

НАО «Медицинский университет Караганды»
АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»

УДК 615.45:547.315:543.544

На правах рукописи

КИШКЕНТАЕВА АНАРКУЛЬ СЕРИКОВНА

**Разработка технологий фармакологически активных субстанций на основе
гроссгемина и их стандартизация**

6D074800 - Технология фармацевтического производства

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
академик НАН РК, д.х.н., профессор
С.М.Адекенов,
Член-корреспондент НАН РК,
доктор химических наук, профессор
Г.А. Атажанова,
PhD, профессор П. Драшар

Республика Казахстан
Караганда, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. СЕСКВИТЕРПЕНОВЫЕ ЛАКТОНЫ: ТЕХНОЛОГИЯ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ	12
1.1 Технологии фармакологически активных сесквитерпеновых лактонов.....	12
1.2 Технология получения сесквитерпенового лактона гроссгемина из растительного сырья.....	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	30
2.1 Материалы исследований.....	30
2.2 Методы исследований.....	31
3 ИЗУЧЕНИЕ РЕСУРСНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ХАРТОЛЕПИСА СРЕДНЕГО	35
4 ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ГРОССГЕМИНА ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ХАРТОЛЕПИСА СРЕДНЕГО	42
4.1 Применение ультразвуковой экстракции растительного сырья хартолеписа среднего для количественного извлечения гроссгемина.....	42
4.2 Подбор оптимальных условий экстракции сырья хартолеписа среднего для количественного извлечения гроссгемина.....	44
4.3 Выделение и очистка гроссгемина из спиртового экстракта хартолеписа среднего.....	45
4.4 Разработка экономичной технологии получения гроссгемина из лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего.....	47
4.5 Исследование показателей качества субстанции гроссгемина, полученной с применением экономичной технологии.....	48
4.6 Разработка опытно-промышленного регламента на производство субстанции гроссгемина.....	53
5 СИНТЕЗ НОВЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ОСНОВЕ ГРОССГЕМИНА	67
5.1 Получение новых модифицированных производных на основе гроссгемина.....	67
5.2 Установление строения полученных производных на основе гроссгемина.....	69
5.3 Изучение биологической активности новых производных на основе гроссгемина.....	72
5.3.1 Цитотоксическая активность новых производных гроссгемина в отношении личинок морских рачков <i>Artemia salina</i> (Leach).....	72

5.3.2	Цитотоксическая активность новых производных гроссгемина в отношении клеток острой моноцитарной лейкемии человека.....	73
5.3.3	Противовоспалительная активность новых производных гроссгемина.....	74
5.3.4	Антимикробная активность новых производных гроссгемина.....	74
5.3.5	Пролиферативная активность новых производных гроссгемина.....	76
5.3.6	Антигельминтная активность новых производных гроссгемина.....	77
5.4	Изучение острой токсичности хлорацетилгроссгемина.....	79
6	РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ ГРОССГЕМИНА.....	81
6.1	Разработка технологии получения субстанции хлорацетилгроссгемина.....	81
6.1.1	Показатели качества и стандартизация субстанции хлорацетилгроссгемина.....	82
6.1.2	Разработка опытно-промышленного регламента на производство субстанции хлорацетилгроссгемина.....	89
6.2	Разработка технологии получения субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина.....	94
6.2.1	Спецификация качества и стандартизация субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина.....	95
6.2.2	Разработка опытно-промышленного регламента на производство субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина.....	102
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	109
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	112
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	119

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие нормативные документы:

- Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011 г. № 407-IV ЗРК;
- ГОСО РК 5.04.034-2011: Государственный общеобязательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. № 1080);
- Правила присуждения ученых степеней от 31 марта 2011 года № 127;
- Межгосударственные стандарты: ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;
- ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.
- ГОСТ 25336-82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
- ГОСТ 8.417-81. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2008. - 592 с;
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2009. – 804 с.
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 3. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2014. – 872 с.
- ОСТ 91500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения;
- СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями и сокращениями:

АО «МНПХ «Фитохимия» - Акционерное общество «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»

АНД – аналитический нормативный документ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВР – вспомогательные работы

г - грамм

ГФ РК – Государственная Фармакопея Республики Казахстан

ГХ – газовая хроматография

д. - дублет

ИК-спектр - инфракрасный спектр

К - коэффициенту распределения

к. - квартет

К_т – контроль технологический

К_х – контроль химический

кв. - квинтет

кг – килограмм

КК - контроль качества

КССВ - константа спин-спинового взаимодействия

КХ – колоночная хроматография

ЛР – лабораторный регламент

ЛС - лекарственное средство

м. - мультиплет

МГц - мегагерц

м.д. – миллионная доля

мкл – микролитр

мл – миллилитр

М_г – молекулярная масса

нм - нанометр

об - оборот

о.с.ч. – особо чистый

ОФС – общая фармакопейная статья

РСА – рентгеноструктурный анализ

с. - синглет

Система FCPC - Fast Centrifugal Partition Chromatograph (быстрый центробежный хроматограф распределения)

см - сантиметр

СО – стандартный образец

т. - триплет

ТП – технологический процесс

т.пл. - температура плавления
УФ–спектр – ультрафиолетовый спектр
Установка HPLC – установка ВЭЖХ
ФС – фармакопейная статья
ФСО – фармакопейный стандартный образец
х.ч. – химически чистый
ЦХР - центробежная хроматография распределения
ч.д.а. – чистый для анализа
ЯМР - ядерный магнитный резонанс
ЯМР-спектроскопия - спектроскопия ядерного магнитного резонанса
ЯМР ¹³C - спектроскопия углеродного магнитного резонанса
ЯМР ¹H (ПМР-спектр) – спектроскопия протонного магнитного резонанса
COLOC - двумерный спектр ЯМР ¹H-¹³C
COSY– COrrrelation SpectroscopY– двумерный спектр ЯМР ¹H-¹H
CRS - стандартное химическое вещество
CPC - Centrifugal Partitioning Chromatography (центробежная хроматография распределения)
GLP - международный стандарт (надлежащая лабораторная практика)
GMP - международный стандарт (надлежащая производственная практика)
ISO - Международная организация по стандартизации, ИСО
LD₅₀ – половинная токсическая доза
μм - микрон

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Работа посвящена совершенствованию технологии извлечения из отечественного лекарственного растительного сырья биологически активного вещества и получению на его основе продуктов с практически ценными свойствами, перспективных для разработки новых лекарственных препаратов.

Актуальность проблемы. Одним из приоритетов развития фармацевтической науки и промышленности Республики Казахстан является поиск подходов для более полного использования собственных ресурсов дикорастущего и культивируемого растительного сырья и создание на его основе оригинальных фитопрепаратов, доступных по ценам, в то же время не уступающих по качеству их конкурентным аналогам.

Перспективным объектом для работ в данном направлении является хартолепис средний (*Chartolepis intermedia* Voiss.), который включен в Государственную фармакопею Республики Казахстан как лекарственное растительное сырье для получения биологически активного сесквитерпенового лактона гроссгемина, обладающего высокой противоопухолевой, противовоспалительной, бактерицидной активностью.

Хартолепис средний является возобновляемым растительным сырьем, который имеет устойчивый эксплуатационный запас, позволяющий получать биологически активный сесквитерпеновый лактон гроссгемин в промышленных масштабах.

Перспективным направлением также является химическая модификация молекулы гроссгемина, которая позволяет получать производные с более высокой биологической активностью или улучшенными физико-химическими свойствами, например, растворимость в воде. Также, данные исследования помогают понять механизм действия того или иного биологически активного вещества в рамках взаимосвязи «структура-активность».

Поэтому совершенствование технологии извлечения биологически активного гроссгемина из растительного сырья хартолеписа среднего, получение на его основе новых соединений с выраженным биологическим действием, с последующим созданием на их основе субстанций для производства оригинальных лекарственных препаратов, является важной и приоритетной задачей.

Цель работы. Разработка энерго- и ресурсосберегающей, экологически безопасной технологии получения гроссгемина из лекарственного сырья хартолеписа среднего, разработка технологий получения новых фармакологически активных субстанций на основе гроссгемина и их стандартизация.

Задачи исследования:

- Исследовать сырьевые запасы на территории Центрального Казахстана и провести оценку качества лекарственного сырья хартолеписа среднего;

- Провести ультразвуковую экстракцию сырья хартолеписа среднего и определить оптимальные условия количественного извлечения гроссгемина из растительного сырья;
- Разработать энерго- и ресурсосберегающую, экологически безопасную технологию получения гроссгемина из хартолеписа среднего;
- Синтезировать новые модифицированные производные на основе гроссгемина, установить строение и исследовать их биологические свойства;
- Разработать технологии получения субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина;
- Разработать нормативную документацию на субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина в виде проектов АНД и опытно-промышленных регламентов на производство.

Объекты исследования: лекарственное сырье: хартолепис средний трава (*Chartolepis intermedia* Boiss.); сумма экстрактивных веществ: водно-спиртовой экстракт хартолеписа среднего, полученный с применением ультразвука, спиртовой экстракт хартолеписа среднего; субстанции: гроссгемина, хлорацетилгроссгемина, гидрохлорида цитизинилгроссгемина; стандартный образец: гроссгемина.

Предмет исследования: оптимальные условия ультразвуковой экстракции хартолеписа среднего для количественного извлечения гроссгемина, технология получения гроссгемина из спиртового экстракта, показатели качества субстанции гроссгемина, синтез, строение и биологическая активность хлорацетилгроссгемина и гидрохлорид цитизинилгроссгемина, технологи получения субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорид цитизинилгроссгемина, нормативная документация на субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорид цитизинилгроссгемина.

Методы исследования: для достижения поставленной цели и решения задач использован комплекс современных физико-химических методов экстракции и анализа: ультразвуковой экстракции, аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), инфракрасная (ИК) и ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), и элементный анализ, температура плавления.

Связь работы с планом государственных научных программ. Диссертационная работа выполнена на базе АО «МНПХ «Фитохимия» в рамках программы НТП Ф.0655 «Новые биологически активные соединения из растений и их синтетические аналоги» на 2014-2016гг.; программы НТП О.0676 «Разработка новых фармакологических соединений – субстанций оригинальных лекарственных препаратов и их стандартных образцов» на 2015-2017 гг.; программы НТП О.0820 «Разработка новых фитопрепаратов и их фармакологические и клинические исследования» на 2018-2020 гг.; грантового проекта №АР05134198 «Изучение биосинтеза терпеноидов в растениях и поиск новых фармакологически активных бимолекулярных соединений» на 2018-2020 гг..

Научная новизна работы:

- исследованы сырьевые запасы на территории Центрального Казахстана и проведена оценка показателей качества лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего на соответствие нормативному документу;
- впервые проведена ультразвуковая экстракция хартолеписа среднего и определены оптимальные условия количественного извлечения гроссгемина из растительного сырья;
- разработана экономичная технология получения субстанции гроссгемина из хартолеписа среднего за счет исключения использования дорогостоящих растворителей на стадиях экстракции и выделения;
- впервые на основе гроссгемина синтезированы хлорацетилгроссгемин и гидрохлорид цитизинилгроссгемина, строение которых установлены на основании ИК-, УФ-, масс-, ЯМР ^1H , ^{13}C -спектров, двумерной спектроскопии ЯМР ^1H - ^1H , ^{13}C - ^1H (COSY, COLOC), данных элементного анализа;
- по результатам исследования биологической активности новых производных гроссгемина установлено, что хлорацетилгроссгемин обладает высокой цитотоксичностью в отношении острой моноцитарной лейкемии, при умеренной токсичности, а гидрохлорид цитизинилгроссгемина в эксперименте *in vivo* проявляет выраженное антигельминтное действие против гельминтов из семейства *Nematodae*;
- разработаны технологии получения субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина;
- разработаны спецификации качества и проведена стандартизация субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина, изучена их стабильность.

Практическая значимость работы:

- установлено, что ежегодный объем заготовки лекарственного сырья хартолеписа среднего в сообществах, произрастающих на территории Центрального Казахстана, составляет от 11,9 до 21,8 ц/га, по внешним признакам, микроскопическим характеристикам, количественному содержанию гроссгемина и результатам товароведческого анализа растительное сырье соответствует нормативному документу;
- применение разработанной технология получения субстанции гроссгемина, путем исключения использования дорогостоящих растворителей на стадиях экстракции и выделения, позволило сократить продолжительность и повысить производительность технологического процесса, и при этом, существенно снизить себестоимость целевого продукта - в 9 раз; проведена оценка качества субстанции гроссгемина, подтверждено ее соответствие нормативному документу; разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции гроссгемина (ОПР-ФД 65005037Р-11-15);
- хлорацетилгроссгемин предложен в качестве субстанции для разработки нового лекарственного средства противоопухолевого действия и рекомендован для расширенных доклинических испытаний;

- гидрохлорид цитизинилгроссгемина предложен в качестве субстанции для создания нового лекарственного средства антигельминтного действия;
- разработаны проекты АНД на субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина;
- разработаны и утверждены опытно-промышленные регламенты на производство субстанции хлорацетилгроссгемина (ОПР-ФД65005037Р-12-17) и субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина (ОПР-ФД65005037Р-13-17);
- на базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» организовано опытное производство субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина.

Обоснованность и достоверность. Экспериментальные работы выполнены с применением современного, поверенного оборудования, позволяющего получать достоверные и надежные результаты.

Основные положения, выносимые на защиту:

- ежегодный объем заготовки на территории Центрального Казахстана и показатели качества лекарственного сырья хартолеписа среднего;
- оптимальные условия ультразвуковой экстракции сырья хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), обеспечивающие количественное извлечение гроссгемина;
- технология получения гроссгемина из спиртового экстракта, показатели качества субстанции гроссгемина;
- синтез, физико-химические показатели, спектральные данные и биологическая активность хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина;
- технологии получения субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина;
- нормативные документы на субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина в виде проектов АНД и опытно-промышленных регламентов;
- организация выпуска опытных партий субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина.

Личный вклад автора заключается в исследованиях, выполненных лично соискателем и включенных в диссертацию: в разработке технологии извлечения гроссгемина из хартолеписа среднего; в синтезе, установлении строения и исследовании биологических свойств хлорацетилгроссгемина и гидрохлорид цитизинилгроссгемина; в разработке оптимальных способов и технологий получения субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорид цитизинилгроссгемина; в разработке нормативной документации на субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорид цитизинилгроссгемина в виде проектов АНД и опытно-промышленных регламентов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены на: X International symposium on the chemistry of natural compounds» (Tashkent, 21-23 ноября 2013); VI Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья»

(Барнаул, 22-24 апреля 2014); 22nd Conference on Isoprenoids (Prague, 7-10 сентября 2014); 6-th Russian-Korean Conference «Current Issues of Biologically Active Compound Chemistry and Biotechnology (Novosibirsk, 5-10 июля 2015); The International Scientific and Practice Conference (Achievements and prospects for the Development of Phytochemistry) (Karaganda, 10-11 апреля 2015); 11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Antalya, 1-4 октября 2015); 24th Conference on Isoprenoids (Bialystok, 9-12 сентября 2018).

Публикации. По материалам диссертации получен 1 патент РК, получено 1 положительное решение на выдачу патента РК. Основные положения диссертации отражены в следующих публикациях:

- 4 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан;
- 7 статей в зарубежных научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus;
- тезисы 7 докладов, из них тезисы 3 докладов на международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, включает 15 рисунков и 25 таблицы; состоит из введения, 6 глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Список литературы включает 85 литературных источников.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. СЕСКВИТЕРПЕНОВЫЕ ЛАКТОНЫ: ТЕХНОЛОГИЯ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Технологии фармакологически активных сесквитерпеновых лактонов

Сесквитерпеновые лактоны – многочисленная группа класса природных терпеноидов, содержащиеся, в основном, в растениях семейства *Asteraceae* и проявляющие противоопухолевую, антималярийную, антивирусную, иммуностимулирующую, противогрибковую, антимикробную, противовоспалительную, антимуtagenную, ростстимулирующую, антифидантную активности [1-10]. И поэтому поиск новых соединений с широким спектром фармакологического действия в данном ряду открывает возможности для создания эффективных и принципиально новых лекарственных препаратов.

К сожалению, на сегодняшний день лекарственных препаратов на основе сесквитерпеновых лактонов, выпускаемых фармацевтическими компаниями, незначительное количество. Сложность внедрения технологии фармакологически активных сесквитерпеновых лактонов фармакологическое производство связана с несовершенством способов выделения их из растительного сырья, очистки и разделения из полученных экстрактов.

Технологии производства используемых в медицинской практике в течение многих лет препаратов «Сантонин», «Алантон» на основе сесквитерпеновых лактонов являются многостадийными, трудозатратными, требующими использования большого количества токсичных органических растворителей, применение которых не допускается международными стандартами GMP.

Первым сесквитерпеновым γ -лактоном, получившим медицинское применение, как оригинальный антигельминтный препарат, является α -сантонин (1).

Организация фармацевтического завода в Южном Казахстане была связано, прежде всего, с сырьевой базой сантонина (1), а именно наличием промышленных запасов полыни цитварной (*Artemisia cina* Berg.).

Технологический процесс получения сантонина (1) состоит из 5 стадий [10].

На первой стадии цветочные корзинки полыни цитварной замачивают в воде и смешивают с известью, содержащей не менее 60% окиси кальция. α -Сантонин растворяется в растворе щелочи с раскрытием лактонного кольца, образуя соль сантониновой кислоты.

На второй стадии производится семикратное выщелачивание кальциевой соли сантониновой кислоты водой. Содержание α -сантонина в вытяжке колеблется в пределах 0,7-1,4 %.

На третьей стадии по окончании экстракции и слива вытяжки в экстрактор пускают острый пар и отгоняют эфирное масло с водяным паром. Полученное масло отстаивают и высушивают над сульфатом натрия. По окончании отгонки эфирного масла экстрактор разгружают. Выход α -сантонина на стадии

извлечения составляет 95%.

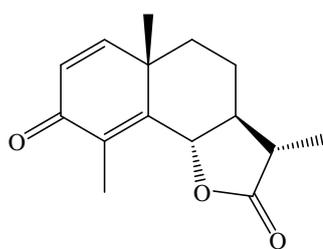
На четвертой стадии концентрированную вытяжку, содержащую кальциевую соль сантониновой кислоты, смолы и другие экстрактивные вещества, подкисляют азотной кислотой. При этом образуется нитрат кальция и сантониновая кислота, которая медленно превращается в α -сантонин. α -Сантонин - сырец десятикратно промывают водой до нейтральной реакции, затем отжимают на центрифуге, переносят в сушильный шкаф и сушат при температуре 66-68°C. Выход на этой стадии около 80 %.

Пятой стадией производства является очистка технического α -сантонина многократной кристаллизацией из этилового спирта и последующей очисткой на специально сконструированном фильтрующем аппарате. Из кристаллизаторов α -сантонин переносят на центрифугу, где отжимают и промывают дистиллированной водой. Выход чистого α -сантонина на данной стадии составляет 80-84 %. Общий выход α -сантонина зависит от содержания целевого вещества в исходном сырье, а также от количества проведенных перекристаллизаций.

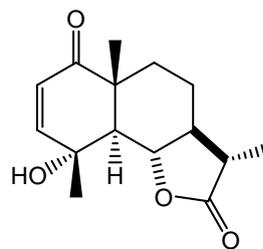
Таким образом, технология производства сесквитерпенового лактона α -сантонина является трудозатратными, использующий многократный процесс при выделении. В связи с созданием сравнительных эффективных антигельминтных препаратов α -сантонин был снят с производства.

Другим сесквитерпеновым γ -лактоном, нашедшим применение в практической медицине в качестве кардиотонического средства, стал эвдесманолид тауремизин (2) [11].

Рыбалко К.С. с соавторами [11] предложили способ получения тауремизина (2) из полыни таврической (*Artemisia taurica* Willd.).



(1)



(2)

Измельченное воздушно-сухое сырье полыни таврической экстрагируют горячей водой при температуре 75-80 °С в течении 30 мин. Далее водное извлечение обрабатывают хлороформом, затем объединяют и упаривают. К полученной густой темно-коричневой кристаллизующейся массе прибавляют серный эфир до прекращения выпадения осадка. Осадок растворяют в хлороформе, дважды промывают 5%-ным раствором $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ для отделения смолистых веществ кислотного характера и дважды водой. Хлороформ отгоняют, остаток растворяют в спирте, прибавляют активированный уголь, кипятят 5 мин и фильтруют. После охлаждения кристаллы отсасывают и вторично перекристаллизовывают из спирта. Выход

тауремизина 0,2% в расчете на воздушно-сухое сырье.

Препарат «Алантон», содержащий в своем составе не менее 95% суммы сесквитерпеновые лактоны алантолактона (3) и изоалантолактона (4) из девясила высокого (*Inula helenium* L.), применяется при лечении язвенной болезни [12].

Сесквитерпеновые лактоны (3, 4) обычно из растительного сырья выделяют экстракцией различными органическими растворителями – 85 %-ным этиловым спиртом [12], ацетоном [13], хлороформом, бензолом, петролейным эфиром [14], смесью этанола и гексана (1:4) [15], а также предложено использовать ультразвук при обработке корней экстрагентом [14, 16]. При разделении их широко используют колоночную хроматографию на Al_2O_3 , на силикагеле и на силикагеле дополнительно обработанном 15 %-ным $AgNO_3$ [14].

Однако, по стандартам GMP запрещается использование токсичных растворителей – хлороформа, бензола и др.

Производство субстанции «Алантон» из сухих измельченных корней и корневищ девясила высокого (*Inula helenium* L.) осуществляется следующим образом [12]:

- проводят экстракцию методом перколяции 85 % этиловым спиртом (соотношение – сырье:экстрагент 1:10)

- полученный экстракт упаривают под вакуумом, затем объединяют водные остатки. Из водного остатка извлекают терпеноидную фракцию хлористым метиленом. Хлористометиленовые вытяжки сливают, объединяют, обезвоживают прокалённым сульфатом натрия в течение 5-6 ч, фильтруют и упаривают до 1/4 от первоначального объема;

- очистка полученного раствора проводится методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия. Элюирование осуществляют хлористым метиленом, полученный элюат упаривают до полной отгонки растворителя. Остаток представляет собой густую массу тёмно-жёлтого цвета;

- на заключительном этапе получения алантона к остатку добавляют 10-кратное количество этилового спирта (96%), перемешивают охлаждают до 0-5 °С и выдерживают сутки до полного осаждения. Отфильтровывают и на фильтре промывают четырёхкратным количеством бензина, охлаждённого до 0-5 °С. Осадок сушат в течение 10-12 ч. Высушенный алантон измельчают в шаровой мельнице, просеивают и фасуют. Выход алантона составляет 1,3 % в пересчете на воздушно-сухое сырье. Содержание сесквитерпеновых лактонов в препарате должно быть не ниже 95%. Недостатком этого способа является его длительность и низкий выход целевого продукта.

Бабаевым Н.Ф. и Серкеревым С.В. [15] предложен альтернативный способ производства субстанции «Алантон». Технология получения суммы сесквитерпеновых лактонов алантолактона (3) и изоалантолактона (4) из растительного сырья по данному методу осуществляется путем 2-х кратного экстрагирования корней и корневищ девясила высокого смесью этанола и гексана (1:4) при кипячении с обратным холодильником, массовое соотношение корней и корневищ с экстрагентом (1:5) в течение 3 ч. Полученные экстракты объединяют, отфильтровывают от механических примесей, при этом выпадает

осадок. Максимальное выпадение кристаллов сесквитерпеновых лактонов достигается в течение 24 ч при комнатной температуре. Желтоватые кристаллы очищенной суммы сесквитерпеновых лактонов алантолактона (3) и изоалантолактона (4), находящихся в количественном соотношении 2:1, с температурой плавления 86-88 °С. При применении данного способа сокращается время по выделению лактонов с 192 часов до 58 ч, а выход увеличивается до 1,7-1,9 %.

Плехановой Н.В. с соавторами [13] предложен способ получения алантолактона (3) из корней девясила большого, который включает стадии:

- экстрагирования ацетоном в течение 4 часов при комнатной температуре (соотношение – сырье:экстрагент 1:5);
- упаривания экстракта до густой массы;
- обработки полученного густого экстракта смесью петролейный эфир:бензол (7:2.8) при соотношении суммы экстрактивных веществ и смеси (9:1). Смесь растворителей отгоняют до 40% объема, кристаллы отделяют. Выход алантолактона (3) из девясила большого при этом составляет 1,12%.

Таким образом, предложенный способ получения алантолактона (3) из девясила большого имеет следующие преимущества: упрощение технологического процесса в несколько раз и исключение ряда операции (отгонка с водяном паром, действие горячей кислоты и щелочи).

Недостатком предложенного метода является использование легковоспламеняющихся растворителей ацетона и петролейного эфира, а также токсичного бензола.

Разработана технология получения стандартного образца алантолактона (3), включающая в себя следующие стадии: извлечение эфирного масла из корневищ и корней девясила высокого перегонкой с водяным паром с одновременной экстракцией в хлороформе; выделение суммы сесквитерпеновых лактонов методом колоночной хроматографии на силикагеле (элюент-смесь петролейный эфир-этилацетат 9:1) [17].

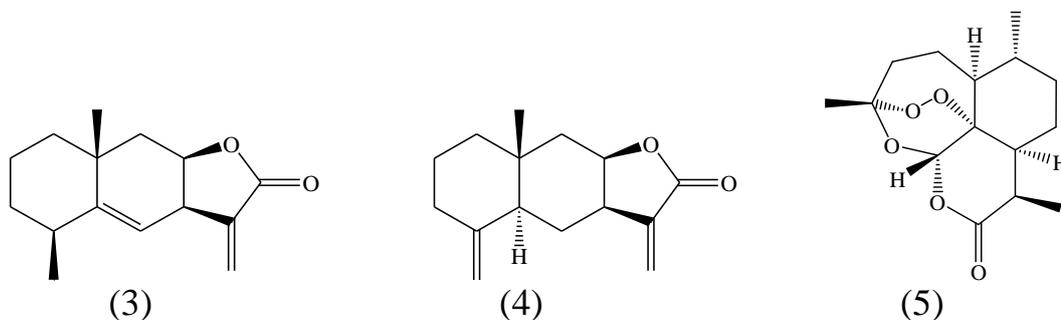
Трендафилова А. с авторами [16] провели химическое изучение корней *Inula helenium* L. спиртового экстракта с применением ультразвуковой обработкой. По результатам проведенных экспериментов установлены оптимальные параметры для количественного выхода алантолактона (3) и изоалантолактона (4). В качестве экстрагента использовали 70%-ный этиловый спирт, время ультразвуковой обработки 30 мин, температура экстракции 25 °С. В результате из экстракта *Inula helenium* L. выделены алантолактон (3) и изоалантолактон (4) с выходом 18,04 и 12,77 мг/г соответственно.

В Харьковском опытном заводе ГНЦЛС (Украина) технология получения «Алантон» включает экстракцию сырья корни и корневища девясила высокого (*Inula helenium* L.) бензином и настаивается сутки при периодическом перемешивании. Затем бензиновый экстракт (первый слив) перекачивается в емкость, а сырье повторно заливается свежим растворителем и снова настаивается, затем экстракт (второй слив) объединяется с предыдущим. Эту операцию извлечения проводят, как правило, трижды. Затем растворитель

отгоняют, а оставшийся упаренный экстракт (кубовый концентрат) растворяют в 4,5-кратном объеме 95% спирта, обрабатывают активированным углем и фильтруют. После фильтрации спиртовой маточник упаривают на половину объема и кристаллизуют алантон (3, 4) при температуре 8-10°C. Препарат сушат на воздухе и затем промывают холодным бензином для удаления примесей желтого цвета и получают кристаллическую субстанцию белого или белого с желтоватым оттенком цвета [18].

Резюмируя литературные данные по методам выделения алантолактона и изоалантолактона из корней *Inula helenium* L. можно отметить, что преимущественным способом является спиртовая экстракция с применением ультразвуковой обработки, позволяющая отказаться от использования дорогостоящих органических растворителей.

Одним из широко изучаемых препаратов в ряде мировых научных центров является разработанный китайскими учеными противомаларийный препарат «Хингаосу» на основе сесквитерпенового лактона артемизинина (5), выделенного из полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) [19].



Martinez-Correa H.A. et al. [20] проводилась экстракция надземной части *Artemisia annua* L. двумя способами. В первом случае использовались различные растворители: жидкий диоксид углерода CO₂ (40 МПа /60 °С), этанол (25 °С) и вода (60 °С). Во втором случае проводилась двухстадийная экстракция, следующим образом: сначала экстрагировали жидким диоксидом углерода CO₂ (40 МПа, 60 °С), а затем во второй ступени экстрагировали с использованием либо этанола 25 °С или воды 60 °С при атмосферном давлении (Рис.1). Этанольные экстракты получены следующим путем: 3 г сырья растворяют в 10 мл этаноле при температуре 25 °С в течение 42 часов и перемешивают в шейкере. Затем смесь фильтруют и снова экстрагируют в 10 мл этаноле на центрифуге при 5000 об/мин, 25 °С в течение 5 мин. Водные экстракты получают следующими способами: 3 г сырья растворяют в 60 мл воде. Смесь перемешивают в течение 10 мин при 60 °С, затем на центрифуге в течение 10 мин при 10000 об / мин. После вакуумной фильтрации получают экстракт. Для сверхкритического процесса использовано 7 г сырья, экстракция проведена в следующих параметрах при 40 МПа, 60 °С и 4 × 10⁻⁵ кг/с CO₂. Были получены две фракции сверхкритического экстракта: фракция экстракта и неполярная фракция. Содержание артемизинина (5) в экстрактах и сырье *Artemisia annua* L. приведено в таблице 1.



Рисунок 1 - Схема процесса экстракции сырья *Artemisia annua* L.

Таблица 1 - Содержание артемизинина в экстрактах и сырье *Artemisia annua* L.

Образцы		Артемизинин	
		Содержание (мг/г в экстракте)	Содержание (мг/г в сырье)
Одностадийная экстракция	CO ₂ – экстракт	95.1	5.47
	CO ₂ –экстракт + неполярная фракция	-	-
	Водный экстракт (В)	Не обнаружен	-
	Спиртовой экстракт (Е)	95.6	5.49
Двухстадийная экстракция	CO ₂ –экстракт + вода	Не обнаружен	-
	CO ₂ –экстракт + этанол	Не обнаружен	-

Как видно из приведенных данных в таблице 1, выход артемизинина сопоставим в полученных CO₂ –, спиртовом экстрактах.

В работе [20] приводятся сравнительные данные по извлечению артемизинина из полыни однолетней методом мацерации, ультразвуковой, сверхкритической и микроволновой экстракции диоксидом углерода (таблица 2).

Как видно из приведенных данных в таблице 2, сравнительный количественный выход артемизинина наблюдается при экстракции гексаном (в аппарате Сокслете) и жидким диоксидом углерода (CO₂).

Авторами [27] доказано, что ультразвуковая экстракция сырья *Artemisia annua* L. гексаном при следующих параметрах: 40 кГц, 25 °С, 60 мин, позволяет получить более высокий (на 58% выше, по данным ВЭЖХ-анализа) выход артемизинина (5) по сравнению с обычным замачиванием в тех же условиях. При этом, наблюдается снижение содержания артемизинина при увеличении продолжительности времени до 120 мин.

Таблица 2 - Содержание артемизинина в сырье *Artemisia annua* L.

Тип экстракции	Экстрагенты	Условия экстракции	Выход артемизинина (мг/г в сырье)	Литературный источник
В аппарате Сокслета	Гексан	-	9.7 и 7.7	21
	<i>n</i> -гексан, петролейный эфир, вода, метанол, этилацетат, <i>n</i> -гексан и этанол	60-80 °С, 2-20 ч.	6.0-6.2 1-12	22-24
Сверхкритическая экстракция	СО ₂	300 бар, 50 °С	7	22
	СО ₂	150 бар, 30 °С	6.2	22
	СО ₂	17.3-31.1 МПа/ 40-60 °С	2.1-6.7	21
	СО ₂	100 бар, 40 °С	9.5	25
	СО ₂ -этанол (16.25%)	17.3- 31.3 МПа /40-60 °С	7.8-11.5	24
	СО ₂ -этанол (1, 3, 5%)	150 бар, 50 °С	8	26
	СО ₂ -этанол (20%)	31.3 МПа, 50 °С	6.7	21
	СО ₂ - <i>n</i> -гексан (16.25%)	7.0-20.8 МПа/30-50 °С	1.4-8.8	21
	СО ₂ - метанол (1, 3, 5 и 10%)	150 бар, 50 °С	6	26
	СО ₂ - толуол (1, 3, 5 и 10%)	150 бар, 50 °С	6.5	26
	СО ₂ - метанол-вода (1, 3 и 5%)	150 бар, 50 °С	7	26
Ультразвуковая экстракция	Гексан	25-45 °С /15-120 мин.	Не выделен*	27
	Петролейный эфир	30-60 °С /120-300 W	4.2-7.4	28
Микроволновая экстракция	Циклогексан, <i>n</i> -гексан, петролейный эфир, этилацетат, хлороформ, ацетон, метанол, ацетонитрил	160 W, 60 сек.	1.8-6.6	23
*Примечание - содержание артемизинина определено по данным ВЭЖХ.				

Авторами [29] разработан способ получения артемизинина (5) без колоночной хроматографии, для этого проводят ультразвуковую экстракцию сырья полыни однолетней этиловым спиртом. Экстракцию проводили на ультразвуковом экстракторе компании China Ningbo Zhenguo Pharmaceutical Equipment Manufacturing Co. модель TCLX200, по следующей технологии: сухое, измельченное, до размеров 60-80 меш., сырье помещают в ультразвуковой экстрактор, заливают 80 % этиловым спиртом (гидромодуль 1:17) и экстрагируют при частоте излучения 35 кГц, мощности 1000 Вт, температуре 40 °С в течение 30 минут. Полученный экстракт фильтруют, к фильтрату приливают петролейный эфир в соотношении 5:1 и обрабатывают ультразвуком при частоте излучения 30 кГц, мощности 1000 Вт, температуре 25 °С в течение 15 минут.

Эфирный слой отделяют, пропускают через колонку, заполненную активированным углем и концентрируют при пониженном давлении, концентрат сливают в кристаллизатор. Выпавшие кристаллы артемизинина перекристаллизовывают из 80 % этилового спирта. Степень извлечения артемизинина из сырья по такому способу составляет 97,25%.

В доступной патентной и научно-технической литературе приведены различные способы выделения артемизинина из *Artemisia annua* L.

Ряд компании [30-33] разработали несколько способов по извлечению артемизинина из сырья полыни однолетней с использованием органических растворителей, такие как: гексан, смеси этилацетата:экстракционного масляного растворителя №6 (Number 6 Extraction Solvent Oil) и петролейного эфира:бензина под вакуумом, а другие компании Китая, Италии и исследователи из Германии [34-40] использовали в качестве экстрагента сжатые газы: бутан, CO₂-газ, сверхкритический диоксид углерода и вода, сверхкритический диоксид углерода в сочетании с микроволновой экстракцией, а также, сверхкритический диоксид углерода с модификатором (этиловый спирт). Ученые из Yunnan Normal University предложили способ получения артемизинина без экстракции [41]. Компания Sanofi (Франция) разработала более длительный способ получения артемизинина полусинтетическим путем из дигидроартемизининовой кислоты [42].

Основными производителями артемизинина являются: в Китае «Novanat Bioresource Co Ltd», «Guilin Pharmaceutical Co Ltd», «Chongqing Kerui Pharmaceutical Ltd», «Shanghai Natural Bio-Engineering Co Ltd»; в Вьетнаме «Vedic Fanxipang Pharma Chemic Co Ltd», «Mediplantex National Pharmaceutical Ltd», «Saokim Pharma»; в Кении «Botanical Extracts EPZ Ltd», в Мадагаскаре «Bionexx», во Франции «Sanofi Aventis», в Индии «Ajanta Pharma Ltd», «Calyx Chemical and Pharmaceuticals Ltd» [19].

Таким образом, для производства артемизинина из полыни однолетней используют различные эффективные методы, в частности, использование экстракции сверхкритическим диоксидом углерода, в сочетании с микроволновой обработкой 70%-ного этанола, а также без применения колоночной хроматографии целевого вещества сверхкритическим диоксидом углерода с последующей перекристаллизацией его из горячего 75%-ного этанола.

На основе сесквитерпенового лактона арглабина (6) в Международном научно-производственном холдинге «Фитохимия» разработан оригинальный лекарственный препарат "Арглабин" и выпускаемый в настоящее время Карагандинским фармацевтическим заводом. Способ получения "Арглабина" запатентован в 11 странах мира, а именно Японии, Китае, США, Великобритании, Германии, Швейцарии, Франции, Австрии, Италии, Нидерландах и Швеции [43].

В МНПХ «Фитохимия» разработана эффективная и экологически безопасная технология выделения и очистки сесквитерпенового лактона арглабина из полыни гладкой в соответствии с требованиями GMP.

Экспериментально установлено, что способ выделения арглабина из углекислотного экстракта полыни гладкой с применением центробежной хроматографии распределения является оптимальным для препаративной наработки и внедрения в производство субстанции на его основе.

При этом, определены оптимальные параметры режима экстракции сырья полыни гладкой с использованием CO₂-газа в сверхкритическом состоянии, обеспечивающие количественный выход арглабина (6).

Применение сверхкритической углекислотной экстракции травы полыни гладкой для извлечения арглабина имеет значительные преимущества по сравнению с хлороформной экстракцией (таблица 3).

Таблица 3 - Сравнительные характеристики методов извлечения арглабина из травы полыни гладкой

Метод экстракции	Выход экстракта и количественное содержание арглабина						
	полнота извлечения арглабина, %	выход экстракта		содержание арглабина в экстракте		остаточное содержание арглабина в шроте	
		г	%	г	%	г	%
Углекислотная	92,4	45,6	4,6	13,8	30,2	0,08	0,09
Хлороформная	78,0	150,0	15,0	11,6	7,8	2,28	0,26

Для повышения производительности, автоматизации, сокращения продолжительности технологического процесса и исключения токсичных растворителей разработана технология получения субстанции арглабина нативного (6), с применением центробежной хроматографии распределения [44].

Изначально выделение арглабина из CO₂-экстракта полыни гладкой проводили с применением центробежной хроматографии распределения в два этапа:

1 Очистка с применением ускоренной центробежной хроматографии распределения FCPC-5000.

2 Перекристаллизация технического арглабина.

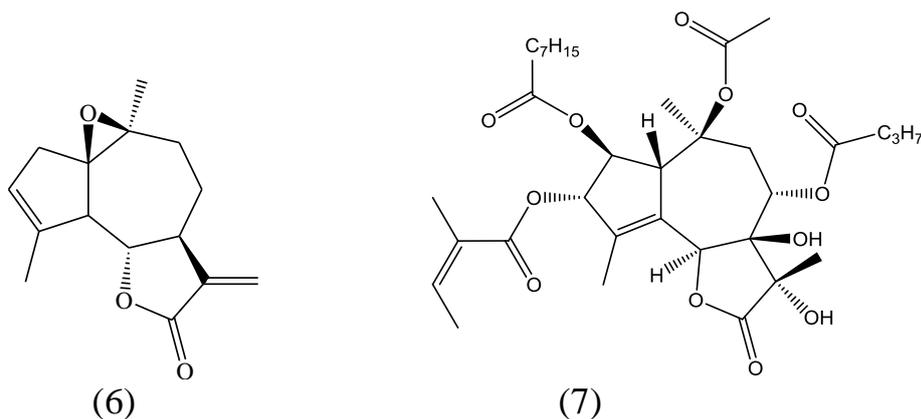
Экспериментально установлено, что способ выделения арглабина из CO₂-экстракта полыни гладкой с применением центробежной хроматографии распределения по сравнению с колоночной хроматографией, характеризуется лучшей производительностью, полной автоматизацией, сокращением продолжительности процесса. В данном способе не требуется применения сорбентов и высокочистых растворителей. Таким образом, разработанная технология позволила обеспечить выход арглабина из CO₂-экстракта до 30% и более 2% из растительного сырья с чистотой целевого вещества не менее 99,0%.

Разработанная технология выделения и очистки сесквитерпенового лактона арглабина внедрена Карагандинском фармацевтическом заводе для производства оригинального лекарственного препарата «Арглабин».

Тапсигаргин (7) – сесквитерпеновый лактон из *Thapsia garganica* L. [1, 48],

возрастающий интерес к нему возник с открытием его способности подавлять выведение кальция из АТФазы саркоэндоплазматического ретикулума (SERCA). Подавление данного процесса создает высокую концентрацию кальция в цитозоле, что приводит к апоптозу клеток. Были получены несколько аналогов тапсигаргина и разработано пролекарство – пептид тапсигаргина, который проходит в настоящее время клинические исследования в качестве противоопухолевого средства.

Выделение и очистка тапсигаргина проводится как с использованием классических, так и современных методов экстракции и хроматографической очистки.



Профессор Appendino G. с соавторами [46] выделяли сесквитерпеновый лактон тапсигаргин из корней *Thapsia garganica* L. следующим образом: измельченные в порошок корни трехкратно экстрагировали ацетоном, экстракты объединяли и упаривали. Густой экстракт хроматографировали на колонке с силикагелем смесью петролейный эфир-этилацетат (7:3), при этом получали тапсигаргин с выходом 1,3% в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Авторизированную систему производства тапсигаргина из ацетонового экстракта надземной части *Thapsia garganica* L. - с применением экстрактора Speed-Extractor E-914 и центробежной хроматографии распределения разработали авторы [47]. Нарработку тапсигаргина проводят двумя способами, отличающейся стадией экстракции, по следующей схеме:

а) Экстракция методом мацерации: воздушно-сухое сырье двукратно экстрагируют ацетоном при комнатной температуре, в течение 12 часов. Полученные экстракты объединяют и упаривают. Выход экстракта 2,46 % в пересчете на воздушно-сухое сырье.

б) Воздушно-сухое сырье двукратно экстрагируют ацетоном в ускоренном экстракторе E-914 в течение 20 минут, при давлении 10 МПа. Полученный экстракт упаривают. Выход экстракта 2,64 %.

Разделение экстрактов проводят методом жидкость-жидкостной хроматографии, для этого образец экстракта растворяют в смеси подвижной и стационарной фаз (1:1, концентрация 0,25 г/мл). Разделение проводят в системе растворителей состоящей, из циклогексан-этилацетат-метанол-вода (19:1:15:5), нисходящим методом, при следующих параметрах: скорость элюирования от 5 до 13 мл/мин, скорость вращения ротора от 1600 до 1000 об/мин. При разделении

экстракта, полученного методом мацерации выделяют тапсигаргин с выходом 1,67% в пересчете на воздушно-сухое сырье. Разделением экстракта, полученного с использованием ускоренного экстрактора получают тапсигаргин с выходом 1,46% в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Таким образом, в выделении и очистке сесквитерпенового лактона тапсигаргина преобладают способы с применением классических методов экстракции и хроматографического разделения, пока еще не обеспечивающие количественный выход целевого соединения.

В большинстве способов для выделения сесквитерпеновых лактонов из растительных экстрактов используют традиционную колоночную хроматографию на силикагеле, с последующей рехроматографией полученных фракций с применением препаративной высокоэффективной жидкостной, что удорожает себестоимость получаемой субстанции.

По проведенному анализу литературных сведений можно сделать вывод о том, что, кроме большой привлекательности и эффективности методов сверхкритической флюидной, микроволновой и ультразвуковой экстракции, их внедрение позволяет существенно удешевить процесс производства сесквитерпеновых лактонов.

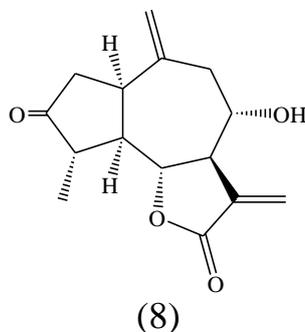
Таким образом, применение инновационных методов для выделения и очистки сесквитерпеновых лактонов, таких как сверхкритическая флюидная экстракция, ультразвуковая экстракция, жидкость-жидкостная хроматография позволяют упрощать технологические процессы, сократить производственные издержки, тем самым повышая производительность труда и снижая себестоимость оригинального лекарственного препарата.

1.2 Технология получения сесквитерпенового лактона гроссгемина из растительного сырья

Сесквитерпеновый лактон гроссгемин (8) выделен из растений разных родов семейства *Asteraceae*: *Grossheimia macrocephala* (Muss.-Pushk.) Sosn. et Takht. [49-51], *Grossheimia ossica* (C. Koch.) Sosn. et Takht. [52], *Venidium decurrens* Less. (синоним *Arctotis arctotoides* (L.f.) O.Hoffm.) [53], *Centaurea ruthenica* Gam. [54], *Centaurea scabiosa* L., *Centaurea pseudomaculosa* (Dobrocz.) [55], *Amberboa lippii* DC. (синонимы *Centaurea lippii* L., *Volutarella lippii* (L.) Cass.), *Volutarella lippii* (L.) Cass. [56], *Centaurea behen* L. [57], *Centaurea ornata* Willd. [58], *Centaurea helenioides* Boiss. [59], *Chartolepis intermedia* Boiss. [54, 60-63], *Chartolepis pterocaula* (Trautv.) Czer. [62], *Cynara scolymus* L. [51], *Cynara cardunculus* L. [65], *Youngia japonica* (L.) DC [66], а также анализируя более подробно работ Nowak G., 1986 и Bruno M., 2013 [64, 67], выявлено, что гроссгемина не обнаружен в видах *Chartolepis glastifolia* (L.) Cass. и *Chartolepis biebersteinii* Jaub. et Spach., что подтверждается данными самого автора в работе Nowak G., 1992 [68].

Рыбалко К.С. и др. [49] 1 кг воздушно-сухих листьев гроссгеймии крупноголовой (*Grossheimia macrocephala* (Muss.-Puschk) D. Sosn et Takht.) три раза экстрагируют водой (при 75-80°C) по 30 мин каждый раз. Водный экстракт

после охлаждения взбалтывают с хлороформом три раза, хлороформ отгоняют, полученную густую смолку растирают с небольшим количеством спирта. К спиртовому раствору прибавляют эфир до помутнения. Выпавшие кристаллы гроссгемина отфильтровывают, промывают эфиром и три раза перекристаллизовывают из спирта. Выход гроссгемина 0.05 % (на воздушно-сухое сырье).



Barbetti P. и др. [50] проводят экстракцию методом перколяции на 8 кг воздушно-сухое сырье *Grosheimia macrocephala* с ацетоном. Получают 240 г густой экстракт. Затем густого экстракта растворяют в метанол-воде (1:1), далее экстрагируют с н-гексаном. Гексановая часть отделяют. Далее фазу MeOH-H₂O экстрагируют с хлороформом. Хлороформный экстракт разделяют методом колоночной хроматографии на силикагеле. В качестве элюента используют CHCl₃-MeOH (20%). Выход гроссгемина 0.125 % (на воздушно-сухое сырье).

Авторами [52] из водного экстракта надземной части *Grossheimia ossica* (C. Koch.) Sosn. et Takht. произрастающего на территории Грузии выделен сесквитерпеновый лактон гроссгемин.

Авторы [54] сесквитерпенового лактона гроссгемина получают двумя методами. Метод А: 1.2 кг листьев и цветочных корзинок растения василька русского (*Centaurea ruthenica* Gam.), собранных в фазу цветения, настаивают в горячей воде (80-84 °С) 3 раза по 1 ч. Водное извлечение 3 раза обрабатывают хлороформом. Из хлороформного извлечения отгоняют хлороформ, получают густую, темную массу (смолка, 15 г), которую хроматографируют на колонке с окисью алюминия (IV степень активности) при соотношении 1:10, затем при элюировании смесью четыреххлористого углерода и бензола (1:1). После двухкратной перекристаллизации из спирта получают 0.012 г. Выход гроссгемина в пересчете на воздушно-сухое сырье составляет 0.001%.

Метод Б: 2.1 кг листьев и цветочных корзинок василька русского (*Centaurea ruthenica* Gam.) исчерпывающе экстрагируют хлороформом, после упаривания получают 121.8 г смолки, которую обрабатывают 60% спиртом, водно-спиртовую часть экстрагируют хлороформом. После обработки аналогичной описанной выше, получили 1.6 г гроссгемина. Выход гроссгемина в пересчете на воздушно-сухое сырье составляет 0.076%.

Авторы [55] измельченное воздушно-сухое листья, цветки и стебли василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.) или василька ложнопятнистого (*Centaurea pseudomaculosa* (Dobroc.)), собранного в фазу цветения, заливают

водой очищенной и экстрагируют при температуре 80°C в течение 1,5 часов при соотношении сырья экстрагент 1:20, затем охлаждают до комнатной температуры, отделяют полученный экстракт от сырья путем процеживания. Отделенный экстракт очищают от механических включений путем фильтрования. Далее сырье повторно заливают водой очищенной и экстрагируют при температуре 80°C в течение 1,5 часов при соотношении сырья экстрагент 1:20, затем охлаждают до комнатной температуры, отделяют полученный экстракт от сырья путем процеживания. Отделенный экстракт очищают от механических включений путем фильтрования. Полученные экстракты объединяют и концентрируют при пониженном давлении до минимального объема. Сконцентрированное водное извлечение подвергают жидко-фазной экстракции хлороформом при соотношении водное извлечение-хлороформ 1:1. Полученное хлороформное извлечение отделяют от водного остатка. Водный остаток повторно обрабатывают хлороформом путем жидко-фазной экстракции при соотношении водный остаток-хлороформ 1:1. Полученное хлороформное извлечение отделяют от водного остатка. Хлороформные извлечения объединяют и органический растворитель удаляют при пониженном давлении. Сконцентрированную хлороформную фракцию высушивают до постоянной массы. Затем хлороформную фракцию хроматографируют на колонке с силикагелем при соотношении фракция-сорбент 1:30. Последовательно элюируют петролейным эфиром (фракция с т. кип. 40-70°C), смесью петролейный эфир-этилацетат (9:1; 8,5:1,5; 8:2). Фракции собирают по 100 мл. При упаривании фракций, элюированных смесью петролейный эфир-этилацетат 8:2, образуются кристаллы гроссгемина (3-оксо-8-гидрокси-1,5,7 α ,4,8 β (H)-гвай-10(14),11(13)-диен-12,6-олида), которые промывают петролейным эфиром и перекристаллизовывают этиловым спиртом. Выход целевого продукта в пересчете на воздушно-сухое сырье составляет 0,01%.

Мелкоизмельченное сырье *Amberbao lippii* D.C. экстрагируют горячим бензолом. Жидкий экстракт концентрируют до сиропообразной консистенции. Густой экстракт растворяют в этиловом спирте и воде при соотношении 1:2. Полученный раствор подкисляют уксусной кислотой и добавляют ацетата свинца. Оставляют на ночь. Следующий день отфильтровывают, фильтрат тщательно промывают петролейным эфиром, затем экстрагируют этилацетатом. Этилацетатную фракцию сгущают на роторном испарителе. Полученный густой экстракт хроматографируют на колонке с силикагелем. При элюировании колонки бензолом выделяют гроссгемин [56].

Rustaiyan A. и соавторы [57] свежее растительное сырье *Centaurea behen* L. собранный около Тегерана экстрагируют хлороформом. Полученные полярные фракции хроматографируют на силикагеле элюируя диэтиловым эфиром и смесью диэтиловый эфир-метанол (в соотношении 20:1), в результате получают смесь веществ. Гроссгемин выделяют из смеси с помощью ВЭЖХ с обращенно-фазовым сорбентом RP2 и системой растворителей метанол-вода (соотношение 7:3).

Воздушно-сухое цветки *Centaurea helenioides* Boiss. экстрагируют хлороформом при комнатной температуре в два раза. Жидкий экстракт отфильтруют и сгущают под вакуумом при температуре 30-35 °С. Затем густой экстракт хроматографируют на силикагеле и элюируя *n*-гексан-хлороформ (с увеличением полярности последнего), хлороформ (100%) и хлороформ-метанол (с увеличением полярности последнего). При необходимости одинаковые фракции объединяют и рехроматографируют на небольших колонках. Аполярные фракции являются смесями сложных эфиров жирных кислот и углеводов. Далее последние фракции разделяют и очищают с помощью препаративной ТСХ с получением соединений (8) и (9) [59].

Авторы [54] сесквитерпенового лактона гроссгемина получают двумя методами. Метод А: 15,6 кг цветочных корзинок и листьев хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), собранных в фазу массового цветения, настаивают 4 раза в горячей воде (80-84 °С) по 1 ч. Из водного извлечения вещества экстрагируют хлороформом, после чего упаривания 92 г полученной сиропобразной массы кремового цвета хроматографируют на колонке с окисью алюминия (активность IV степени) при соотношении сумма – носитель (1:15). При элюировании бензолом и после трехкратной перекристаллизации из спирта получают 1,56 г бесцветных пластинчатых кристаллов (гроссгемин). Выход целевого продукта в пересчете на воздушно-сухое сырье составляет 0.01%.

Метод Б: 12 кг листьев и цветочных корзинок хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) исчерпывающе экстрагируют хлороформом, отгоняют растворитель и получают 1175.2 г суммы экстрактивных веществ, которую обрабатывают смесью спирт-вода 5.64:2.82 (в л). Осадок отделяют, водно-спиртовую часть экстрагируют хлороформом (3×500 мл), хлороформ упаривают и получают 672 г окрашенного в кремовый цвет остатка; после хроматографии на силикагеле КСК при соотношении вещество – носитель 1:15 и элюирования смесью бензол-эфир (1:1) выделяют кристаллическую массу после трехкратной перекристаллизации из спирта получают гроссгемин. Выход 6.7081 г. Выход целевого продукта в пересчете на воздушно-сухое сырье составляет 0.056%.

Ивасенко С.А. [60] 3,0 кг надземной части (цветочные корзинки, бутоны, листья, стебли) хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), собранного в фазу цветения в окр. г. Караганды (июль 2002г.) исчерпывающе экстрагируют хлороформом (45-50°С). Хлороформный экстракт отгоняют на роторном испарителе и получают сумму экстрактивных веществ в виде темно-зеленой смолы, которую обрабатывают смесью этанол-вода в соотношении 2:1 при 70°С. Выпавшие в осадок балластные вещества отделяют фильтрованием через складчатый фильтр, водно-спиртовой фильтрат последовательно обрабатывают петролейным эфиром, затем бензолом. Бензольные извлечения отгоняют под вакуумом. Остаток (44 г) хроматографируют на колонке силикагелем марки КСК в соотношении сумма-носитель 1:20. В качестве элюента используют смеси петролейного эфира с этилацетатом с возрастающим содержанием последнего от 20 до 100%. При элюировании колонки 25%-ым раствором этилацетатом

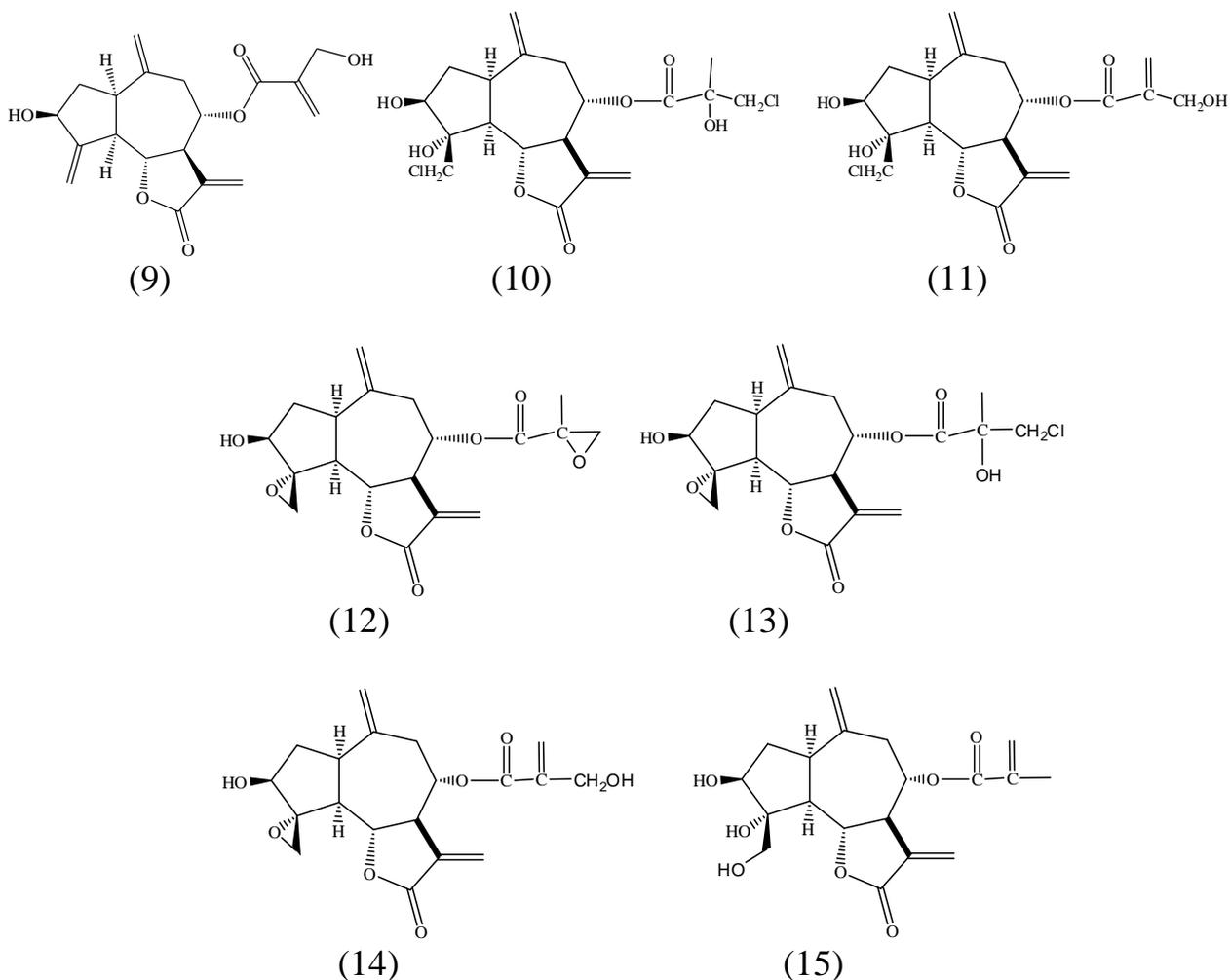
выделяют 1,8 г гроссгемина. Выход гроссгемина в пересчете на воздушно-сухое сырье составляет 0.06%.

8 кг травы надземной части (цветочные корзинки, бутоны, листья, стебли) хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) в 10 мешочках, сшитых из «бязи», по 0.8 кг каждом экстрагируют этилацетатом при температуре 80 °С в течение 120 минут. После охлаждения жидкий экстракт сливают и заливают в роторный испаритель. В роторном испарителе сгущают. Экстракцию повторяют еще 3 раза при тех же условиях. Полученный этилацетатный экстракт разделяют на производственной установке ФСРС-5000 в условиях 1) эквирбровку (5 минут со скоростью подачи мобильной фазы 10 мл/мин, запуск вращения и разгон ротора до скорости 1000 об/ мин), 2) ввод пробы (8 минут со скоростью 100 мл/ мин) и 3) разделение пробы на фракции (100 мин со скоростью подачи мобильной фазы 100 мл/ мин, скорость вращения ротора 1000 об/мин). В результате разделения получают 4 фракции объемом от 300 до 800 мл. Фракций обогащенные гроссгемином (фракция №3), упаривают на роторном испарителе. После отгона растворителя получают кристаллический остаток (технический гроссгемин). Далее проводят перекристаллизацию в этиловом спирте. В результате получают гроссгемина очищенного. Выход гроссгемина составляет 2% в пересчете на массу этилацетатного экстракта хартолеписа среднего. Преимуществом данного метода является полная автоматизация и значительное уменьшение продолжительности процесса [61].

Nowak G. соавторами [64] при хроматографировании на колонке с силикагелем хлороформного экстракта *Chartolepis pterocaula* (Trautv.) Czer. смесью хлороформ-ацетон при соотношении 7:1. Выделяют гроссгемин (8), цинаропикрин (9), centaурепенсин (10), цебеллин С (11), репин (12), акроптиллин (13), янерин (14) и птерокаулин (15).

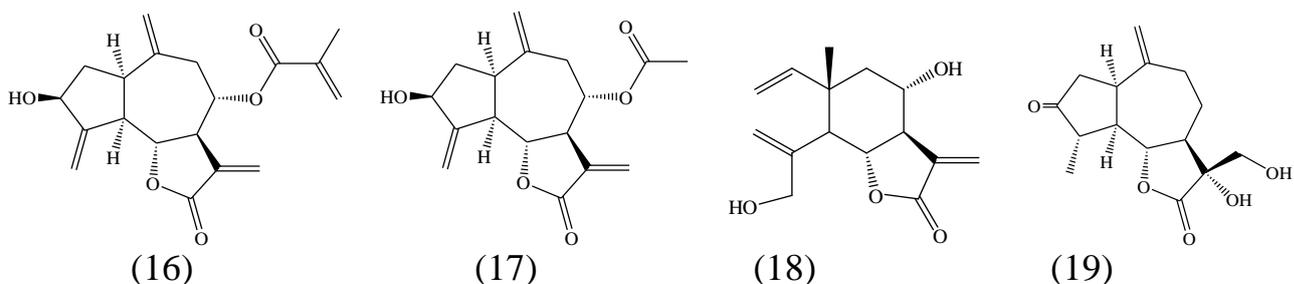
Samek Z. и соавторами [51] сесквитерпенового лактона гроссгемина выделяют из двух родов растений *Cynara scolymus* L. и *Grossheimia macrocephala* Muss. - Puschk.) D.Sosn. et Takht.:

А) Свежие измельченные листья *Cynara scolymus* L. (20 кг) итальянского происхождения экстрагируют ацетоном при комнатной температуре. После выпаривания растворителя при 25 °С и пониженном давлении получают экстракт, который разделяют между петролейным эфиром и водой. Водную часть экстрагируют петролейным эфиром и хлороформом. Полученный хлороформный экстракт (34 г) хроматографируют на колонке с силикагелем элюируя петролейным эфиром и этилацетатом (1:1), выделяют смесь, содержащую гроссгемин, которую повторно хроматографируют на силикагеле, используя для элюирования хлороформ-метанол в соотношении 49:1.

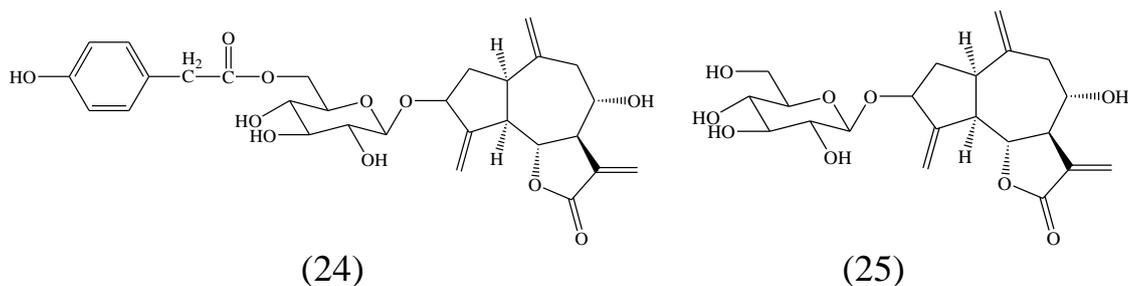
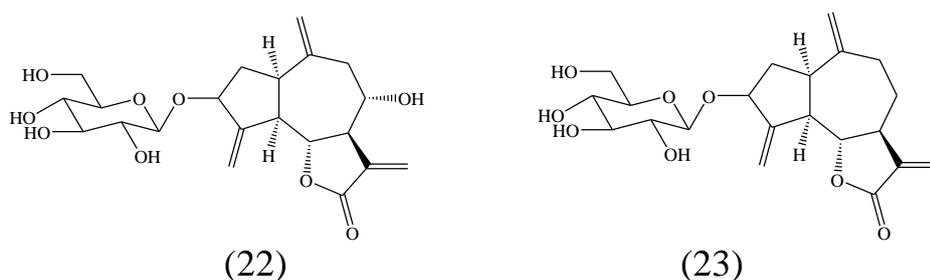
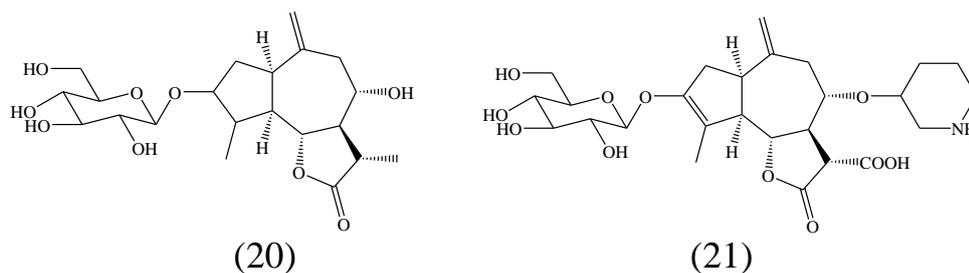


В) Сухие измельченные листья *Grossheimia macrocephala* (Muss. - Puschk.) D.Sosn. et Takht. (30 кг), культивируемые в Фармакогностическом саду, Познань (Польша), собранные до цветения обрабатываются аналогичным образом и получают экстракт (23 г), который содержит по данным тонкослойной хроматографии три вещества со значениями Rf 0.43, 0.60 и 0.90 (хлороформ-ацетон 3:1). Экстракт (20 г) хроматографируют на колонке с силикагелем (500 г) элюируя хлороформом, а затем смесью хлороформ:ацетон (3:1), из средних фракций выделяют гроссгемин.

Авторами [65] из этилацетатного экстракта *Synara cardunculus* L. с дальнейшим хроматографированием на силикагеле используя в качестве экстрагента смесь гексан:ацетон (с увеличением полярности последнего), получают фракции от А до L. Далее при рехроматографировании фракций D, E, F и G выделяют гроссгемин (8) и других пять сесквитерпеновых лактонов: цинаропикрин (9), агуерин В (16), 8 α -ацетоксизалузанин С (17), дегидромелитенсин (18), 11,13-дигидрокси-8-дезоксигроссгемин (19). Выделенные соединения идентифицированы по их спектроскопическим данным (^1H ЯМР, ^{13}C -ЯМР, НМРС, COSY, НМБС, IR и MS) в сравнение с данными, приведенными в литературе.



Исследователи из Японии [66] экстрагируют целое растение *Youngia japonica* (L.) DC горячим метанолом. Получают 133.0 г густого экстракта. Далее экстракт растворяют в воде и получают 107.0 г водорастворимую и 26.0 г нерастворимую части. Водорастворимую часть хроматографируют на колонке с маркой МСИ гель СНР-20Р элюируя последовательно (H₂O, H₂O-МеОН 60:40, H₂O-МеОН 40:60, H₂O-МеОН 20:80, МеОН 100%) с получением водного элюата (93,0 г) и десять фракций (от 1 до 10). Далее фракцию №8 рехроматографируют на силикагеле (СНCl₃-МеОН-Н₂O=9:1:0.1) и выделяют 44.8 мг гроссгемина (8). А также из других фракции выделяют два новых сесквитерпеновых лактонов (20, 21) ранее неописанных в литературе и четыре известных сесквитерпеновых лактонов (22-25). Все выделенные сесквитерпеновые лактоны являются гваянового типа.



Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что основными методами

выделения и очистка сесквитерпенового лактона гроссгемина составляет экстракция сырья различными органическими растворителями с последующей хроматографической очисткой на силикагеле.

Недостатками вышеописанных способов являются:

1. Продолжительное время экстрагирования;
2. Использование токсичных растворителей при экстрагировании – ацетона, хлороформа, этилацетат применение которых в фармацевтическом производстве запрещено по стандартам надлежащей производственной практики (GMP).

Повышенный интерес ученых к данному сесквитерпеновому лактону гроссгемину обусловлен, прежде всего, широким спектром биологической активности. Необходимость изучения данного сесквитерпенового лактона гроссгемина связан с возможностью практического применения его и производных в медицине в качестве противоопухолевого, противовоспалительного, противопаразитарного средства, а также наличие в Республике Казахстан сырьевой базы растительного сырья хартолеписа среднего.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалы и методы, использованные для проведения научных исследований, соответствуют требованиям ОФС Государственной Фармакопеи Республики Казахстан, European Pharmacopoeia, United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, ФС, ВФС и других нормативных документов, действующих на территории Республики Казахстан.

2.1 Материалы исследований

Объекты исследования:

Лекарственное растительное сырье. Воздушно-сухая надземная часть (листья и соцветия) хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), собранная в июле 2014 г., в окрестностях села Акбастау Абайского района Карагандинской области, степень измельчения сырья 8 мм (проект АНД, РК-ЛС-3№019524).

Экстракты. Густой водно-спиртовой экстракт хартолеписа среднего, полученный с применением ультразвуковой экстракции, густой спиртовой экстракт хартолеписа среднего.

Субстанции. Гроссгемина, хлорацетилгроссгемина, гидрохлорида цитизинилгроссгемина.

Реактивы и растворители:

В экспериментальных исследованиях использованы химические реактивы и растворители квалификации «о.с.ч.», «х.ч.», «ч.д.а.».

Аммиака раствор концентрированный. Аммиака раствор концентрированный содержит не менее 25.0 % (м/м) и не более 30.0 % (м/м) аммиака (NH_3 ; M_r 17.03). Прозрачная, бесцветная, очень щелочная жидкость. Смешивается с водой и 96 % спиртом.

Азотная кислота разбавленная. 1058402. Содержит около 125 г/л HNO_3 (M 63.0). 20 г кислоты азотной *P* доводят водой *P* до объема 100 мл.

Аммиака раствор разбавленный P 2. 1004703. Содержит не менее 33 г/л и не более 35 г/л NH_3 (M_r 17.03). 14 г раствора аммиака концентрированного *P* доводят водой *P* до объема 100 мл.

Ванилин. 1095300. [121-35-5]. (ГФ РК с. 346).

Вода очищенная. 1095500. [7732-18-5]. (ГФ РК с. 346).

Йода раствор P1. 1045801. К 10.0 мл 0.05 *M* раствора йода прибавляют 0.6 г калия йодида *P* и доводят объем раствора водой *P* до 100.0 мл. Готовят непосредственно перед использованием.

Калия йодида раствор. 1070502. Раствор 166 г/л.

Лантана(III) нитрата раствор. 1048001. Раствор 50 г/л.

Натрия сульфат безводный. 1083800. [7757-82-6]. (ГФ РК с. 396). Порошок белого цвета. Гигроскопичный. Легко растворим в воде.

Петролейный эфир. 1063100. [8032-32-4]. Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость, не флуоресцирует. Практически не растворим в

воде, смешивается с 96 % спиртом (ГФ РК с. 404). Петролейный эфир используется в качестве растворителя.

Пиридин. 1073200. [110-86-1]. (ГФ РК с. 405). Прозрачная, бесцветная, гигроскопическая жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

Серебра нитрата раствор P2. 1078302. Раствор 17 г/л. Хранят в защищенном от света месте.

Серная кислота. H_2SO_4 . 1086800. [7664-93-9]. Содержит не менее 95.0 % и не более 97.0 % H_2SO_4 . Бесцветная, едкая, маслянистой консистенции, очень гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой и 96 % спиртом с интенсивным выделением тепла (ГФ РК с. 413).

96 % спирт этиловый. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. (M_r 46.07). 102500. [64-17-5]. Прозрачная, бесцветная, подвижная, летучая жидкость с характерным запахом и жгучим вкусом. Легко воспламеняется, горит синеватым слабо светящимся бездымным пламенем, смешивается во всех соотношениях с водой, эфиром, хлороформом, ацетоном и глицерином (ГФ РК с. 419). Спирт этиловый широко используется в качестве растворителя и экстрагента.

Хлороводородная кислота концентрированная. 1043500. [7647-01-0]. (ГФ РК с. 439). Прозрачная, бесцветная дымящая жидкость. Смешивается с водой.

Хлороформ. CHCl_3 . (M_r 119.4). 1018600. [67-66-3]. Трихлорметан. Прозрачная, бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96 % спиртом. Хлороформ содержит от 0,4 % (m/m) до 1.0 % (m/m) этанола.

Хлоруксусный ангидрид. $\text{C}_4\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}_3$. (M_r 170.98). Бесцветные кристаллы. Растворим в эфире и хлороформе.

Щавелевая кислота. $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. (M_r 126.1). 1061400. [6153-56-6]. Этандикарбоновой кислоты дигидрат. Кристаллы белого цвета. Растворима в воде, легко растворима в 96 % спирте.

Этилацетат. $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$. (M_r 88.1). 1035300. [141-78-6]. Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96 % спиртом (ГФ РК с. 448). Этилацетат используется в качестве растворителя.

2.2 Методы исследований

Для проведения физико-химических и фармацевтических исследований использованы следующие приборы: ультразвуковая баня НО-230.00 22 кГц (Россия), спектрометр «Термо Nicolet Avatar-360» (США), спектрофотометр «Helios-β» (Великобритания), жидкостной хроматограф HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series (США), газовый хроматограф «Кристаллюкс 4000М» (Россия), спектрометр JEOL RESONANCE-500 рабочая частота 500.16 МГц для ^1H , 125.76 МГц для ^{13}C , δ-шкала (Япония), прибор для определения температуры плавления OptiMelt (Германия), элементный анализатор Eurovector 3000, поляриметр «Polax-2L» в трубке длиной 0.5 дм и объемом 3 мл, масс-спектр высокого разрешения DFS Thermo Scientific и Finnigan MAT-80 с ионизирующим напряжением 70 В (температура испарителя 210-280 °С), дифрактометр Bruker

APEX-II CCD (графитовый монохроматор, $\lambda(\text{Mo-K}\alpha) = 0.71073 \text{ \AA}$, температура 297 К, φ, ω -сканирование).

Физико-химические методы

Ультразвуковая экстракция

Ультразвуковую экстракцию лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего, измельченного до размера 3-5 мм, проводили на лабораторной установке НО-230.00 при частоте ультразвукового излучения 22 кГц, при комнатной температуре (20-22°C), в течение 90 мин, в качестве экстрагента использовали смесь этиловый спирт:вода (1:1 об./об.), с замачиванием в течение 30 мин., соотношение сырье:экстрагент 1:20.

Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография

Количественное содержание гроссгемина в лекарственном растительном сырье, экстрактах хартолеписа среднего и субстанции гроссгемина определяли на жидкостном хроматографе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме, стационарная фаза: аналитическая колонка 4,6x150 мм, Zorbax SB-C18 (5 μm); подвижная фаза: метанол–вода 1:1 (об/об), скорость подачи элюента 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. УФ-детектирование при 204 нм. Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Количественное содержание хлорацетилгроссгемина в субстанции хлорацетилгроссгемина определяли на жидкостном хроматографе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме, стационарная фаза: аналитическая колонка 4,6x150 мм, Zorbax SB-C18 (5 μm); подвижная фаза: метанол–вода 1:1 (об/об), скорость подачи элюента 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. УФ-детектирование при 214 нм. Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Количественное содержание гидрохлорида цитизинилгроссгемина в субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина определяли на жидкостном хроматографе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме, стационарная фаза: аналитическая колонка 4,6x150 мм, Zorbax SB-C18 (5 μm); подвижная фаза: метанол–вода 1:1 (об/об), скорость подачи элюента 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. УФ-детектирование при 202 нм. Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Газовая хроматография

Содержание остаточных растворителей в субстанции хлорацетилгроссгемина и субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина определяли на газовом хроматографе «Кристаллюкс 4000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях: колонка капиллярная, размером 30 м x 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил-диметилполисилоксана (5:95) толщиной 0.25 мм; газ-носитель аргон скорость подачи 20 мл/мин; скорость подачи водорода 40 мл /мин; скорость подачи

воздуха 400 мл/мин; температура колонки 30 °С; температура детектора 120 °С; температура испарителя 100 °С.

ИК-спектроскопия

ИК-спектры субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина, гидрохлорида цитизинилгроссгемина и других производных гроссгемина регистрировали на спектрометре «Termo Nicolet Avatar-360» (США) в таблетках с калия бромидом, в области от 3800 до 600 см⁻¹.

УФ-спектрофотометрия

УФ-спектры субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина, гидрохлорида цитизинилгроссгемина и других производных гроссгемина снимали на приборе «Helios-β» (Великобритания), в области от 200 до 400 нм.

ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР хлорацетилгроссгемина, гидрохлорида цитизинилгроссгемина и других производных гроссгемина записывали на спектрометре JEOL RESONANCE-500 (Япония), рабочая частота 500.16 МГц для ¹H, 125.76 МГц для ¹³C, δ-шкала с использованием стандартных программ фирмы JEOL RESONANCE для регистрации двумерных спектров.

Масс-спектроскопия

Для определения молекулярной массы и элементного состава хлорацетилгроссгемина, гидрохлорида цитизинилгроссгемина и других производных гроссгемина использовали масс-спектрометр высокого разрешения Finnigan DMS-8200 с ионизирующим напряжением 70 эВ (температура испарителя 220°С).

Элементный анализ

Элементный анализ хлорацетилгроссгемина, гидрохлорида цитизинилгроссгемина проводили на анализаторе Eurovector 3000 (Италия).

Химические методы:

К 20 мг субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина прибавляют 1 каплю раствора ванилина в кислоте серной, появляется фиолетовое окрашивание (терпеноиды).

К 20 мг субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина.

К 15 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *кислоты азотной разбавленной Р* и выливают смесь в один прием в пробирку, содержащую 1 мл *раствора серебра нитрата Р2*. Параллельно в этих же условиях готовят раствор сравнения, используя 10 мл *стандартного раствора хлорида (5млн⁻¹ Cl⁻) Р* и 5 мл *воды Р*. Пробирки помещают в защищенное от света место. Через 5 мин пробирки просматривают на черном фоне горизонтально

(перпендикулярно оси пробирок). Опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию суспензии сравнения (на хлорид-ион).

Испытуемую субстанцию нагревают с равным количеством *кислоты щавелевой Р*; выделяется кислота уксусная, обнаруживаемая по запаху и кислой реакции (2.2.4) (на ацетат-ион).

Около 30 мг испытуемой субстанции растворяют в 3 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 3 мл раствора, указанного в частной статье, последовательно прибавляют 0.25 мл *раствора лантана нитрата Р*, 0.1 мл *0.05 М раствора йода* и 0.05 мл *раствора аммиака разбавленного Р2*. Смесь осторожно нагревают до кипения; в течение нескольких минут образуется синий осадок или появляется синее окрашивание (на ацетат ион).

Фармакопейные методы:

- определение цвета, вкуса, запаха субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина проводили по методике, изложенной в ГФ РК, Т. 1, с. 548;
- определение растворимости субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина в различных растворителях проводили по методике ГФ РК, Т. 1, с. 175;
- определение температуры плавления субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина проводили по методике ГФ РК, Т. 1, с. 16 метод 1а.

Товароведческий анализ:

Определение диагностических признаков травы хартолеписа среднего проводили согласно требованиям ГФ РК т. 1, с. 563; золы общей определяли по ГФ РК т. 1, раздел 2.4.16; золы нерастворимой в 10 % кислоте хлороводородной, определяли по ГФ РК т. 1, раздел 2.8.1.; влажность сырья проводили согласно требованиям ГФ РК т. 1, раздел 2.8.17.

Статистическая обработка результатов

При обработке полученных результатов исследований применен метод вариационно-статистического анализа с использованием критерия достоверности по Стьюденту ($P < 0,95$).

3 ИЗУЧЕНИЕ РЕСУРСНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ХАРТОЛЕПИСА СРЕДНЕГО

Хартолепис средний (*Chartolepis intermedia* Boiss.) - многолетнее растение, высотой 50-100 см., корневище деревянистое, ветвистое, в шейке утолщенное; стебель прямостоящий, тонко-ребристый, слабо паутинистоопушенный; листья прикорневые и нижние стеблевые продолговато- или эллиптически-обратно-ланцетные до почти ланцетных, 2-3 см. шир., на черешке 4-20 см. длины; корзинки на верхушках стебля и его боковых ветвей, одиночные, собранные в раскидистую кистевидную или в кистевидно-щитковидную рыхлую метелку; обертка продолговато-яйцевидная, 20-25 мм длины и 10-15 мм шир., придатки ее листочков тонкоперепончатые, частично скрывают кожистую часть листочка, у основания с бледно-буроватым маленьким пятном или почти сплошь полупрозрачные; цветки желтые; хохолок перистый, грязновато-дымчатый, 8-10 мм дл.; семянки буровато-кремовые, 5-6 мм дл., Цв. VII, пл. VIII [62].

Растет на солонцеватых лугах, в долинах рек и по берегам озер. Распространение: встречается во флористических районах: Тоболо-Ишимского, Иртышского, Семипалатинского борового, Прикаспийского, Актюбинского, Тургайского, Зайсанского, Приаральского, Бетпақдалинского, Мойынқумского, Балхаш-Алакольского, Чу-Илийского, Каратауского флористических районов, в Западном мелкосопочнике, Тарбағатае и Джунгарском Алатау [62].

Как видно из приведенных данных, хартолепис средний широко распространен по всему Казахстану: от Прикаспия, южных и северных регионов страны до Южного Алтая и северных склонов Калбинского хребта.

В ходе экспедиционного выезда в августе 2015 г. проведено ресурсное обследование хартолеписа среднего на территории Центрального Казахстана. В Шетском и Абайском районах Карагандинской области выявлено 2 сообщества с участием хартолеписа среднего.

Первое сообщество изучено в окрестностях села Нураталды (Шетский р-н). Второе сообщество с участием хартолеписа среднего изучено в окрестностях села Акбастау (Абайский район) (рисунок 1).

Общее проективное покрытие составляет 83%. В первом подъярусе травянистая растительность высотой 60-135 см, второй ярус – высотой 30-60 см.

Средний вес генеративных побегов в окрестностях поселка Нураталды составляет $19,7 \pm 1,2$ г, а в окрестностях поселка Акбастау - $22,2 \pm 1,8$ г, урожайность сухой массы хартолеписа среднего в исследованных природных сообществах колеблется от 299,4 до 328,59 г/м² (таблица 4).

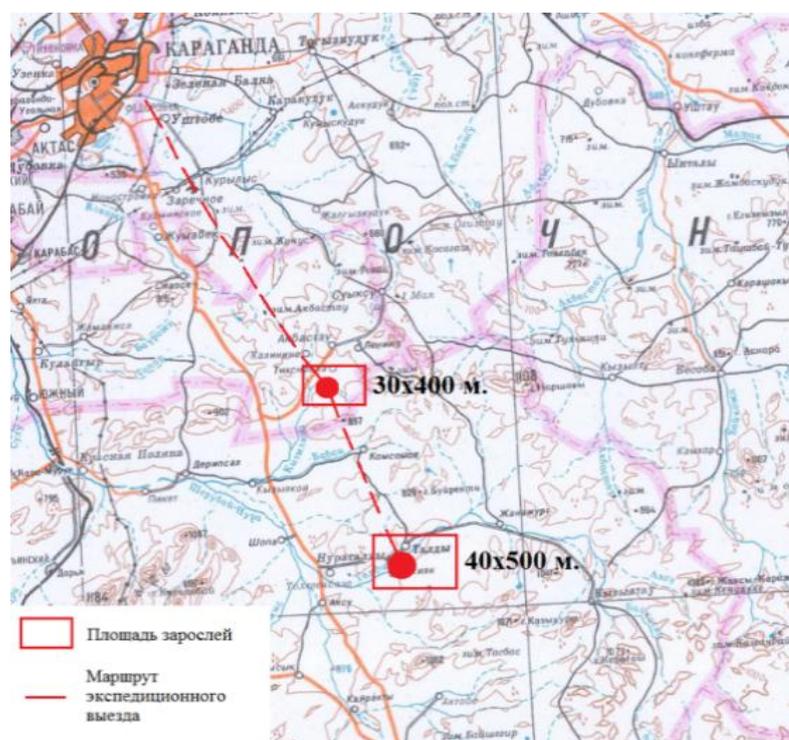


Рисунок 2 - Карта – схема природных популяций хартолеписа среднего на территории Центрального Казахстана

Таблица 4 - Показатели продуктивности хартолеписа среднего, произрастающего в растительных сообществах на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области

Показатели продуктивности	Хартолеписо-солодково-разнотравное (Шетский р-н)	Разнотравно-хартолеписовое (Абайский р-н)
Число особей на м ²	4,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1
Число генеративных побегов на 1 м ²	15,2 ± 0,8	14,8 ± 1,1
Сухой вес генеративного побега, г	19,7 ± 1,2	22,2 ± 1,8
Плотность запас, г/м ²	299,4 ± 24,3	328,59 ± 29,2
Эксплуатационный запас, ц	35,9	65,6
Объем ежегодных заготовок, ц/га	11,9	21,8

Таким образом, проведенное обследование на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области фитоценозов с участием хартолеписа среднего показало, что явленные заросли хартолеписа среднего значительны по площади и пригодны для эксплуатации. Общий эксплуатационный запас сырья хартолеписа среднего в исследуемых сообществах определен в 101,5 ц/га. Возможный объем ежегодной заготовки оценивается в разных сообществах от 11,9 до 21,8 ц/га.

Произведен сбор растительного сырья хартолеписа среднего на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области.

Ранее существовал нормативный документ (ВАНД РК 42-483-12, РК-ЛС-3№019524), регламентирующий качество лекарственного растительного сырья «Хартолепис средний трава», область применения - сырье для получения лактона гроссгемина. Взамен ему разработан проект АНД [61].

Так как хартолепис средний является возобновляемым растительным сырьем для производства субстанции гроссгемина, нами исследованы показатели качества 3 серий каждой из опытно-промышленных партий, собранных на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области, согласно требованиям проекта АНД (таблица 5).

Цельное сырье хартолеписа среднего, собранное на территории Шетского и Абайского районов, имеет следующие *внешние признаки*: цельные или частично измельченные верхние части стеблей с цветками и листьями. Стебли тонко-ребристые паутинисто-опушенные простыми волосками. Для стебля характерны золотистые сидячие головчатые железки. Прикорневые и нижние стеблевые листья эллиптически-обратно-ланцетные; верхние листья продолговато-ланцетные, сидячие длинно избегающие на стебель. Цветочные корзинки одиночные или собраны в кистевидную метелку. Обертка цветочных корзинок продолговато-яйцевидная 18-20 мм длиной и 10-13 мм шириной. Придатки листочков тонко перепончатые полупрозрачного цвета [63].

Измельченное сырье хартолеписа среднего, собранное на территории Шетского и Абайского районов, представляет собой кусочки стеблей, корзинок, листьев и отдельных опушенных цветков, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет листьев и стеблей зеленый или серовато-зеленый, цветков - желтый с перистым хохолком дымчатого цвета [63].

Вкус своеобразный горьковатый. Запах слабый травянистый.

Микроскопия. Для определения *диагностических признаков* исследуемых образцов хартолеписа среднего провели микроскопию листьев и стеблей в соответствии с требованиями ГФ РК, при этом установлено, что эпидермальные клетки листа прямостенные вытянутые; клетки нижнего эпидермиса мелкие, плотно расположенные; на эпидермисе листа волоски двух типов: простые сегментированные и головчатые, расположенные на обеих сторонах листа с преобладанием на нижней; мелкие глубоко-сидячие железки в эпидермальных клетках стебля [63].

Идентификацию сырья подтверждали, исходя из химического состава хартолеписа среднего, реакцией на наличие в нем терпеноидов. Сумму лактонов выделяли из растительного материала экстракцией спирта этилового 96 %. Полученный экстракт каждой серии показал положительную реакцию на наличие терпеноидов при добавлении раствора ванилина в серной кислоте к экстракту, смесь окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды) [63].

Также наличие сесквитерпенового лактона гроссгемина во всех образцах сырья установлено методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Сорбфил ПТСХ-УФ» R_f около 0,45 (петролейный эфир – этилацетат, 1:1).

Таблица 5 - Показатели качества 3 серий каждой из опытно-промышленных партий, собранных на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области

Показатели качества	Методы испытаний	Нормируемые отклонения	Трава хартолеписа среднего (Шетский р-н Карагандинской обл.)			Трава хартолеписа среднего (Абайский р-н Карагандинской обл.)		
			Серия			Серия		
			150714	160714	170714	180714	190714	200714
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Идентификация: А. Внешние признаки	А. Визуально	А. Соответствие морфологическим признакам при просмотре невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
В. Микроскопия	В. ГФ РК, Т. 2, 2.8.3	В. Соответствие анатомическим признакам при просмотре под микроскопом с увеличением (не менее 40х)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
С. – гроссгемина	С. ТСХ ГФ РК, т. 2, 2.2.27	С. R _f около 0,45 (петролейный эфир – этилацетат, 1:1)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Д. - терпеноидов	Д. Качественная реакция	Д. - реакция с раствором ванилина в серной кислоте, наблюдается красно – фиолетовое окрашивание.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Потеря в массе при высушивании	ГФ РК, Т. 1, 2.8.17	не более 13 %	7,8	7,2	7,6	8,5	8,2	8,3
Золы общей	ГФ РК, Т. 1, 2.4.16	не более 12 %	10,7	10,9	10,5	11,4	11,3	11,4
Золы, нерастворимой в 10% кислоте хлороводородной	ГФ РК, Т. 1, 2.8.1	не более 3,5 %	2,84	2,85	2,84	2,86	2,85	2,85
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм	ГФ РК, Т. 1, 2.8.17	не более 13 %	7,1	7,4	7,2	7,3	7,3	7,5

Продолжение таблицы 5

	2		4	5	6	7	8	9
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм	ГФ РК, Т. 1, 2.4.16	не более 12 %	4,9	5,2	5,0	5,1	5,3	5,4
Побуревших и почерневших частиц	ГФ РК, Т. 1, 2.8.1	не более 3,5 %	2,0	1,8	2,1	1,9	2,3	2,4
Органической примеси	ГФ РК, Т. 1, с. 562	не более 14 %	4,6	4,3	4,5	4,7	5,0	4,9
Минеральной примеси	ГФ РК, Т. 1, с. 562	не более 7 %	3,2	2,9	3,3	3,5	3,1	3,4
Микробиологическая чистота	В соответствии с ГФ РК, Т. 2, 5.1.4 и МУ РК «Методы микробиологического контроля лекарственных средств», категория 4А	- не более 10^7 бактерий и не более 10^5 грибов в 1 грамме; - не более 10^2 <i>Escherichia coli</i> в 1 грамме	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Содержание радионуклидов		В соответствии с требованиями СП 21.6.1.758-99 (НРБ 99)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Количественное определение содержания гроссгемина	ВЭЖХ ГФ РК, Т. 1, с. 94	не менее 0,05 %	0,07	0,08	0,07	0,06	0,08	0,07

Результаты товароведческого анализа травы хартолеписа среднего, собранной на территории Шетского и Абайского районов, приведены в таблице 6.

Таблица 6 - Результаты товароведческого анализа травы хартолеписа среднего, собранной на территории Шетского и Абайского районов

Серия	Посторонние примеси, %	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, %	Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной, %	Микробиологическая чистота	Радионуклиды
Трава хартолеписа среднего (Шетский р-н Карагандинской обл.)						
150714	1,31	7,8	10,7	2,84	соответствует	соответствует
160714	1,29	7,2	10,9	2,85	соответствует	соответствует
170714	1,32	7,6	10,5	2,84	соответствует	соответствует
Трава хартолеписа среднего (Абайский р-н Карагандинской обл.)						
180714	1,33	8,5	11,4	2,86	соответствует	соответствует
190714	1,35	8,2	11,3	2,85	соответствует	соответствует
200714	1,34	8,3	11,4	2,85	соответствует	соответствует

Метрологические характеристики результатов товароведческого анализа хартолеписа среднего представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Метрологические характеристики результатов товароведческого анализа хартолеписа среднего

Серия	Потеря в массе при высушивании, %	Метрологические характеристики	Зола, %	Метрологические характеристики	Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной, %	Метрологические характеристики
Трава хартолеписа среднего (Шетский р-н Карагандинской обл.)						
150714	7,8	$X_{cp}=7,53$ $S=0,2233$	10,7	$X_{cp}=10,70$ $S=0,1333$	2,84	$X_{cp}=2,84$ $S=0,01$
160714	7,2	$S_x=0,0615$	10,9	$S_x=0,0723$	2,85	$S_x=0,0082$
170714	7,6	$\Delta X=0,0698$ $A=\pm 0,76$	10,5	$\Delta X=0,0856$ $A=\pm 0,75$	2,84	$\Delta X=0,013$ $A=\pm 0,34$
Трава хартолеписа среднего (Абайский р-н Карагандинской обл.)						
180714	8,5	$X_{cp}=8,33$ $S=0,1100$	11,4	$X_{cp}=11,37$ $S=0,0433$	2,86	$X_{cp}=2,85$ $S=0,01$
190714	8,2	$S_x=0,0534$	11,3	$S_x=0,0597$	2,85	$S_x=0,0092$
200714	8,3	$\Delta X=0,0698$ $A=\pm 0,81$	11,4	$\Delta X=0,0823$ $A=\pm 0,73$	2,85	$\Delta X=0,019$ $A=\pm 0,41$

Количественное определение содержания гроссгемина в каждой серии опытно-промышленных партий, собранных на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области, проводили методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.29) по методике, описанной в [63]. На рисунке 3 представлена хроматограмма количественного определения гроссгемина в сырье хартолеписа среднего.

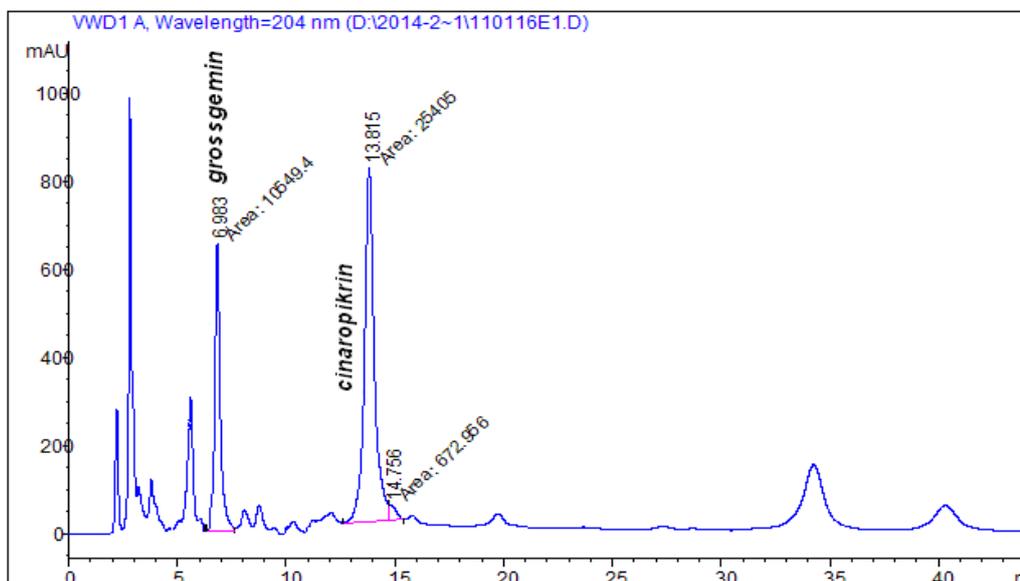


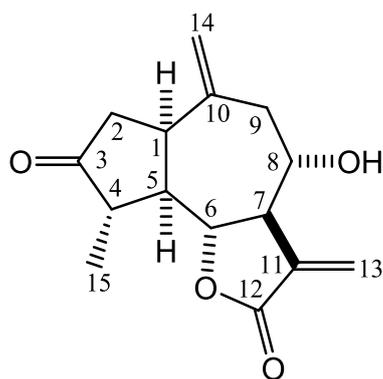
Рисунок 3 - Хроматограмма количественного определения гроссгемина в сырье хартолеписа среднего

Как показывают результаты исследования показателей качества, лекарственное растительное сырье хартолеписа среднего, собранное на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области, соответствует проекту АНД «Хартолепис средняя трава» и может быть использовано для производства субстанции гроссгемина.

Таким образом, проведено обследование фитоценозов с участием хартолеписа среднего на территории Шетского и Абайского районов Карагандинской области, явлены заросли хартолеписа среднего значительные по площади и пригодные для эксплуатации. Общий эксплуатационный запас сырья хартолеписа среднего в исследуемых сообществах определен в 101,5 ц/га. Возможный объем ежегодной заготовки оценивается в разных сообществах от 11,9 до 21,8 ц/га. По внешним признакам, микроскопическим характеристикам, количественному содержанию гроссгемина и результатам товароведческого анализа растительное сырье хартолеписа среднего соответствует нормативному документу, и может быть использовано для производства субстанции гроссгемина.

4 ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ГРОССГЕМИНА ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ХАРТОЛЕПИСА СРЕДНЕГО

Гроссгемин (8) представляет собой сесквитерпеновый лактон гваянового типа, обладающий противоопухолевой, противовоспалительной, противопаразитарной активностью [54, 60]. Возобновляемым растительным сырьем для получения гроссгемина являются цветочные корзинки и листья хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.), содержание целевого вещества составляет не менее 0,05% [61].



(8)

$C_{15}H_{18}O_4$

Т. пл. 200-203 °С

М.м. 262

$[\alpha]_D^{20} +137.7^\circ$

4.1 Применение ультразвуковой экстракции растительного сырья хартолеписа среднего для количественного извлечения гроссгемина

Ранее для извлечения гроссгемина и сопутствующих лактонов использовали экстракцию хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) хлороформом, этилацетатом, 96 % этиловым спиртом, а также сжиженным диоксидом углерода в сверхкритическом режиме. В результате проведенных экспериментальных работ, оптимальным экстрагентом для количественного извлечения гроссгемина из хартолеписа среднего был определен этилацетат [61]. Основу технологии получения субстанции гроссгемина - на стадии извлечения целевого продукта из хартолеписа среднего, до настоящего момента, составляла четырехкратная экстракция сырья этилацетатом при температуре 80 °С в течение 120 минут [61].

Впервые нами проведена ультразвуковая экстракция сырья хартолеписа среднего, изучено влияние продолжительности процесса экстрагирования растительного сырья и выбора экстрагента на количественное извлечение гроссгемина из хартолеписа среднего [69].

Во всех экспериментах использовали воздушно-сухое растительное сырье хартолеписа среднего, со степенью измельчения 8 мм (проект АНД), масса загрузки 200,0 г. Однократное экстрагирование проводили при комнатной температуре. Полученные результаты представлены в таблице 8.

Как видно из полученных результатов ультразвуковая экстракция хартолеписа среднего этанолом не может обеспечить достаточное извлечение гроссгемина, независимо от продолжительности экстрагирования (эксперименты 1-3).

Применение в качестве экстрагента смеси этанол:вода (1:1) при однократной ультразвуковой экстракции хартолеписа среднего приводит к увеличению выхода суммы экстрактивных веществ и повышению содержания в ней гроссгемина (эксперименты 4-6). Однократная ультразвуковая экстракция продолжительностью 90 минут обеспечивает максимальную полноту извлечения гроссгемина из растительного сырья - 98,0 %, при этом выход водно-спиртового экстракта составляет 1,55 % (3,1 г) с содержанием гроссгемина 8,22 % (0,254 г) по данным ВЭЖХ.

Таблица 8 - Результаты изучения динамики извлечения гроссгемина с применением ультразвуковой экстракции хартолеписа среднего в зависимости от времени экстрагирования и выбора экстрагента

№ эксперимента	Экстрагент	Время, мин	Выход экстракта		Содержание гроссгемина	
			г	%	г	%
1	Этанол	30	2,8	1,40	0,147	5,25
2	Этанол	60	2,9	1,45	0,198	6,84
3	Этанол	90	2,9	1,45	0,137	4,74
4	Этанол:вода (1:1)	30	3,06	1,53	0,185	6,06
5	Этанол:вода (1:1)	60	3,07	1,53	0,239	7,70
6	Этанол:вода (1:1)	90	3,1	1,55	0,254	8,22
7	Этанол:вода (1:1)	120	3,1	1,55	0,253	8,20
8	Этанол:вода (1:1)	150	3,07	1,53	0,251	8,10

Увеличение времени ультразвуковой экстракции с 90 до 150 минут не оказывает существенного влияния на выход водно-спиртового экстракта и приводит к снижению содержания гроссгемина в нем (эксперименты 7, 8).

Таким образом, впервые для извлечения гроссгемина из сырья хартолеписа среднего применена ультразвуковая экстракция. Экспериментальным путем установлено, что количественное извлечение гроссгемина из хартолеписа среднего - 98,0 %, обеспечивает однократная ультразвуковая экстракция сырья смесью этанол:вода (1:1) в течение 90 минут, при этом выход водно-спиртового экстракта составляет 1,55 % с содержанием гроссгемина 8,22 %.

На основании полученных результатов, нами рассмотрена возможность совершенствования технологии получения субстанции гроссгемина за счет внедрения ультразвуковой экстракции на стадии извлечения целевого продукта из растительного сырья хартолеписа среднего, для сокращения продолжительности технологического процесса и исключения дорогостоящего токсичного растворителя этилацетата.

Сравнение основных показателей технологии получения субстанции

гроссгемина с экстрагированием сырья хартолеписа среднего этилацетатом на водяной бане и с применением ультразвуковой экстракции представлено в таблице 9.

Таблица 9 - Сравнение основных показателей технологии получения субстанции гроссгемина с экстрагированием сырья хартолеписа среднего этилацетатом на водяной бане и с применением ультразвуковой экстракции

Показатели	Экстракция этилацетатом на водяной бане	Ультразвуковая экстракция	Эффективность
Временные затраты на экстракцию 10 кг растительного сырья	3 рабочих дня	0,5 рабочего дня	Сокращены в 6 раз
Продолжительность технологического процесса	6 рабочих дней	3 рабочих дня	Сокращена в 2 раза
Производительность технологического процесса	12,7 г	12,7 г	-
Расход растворителей	Этилацетат - 100 кг	Этанол - 50 кг, вода – 50 кг	Снижен в 2 раза; исключен токсичный дорогостоящий растворитель - этилацетат

Как видно из таблицы 9, внедрение ультразвуковой экстракции сырья хартолеписа среднего в технологию получения субстанции гроссгемина, позволит снизить расход растворителей в 2 раза, исключить дорогостоящий токсичный растворитель (этилацетат), сократить время экстракции в 6 раз и общую продолжительность технологического процесса в 2 раза, в результате снизить себестоимость целевого соединения в 5 раз.

Таким образом, впервые проведена ультразвуковая экстракция хартолеписа среднего и определены оптимальные условия количественного извлечения гроссгемина из растительного сырья. Внедрение ультразвуковой экстракции сырья хартолеписа среднего в технологию получения субстанции гроссгемина, за счет снижения расхода экстрагента, исключения использования дорогостоящего токсичного растворителя, сокращения время экстракции и общей продолжительности технологического процесса, позволит снизить себестоимость целевого соединения в 5 раз.

4.2 Подбор оптимальных условий экстракции сырья хартолеписа среднего для количественного извлечения гроссгемина

Для оптимизации стадии экстракции сырья хартолеписа среднего с заменой дорогостоящего экстрагента – этилацетата, на более доступный и сравнительно дешевый этанол, провели серию экспериментальных экстракций сырья хартолеписа среднего 96, 80 и 70 %-ным этанолом.

Сырье хартолеписа среднего (цветочные корзинки, листья), трехкратно экстрагировали этиловым спиртом или его водными растворами (гидромодуль

1:10), экстракт упаривали на ротационном испарителе под вакуумом. Сумму экстрактивных веществ обрабатывали смесью этиловый спирт-вода (2:1), водно-спиртовое извлечение экстрагировали хлороформом и упаривали.

Содержание гроссгемина (8) в экстракте определяли методом ВЭЖХ. Результаты экспериментов приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Содержание гроссгемина в экстракте хартолеписа среднего в зависимости от экстрагента

Экстрагент	Выход экстракта, %	Содержание гроссгемина по данным ВЭЖХ, %
Этанол 96%	12,5	4,6
Этанол 80%	15	0,07
Этанол 70%	15	0,04
Этилацетат	5,25	4,3

Как видно из данных приведенных в таблице 10, количественный выход экстракта наблюдается при использовании этилового спирта с концентрацией 70 и 80 %, при этом содержание гроссгемина в этих экстрактах более чем в 60 раз ниже, чем при экстракции сырья 96 %-ным этиловым спиртом. При этом содержание гроссгемина в спиртовом экстракте сопоставимо с содержанием гроссгемина в этилацетатном экстракте, но выход спиртового экстракта в 2 раза выше этилацетатного.

Преимущества применения в качестве экстрагента этилового спирта по сравнению с этилацетатом представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Сравнение стоимости экстрагентов для извлечения гроссгемина

Экстрагент	Количество на экстракцию 4 кг сырья, кг	Цена, тенге
Этилацетат	45	157 500
Этанол 96%	45	16 256

Как видно из данных приведенных в таблице 11, применение в качестве экстрагента 96%-ного этилового спирта снижает затраты на данной стадии производства в 9,7 раза.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что использование в качестве экстрагента 96%-ного этилового спирта позволяет получить густой экстракт с количественным содержанием гроссгемина (4,6% в пересчете на сумму экстрактивных веществ), при этом производственные издержки на стадии экстракции снижаются в 10 раз.

4.3 Выделение и очистка гроссгемина из спиртового экстракта хартолеписа среднего

В плане снижения производственных затрат проведены эксперименты по фракционированию густого экстракта хартолеписа среднего и получению экстракта с количественным содержанием гроссгемина. Фракционирование проводили по следующей методике: очищенную сумму экстрактивных веществ хартолеписа среднего четырехкратно обрабатывали смесью нефрас-этилацетат

(3:1), каждое извлечение упаривали отдельно. Получены 4 фракции с содержанием гроссгемина в пересчете на экстракт: 5,43%; 12,5%; 25%; 26% соответственно. По результатам анализа объединены фракции 1 и 2, 3 и 4, получены две фракции с выходом 33% и 8 % соответственно в пересчете на массу экстракта.

Проведены исследования по замене дорогостоящих растворителей (петролейный эфир) на стадии хроматографического разделения суммы экстрактивных веществ сырья хартолеписа среднего.

Разделение суммы экстрактивных веществ сырья хартолеписа среднего (в том числе и фракции, полученные из очищенного экстракта хартолеписа среднего) проводят следующим образом: густой экстракт смешивают с силикагелем в соотношении 1:1, смесь высушивают при комнатной температуре и загружают в колонку с силикагелем (соотношение сумма-носитель = 1:15) и элюируют смесью петролейный эфир:этилацетат (80:20), либо смесью нефрас:этилацетат градиентом от 90:10 до 65:35, собирая фракции, содержащие гроссгемин. Элюент упаривают на ротационном испарителе под вакуумом, выпавшие кристаллы технического гроссгемина перекристаллизовывают из этилового спирта. Результаты экспериментов приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Сравнение расхода растворителей и выхода гроссгемина

Система растворителей	Вид экстракта	Продолжительность выделения гроссгемина, день	Количество растворителей 1 раст-ль / 2 раст-ль, кг	Расход растворителей на 1 кг экстракта, кг	Выход гроссгемина в пересчете на экстракт, %
Петролейный эфир-этилацетат 80:20	Очищенный этилацетатный экстракт	11	17,5/6,6	60	1,32
Нефрас-этилацетат 90:10 до 65:35	Очищенный этилацетатный экстракт	6	10/2,85	67	0,94
Нефрас-этилацетат 70:30	Фракция 3-4 этилацетатного экстракта	4	1,7/0,7	60	6,25

Таким образом, в ходе экспериментов при использовании систем растворителей с нефрасом, время элюирования фракций, содержащих гроссгемин, сокращено в 2,5 раза. При этом расход растворителей, требуемых для разделения 1 кг экстракта одинаков. Это показывает целесообразность предварительного фракционирования очищенной суммы экстрактивных веществ и применения нефрасосодержащих систем растворителей.

4.4 Разработка экономичной технологии получения гроссгемина из лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего

На основании полученных результатов разработана экономичная технология получения субстанции гроссгемина из хартолеписа среднего, которая включает в себя экстракцию растительного сырья 96% этиловым спиртом и выделение целевого продукта с использованием в качестве элюента смеси нефраса и этилацетата.

Сравнение основных показателей разработанной экономичной технологии производства гроссгемина с ранее используемой представлено в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнение основных показателей производства гроссгемина с использованием ранее применяемой (КТ) и оптимизированной технологий (ОТ)

Показатели	КТ	ОТ	Эффективность
Экстракция хартолеписа среднего			
Масса сырья хартолеписа среднего	40 кг	40 кг	-
Расход экстрагента	Этилацетат - 450 кг (Стоимость 1 575 000 тенге)	96% этиловый спирт - 450 кг (Стоимость 162 560 тенге)	Затраты снижены в 9,7 раза, исключен дорогостоящий растворитель - этилацетат
Продолжительность экстракции	40 рабочих дней	10 рабочих дней	Сокращена в 4 раза
Выход экстракта	5,25 %	12,5 %	Увеличен в 2,4 раза
Содержание гроссгемина в экстракте	4,3 %	4,6 %	Увеличен на 0,3%
Предварительное фракционирование	-	4-х кратная обработка смесью нефрас/этилацетат (3:1)	Предварительная стадия очистки
Хроматографическое разделение суммы экстрактивных веществ			
Продолжительность хроматографического разделения	20 рабочих дней	20 рабочих дней	-
Производительность технологического процесса	0,5 кг	2,5 кг	Увеличена в 5 раз
Выход гроссгемина (в пересчете на массу экстракта)	1,32 %	6,25 %	Увеличен в 4,7 раза
Расход растворителей	Смесь петролейный эфир/этилацетат – 2400 кг (Стоимость 10584000 тенге)	Смесь нефрас/этилацетат – 2400 кг (Стоимость 4346000 тенге)	Затраты снижены в 2,4 раза, исключен дорогостоящий растворитель - петролейный эфир

Как видно из таблицы 13, разработанная технология имеет ряд преимуществ, исключение использования этилацетата на стадии экстракции, позволило сократить продолжительность экстрагирования в 4 раза и повысить выход экстракта в 2,4 раза, при этом сократить затраты почти в 10 раз. Исключение применения петролейного эфира на стадии хроматографического разделения, привело к увеличению производительности технологического процесса в 5 раз и выхода субстанции гроссгемина в 4,7 раза, при этом сократить затраты в 2,4 раза.

Таким образом, применение разработанной экономичной технологии получения субстанции гроссгемина, путем исключения использования дорогостоящих растворителей на стадиях экстракции и выделения, позволило сократить продолжительность и повысить производительность технологического процесса, сократить затраты и снизить себестоимость целевого продукта в 9 раз.

4.5 Исследование показателей качества субстанции гроссгемина, полученной с применением экономичной технологии

Независимо от технологии получения, целевой продукт должен соответствовать всем требованиям АНД, который регламентирует качество субстанции гроссгемина.

Поэтому проведены исследование физико-химических характеристик и оценка качества субстанции гроссгемина, полученной с применением экономичной технологии, согласно проекта АНД на 5 сериях опытно-промышленной партии (таблица 14).

Описание: субстанция гроссгемина представляет собой белый или белый с желтоватым оттенком кристаллический порошок, без запаха.

Растворимость: растворим в 96 % этаноле *P*, легко растворим в этилацетате *P*, хлороформе *P*, практически не растворим в воде *P*.

Идентификация: А. Инфракрасный спектр поглощения (2.2.24) субстанции гроссгемина, полученный в дисках с калия бромидом *P* (3 мг в 300 мг калия бромида), в области от 3800 см⁻¹ до 600 см⁻¹, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3474 (ОН), 1740 (С=О γ -лактона), 1648 (С=С), 1399, 1167 (экзоциклическая метиленовая группа, сопряженная с карбонилем γ -лактона), 977, 921, 822, 685, 562, 482 см⁻¹.

В. Ультрафиолетовый спектр 0.01 % раствора субстанции гроссгемина в 96 % этаноле *P* в области длин волн от 190 нм до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 201±2 нм.

С. К 20 мг субстанции гроссгемина прибавляют 1 каплю раствора ванилина в кислоте серной, появляется фиолетовое окрашивание (терпеноиды).

Температура плавления: субстанция гроссгемина имеет температуру плавления от 200 °С до 203°С.

Микробиологическая чистота: определение микробиологической чистоты исследуемых образцов субстанции гроссгемина проведено в соответствии с требованиями ГФ XI, вып.2, с.193, изменение № 3, категория 1. 2 Б. Субстанция

в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В 1 г субстанции допускается наличие не более 1000 бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Не допускается наличие *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Наличие бактерий, дрожжевых и плесневых грибов в субстанции субстанции гроссгемина не установлено.

Этанол. Не более 0.5 % (м/м). Определение проводят методом газовой хроматографии (2.2.28).

Раствор внутреннего стандарта. 0.5 мл пропанола *P* доводят углерода тетрахлоридом *P* до объема 100.0 мл.

Испытуемый раствор. Около 150 мг (точная навеска) стандартного образца гроссгемина растворяют в 3 мл раствора внутреннего стандарта.

Раствор сравнения. По 0.5 мл этанола *P* и пропанола *P* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят углеродом четыреххлористым *P* до объема 100.0 мл и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- колонка капиллярная, размером 30 м x 0.25 мм, покрытая пленкой сополимера фенил-диметилполисилоксана (5:95) толщиной 0.25 мм;
- газ-носитель *аргон для хроматографии*, скорость 20 мл /мин;
- скорость водорода 40 мл /мин;
- скорость воздуха 400 мл /мин;
- температура колонки 30 °С;
- температура детектора 120 °С;
- температура испарителя 100 °С.

Хроматографируют 0,2 мкл раствора сравнения.

Таблица 14 - Показатели качества субстанции гроссгемина

Показатели качества	Методы испытаний	Нормы отклонений	Серия				
			040115	050115	060115	070115	080115
Описание	Визуально	Кристаллический порошок белого с желтоватым оттенком цвета, без запаха.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Растворимость	ГФ РК I, т. 1, 1.4	Растворим в 96 % этаноле <i>P</i> , легко растворим в этилацетате <i>P</i> , хлороформе <i>P</i> , практически не растворим в воде <i>P</i> .	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация: - гроссгемин	ИК-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, 2.2.24	ИК-спектр: 3474 (ОН), 1740 (С=О γ -лактона), 1648 (С=C), 1399, 1167 (экзоциклическая метиленовая группа, сопряженная с карбонилем γ -лактона), 977, 921, 822, 685, 562, 482 см^{-1} .	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
- гроссгемин	УФ-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, 2.2.25	УФ-спектр: 201 \pm 2 нм.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
- терпеноиды	В соответствии с АНД	К 20 мг стандартного субстанции гроссгемина прибавляют 1 каплю раствора ванилина в кислоте серной; появляется фиолетовое окрашивание.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Температура плавления	ГФ РК I, т. 1, 2.2.14	От 200 до 203 °С.	200-202	201-203	200-202	201-203	200-202
Вода	ГФ РК I, т. 1, 2.5.12	Не более 0.5 %	0,32	0,28	0,29	0,28	0,29
Остаточные количества органических растворителей (этанол)	ГХ, ГФ РК I, т. 1, 2.2.28	Не более 0.5 %	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
Родственные примеси	ВЭЖХ ГФ РК I, т. 1, 2.2.29	Не более 2.0 %.	1,47	0,24	0,24	0,24	0,24
Количественное определение	В соответствии с АНД	Не менее 97.0 %.	98,18	99,46	99,45	99,46	99,45

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику этанола составляет не менее 30000 теоретических тарелок;
- коэффициент симметрии пика этанола составляет не более 2 %;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика этанола составляет не более 2 %.

Хроматографируют 0,2 мкл испытуемого раствора.

Содержание этанола в стандартном образце в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot S_{on} \cdot f}{S_{in} \cdot S_0 \cdot m},$$

- где: S_1 – площадь пика этанола на хроматограмме испытуемого раствора;
 S_{in} – площадь пика внутреннего стандарта (пропанола) на хроматограмме испытуемого раствора;
 S_{on} – площадь пиков внутреннего стандарта (пропанола), на хроматограмме раствора сравнения;
 S_0 – площадь пика этанола на хроматограмме раствора сравнения;
 m – масса навески стандартного образца в миллиграммах;
 V_0 – объем растворителя в растворе сравнения в миллилитрах;
 p – плотность этанола;
 P – содержание этанола в образце этанола в процентах;
 3 – разведение;
 f – фактор пересчета, равный

$$f = \frac{V_0 \cdot p \cdot 3 \cdot P}{100}$$

Содержание C_2H_5OH (этанола) в субстанции гроссгемина должно быть не более 0,5 %.

Количественное определение. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (2.2.29), используя метод внешнего стандарта.

Около 25 мг (точная навеска) субстанции субстанция гроссгемина помещают в мерную колбу вместимостью 25 растворяют в 10 мл подвижной фазе и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

По 20 мкл полученного фильтрата и раствора СО гроссгемина попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C18, 4,6x150 мм с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 50:50;
- детектирование при длине волн 204 нм;
- скорость подвижной фазы, 0,5 мл/мин;
- температура колонки – комнатная.

Содержание гроссгемина (X) в субстанции, в процентах вычисляют по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 100} = \frac{S \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m};$$

где S_1 – среднее значение площадей пиков гроссгемина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков гроссгемина, вычисленное из хроматограмм раствора СО гроссгемина;

m_0 – масса навески СО гроссгемина, в миллиграммах;

m – масса навески субстанции гроссгемина, в миллиграммах;

P – содержание гроссгемина в СО гроссгемина, в процентах.

Примечания. Приготовление раствора СО гроссгемина: Около 25 мг (точная навеска) гроссгемина помещают в мерную колбу вместимостью 25 растворяют в 10 мл подвижной фазе и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Проверка пригодности хроматографической системы: Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность аналитической колонки, рассчитанная по пику СО гроссгемина на хроматограмме СО гроссгемина, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок;

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика СО гроссгемина на хроматограмме СО гроссгемина при 5 повторных инъекциях должно быть не более 2 %;

- коэффициент симметрии пика, рассчитанный для пика СО гроссгемина на хроматограмме СО гроссгемина должно быть не более 2.

Содержание $C_{15}H_{18}O_4$ (гроссгемина) в исследуемых образцах субстанции гроссгемина должно составлять не менее 97,0 % (рисунок 4).

Вода (2.5.12). Не более 0.5 %. Определение проводят из 0.150 г субстанции гроссгемина.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

Для проверки срока хранения субстанции гроссгемина нами исследована стабильность 3 серий опытной партии, заложенных на хранение в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С. Субстанцию гроссгемина хранили по 0.1 кг или 0.2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

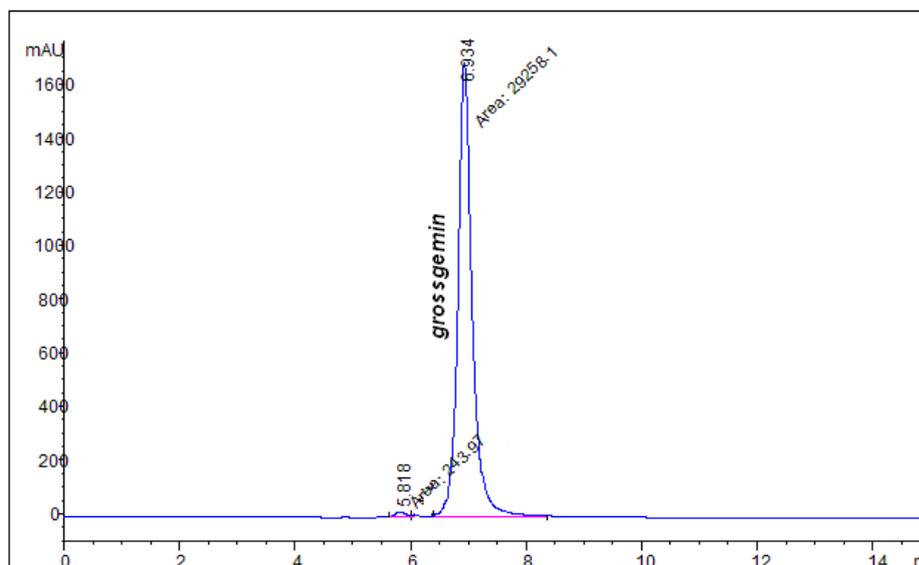


Рисунок 4 – Хроматограмма субстанции гроссгемина серия 040115

Контроль основных показателей качества проводили сразу после производства субстанции гроссгемина, затем через каждые 3 месяца в течение первого полугодия и каждые 6 месяцев в течение последующего периода (в соответствии с требованиями ГФ РК и проекта аналитического нормативного документа на субстанцию гроссгемина).

Показатели качества субстанции гроссгемина всех серий соответствовали проекту аналитического нормативного документа «Гроссгемин субстанция» в течение всего периода хранения (таблица 15). По результатам исследования подтвержден срок хранения субстанции гроссгемина 2 года.

Таким образом, исходя из полученных данных установлено, что показатели качества субстанции гроссгемина, полученной с применением ультразвуковой экстракции хартолеписа среднего, соответствует всем требованиям нормативной документации.

4.6 Разработка опытно-промышленного регламента на производство субстанции гроссгемина

На основе экономической технология разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции гроссгемина (Приложение А).

Наименование продукции. Субстанция гроссгемина.

Краткое описание внешнего вида и физико-химических свойств продукции:

Гроссгемин [3-оксо-8-гидрокси-1,5,7 α ,4,8 β (H)-гвай-10(14),11(13)-диен-6,12-олид].

Описание. Кристаллический порошок от белого до белого с желтоватым оттенком белого цвета, без запаха. Содержание основного вещества не менее 97 %.

Таблица 15 - Результаты исследования стабильности субстанции гроссгемина, полученной с использованием экономичной технологии

Номер серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Идентификация	Температура плавления	Вода	Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Родственные примеси	Количественное определение
Серия 010215	09.02.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,32	0,03	1,47	98,18
	11.05.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,25	99,43
	10.08.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
	09.11.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
	11.02.16	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
	15.08.16	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
	06.02.17	не соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
Серия 010315	06.03.15	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,28	0,02	0,24	99,46
	09.06.15	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,29	0,02	0,25	99,44
	08.09.15	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,31	0,02	0,24	99,43
	08.12.15	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,31	0,02	0,24	99,43
	09.03.16	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,31	0,02	0,24	99,43
	12.09.16	соответствует	соответствует	соответствует	201-203	0,31	0,02	0,24	99,43
	06.03.17	не соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44
Серия 020315	10.03.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,25	99,43
	10.06.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43
	10.09.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43
	11.12.15	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43
	11.03.16	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43
	12.09.16	не соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,31	0,02	0,24	99,43
	13.03.17	соответствует	соответствует	соответствует	200-202	0,30	0,02	0,24	99,44

Растворимость. Растворим в спирте этиловом 96 %, легко растворим в этилацетате, хлороформе, практически нерастворим в воде очищенной.

Подлинность. Инфракрасный спектр поглощения субстанции, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 см⁻¹, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3474 (ОН), 1740 (С=О γ-лактона), 1648 (С=C), 1399, 1167, 977, 921, 822, 685, 562, 482.

При добавлении к субстанции капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора субстанции в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 201±2 нм.

Элементный анализ: найдено %: С 68.80; Н 6.89; вычислено %: С 68.70; Н 6.87.

Чистота и подлинность гроссгемина определяется методом ВЭЖХ на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series в изократическом режиме и составляет не менее 97 %. Время удерживания гроссгемина: 7,0±1,0 мин.

Условия проведения качественного анализа методом обращенно-фазовой ВЭЖХ:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈, 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: метанол-вода (1:1);
- детектирование при длине волны 204 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,500 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обработку результатов проводят с использованием программного обеспечения ChemStation.

Температура плавления. От 201 до 203 °С (спирт этиловый).

Нормативные требования к упаковке, маркировке, транспортированию и хранению.

Упаковка. По 0.1 кг или 0.2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

Маркировка. На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название препарата на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е.

Хранение. В прохладном, защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С.

Срок годности 3 года.

Химические превращения при производстве субстанции гроссгемина отсутствуют, поэтому химическая схема не приводится.

Технологическая схема производства субстанции гроссгемина из спиртового экстракта хартолеписа среднего представлена на рисунке 5.

Аппаратурная схема производства субстанции гроссгемина из спиртового экстракта хартолеписа среднего приведена на рисунке 6.

Изложение технологического процесса

Стадии вспомогательных работ

ВР.1 - Подготовка сырья, экстрагента

При сушке сырья хартолеписа среднего теряется 60 % влаги, в таком случае:

Масса сухого неизмельченного сырья составит:

$$M_{\text{сухого сырья}} = \frac{357,25 * 40\%}{100\%} = 142,9 \text{ кг}$$

Потери влаги при этом составляют 357,25-142,9=214,35 кг.

При измельчении сырья хартолеписа среднего теряется 60 %, тогда масса сухого измельченного сырья составит:

$$M_{\text{сухого измельченного сырья}} = \frac{142,9 * 40\%}{100\%} = 57,16 \text{ кг}$$

Потери сырья при этом: 142,9-57,16 = 85,74 кг.

При просеивании сухого измельченного сырья теряется 3 %, что составляет:

$$M_{\text{потери}} = \frac{57,16 * 3\%}{100\%} = 1,71 \text{ кг}$$

Масса просеянного сухого измельченного сырья:

$$M_{\text{сырье}} = \frac{57,16 * 100\%}{97\%} = 58,83 \text{ кг}$$

ВР 1.1 Сушка травы хартолеписа среднего

Надземная часть (цветочные корзинки, листья, стебли) хартолеписа среднего сушится в специальном сухом помещении с хорошей циркуляцией воздуха и отсутствием прямых солнечных лучей. Сухое сырье хартолеписа среднего передается на ВР 1.2.

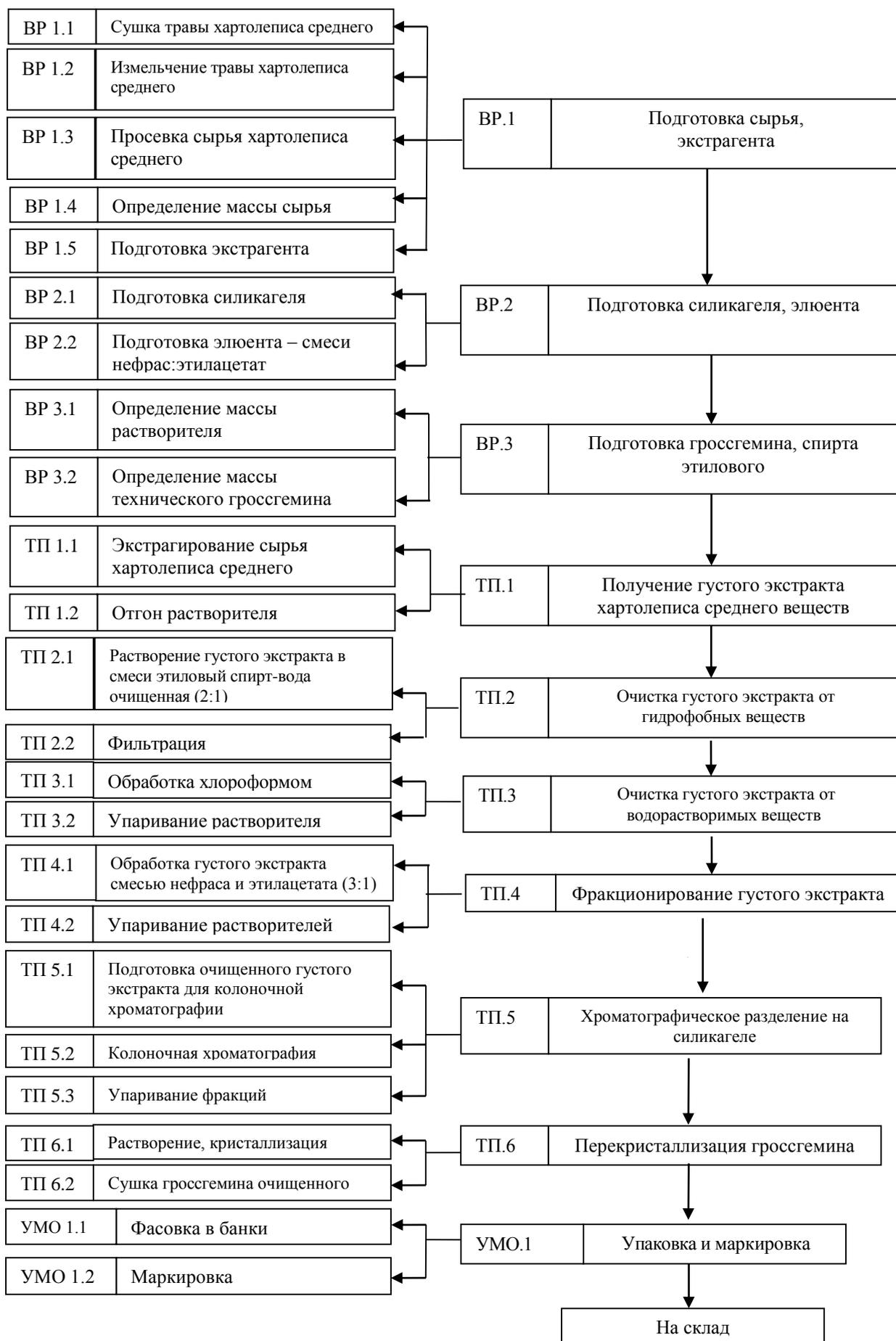


Рисунок 5 - Технологическая схема производства субстанции гроссгемина

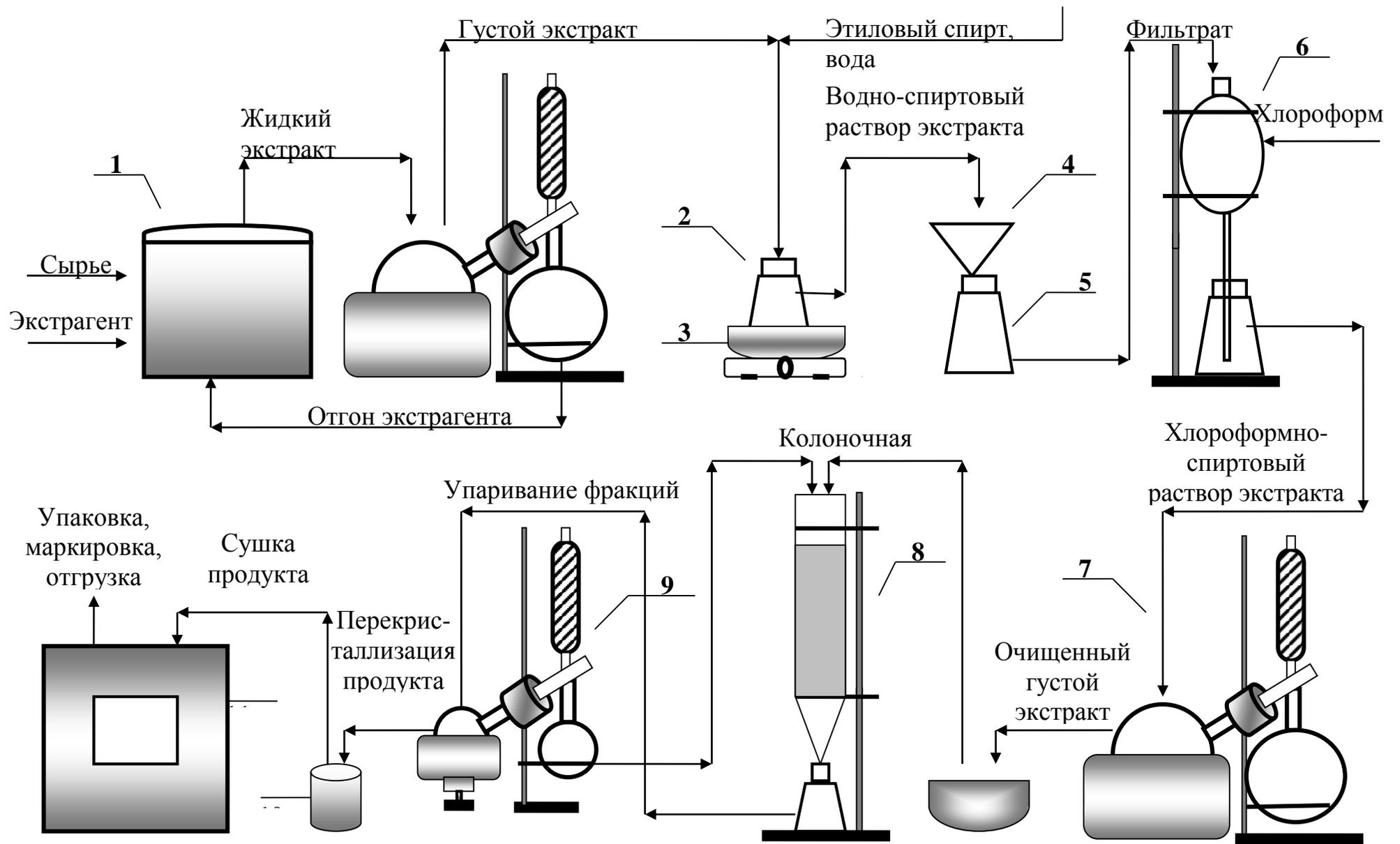


Рисунок 6 - Аппаратурная схема выделения субстанции гроссгемина

ВР 1.2 Измельчение травы хартолеписа среднего

Из сухого сырья хартолеписа среднего удаляются стебли. Цветочные корзинки и листья измельчают на ножевой мельнице для тонкого измельчения до 8 мм. Сухое измельченное сырье хартолеписа среднего передается на ВР 1.3.

ВР 1.3 Просеивание сырья хартолеписа среднего

Сухое измельченное сырье хартолеписа среднего просеивают через сита с диаметром отверстий 5 мм.

В сухом измельченном просеянном сырье хартолеписа среднего проводится определение количественного содержания гроссгемина методом ВЭЖХ.

Определение количественного содержания гроссгемина в сырье хартолеписа среднего проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈, 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 1:1;
- детектирование при длине волны 204 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,500 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Сухое измельченное просеянное сырье хартолеписа среднего передается на ВР 1.4.

ВР 1.4 Определение массы сырья

Сухое измельченное просеянное сырье хартолеписа среднего взвешивают на медицинских весах РП-150 по 8,0 кг. 8,0 кг хартолеписа среднего помещают в 10 мешочков, сшитых из «бязи», по 0,8 кг в каждом. Сухое измельченное просеянное сырье хартолеписа среднего определенной массы передается на ТП 1.1.

ВР 1.5 Подготовка экстрагента

Готовят 80,0 кг этилового спирта 96%. Этиловый спирт определенной массы передается на ТП 1.1.

ВР.2 - Подготовка силикагеля, элюента

ВР 2.1 Подготовка силикагеля

Силикагель марки КСК (не белее 0,3 мм) прокаливают в сухожаровом шкафу при температуре 300-400⁰С в течение 24 часов. Затем его взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г.) 4,0 кг (точная навеска). Прокаленный силикагель определенной массы передается на ТП 4.1.

ВР 2.2 Подготовка элюента – смеси нефрас:этилацетат

В бутылку объемом 20 литров приливают 10,5 кг нефраса и 4,5 кг этилацетата, перемешивают. Смесь нефрас-этилацетат (70:30) передается на ТП4.1.

ВР.3 - Подготовка гроссгемина, спирта этилового

ВР 3.1 Определение массы растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,3 л этилового спирта и передают на ТП 5.1.

ВР 3.2 Определение массы технического гроссгемина

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г.) 30,0 гр. (точная навеска) гроссгемина и передают на ТП 5.1.

Стадии технологического процесса

ТП.1 – Получение густого экстракта хартолеписа среднего

Выход густого экстракта из сырья хартолеписа среднего составляет 14.75 %, таким образом, при экстракции сырья в количестве 55,45 кг масса густого экстракта составит:

$$M_{\text{густого экстракта}} = \frac{55.45 * 14.75\%}{100\%} = 8.18 \text{ кг}$$

Для экстракции сырья хартолеписа среднего гидромодуль равен 10, исходя из этого для проведения экстракции сырья хартолеписа среднего в количестве 55,45 кг необходимо 554,5 кг этанола.

При экстракции сырья хартолеписа среднего в количестве 4 кг (масса этанола 40 кг) масса жидкого экстракта составляет 29,5 кг, в таком случае при экстракции сырья в количестве 55,45 кг масса жидкого экстракта будет равна:

$$M_{\text{жидкого экстракта}} = \frac{(55.45 + 554.5) * 29.5}{44} = 408.94 \text{ кг}$$

ТП 1.1 Экстрагирование сырья хартолеписа среднего

8 кг травы хартолеписа среднего в 10 мешочках, сшитых из «бязи», по 0,8 кг в каждом, помещают в емкость для экстрагирования сырья, затем заливают заранее приготовленный экстрагент – этиловый спирт 96% в количестве 80,0 кг, экстрагируют при температуре 70⁰С. После охлаждения жидкий экстракт сливают и экстракцию повторяют еще 2 раза при тех же условиях. Жидкий экстракт поступает на ТП 1.2.

ТП 1.2 Отгон растворителя

По истечении времени экстрагирования, жидкий экстракт заливают в роторный испаритель. В роторном испарителе проводится процесс сгущения жидкого экстракта при температуре 60⁰С. Полученный густой экстракт поступает на ТП 2.

Потери экстрагента при 3-х кратной экстракции составляют 40%. Соответственно при экстракции сырья хартолеписа среднего из 408,94 кг жидкого экстракта потери экстрагента составят:

$$M_{\text{потери этилового спирта}} = \frac{408.94 * 40}{100\%} = 163.57 \text{ кг}$$

Масса шрота составит:

$$M_{\text{шрот}} = 609,95 - 408,94 - 163,57 = 37,44 \text{ кг}$$

Потери растворителя при упаривании составляют 5%:

$$M_{\text{потери}} = \frac{408,94 * 5}{100\%} = 20,44 \text{ кг}$$

Масса рекуперата этанола при этом составит:

$$M_{\text{рекуперат этанола}} = 408,94 - 8,18 - 20,44 = 380,32 \text{ кг};$$

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.1), а именно, на получение 6651,16 кг густого экстракта хартолеписа среднего составляют 17186 рабочих дней.

ТП 2 - Очистка густого экстракта от гидрофобных веществ

ТП 2.1 Растворение густого экстракта в смеси этиловый спирт-вода очищенная (2:1)

Полученный в ТП 1.2 густой экстракт помещают в плоскодонную коническую колбу и при постоянном перемешивании растворяют в горячем 96 % - ном этаноле при температуре 70°C и добавляют воды очищенной, нагретой до аналогичной температуры (соотношение масса густого экстракта - масса этилового спирта 1:2; соотношение массы этилового спирта - масса воды 2:1). Полученный раствор оставляют в темном месте на сутки для охлаждения, при этом образуется темно-зеленый коагулянт. Полученный водно-спиртовой раствор экстракта передается на ТП 2.2.

Выход густого экстракта после водно-спиртовой и хлороформной обработки согласно проведенным экспериментам составляет 45,45 %, таким образом:

$$M_{\text{очищенного экстракта}} = \frac{8,18 * 45,45\%}{100\%} = 3,72 \text{ кг}$$

Для проведения водно-спиртовой обработки густого экстракта хартолеписа среднего из 7,5 кг экстракта необходимо этилового спирта в количестве:

$$M_{\text{этанол}} = 8,18 * 3 = 24,55 \text{ кг};$$

Дистиллированной воды в таком случае требуется:

$$M_{\text{очищенная вода}} = 8,18 * 1,5 = 12,27 \text{ кг};$$

При проведении водно-спиртовой обработки из 6,28 кг водно-спиртового раствора образуется 0,03 кг балласта, что составляет 0,47 %. Таким образом, при получении водно-спиртового раствора массой (8,18+24,55+12,27 = 45,0 кг) образуется балласта

$$M_{\text{балласт}} = \frac{45,0 * 0,47}{100\%} = 0,21 \text{ кг}$$

ТП 2.2 Фильтрация

Водно-спиртовой раствор экстракта фильтруют через бумажный фильтр. Полученный осадок (гидрофобный балласт: липиды, хлорофиллы и т.д.) возвращают на ТП 2.1 для повторной обработки, затем для третьей обработки. Фильтраты объединяют и передают на ТП 3.

Из 6,28 кг водно-спиртового раствора образуется 5,73 кг фильтрата, соответственно при проведении водно-спиртовой обработки фильтрата в количестве 45,0 кг образуется

$$M_{\text{фильтрат}} = \frac{5,73 \cdot 45,0}{6,28} = 41,05 \text{ кг}$$

$$M_{\text{потери}} = 45,0 - 41,05 - 0,21 = 3,74 \text{ кг.}$$

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.2), а именно, на получение 13286,23 кг фильтрата хартолеписа среднего составляют 9627 рабочих дней.

ТП 3 - Очистка густого экстракта от водорастворимых веществ

ТП 3.1 Обработка хлороформом

Для отделения водного слоя фильтрат помещают в делительную воронку объемом 2 литра и обрабатывают хлороформом в соотношении фильтрат-хлороформ 3:1 3 раза. Водный слой отделяют и утилизируют, а хлороформно-спиртовой раствор экстракта передают на ТП 3.2.

Для проведения хлороформной обработки фильтрата необходимо хлороформа в количестве:

$$M_{\text{хлороформ}} = \frac{41,05}{3} = 13,68 \text{ кг};$$

При проведении хлороформной обработки фильтрата в количестве 5,73 кг образуется 1,65 кг воды, что составляет 28,79 %, соответственно при проведении обработки 41,05 кг фильтрата хлороформом образуется водный слой в количестве:

$$M_{\text{водного извлечения}} = \frac{41,05 \cdot 28,79}{100\%} = 11,82 \text{ кг}$$

Таким образом, масса хлороформно-спиртового раствора составляет:

$$M_{\text{хлороформно-спиртовый раствор}} = 41,05 + 13,68 - 11,82 = 42,91 \text{ кг};$$

ТП 3.2 Упаривание

Хлороформно-спиртовое извлечение упаривается на ротационном испарителе при температуре 60 °С до образования густого экстракта. Очищенный густой экстракт передается на ТП 4.

Из хлороформно-спиртового раствора массой 41,05 кг на данной стадии образуется 3,72 кг очищенного экстракта.

Потери растворителей при упаривании составляют:

$$M_{\text{потери}} = \frac{(41,05 - 3,72) \cdot 10\%}{100\%} = 3,73 \text{ кг}$$

Масса рекуперата смеси хлорофом:этанол в таком случае составит:

$$M_{\text{хлорофом:этанол}} = 41,05 - 3,72 - 3,73 = 33,60 \text{ кг.}$$

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.3), а именно, на получение 3903,30 кг очищенного густого экстракта хартолеписа среднего составляют 14297 рабочих дней.

ТП 4 - Фракционирование густого экстракта

ТП 4.1 Обработка густого экстракта смесью нефрас:этилацетат (3:1)

Полученный на стадии ТП 3.2 очищенный густой экстракт помещают в круглодонную колбу и заливают смесью нефрас:этилацетат (3:1). Полученный раствор перемешивают без вакуума на ротационном испарителе при температуре 60°C в течение 2 часов. Растворившуюся часть сливают через воронку в круглодонную колбу и передают на стадию ТП 4.2.

Масса растворителей (нефрас:этилацетат – 3:1) при фракционировании превышает массу густого обработанного экстракта в 10 раз, таким образом, для фракционирования 3,72 кг густого экстракта необходимо смеси в количестве 37,2 кг, что составляет 11,16 кг этилацетата и 26,04 кг нефраса.

Выход фракции, обогащенной гроссгемином после стадии фракционирования составляет 43%, таким образом:

$$M_{\text{фракции, обогащенной гроссгемином}} = \frac{3,72 * 43\%}{100\%} = 1,6 \text{ кг}$$

ТП 4.2 Упаривание

Полученную фракцию на стадии ТП 4.1 упаривают на ротационном испарителе при температуре 60°C до образования густого экстракта, после чего передают на стадию 5.1.

Возврат растворителей при этом составляет 90 %, соответственно:

$$M_{\text{рекуперат}} = 37,2 * 90\% / 100\% = 33,48 \text{ кг}$$

Потери растворителей составляют 10 % = 3,72 кг.

Масса балласта в таком случае составит:

$$M_{\text{балласт}} = 40,92 - 1,6 - 33,48 - 3,72 = 2,12 \text{ кг.}$$

ТП 5. Хроматографическое разделение на силикагеле

ТП 5.1 Подготовка очищенного густого экстракта для колоночной хроматографии

Очищенный густой экстракт массой 0,275 кг в испарительной колбе, полученный на стадии ТП 4.2, взвешивают на технических весах. Из испарительной колбы экстракт сливают в выпарительную фарфоровую чашку, остатки экстракта со стенок колбы смывают небольшим количеством этилацетата (0,2 кг). Смыв объединяют вместе с густым экстрактом в выпарительной чашке и

тщательно перемешивают до получения однородной массы достаточно жидкой консистенции. К растворенному экстракту добавляют силикагель в соотношении 1:1,5 (0,4 кг) и тщательно перемешивают до получения однородной кашицеобразной массы. Сгущенный экстракт, смешанный с силикагелем, раскладывают на ровную поверхность (противень из нержавеющей стали или стекло) тонким слоем для быстрого испарения этилацетата под вытяжной вентиляцией. Сухой экстракт с силикагелем измельчают, взвешивают, его масса составляет 0,675 кг и передают на ТП 4.2

Для проведения колоночной хроматографии необходимо обработанного силикагеля в количестве $1,6 \cdot 10 = 16,0$ кг;

Для подготовки смолки необходимо силикагеля в соотношении к экстракту 1:1, т.е. 1,6 кг;

ТП 5.2 Колоночная хроматография

Используется колонка $d = 0,1$ м, $l = 2,0$ м.

Хроматографическая колонка заполняется силикагелем «мокрым способом», а именно, в коническую колбу объемом 1 л засыпается силикагель, приливается нефрас, смесь перемешивается и заливается в колонку. Масса силикагеля 1,1 кг, объем нефраса 2,0 л. Затем в колонку засыпают сухой экстракт с силикагелем.

Колонку элюируют смесью нефрас-этилацетат 70:30. Собирают фракции объемом 1,0 л и передают на ТП 4.3.

Расход нефраса для выделения гроссгемина методом колоночной хроматографии составляет 1,08 кг/г. Исходя из этого, масса нефраса необходимого для наработки 0,1 кг гроссгемина составляет:

$$M_{\text{нефрас}} = 1,08 \cdot 100 = 108 \text{ кг};$$

Масса этилацетата соответственно:

$$M_{\text{этилацетат}} = \frac{108 \cdot 30}{70\%} = 46,28 \text{ кг}$$

ТП 5.3 Упаривание фракций

Фракции, полученные на ТП 4.2, упаривают на ротационном испарителе. Сухой остаток фракций контролируют по ТСХ и объединяют этилацетатом. Фракции, содержащие гроссгемин, промывают этиловым спиртом и высушивают. Гроссгемин технический передают на ТП. 6.

Выход технического гроссгемина из обогащенной фракции гроссгемином составляет 8,37%, таким образом из 1,6 кг обогащенной фракции гроссгемином получим технический гроссгемин в количестве:

$$M_{\text{технический гроссгемин}} = \frac{1,6 \cdot 8,93}{100} = 0,14288 \text{ кг}$$

Потери растворителей при упаривании элюента на ротационном испарителе составляют 15 %, соответственно при проведении колоночной хроматографии

будет утеряно:

$$M_{\text{потери элюента}} = \frac{154,28 * 15}{100} = 23,142 \text{ кг}$$

В таком случае масса рекуперата смеси нефрас:этилацетат составит:

$$154,28 + 3,2 + 16,0 - 0,131 - 23,142 - 18,24 = 131,97 \text{ кг};$$

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП. 5), а именно, на получение 106,30 кг гроссгемина технического составляют 94703 рабочих дней.

Стадия ТП 6. Перекристаллизация гроссгемина

ТП 6.1 Растворение, кристаллизация

Гроссгемин технический, полученный на стадии ТП. 5, подвергают перекристаллизации. Испарительную колбу с гроссгемином техническим устанавливают на водяную баню при температуре 80-90 °С и растворяют в этиловом спирте. Этиловый спирт добавляют постепенно до момента полного растворения гроссгемина. Чтобы снизить потери спирта используют обратный холодильник.

После полного растворения гроссгемина колбу снимают с водяной бани и постепенно охлаждают (сначала при комнатной температуре 1 час, затем в холодильнике при 25 °С – 1 час). При этом в колбе постепенно начинают выпадать кристаллы гроссгемина в виде мелкого кристаллического порошка.

Полученный очищенный гроссгемин передают на ТП 5.2.

Для проведения перекристаллизации гроссгемина технического необходим этиловый спирт в 20 раз превышающий массу технического гроссгемина, соответственно:

$$M_{\text{этанол}} = 0,131 * 20 = 2,62 \text{ кг};$$

Выход готового продукта при перекристаллизации технического гроссгемина составляет 77 %, т.е. из 0,131 кг технического гроссгемина получим:

$$M_{\text{очищенный гроссгемин}} = \frac{0,131 * 77}{100\%} = 0,101 \text{ кг}$$

Потери этанола составляют 10 %, таким образом:

$$M_{\text{потери этанола}} = \frac{2,62 * 10}{100\%} = 0,262 \text{ кг}$$

Масса рекуперата этанола равна:

$$M_{\text{рекуперат этанола}} = 2,62 + 0,131 - 0,262 - 0,544 - 0,101 = 1,844 \text{ кг}.$$

ТП 6.2 Сушка гроссгемина очищенного

После кристаллизации гроссгемин сушат сначала на фильтре под вытяжной вентиляцией в течение 2 часов, а затем переносят в фарфоровую чашку и сушат их в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С и давлении –0,08-(-0,09) мПа

до постоянной массы. Гроссгемин должен иметь вид мелкого кристаллического порошка белого цвета без запаха.

Содержание влаги в очищенном гроссгемине составляет 1 %, таким образом, после высушивания масса очищенного гроссгемина составит:

$$M_{\text{влаги}} = \frac{0,101}{100\%} = 0,001\text{кг}; M_{\text{гроссгемин}} = 0,101 - 0,001 = 0,1 \text{ кг.}$$

Температуру плавления определяют на приборе для определения температуры плавления, которая составляет 201-203 °С (из этилового спирта).

Чистота и подлинность, полученного гроссгемина очищенного, определяется методом ВЭЖХ в условиях описанных выше. Время удерживания гроссгемина 7±1 мин. Чистота гроссгемина очищенного должна составлять не менее 97,0 %.

Инфракрасный спектр поглощения субстанции гроссгемина, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 см⁻¹, должен иметь характеристические полосы поглощения при 3474 (ОН), 1740 (С=О γ-лактона), 1648 (С=С), 1399, 1167, 977, 921, 822, 685, 562, 482.

При добавлении к субстанции капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора субстанции гроссгемина в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 201±2 нм.

Элементный анализ: найдено %: С 68.80; Н 6.89 (данные 3-х анализов); вычислено %: С 68.70; Н 6.87.

Полученный сухой очищенный гроссгемин передается на УМО.1.

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП. 6), а именно, на получение 100 кг субстанции гроссгемина с чистотой не менее 99,0 % составляют 42900 рабочих дней.

6.3 Стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УМО.1 - Упаковка и маркировка субстанции гроссгемина

УМО 1.1 Фасовка в банки

По 0,1 кг или 0,2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

УМО 1.2 Маркировка

На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название препарата на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96. Затем препарат передают на склад.

5 СИНТЕЗ НОВЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ОСНОВЕ ГРОССГЕМИНА

5.1 Получение новых модифицированных производных на основе гроссгемина

Сесквитерпеновые лактоны представляют большую группу природных терпеноидов, часто встречающихся в растительном мире и они обладают противоопухолевой, антималярийной, антимикробной, противогрибковой, противовоспалительной, ростстимулирующей и антифидантной активностями.

Среди них перспективными молекулами считаются содержащие в своей структуре гетероатомы, как хлор, фтор, азот, сера и т.д. По литературным данным фторсодержащие сесквитерпеновые лактоны в природе не обнаружены.

Ранее на основе сесквитерпенового лактона гроссгемина проведен ряд химических превращений: гидрирование, аминирование, ацилирование, окисление, замещение, эпоксицирование и метоксилирование [70-72].

На основе гроссгемина по экзометиленовой группе реакции Михаэля, получен ряд его аминопроизводных, в частности с гидроксиэтил-пиперазином, пиперидином, пирролидином, морфолином, N-гексаметиленимином, циклогексиламином, диалкилфосфитом [70-73], а также синтезирован 13-метоксигроссгемин.

По вторичной гидроксильной группе гроссгемина в положении С-8 получены ацетатное и тозилатное производные. При окислении реагентом Джонса в ацетоне получено 8-кетопроизводное гроссгемина [50]. Восстановление гроссгемина боргидридом натрия в водно-этанольной среде получают 3-гидроксигроссгемин [50].

При эпоксицировании гроссгемина с м-хлорнадбензойной кислотой получают два соединения: 10(14)-эпоксигроссгемин и 3-кето-8-гидрокси-гвай-10(14),11(13)-диен-3(4),6(12)-диолид [71].

На основании анализа вышеприведенных литературных сведений, нами получены 17 новых производных на основе сесквитерпенового лактона гроссгемина: 3 новых фторпроизводных [74], изотиоазолпроизводное и изоаксозолпроизводное [75, 76], хлорпроизводное [77-80], арилпроизводные [81, 82], азиридинпроизводное [83], аминопроизводные [80, 84, 85].

Структуры полученных соединений установлено на основании физико-химических констант и спектральных данных (ЯМР ^1H и ^{13}C , двумерных спектров ЯМР ^1H - ^1H (COSY, NOESY) и ^{13}C - ^1H (COSY, COLOC), а также рентгеноструктурного анализа.

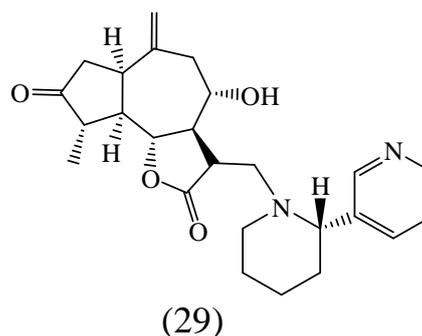
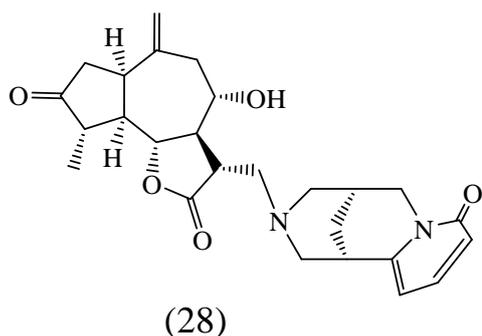
Получение аминопроизводных на основе гроссгемина

Введение атома азота в молекулу сесквитерпеновых лактонов чаще всего осуществляется путем аминирования по типу реакции Михаэля. При этом, нами получены новые гибридные молекулы на основе природных соединений, которые представляют интерес для поиска среди них потенциально биологически активных веществ.

В качестве нуклеофильного реагента использованы алкалоиды цитизин (26) и анабазин (27). В результате реакции получены новые производные (28), (29) строение которых установлено на основании спектральных данных (ИК-, УФ-, ЯМР ^{-1}H , ^{-13}C , DEPT, COSY), масс-спектрометрии, элементного анализа и рентгеноструктурного анализа и сравнением их с литературными данными.

Наличие и количество атомов азота в молекулах (28), (29) подтверждены данными элементного анализа.

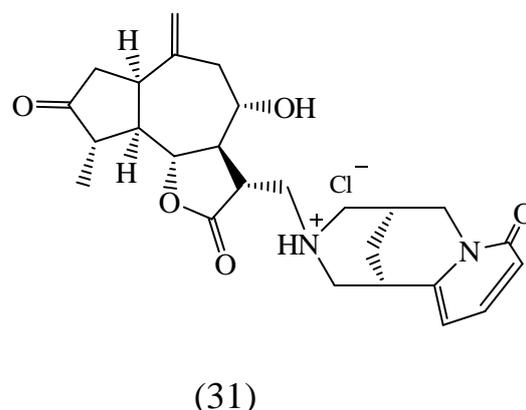
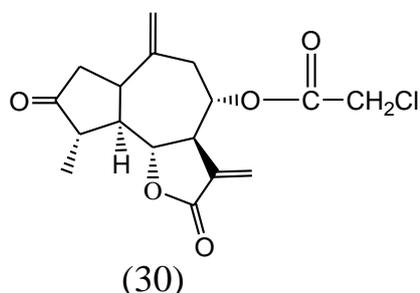
Отсутствие в спектре ПМР сигнала протонов экзометиленовой группы подтверждает присоединение алкалоида (цитизина или анабазина) по экзометиленовой двойной связи γ -лактона [84, 85].



А соединение (28) показывает умеренно-выраженную антимикробную активность в отношении грамположительных штаммов *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, проявляет слабое противовоспалительное действие на модели острой экссудативной реакции и проявляют цитотоксическую активность в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach).

Получение гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Для получения нового производного сесквитерпенового лактона гроссгемина (8) проведена реакция хлоруксусным ангидридом в пиридине, получено новое производное (31).



Соединение (30) показывает умеренно-выраженную антимикробную активность в отношении грамположительных штаммов *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, проявляет слабое противовоспалительное действие на модели острой экссудативной реакции и проявляют цитотоксическую активность в

отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach).

Получение хлорацетилпроизводного гроссгемина

Для получения нового производного сесквитерпенового лактона гроссгемина (8) проведена реакция хлоруксусным ангидридом в пиридине, получено новое производное (30).

В результате изучения биологической активности показало, что 8 α -хлорацетокси-3-оксо-5,7 α ,4,6,8 β (H)-гвай-10(14),11(13)-диен-6,12-олид (хлорацетилгроссгемина) в дозе 50 μ M обладает высокой цитотоксичностью в отношении острой моноцитарной лейкемии (*in vitro*) [79].

Таким образом, на основе гроссгемина синтезировано четыре новых модифицированных производных.

5.2 Установление строения полученных производных на основе гроссгемина

Установление строения цитизинилгроссгемина (3-оксо-8-гидрокси-1,5,7 α ,4,8 β (H)-гвай-10(14)-ен-11(13-цитизинил)-12,6-олид) (28) [85].

Белое кристаллическое вещество с т.пл. 261-263°C, состава C₂₆H₃₂O₅N₂. R_f0.61 (этилацетат-этиловый спирт=4:1). Выход 68%.

Элементный анализ (28): найдено, %: С 69.06, Н 7.25, N 6.24. Вычислено, %; С 69.01, Н 7.13, N 6.19. Найдено: *m/z* 452.2299 [M]⁺. Вычислено: *m/z* 452.2306.

ИК-спектр (KBr, ν_{\max} , см⁻¹) (28): 3441, 3075, 3032, 2987, 2933, 2783, 2359, 1761 (C=O γ -лактона), 1731 (C=O), 1648, 1565, 1576, 1545, 1470, 1454, 1393, 1353, 1341, 1312, 1278, 1240, 1191, 1161, 1075, 1048, 985, 957, 826, 802, 741.

УФ-спектр (EtOH, λ_{\max} , нм) (28): 204, 236, 312.

Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, CDCl₃, δ , м.д., J/Гц) (28): 3.01 (1H, ддд, J=9.3, 8.4, 3.6, H-1), 2.41 (1H, м, H-2a), 2.56 (1H, м, H-2b), 2.37 (1H, м, H-4), 2.16 (1H, к, J=9.1, H-5), 3.84 (1H, т, J=9.4, H-6), 2.22 (2H, м, H-7, H-11) 3.17 (1H, тд, J=9.7, 5.7, H-8), 1.93 (1H, м, H-9a), 2.60 (1H, дд, J=12.7, 5.8, H-9b), 2.65 (1H, дд, J=13.3, 7.4, H-13a), 2.88 (1H, дд, J=13.3, 2.9, H-13b), 4.67 (1H, с, H-14a), 4.93 (1H, с, H-14b), 1.18 (3H, д, J=7.02, H-15), 6.45 (1H, дд, J=9.0, 1.3, H-3'), 7.27 (1H, дд, J=9.0, 6.7, H-4'), 5.97 (1H, дд, J=6.7, 1.1, H-5'), 3.05 (1H, уш.с, H-7'), 1.83 (1H, уш.д, J=12.6, H-8'a), 1.93 (1H, уш.д, J=12.4, H-8'b), 2.47 (1H, уш.с, H-9'), 3.87 (1H, дд, J=15.6, 6.6, H-10'a), 4.05 (1H, д, J=15.6, H-10'b), 2.53 (1H, уш.д, J=11.4, H-11'a), 2.95 (1H, уш.д, J=11.0, H-11'b), 2.44 (1H, уш.д, J=10.3, H-13'a), 3.05 (1H, уш.д, J=10.2, H-13'b).

Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, CDCl₃, δ , м.д., J/Гц) (28): 39.57 (CH, C-1), 43.44 (CH₂, C-2), 219.11 (C=O, C-3), 45.33 (CH, C-4), 50.71 (CH, C-5), 84.27 (CH, C-6), 47.33 (CH, C-7), 74.42 (CH, C-8), 47.33 (CH₂, C-9), 144.46 (C, C-10), 54.05 (CH, C-11), 175.83 (C=O, C-12), 57.49 (CH₂, C-13), 114.42 (CH₂, C-14), 14.74 (CH₃, C-15), 163.71 (C=O, C-2'), 117.53 (CH, C-3'), 138.43 (CH, C-4'), 104.37 (CH, C-5'), 150.30 (C, C-6'), 35.10 (CH, C-7'), 25.76 (CH₂, C-8'), 28.02 (CH, C-9'), 49.70 (CH₂, C-10'), 61.13 (CH₂, C-11'), 60.66 (CH₂, C-13').

Кристаллографические данные соединения (28): моноклинная сингония, *a* = 9.4330(5), *b* = 17.5957(7), *c* = 14.2570(7) Å, β = 92.724(2)°, *V* = 2363.71(19) Å³,

пространственная группа $P2_1$, $C_{26}H_{32}N_2O_5$, $Z = 4$, $d_{\text{выч}} = 1.272 \text{ г/см}^3$, $\mu = 0.088 \text{ мм}^{-1}$. Измерили интенсивности 42341 отражений с $2\theta < 52^\circ$, из них 9322 независимых ($R_{\text{int}} = 0.0340$). Результаты уточнения: $wR_2 = 0.1181$, $R = 0.0542$, $S = 1.031$ для всех отражений, $R = 0.0404$ для 7879 наблюдаемых отражений ($F > 4\sigma(F)$), параметр Флека 0.9(8) и 0.1(8) для энантиомера, CCDC 1578031 (рисунок 7).

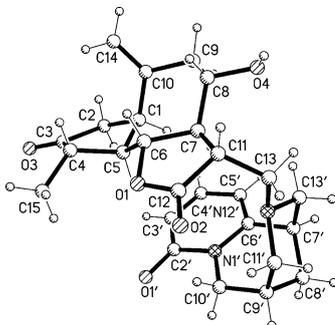


Рисунок 7 - Строение молекул (28), показана одна из двух независимых молекул, по данным РСА

Установление строения анабазинилгроссгемина (3-оксо-8-гидрокси-1,5,7 α ,4,8 β (H)-гвай-10(14)-ен-11(13-анабазинил)-12,6-олид) (29) [85].

Белое порошкообразное вещество с т.пл. 66°C с разл., состава $C_{25}H_{32}O_4N_2$. R_f 0,41 (этилацетат-этиловый спирт=4:1). Выход 68%.

Элементный анализ: найдено, % (29): C 70.95; H 8.09; N 6.37. Вычислено, %; C 70.73, H 7.6, N 6.6.

ИК-спектр (KBr, ν_{max} , см^{-1}) (29): 3451, 3078, 2934, 2856, 2816, 1769 (C=O γ -лактона), 1739 (C=O), 1643, 1591, 1576, 1455, 1427, 1394, 1358, 1302, 1302, 1273, 1189, 1111, 982, 953, 902, 808.

УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм) (29): 203, 263.

Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц) (29): 3.14 (1H, уш.с, H-1), 2.43 (3H, м, H-2a, H-11, H-6'a), 2.53 (2H, м, H-2б, H-13a), 1.86 (3H, м, H-4, H-3'б, H-4'б), 2.22 (3H, м, H-5, H-7, H-9a), 3.88 (1H, т, J= 9.3, H-6), 3.54 (1H, тд, J=9.6, 5.9, H-8), 2.82 (1H, дд, J=12.6, 5.6, H-9б), 3.10 (2H, м, H-13б, H-6'б), 4.69 (1H, с, H-14a), 5.04 (1H, с, H-14б), 1.09 (3H, д, J= 5.0, H-15), 3.44 (1H, дд, J= 10.9, 2.9, H-2'), 1.73 (3H, м, H-3'a, H-5'a, H-5'б), 1.48 (1H, м, H-4'a), 8.64 (1H, д, J=1.6, H-8'), 7.98 (1H, д, J=7.9, H-10'), 7.44 (1H, дд, J= 7.9, 4.9, H-11'), 8.47 (1H, дд, J=4.9, 1.6, H-12').

Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц) (29): 39.41 (CH, C-1), 42.95 (CH₂, C-2), 220.30 (C=O, C-3), 46.34 (CH, C-4), 50.65 (CH, C-5), 83.22 (CH, C-6), 46.99 (CH, C-7), 73.86 (CH₂, H-8), 46.99 (CH₂, H-9a), 144.95 (C, C-10), 52.43 (CH, C-11), 175.73 (C=O, C-12), 56.49 (CH₂, C-13), 113.21 (CH₂, C-14), 13.44 (CH₃, C-15), 66.46 (C=O, C-2'), 36.41 (CH₂, C-3'), 24.58 (CH₂, C-4'), 25.68 (CH₂, C-5'), 51.49 (CH₂, C-6'), 148.7 (CH, C-8'), 140.28 (C, C-9'), 135.61 (CH, C-10'), 123.23 (CH, C-11'), 149.57 (CH, C-12').

Установление строения хлорацетилгроссгемина (8 α -хлорацетокси-3-оксо-5,7 α ,4,6,8 β (H)-гвай-10(14),11(13)-диен-6,12-олид) (30) [79].

Белое порошкообразное вещество с т.пл. 162-164 °С (EtOH), состава C₁₇H₁₉O₅Cl. R_f 0,41 (этилацетат-этиловый спирт=4:1). Выход 68%.

Элементный анализ (30): Найдено % С 59.39; Н 5.41; Cl 12.15; вычислено %: С 60.26; Н 5.6; Cl 10.5.

В ИК-спектре производного (30) наблюдаются следующие полосы поглощения: 1754 (C=O γ -лактона), 1730 (C=O), 1240 (C=O сложноэфирной группы), 1647 (C=C), 821 (C-Cl).

УФ-спектр (C₂H₅OH, λ_{\max} , нм) (30): 214 (ϵ 1,225).

В ЯМР ¹H производного (30) отмечается трехпротонный дублет метильный группы Н-15 при 1.25 м.д. с КССВ 6.8 Гц, дублеты дублетов метиленовых протонов Н-2а и Н-2б при 2.49 м.д. с КССВ 3.37 Гц, 19.19 Гц и 2.56 м.д. с КССВ 8.73 Гц, 19.19 Гц, мультиплет метиленового протона Н-7 при 3.38 м.д., триплет лактонного протона Н-6 при 4.06 м.д. с КССВ 9.09 Гц, дублеты протонов экзометиленовой группы лактонного цикла Н-13а и Н-13б при 5.92 м.д. с КССВ 2.86 Гц и 6.36 м.д. с КССВ 3.29 Гц, а также синглеты протонов экзоциклической двойной связи Н-14а и Н-14б при соответственно 4.88 и 5.15 м.д.

Установление строения гидрохлорид цитизинилгроссгемина (гидрохлорид 3-оксо-8-гидрокси-1,5,7 α ,4,8 β (H)-гвай-10(14)-ен-11(13-цитизинил)-12,6-олид) (31).

Белое порошкообразное вещество с т.пл. 196-198 °С, состава C₂₆H₃₃O₅N₂Cl. Выход 93%.

ИК-спектр (KBr, ν_{\max} , см⁻¹) (31): 3441 (ОН-группа), 3075, 2984 (C-H), 2785, 2590 (характерный сигнал для соли), 1761 (C=O γ -лактона), 1732 (C=O), 1648, 1565, 1545, 1470, 1454, 1422, 1393, 1353, 1341, 1312, 1278, 1192, 1162, 1076, 1049, 986, 957, 946, 931, 886, 802, 730.

УФ-спектр (EtOH, λ_{\max} , нм) (31): 202.

Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, D₂O, δ , м.д., J/Гц) (31): 4.09 (1H, т, J=10, Н-6), 4.57 (1H, с, Н-14а), 4.90 (1H, с, Н-14б), 0.95 (3H, д, J=6.0, Н-15), 6.42 (1H, д, J=9.0, Н-3'), 7.49 (1H, т, J=10.0, 6.0, Н-4'), 6.42 (1H, д, J=10.0, Н-5'), 2.78 (1H, уш.с, Н-9'), остальные сигналы соответствуют исходной молекуле (28).

Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, D₂O, δ , м.д., J/Гц) (31): 38.93 (CH, C-1), 41.35 (CH₂, C-2), 226.26 (C=O, C-3), 43.33 (CH, C-4), 49.56 (CH, C-5), 84.44 (CH, C-6), 47.12 (CH, C-7), 73.63 (CH, C-8), 46.11 (CH₂, C-9), 143.14 (C, C-10), 52.34 (CH, C-11), 176.81 (C=O, C-12), 58.05 (CH₂, C-13), 114.91 (CH₂, C-14), 13.30 (CH₃, C-15), 165.11 (C=O, C-2'), 117.52 (CH, C-3'), 141.74 (CH, C-4'), 110.07 (CH, C-5'), 146.20 (C, C-6'), 32.82 (CH, C-7'), 25.86 (CH₂, C-8'), 26.52 (CH, C-9'), 48.43 (CH₂, C-10'), 58.29 (CH₂, C-11'), 58.41 (CH₂, C-13').

Таким образом, строение новых модифицированных производных на основе гроссгемина однозначно установлено на основании ИК-, УФ-, масс-, ЯМР ¹H, ¹³C-спектров, двумерной спектроскопии ЯМР ¹H-¹H, ¹³C-¹H (COSY, COLOC), данных элементного анализа.

5.3 Изучение биологической активности новых производных на основе гроссгемина

5.3.1 Цитотоксическая активность новых производных гроссгемина в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach)

Исследование цитотоксической активности новых производных гроссгемина в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) проводили в лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии АО «МНПХ «Фитохимия» (Приложение Б).

Объекты исследования: Gr-AcCl - хлорацетилгроссгемина, GRS-X1 – (*E*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина, GRS-X2 - (*Z*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина, Gr-Cyt(15)-аминопроизводное гроссгемина (цитизинилгроссгемина).

Цитотоксичность оценивали в тесте выживаемости личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach). Эксперименты проводились на личинках 2-х дневного возраста в условиях культивирования *in vitro*. Личинки выращены погружением яиц морских рачков *Artemia salina* (Leach) в искусственную морскую воду и инкубировали 48 ч при температуре 37⁰С. Навеску 2 мг каждого исследуемого образца растворили в 2 мл этанола, затем из этого раствора брали по 500 мкл (3 параллели), 50 мкл (3 параллели), 5 мкл (3 параллели). После испарения этанола в каждый флакон добавили по 5 мл искусственной морской воды. Таким образом, если начальная масса навески составляла 2 мг, то конечные концентрации образца составили 100 мкг/мл, 10 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно, каждой концентрации в 3 повторениях. В каждый флакон с образцами с помощью пастеровской пипетки сажали по 10 личинок морских рачков *Artemia salina* 2-дневного возраста. После этого все флаконы оставляли при комнатной температуре на свету на 24 часа. По истечении 24 часов пересчитывали выжившие и погибшие личинки. Затем с использованием полученных данных по верхнему и нижнему токсическому лимиту рассчитывали половинную токсическую дозу каждого образца. Препаратом сравнения служил гидрохлорид 13-диметиламино-1,10β-эпокси-5,7α,6,11β(Н)-гвай-3,4-ен-6,12-олид (субстанция препарата «Арглабин»), обладающий противоопухолевой активностью.

Результаты тестирования цитотоксической активности образцов сесквитерпеновых лактонов в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) в условиях культивирования *in vitro* приведены в таблице 16.

Как видно из таблицы, образцы сесквитерпеновых лактонов: GRS-X1 – (*E*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина, GRS-X2 - (*Z*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина, GRN-5-1 – (*E*-изомер)-арилпроизводное гроссгемина, GRN-5-2 – (*Z*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина, GRN-6-2 – (*Z*-изомер)-арилпроизводное гроссгемина, Gr-AcCl-хлорацетилгроссгемина и Gr-Cyt(15)-аминопроизводное гроссгемина (цитизинилгроссгемина) проявляют цитотоксическую активность в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach).

Таблица 16 - Цитотоксическая активность новых производных гроссгемина

Наименование вещества	ЛД ₅₀ , мкг/мл	Активность
GRS-X1 – (<i>E</i> -изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина	68,4	Обладает
GRS-X2 - (<i>Z</i> -изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина	49,5	Обладает
Gr-AcCl-хлорацетилгроссгемина*	104,2	Обладает
Gr-Cyt(15)-аминопроизводное гроссгемина (цитизинилгроссгемина)*	96,2	Обладает
GRN-5-1 – (<i>E</i> -изомер)-арилпроизводное гроссгемина	113,2	Обладает
GRN-5-2 – (<i>Z</i> -изомер)-арилпроизводное гроссгемина	105,2	Обладает
GRN-6-2 – (<i>Z</i> -изомер)-арилпроизводное гроссгемина	127,7	Обладает
Препарат сравнения: гидрохлорид 13-диметиламино-1,10β-эпокси-5,7α,6,11β(Н)-гвай-3,4-ен-6,12-олида	20,6	

5.3.2 Цитотоксическая активность новых производных гроссгемина в отношении клеток острой моноцитарной лейкемии человека

Определение цитотоксичности гроссгемина и нового производного на его основе в отношении клеток острой моноцитарной лейкемии ТНР-1 человека проводилось в Департаменте микробиологии и иммунологии Государственного Университета Монтаны (США) (Приложение В).

Объекты исследования: гроссгемин, хлорацетилгроссгемин.

Эксперименты проведены на клетках человека острой моноцитарной лейкемии ТНР-1 (*in vitro*). Клетки ТНР-1 были инкубированы 24 часа с различными концентрациями сесквитерпеновых лактонов (от 50 μМ и ниже). После 24 часов инкубации жизнеспособность клеток была оценена по уровню внутриклеточной АТФ (набор CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega)). Для активных соединений были рассчитаны величины IC₅₀ (концентрация соединения при которой уровень жизнеспособности клеток уменьшается на 50%). Полученные результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Влияние 8α-хлорацетокси-3-оксо-5,7α,4,6,8β(Н)-гвай-10(14), 11(13)-диен-6,12-олида (хлорацетилгроссгемина) на жизнеспособность клеток и подавление транскрипционной активности NF-κB

Название соединения	Цитотоксичность	NF-κB ингибиторы
	IC ₅₀ , μM	
Гроссгемин	-	-
Хлорацетилгроссгемина	0.59	-
Арглабин – препарат сравнения	11.0	-

Из данных таблицы 17 следует, что хлорацетилгроссгемина в дозе 50 μМ обладает высокой цитотоксичностью в отношении клеток острой моноцитарной

лейкемии (*in vitro*) и при этом превосходит действие препарата сравнения - арглабин в 18 раз.

5.3.3 Противовоспалительная активность новых производных гроссгемина

Исследование противовоспалительной активности новых производных гроссгемина проводили в лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии АО «МНПХ «Фитохимия» (Приложение Г).

Объекты исследования: хлорацетатпроизводное гроссгемина, аминопроизводное гроссгемина.

Острую экссудативную реакцию (перитонит) вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты в объеме 1 мл на 100 г массы тела крыс. Через 3 часа животных забивали, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и оценивали его объем [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-е издание, перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005 – 832 с.]. Исследуемые объекты изучали в дозе 25 мг/кг при пероральном введении в виде крахмальной слизи. Препарат сравнения «Диклофенак натрия» изучали в дозе 8 мг/кг. Контрольные животные получали эквивалентное количество крахмальной слизи. Исследуемые объекты вводили однократно за 1 час до введения 1% раствора уксусной кислоты.

Результаты исследования противовоспалительной активности образцов хлорацетатпроизводное гроссгемина, аминопроизводное гроссгемина приведены в таблице 18.

Таблица 18 – Противовоспалительная активность образцов хлорацетатпроизводное гроссгемина, аминопроизводное гроссгемина

Исследуемый показатель	Контроль n=4	Диклофенак натрия n=4	хлорацетатпроизводное гроссгемина n=4	аминопроизводное гроссгемина n=4
Масса животных, г	220,0±17,4	243,3±19,2	232,0±11,8	216,8±10,7
Количество экссудата, мл	6,7±1,2	4,5±1,7	4,9±2,3	5,6±0,9

В результате проведенного эксперимента выявлено, что образец хлорацетатпроизводное гроссгемина в дозе 50 мкг/кг обладает противовоспалительным действием на модели острой экссудативной реакции, образец аминопроизводное гроссгемина в дозе 50 мкг/кг проявил слабое противовоспалительное действие на модели острой экссудативной реакции.

5.3.4 Антимикробная активность новых производных гроссгемина

Исследование антимикробной активности новых производных гроссгемина проводили в лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии АО

«МНПХ «Фитохимия» (Приложение Д).

Объекты исследования: хлорацетатпроизводное гроссгемина, аминопроизводное гроссгемина (цитизинилгроссгемина), GRS-X1 – (*E*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина; GRS-X2 – (*Z*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина.

Изучение антимикробной активности вышеуказанных образцов проводилось по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, грамотрицательных штаммов *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и к дрожжевому грибку *Candida albicans* методом диффузии в агар (лунок). Препараты сравнения – гентамицин для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка *Candida albicans*.

Культуры выращивали на жидкой среде pH $7,3 \pm 0,2$ при температуре от 30 до 35⁰С в течение 18-20 часов. Культуры разводили 1:1000 в стерильном 0,9%-ном растворе натрия хлорида изотоническом, вносили по 1 мл в чашки с соответствующими элективными, питательными средами для изучаемых тест-штаммов и засеивали по методу «сплошного газона». После подсушивания на поверхности агара формировали лунки размером 6,0 мм, в которые вносили раствор исследуемого образца, линкомицина гидрохлорид, нистатина. В контроле использовали этиловый спирт в эквивалентных количествах. Таким образом, исследуемый образец испытывался в количестве 1 мкг, а препарат сравнения в количестве 1 мг. Посевы инкубировали при 37⁰С, учет растущих культур проводили через 24 часа. Антимикробная активность образцов оценивалась по диаметру зон задержки роста тест-штаммов (мм). Диаметр зон задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антибактериальной активности, 10-15 мм – слабая активность, 15-20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная. Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах. Статистическую обработку проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки.

Результаты исследования антимикробной активности образцов приведены в таблице 19.

Таким образом, установлено, что образцы сесквитерпеновых лактонов GRS-X1 – (*E*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина, GRS-X2 – (*Z*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина, хлорацетат производное гроссгемина, аминопроизводное гроссгемина (цитизинилгроссгемина) проявляют умеренно-выраженную антимикробную активность в отношении грамположительных тест-штаммов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Образец GRS-X2 – (*Z*-изомер)-галогенарилпроизводное гроссгемина проявляет также умеренно-выраженную антибактериальную активность в отношении грамотрицательного тест-штамма *Escherichia coli*.

Таблица 19 - Антимикробная активность образцов сесквитерпеновых лактонов

Наименование вещества	<i>St. aureus</i>	<i>Bac. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Хлорацетилгроссгемина (хлорацетатпроизводное гроссгемина)	15,0±0,3	16 ± 0,2	13 ± 0,2	-	12 ± 0,4
Аминопроизводное гроссгемина (цитизинилгроссгемина)	16,3±0,3	14 ± 0,3	13 ± 0,3	-	14 ± 0,2
GRS-X1 – (<i>E</i> -изомер)- галогенарилпроизводное гроссгемина	16± 0,1	16 ± 0,1*	14 ± 0,1	-	12 ± 0,1
GRS-X2 - (<i>Z</i> -изомер)- галогенарилпроизводное гроссгемина	16 ± 0,1	19± 0,1	16 ± 0,2	-	15 ± 0,2
Гентамицин	24 ± 0,1	21 ± 0,2	26 ± 0,1	27±0,1	-
Нистатин	-	-	-	-	21 ± 0,2
*Примечание - достоверность различий $p < 0,05$ по сравнению с группой сравнения					

5.3.5 Проллиферативная активность новых производных гроссгемина

Изучение пролиферативной активности новых производных гроссгемина проводили в лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии АО «МНПХ «Фитохимия» (Приложение Е).

Объекты исследования: гроссгемин (Grs), цитизинилгроссгемин (Grs-Cyt), цитизин (Cyt).

Для исследований был использован монослой клеток почки ягнят в 96-луночных планшетах. Клетки культивировали в среде ПСП (НИИПББ) с добавлением 200 mM L-глутамин, 10% телячьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг-мл стрептомицина. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Препараты вносили через 24 часа культивирования клеток. Все образцы предварительно растворили в ДМСО, так что концентрация каждого образца составляла 10 мг/мл. после разведения образцов питательной средой фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и использовали в концентрациях 0,5 и 5 мг/мл. культуру клеток с препаратами инкубировали при 37°C в течение 48 часов, после чего в среду добавляли 20 мкл готового раствора МТТ (исходная концентрация 5 мг/мл в фосфатном буфере). Время инкубации с МТТ составляло 5 ч при 37°C. Затем среду удаляли, образовавшийся нерастворимый формазан экстрагировали добавлением 100 мкл ДМСО. Осадок ресуспендировали и 10-15 мин инкубировали в темноте при комнатной температуре. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 570 нм на спектрофотометре «StatFax 2000». Оценку результатов теста МТТ проводили путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках.

Результаты исследования влияния образцов грессгемин (Grs), цитизинилгрессгемин (Grs-Cyt), цитизин (Cyt) на пролиферативную активность клеток почки ягнят приведены в таблицах 20.

Таблица 20 – Влияние образцов сесквитерпеновых лактонов - грессгемин (Grs), цитизинилгрессгемин (Grs-Cyt), цитизин (Cyt) на пролиферативную активность клеток почки ягнят (n=6).

Образцы	Концентрация	Оптическая плотность (среднее значение + стан. ошибка реднего)
Grs	0,5	0,438±0,027
Grs-Cyt	0,5	0,422±0,011
Cyt	0,5	0,424±0,009
Grs	5	0,391±0,004
Grs-Cyt	5	0,388±0,014
Cyt	5	0,377±0,006
Контроль		0,415±0,017

В результате исследования на культуре клеток почки ягнят было выявлено, что образцы грессгемин (Grs), цитизинилгрессгемин (Grs-Cyt), цитизин (Cyt) не оказали какого-либо влияния на пролиферативные свойства клеток. Однако при микроскопии было установлено, что добавление этих препаратов после фильтрации приводило к наслоению плотной массы нерастворенного препарата на монослой клеток, что и могло быть причиной высоких значений оптической плотности.

5.3.6 Антигельминтная активность новых производных грессгемина

Изучение антигельминтной активности в эксперименте *in vivo* проводилось в лаборатории паразитологии ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» (Приложение Ж).

Объекты исследования: «ГАГ» (гидрохлорид анабазинилгрессгемина), «ГЦГ» (гидрохлорид цитизинилгрессгемина).

Для исследования из 8 сельских округов, расположенных в Алматинской области Жамбылского района были отобраны фекалии от 134 приотарных собак для определения их исходной зараженности гельминтами. На базе лаборатории паразитологии ТОО «КазНИВИ» провели копроовоскопию отобранных фекалий по методу Дарлинга. В результате копрологического исследования из 134 собак оказались зараженными различными видами гельминтов 51 (38,05%) голов с ИИ от 1 до 693 яиц. Из 51 собаки у 9 (17,64%) были обнаружены яйца *Taenia sp.* с ИИ 1-188 яиц, у 11 (21,56%) яйца *Toxocara canis* с ИИ 1-693, у 3 (5,88) *Toxascaris leonina* с ИИ 1-47 яиц, у 8 (15,68%) яйца *Trichocephalus vulpis* с ИИ 1-68, у 2 (3,92%) яйца *Trichocephalus georgicus* с ИИ 1 яйцо, у 17 (33,33%) яйца *Ancylostoma caninum* с ИИ 1-11 яиц, у 2 (3,92%) яйца *Spirocerca lupi* с ИИ 9-28 яиц, у 8 (15,68%) яйца *Uncinaria stenocephala* с ИИ 1-68 яиц, у 6 (23,52%) ооцисты *Isospora canis* с ИИ 3-27 ооцист, у 3 (5,88%) *Nematoda spp.* с ИИ 1 яйцо и у 2 (3,92%) неинвазионные личинки нематод Sp. Моноинвазия отмечена у 34 (66,66%) из 51 зараженной собаки,

полиинвазия у 17 (33,3%). Другие виды гельминтов путем копроовоскопии в фекалиях приотарных собак не выявлены.

По результатам копроовоскопии инвазированных гельминтами собак (51 собака) разделили на 3 опытные группы. В первую группу - 12 спонтанно зараженных гельминтами собак, во вторую - 14 собак, в третью - 12 собак.

Собакам первой группы (12 гол.) задали «ГАГ» (гидрохлорид анабазинилгроссгемина) в дозе 1 капсула на 10 кг массы тела, собакам второй группы (14 гол.) задали «ГЦГ» (гидрохлорид цитизинилгроссгемина) в дозе 1 капсула на 10 кг массы тела, для сравнительного анализа собакам 3 группы (12 гол.) задали «ЦесТремГоПе» (препарат КазНИВИ), который содержит в своем составе празиквантел, в дозе 1 таблетка на 10 кг массы животного.

Испытуемые препараты задавали однократно, индивидуально. Через 7 дней после дачи препарата, выехали в хозяйства для отбора фекалий у опытных собак, затем на базе лаборатории паразитологии ТОО «КазНИВИ» провели копроовоскопию фекалий для определения экстенс- и интенсэфективности испытуемых препаратов. Во всех группах животных побочных действий от применения испытуемых препаратов отмечено не было.

В результате проведенных испытаний у собак первой группы, дегельминтизированных испытуемым препаратом «ГАГ» (гидрохлорид анабазинилгроссгемина) из 12 собак у 5 (41,66%) выявлены яйца различных видов гельминтов, в том числе у 1 (20%) яйца *Taenia spp.* с ИИ 188 яиц, у 3 (60%) яйца *Toxocara canis* с ИИ 2-351, у 2 (40%) яйца *Ancylostoma caninum* с ИИ 2-40 яиц, у 1 (20%) ооцисты *Isospora canis* с ИИ 8 ооцист, у 2 (40%) собак *Nematoda spp.* с ИИ 1 яйцо. Моноинвазия отмечена у 3 (60%) из 5 зараженных собак и полиинвазия у 2 (40%) из 5 зараженных собак.

Таким образом, экстенсэфективность препарата «ГАГ» составила 58,34%, интенсэфективность - 40,56%.

У собак второй группы, дегельминтизированных испытуемым препаратом «ГЦГ» (гидрохлорид цитизинилгроссгемина) из 14 собак у 3 (21,42%) были выявлены яйца различных видов гельминтов, в том числе у 1 (33,33%) было обнаружено 1 яйцо *Taenia spp.*, у 2 (66,67%) собак по одному яйцу *Uncinaria stenocephala*, у 1 (33,33%) 1 ооциста *Isospora canis*, у 1 (33,33%) собаки 2 неполовозрелые личинки *Nematoda sp.* Из 3 зараженных собак у 2 полиинвазия, сочетание нескольких видов гельминтов и у 1 собаки моноинвазия.

Таким образом, экстенсэфективность препарата «ГЦГ» составила 78,58%, интенсэфективность - 98,58%.

У собак 3 группы, дегельминтизированных препаратом «ЦесТремГойе» из 13 собак у 1 (7,69%) выявлено 1 яйцо *Trichocephalus vulpis*. Перед дегельминтизацией у этой собаки было выявлено 68 яиц *Trichocephalus vulpis*.

Таким образом, экстенсэфективность препарата «ЦесТремГоПе» составила 92,31%, интенсэфективность - 99,76%.

Заключение: Результаты испытаний препаратов «ГАГ» (гидрохлорид анабазинилгроссгемина) и «ГЦГ» (гидрохлорид цитизинилгроссгемина), представленных на испытания АО «Международный научно-производственный

холдинг «Фитохимия» показали, что экстенсэффективность препарата «ГАГ» составила 58,34%, интенсэффективность - 40,56%, «ГЦГ» (гидрохлорид цитизинилгроссгемина) - 78,58% и 98,58% соответственно. Для сравнительных испытаний с представленными препаратами «ГАГ» и «ГЦГ» был использован, разработанный ТОО «КазНИВИ» препарат для дегельминтизации собак «Н,есТреМForte», экстенсэффективность которого составила 92,31%, а интенсэффективность - 99,76%. Кoproовоскопия каждой пробы фекалий до и после дегельминтизации собак проводилась двукратно.

Таким образом, наиболее высокую антгельминтную эффективность при гельминтозах собак показали «ЦесТреМРоПе», разработанный ТОО «КазНИВИ» и «ГЦГ» (гидрохлорид цитизинилгроссгемина), разработанный АО «МНПХ «Фитохимия». Однако следует отметить, что препараты «ГАГ» и «ГЦГ» абсолютно не эффективны против цестод из семейства *Taeniidae*, но препарат «ГЦГ» (гидрохлорид цитизинилгроссгемина) показал высокую эффективность против гельминтов из семейства *Nematodae*.

5.4 Изучение острой токсичности хлорацетилгроссгемина

Изучение острой токсичности хлорацетилгроссгемина проводили в лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии АО «МНПХ «Фитохимия» (Приложение И).

Задачи исследования: Определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации.

Результаты исследования: Токсический эффект исследуемого образца проявлялся спустя 5-10 минут после его введения и выражался в учащенном дыхании, специфических спазмах в области желудка, нарушении устойчивости и координации движений подопытными животными. У экспериментальных животных получавших исследуемое вещество, в течение первых суток отмечали тремор, подергивания, судороги, заторможенность, вялость, отказ от потребления корма и воды, массы тела, более выраженные при более высоких дозах. Однако, гибель животных наступала не сразу, а спустя 24 часа после его введения.

У выживших животных, на всем протяжении наблюдения регистрировались вышеописанные признаки интоксикации, однако они носили менее выраженный характер. На третьи сутки эксперимента общее состояние животных получивших исследуемое вещество в дозе 100 мг не отличалось от подопытных животных контрольной группы, животные не отказывались от потребления корма и воды. Поведенческие реакции не отклонялись от нормы. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек без патологических изменений. Впоследствии общее состояние и поведение всех экспериментальных групп животных соответствовала норме.

В результате исследования острой токсичности хлорацетилгроссгемина на лабораторных крысах в условиях *in vivo*, рассчитана полулетальная доза (LD_{50}) равная 183 мг/кг и тем самым, фармакологическое вещество отнесено к III классу

токсичных веществ (умеренно опасные). На основании полученных результатов хлорацетилгроссгемина рекомендован для дальнейшего изучения.

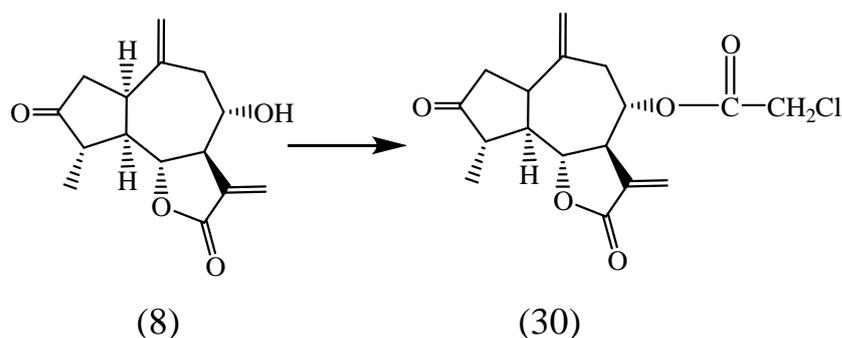
Таким образом, по результатам исследования биологической активности новых производных гроссгемина установлено, что хлорацетилгроссгемин обладает высокой цитотоксичностью в отношении острой моноцитарной лейкемии, при умеренной токсичности, а гидрохлорид цитизинилгроссгемина в эксперименте *in vivo* проявляет выраженное антигельминтное действие против гельминтов из семейства *Nematodae*.

На основании полученных экспериментальных данных, хлорацетилгроссгемин предложен в качестве субстанции для разработки нового лекарственного средства противоопухолевого действия и рекомендован для расширенных доклинических испытаний, а гидрохлорид цитизинилгроссгемина предложен в качестве субстанции для создания нового лекарственного средства антигельминтного действия.

6 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ ГРОССГЕМИНА

6.1 Разработка технологии получения субстанции хлорацетилгроссгемина

Хлорацетилгроссгемин (30), обладающий выраженным цитотоксическим действием, получают взаимодействием гроссгемина (8) с уксусным ангидридом в пиридине [79].



Чтобы организовать стабильную наработку субстанции, произведен подбор оптимальных условий синтеза хлорацетилгроссгемина, которые обеспечат количественный выход качественного целевого продукта. В ходе экспериментов варьировали соотношение гроссгемина, растворителя пиридина, реагентов, а также изменяли продолжительность синтеза. Зависимость количественного выхода хлорацетилгроссгемина от условий проведения реакций представлена в таблице 21.

Таблица 21 – Зависимость выхода хлорацетилгроссгемина от условий синтеза при 20 °С (количество гроссгемина – 1,0 г)

Объем пиридина, мл	Хлоруксусный ангидрид, г	Продолжительность синтеза, мин	Выход хлорацетилгроссгемина, %
5	1,3	10	55
10	1,3	20	60
10	1,3	20	67
10	1,3	25	67

Из таблицы 21 видно, нами подобраны условия проведения ацилирования гроссгемина в пиридине, обеспечивающие выход 65-67 %, с чистотой продукта не менее 99 %.

На основании полученных результатов разработана технология получения субстанции хлорацетилгроссгемина которая включает в себя два этапа.

Первый этап: ацилирование гроссгемина (8) и обработку реакционной смеси. К раствору 100,0 г (0,38 моль) гроссгемина в 0,5 л пиридине добавляют 117 г (0,68 моль) хлоруксусного ангидрида. Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 20 минут. Ход реакции контролируют методом тонкослойной

хроматографии.

Далее реакционную смесь переносят в делительную воронку, добавляют 100 мл хлороформа и 3%-ный водный раствор соляной кислоты, обработку повторяют 3 раза (до нейтральной среды), затем органический слой высушивают над Na_2SO_4 , через 1 час отфильтровывают. Фильтрат отгоняют на роторном испарителе

Второй этап: перекристаллизация хлорацетилгроссгемина. Вещество перекристаллизовывают в этиловом спирте, в результате в колбе постепенно начинают выпадать кристаллы гроссгемина в виде мелкого кристаллического вещества с желтовато-коричневым оттенком.

После кристаллизации хлорацетилгроссгемина сушат сначала на фильтре под вытяжной вентиляцией в течение 2 часов, а затем переносят в фарфоровую чашку и сушат их в вакуумном сушильном шкафу при температуре $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении – 0,08-(-0,09) мПа до постоянной массы.

Субстанция хлорацетилгроссгемина должен иметь вид мелкого кристаллического порошка с желтовато-коричневого цвета без запаха.

Таким образом, разработана технология получения субстанции хлорацетилгроссгемина, обеспечивающая количественный выход качественного целевого продукта.

6.1.1 Показатели качества и стандартизация субстанции хлорацетилгроссгемина

Для обеспечения контроля качества, нами разработан проект АНД на субстанцию хлорацетилгроссгемина, который составлен на основании результатов анализов 5 серий опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК. Показатели качества субстанции хлорацетилгроссгемина представлены в таблице 22.

Спецификация качества субстанции хлорацетилгроссгемина включает в себя следующие показатели:

Описание. Порошок светло-коричневого цвета, без запаха.

Растворимость. Растворим в хлороформе *P*, 95 % спирте *P*, практически не растворим в воде *P* (ГФ РК I, т. 1, 1.4).

Идентификация. Определение проводят методом абсорбционной спектрофотометрии в инфракрасной области (ГФ РК I, т. 1, 2.2.24).

А. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в дисках с калия бромидом *P* (3 мг субстанции с 300 мг калия бромида *P*), в области от 3800 до 600 см^{-1} должен иметь полосы поглощения: 1754 (C=O γ -лактона), 1730 (C=O), 1240 (C=O сложноэфирной группы), 1647 (C=C), 821 (C-Cl).

В. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01% раствора субстанции в 96% этаноле *P*, снятый на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм, в области от 200 до 350 нм должен иметь максимум при длине волны (214 ± 2) нм. В качестве компенсационного раствора используют 95% этанол *P*. Определение проводят методом абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях (ГФ РК I, т. 1, 2.2.25).

С. При добавлении к 0.02 г субстанции одной капли раствора ванилина *P* в

кислоте серной *P* появляется фиолетовое окрашивание (терпеноиды).

Примечание. Приготовление раствора ванилина в кислоте серной. 0.1 г ванилина *P* растворяют в 10 мл кислоты серной *P*.

Раствор используют свежеприготовленным.

0.02 г субстанции дает характерную реакцию на хлориды (ГФ РК I, т. 1, 2.4.4).
0.02 г субстанции дает характерную реакцию на ацетаты.

Температура плавления. От 162°C до 164°C (ГФ РК I, т. 1, 2.2.14).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0.5% (ГФ РК I, т. 1, 2.2.32).

Родственные примеси. По 20 мкл испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-детектором в условиях описанных в разделе «Количественное определение» (ГФ РК I, т. 1, 2.2.29).

На хроматограмме испытуемого раствора сумма площадей всех дополнительных пиков, кроме основного не должна превышать 2.0%.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13.

Субстанция в условиях испытания не обладает антимикробным действием.

Субстанция должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 В.

В 1 г субстанции допускается наличие не более 10⁵ аэробных бактерий и 10⁴ грибов (суммарно), 10³ энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий. Не допускается наличие *Escherichia coli* в 1 г субстанции и *Salmonella* в 10 г субстанции.

Остаточные количества органических растворителей. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.28).

150.0 мг субстанции растворяют в 3 мл раствора внутреннего стандарта (испытуемый раствор).

По 0.2 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка капиллярная ZB-5 размером 30 м x 0.25 мм, покрытой сополимером 5% - фенил - 95% - диметилполисилоксана с толщиной пленки 0.25 мм;
- газ-носитель: аргон *P*, скорость 20 см³/мин;
- водород - 40 см³/мин;
- воздух - 400 см³/мин;
- температура колонки 30°C;
- температура детектора 120°C;
- температура испарителя 100°C.

Содержание этилацетата (X) в субстанции, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot S_{on} \cdot f}{S_{1n} \cdot S_0 \cdot m}$$

S_{wp} – среднее значение площадей пиков этилацетата, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

Таблица 22 - Показатели качества субстанции хлорацетилгроссгемина

Показатели качества	Методы испытаний	Нормы отклонений	Серия				
			030416	040416	050416	060416	070516
Описание	Визуально	Порошок светло-коричневого цвета, без запаха.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Растворимость	ГФ РК I, т. 1, 1.4	Растворим в хлороформе, 95 % спирте, практически не растворим в воде.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Идентификация: - хлорацетилгроссгемина	ИК-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, 2.2.24	Инфракрасный спектр поглощения субстанции, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 см ⁻¹ , должен иметь характеристические полосы поглощения при 1754 (C=O γ-лактона), 1730 (C=O), 1240 (C=O сложноэфирной группы), 1647 (C=C), 821 (C-Cl).	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
- хлорацетатгроссгемина	Спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, 2.2.25	Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01 % раствора препарата в 95 % спирте этиловом Р в области от 200 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны (214 ±2) нм.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
- терпеноиды	В соответствии с АНД	При добавлении к 0.02 г субстанции одной капли раствора ванилина в кислоте серной появляется фиолетовое окрашивание.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
- хлориды	ГФ РК т.1,2.4.4	0,02 г субстанции дает характерную реакцию на хлориды.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
- ацетаты	В соответствии с АНД	0,02 г субстанции дает характерную реакцию на ацетаты.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Температура плавления	ГФ РК I, т. 1, 2.2.14	От 162 до 164 °С	162-163	163-164	163-164	163-164	162-163
Вода	ГФ РК I, т. 1, 2.2.32.	Не более 0.5 %	0,32	0,28	0,29	0,28	0,29
Родственные примеси	ВЭЖХ ГФ РК I, т. 1, 2.2.29	Не более 2 %	1,47	1,24	1,24	1,24	1,24
Сульфатная зола	ГФ РК I, т. 1, 2.4.14	Не более 0.1%	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03
Тяжелые металлы	ГФ РК I, т. 1, 2.4.8	Не более 0.001 %	0,0008	0,0007	0,0008	0,0007	0,0008

Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5	6	7	8
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13	<p>Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 В.</p> <p>В 1 г субстанции допускается наличие не более 10^5 аэробных бактерий и 10^4 грибов. Не более 10^3 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г.</p> <p>В 1 г субстанции не допускается наличие <i>Escherichia coli</i>. Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г.</p>	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Остаточные количества органических растворителей	ГХ, ГФ РК I, т. 1, 2.2.28	Не более 0.1%	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
Количественное определение	ВЭЖХ, ГФ РК I, т. 1, 2.2.29	Не менее 97.0 %	98,18	98,46	99,45	99,06	98,01
Упаковка	В соответствии с АНД	См. утвержденный макет упаковки	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Маркировка	В соответствии с АНД	<p>На этикетке указывают страну-производителя, наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак и адрес, название субстанции на латинском, государственном и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности.</p> <p>Маркировка групповой и транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.</p>	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Транспортирование	ГОСТ 17768-90 Е	В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Хранение	В соответствии с АНД	В защищенном от света месте при температуре не выше 30°C.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Срок хранения	В соответствии с АНД	2 года					

S_{wir} – среднее значение площадей пиков внутреннего стандарта, вычисленное из хроматограмм раствора сравнения;

S_{wir} – среднее значение площадей пиков внутреннего стандарта, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_{wr} – среднее значение площадей пиков этилацетата, вычисленное из хроматограмм раствора сравнения;

m – масса навески препарата, в миллиграммах;

V_0 – объем этилацетата в растворе сравнения, в миллилитрах;

ρ – плотность этилацетата;

P – содержание этилацетата в СО этилацетата, в процентах;

3 – разведение;

f – расчетный фактор, равный

$$f = \frac{V_0 \cdot \rho \cdot 3 \cdot P}{100}$$

Содержание этилацетата в субстанции должно быть не более 0.1%.

Количественное определение. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.29).

0.1000 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл подвижной фазы: *метанол P - вода P* (1:1), растворяют при нагревании на водяной бане и охлаждают. Доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

По 20 мкл полученного раствора и раствора сравнения хроматографируют на жидкостном хроматографе получая не менее 5 хроматограмм в следующих условиях:

- колонка размером 4,6 x 150 мм, заполненная "Zorbax SB-C18," с размером частиц 5 мкм;

- подвижная фаза: *метанол P - вода P* (1:1), дегазированная любым удобным способом;

- детектирование при длине волны 214 нм;

- скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин;

- температура колонки – 20° С.

- время удерживание хлорацетилгроссгемина составляет 5±1 мин.

Содержание хлорацетилгроссгемина в субстанции, в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot (100 - W)}$$

где S_1 - среднее значение площадей пика хлорацетилгроссгемина на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 - среднее значение площадей пика хлорацетилгроссгемина на хроматограмме раствора сравнения хлорацетилгроссгемина;

m_0 – навеска хлорацетилгроссгемина в граммах;

m_1 - навеска субстанции хлорацетилгроссгемина в граммах;
Р – содержание хлорацетилгроссгемина в субстанции хлорацетилгроссгемина в процентах.

W– потеря в массе при высушивании, в процентах.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Проверка пригодности хроматографической системы: Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

-эффективность аналитической колонки, рассчитанная по пику образца хлорацетилгроссгемина на хроматограмме хлорацетилгроссгемина, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок;

-относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика хлорацетилгроссгемина на хроматограмме хлорацетилгроссгемина при 5 повторных инъекциях должно быть не более 2 %;

-коэффициент асимметрии пика, рассчитанный для пика хлорацетилгроссгемина на хроматограмме хлорацетилгроссгемина должен быть не более 2.

По результатам анализа содержание $C_{17}H_{19}O_5Cl$ (хлорацетилгроссгемин) в исследуемых образцах субстанции хлорацетилгроссгемина составляет 98-99 % (рисунок 8).

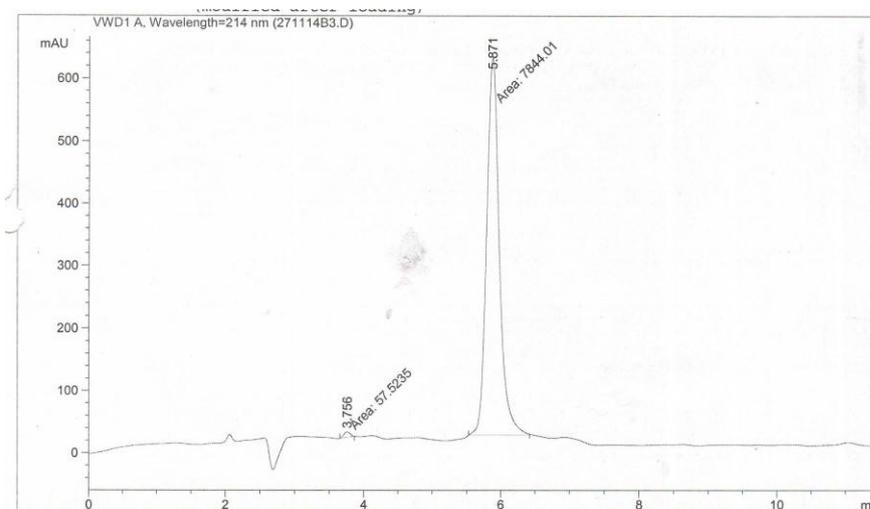


Рисунок 8 - Хроматограмма хлорацетилгроссгемина

Изучение стабильности хлорацетилгроссгемина проведено нами при естественных условиях. На хранение были заложены 5 серий опытных образцов хлорацетилгроссгемина.

Контроль основных показателей качества проводили через каждые 6 месяцев в течение 2,5 лет. На основании результатов исследований (таблица 23) срок хранения субстанции хлорацетилгроссгемина 2 года.

Таким образом, разработана спецификация качества и проведена стандартизация субстанций хлорацетилгроссгемина, разработан проект АНД на субстанцию хлорацетилгроссгемина (Приложение К).

Таблица 23 – Изучение стабильности субстанции хлорацетилгроссгемина

Номер серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Идентификация	Температура плавления	Вода	Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Родственные примеси	Количественное определение
Серия 011115	09.11.15	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,30	0,02	0,11	99,57
	09.02.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,30	0,02	0,11	99,57
	11.05.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,30	0,02	0,11	99,57
	09.08.16	соответствует	соответствует	соответствует	163-165	0,31	0,02	0,11	99,56
	09.11.16	соответствует	соответствует	соответствует	163-165	0,31	0,02	0,13	99,54
	09.02.17	соответствует	соответствует	соответствует	163-165	0,31	0,02	0,13	99,54
	11.05.17	не соответствует	соответствует	соответствует	163-165	0,31	0,02	0,13	99,54
Серия 011215	04.12.15	соответствует	соответствует	соответствует	161-163	0,29	0,03	0,12	99,56
	04.03.16	соответствует	соответствует	соответствует	161-163	0,29	0,02	0,12	99,57
	06.06.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,29	0,02	0,12	99,57
	06.09.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,30	0,02	0,12	99,56
	06.12.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,30	0,02	0,12	99,56
	06.03.17	соответствует	соответствует	соответствует	162-165	0,31	0,02	0,13	99,54
	06.06.17	не соответствует	соответствует	соответствует	163-165	0,31	0,02	0,13	99,54
Серия 021215	14.12.15	соответствует	соответствует	соответствует	161-163	0,30	0,03	0,10	99,57
	14.03.16	соответствует	соответствует	соответствует	161-163	0,30	0,02	0,10	99,58
	14.06.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,31	0,02	0,10	99,57
	14.09.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-164	0,31	0,02	0,11	99,56
	14.12.16	соответствует	соответствует	соответствует	162-165	0,31	0,02	0,11	99,56
	14.03.17	соответствует	соответствует	соответствует	163-165	0,31	0,02	0,11	99,56
	14.06.17	не соответствует	соответствует	соответствует	163-165	0,31	0,02	0,11	99,56

6.1.2 Разработка опытно-промышленного регламента на производство субстанции хлорацетилгроссгемина

На основании проведенных исследований, разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции хлорацетилгроссгемина (Приложение Л).

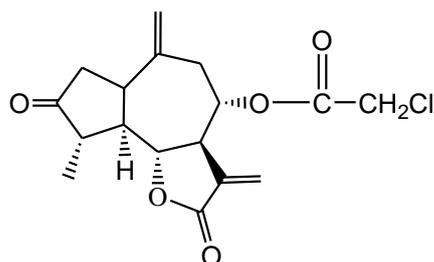
Наименования продукции. Субстанция хлорацетилгроссгемина.

Основное назначение продукции. Субстанция для производства препарата цитотоксического действия.

Краткое описание внешнего вида и физико-химических свойств продукции:

Хлорацетилгроссгемин - [8 α -хлорацетокси-3-оксо-5,7 α ,4,6,8 β (H)-гвай-10(14), 11(13)-диен-6,12-олид].

Химическая формула:



C₁₇H₁₉O₅Cl

М.м. 338,09

Описание. Кристаллический порошок от желтого до желтовато-коричневым оттенком цвета, без запаха. Содержание основного вещества не менее 97 %.

Растворимость. Растворим легко в этилацетате, хлороформе, частично растворим в спирте этиловом 96 %, практически нерастворим в воде очищенной.

Подлинность. Инфракрасный спектр поглощения субстанции, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 см⁻¹, должен иметь характеристические полосы поглощения при 1754 (C=O γ -лактона), 1723 (C=O), 1240 (C=O сложноэфирной группы), 1647 (C=C), 1453, 1417, 1360, 1338, 1316, 1296, 1278, 1207, 1143.

При добавлении к субстанции капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора субстанции в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 214 \pm 2 нм.

Элементный анализ: найдено %: С 59.39; Н 5.41; Cl 12.15; вычислено %: С 60.26; Н 5.6; Cl 10.5.

Температура плавления. От 162 до 164 °С (спирт этиловый).

Нормативные требования к упаковке, маркировке, транспортированию и хранению.

Упаковка. По 0.1 кг или 0.2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по

ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

Маркировка. На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название препарата на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е.

Хранение. В прохладном, защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С.

Срок годности 2 года.

На рисунке 9 представлена химическая схема производства субстанции хлорацетилгроссгемина.

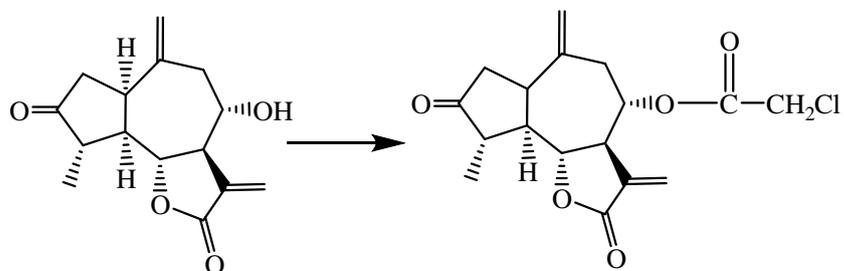


Рисунок 9 - Химическая схема производства субстанции хлорацетилгроссгемина

Технологическая схема производства субстанции хлорацетилгроссгемина представлена на рисунке 10.

Аппаратурная схема производства субстанции хлорацетилгроссгемина приведена на рисунке 11.

Изложение технологического процесса

Стадии вспомогательных работ

ВР.1 - Подготовка гроссгемина, спирта этилового

ВР 1.1 Определение массы растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,3 л этилового спирта и передают на ТП 2.1.

ВР 1.2 Определение массы технического гроссгемина

Взвешивают на весах общего назначения марки МЕ-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г.) 100 г. (точная навеска) гроссгемина и передают на ТП 1.1.

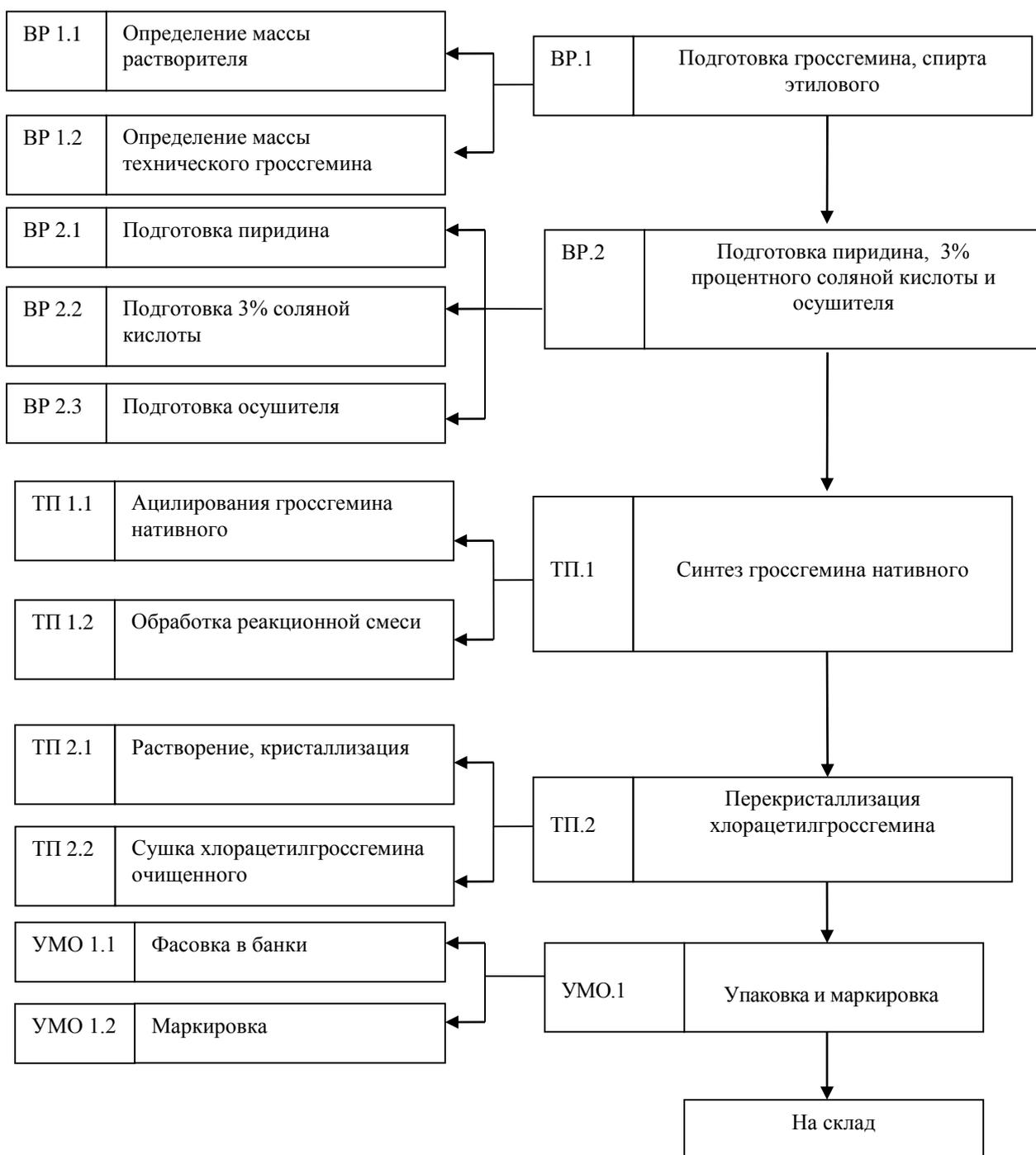


Рисунок 10 - Технологическая схема получение субстанции хлорацетилгроссгемина

BP 2 Подготовка пиридина, 3% процентного соляной кислоты и осушителя
 BP 2.1 Подготовка пиридина

Для очистки 0,6 л пиридина (от влаги и от пиколинов) добавляет 100 г едкого калия, оставляют на неделю, затем перегоняют на обычном аппарате с дефлегматором. Применение резиновых пробок недопустимо. Собирают фракцию 154,5 °С и передают на TP 1.1.

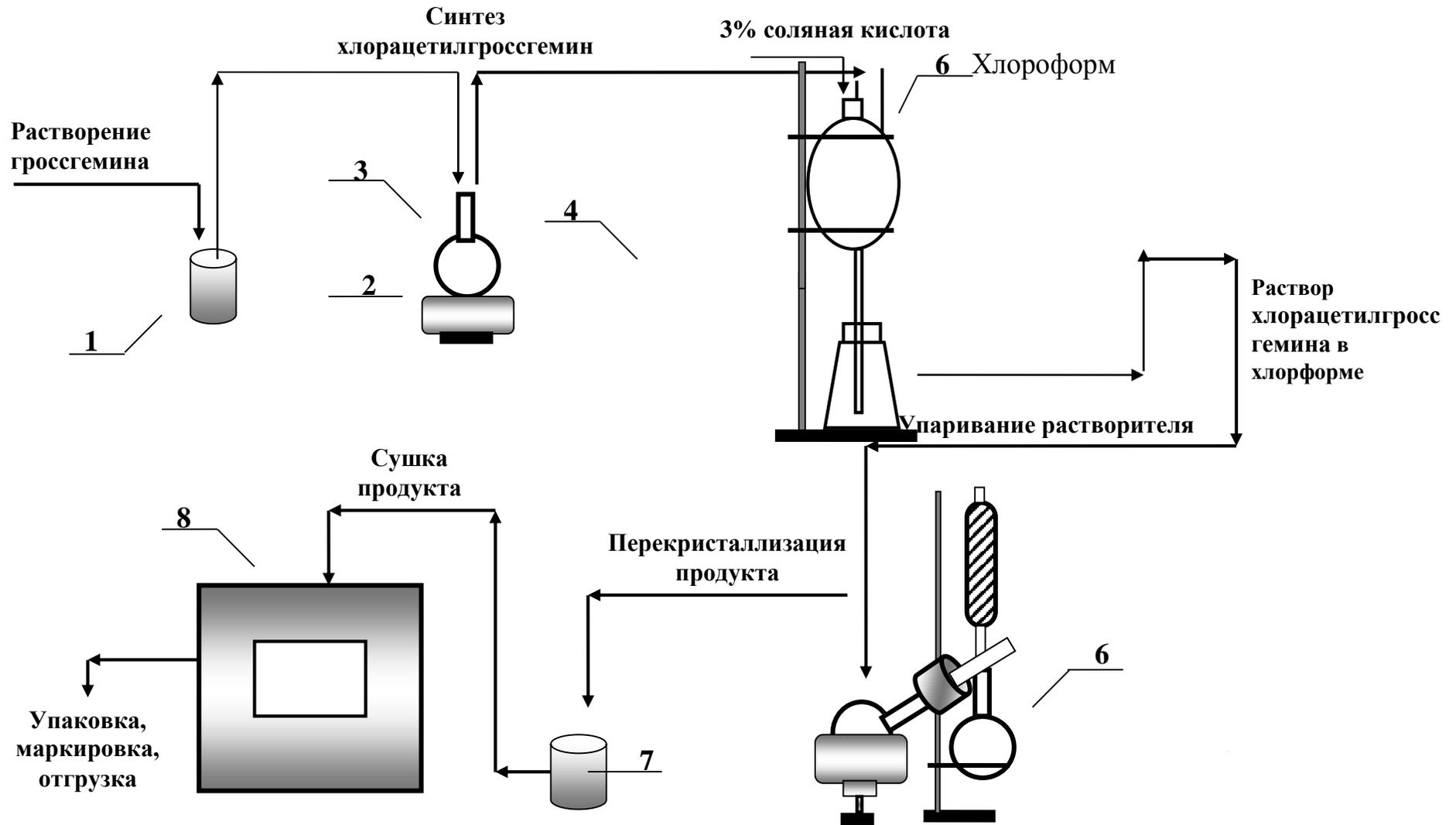


Рисунок 11 - Аппаратурная схема получение хлорацетилгроссгемина

ВР 2.2 Подготовка 3% соляной кислоты

450 мл концентрированной соляной кислоты добавляют 9,55 л воды очищенной и передают на ТП 1.2.

ВР 2.3 Подготовка осушителя

Натрий сернокислый ГОСТ 4166-79 с изм. 1.2 прокаливают в сухожаровом шкафу при температуре 200-300⁰С в течение 2 часов. Затем его взвешивают на весах общего назначения марки МЕ-2100 (Германия, предел измерения 2,1 кг, цена деления 0,01 г.) 4,0 кг (точная навеска). Прокаленный натрий сернокислый определенной массы передается на ТП 1.2.

Стадии технологического процесса

ТП. 1 Синтез гроссгемина нативного

ТП 1.1 Ацилирования гроссгемина нативного

К раствору 100,0 г (0,38 моль) гроссгемина в 0,5 л пиридине добавляют 117 г (0,68 моль) хлоруксусного ангидрида. Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 20 минут. Ход реакции контролируют методом тонкослойной хроматографии и передают на ТП 1.2.

ТП 1.2 Обработка реакционной смеси

Далее реакционную смесь переносят в делительную воронку, добавляют 100 мл хлороформа и 3%-ный водный раствор соляной кислоты, обработку повторяют 3 раза (до нейтральной среды), затем органический слой высушивают над Na₂SO₄, через 1 час отфильтровывают. Фильтрат отгоняют на роторном испарителе и передают на ТП 2.1.

ТП 2 Перекристаллизация

ТП 2.1 Расворение и кристаллизация

Вещество перекристаллизовывают в этиловом спирте, в результате в колбе постепенно начинают выпадать кристаллы гроссгемина в виде мелкого кристаллического вещества с желтовато-коричневым оттенком.

Полученный очищенный хлорацетилгроссгемин передают на ТП 2.2.

ТП 2.2 Сушка хлорацетилгроссгемина очищенного

После кристаллизации хлорацетилгроссгемина сушат сначала на фильтре под вытяжной вентиляцией в течение 2 часов, а затем переносят в фарфоровую чашку и сушат их в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 ⁰С и давлении -0,08-(-0,09) мРа до постоянной массы. хлорацетилгроссгемина должен иметь вид мелкого кристаллического порошка с желтовато-коричневого цвета без запаха.

Температуру плавления определяют на приборе для определения температуры плавления, которая составляет 162-164 ⁰С (из этилового спирта).

Чистота и подлинность, полученного хлорацетилгроссгемина очищенного, определяется методом ВЭЖХ в условиях описанных выше. Время удерживания хлорацетилгроссгемина 17±1 мин. Чистота хлорацетилгроссгемина очищенного должна составлять не менее 98,0 %.

Инфракрасный спектр поглощения хлорацетилгроссгемина, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от

3800 до 600 см⁻¹, должен иметь характеристические полосы поглощения при 1754 (C=O γ-лактона), 1723 (C=O), 1240 (C=O сложноэфирной группы), 1647 (C=C), 1453, 1417, 1360, 1338, 1316, 1296, 1278, 1207, 1143.

Полученный сухой очищенный хлорацетилгроссгемин передаются на УМО.1.

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.2), а именно, на получение 100 г субстанции хлорацетилгроссгемина с чистотой не менее 97,0 % составляют 2 рабочих дней.

Стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УМО.1 - Упаковка и маркировка субстанции гроссгемина

УМО 1.1 Фасовка в банки

По 1 г в банки из стекломассы типа БВ-10-63-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

УМО 1.2 Маркировка

На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название препарата на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96. Затем препарат передают на склад.

Таким образом, разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции хлорацетилгроссгемина (ОПР-ФД65005037Р-12-17).

6.2 Разработка технологии получения субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Для обеспечения стабильной наработки целевого продукта соответствующего качества, разработана технология получения субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина, которая состоит из трех этапов.

Первый этап: получение цитизинилгроссгемина - 30,0 г гроссгемина растворяют в 300 мл метаноле при перемешивании, к спиртовому раствору гроссгемина добавляют 25,0 г цитизина и оставляют на сутки при перемешивании. Ход реакции контролируют по ТСХ. По окончании реакции растворитель упаривают в вакууме на роторном испарителе.

Получают 32,0 г бесцветного кристаллического вещества состава C₂₆H₃₂O₅N₂ с т. пл. 261-263 °С. Выход 62 %.

Второй этап: получение гидрохлорида цитизинилгроссгемина - 30,0 г цитизинилгроссгемина растворяют в 300 мл этиловом спирте, при перемешивании приливают к нему 10,2 мл соляной кислоты, оставляют на сутки при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ. По

окончании реакции растворитель упаривают в вакууме на роторном испарителе. Получают 50,0 г маслообразного вещества от коричневого цвета.

Третий этап: кристаллизация гидрохлорида цитизинилгроссгемина - к полученному маслообразному гидрохлорида цитизинилгроссгемина приливают 0,5 л этилацетата и перемешивают, гидрохлорид цитизинилгроссгемина выпадает в виде порошка, который промывают этилацетатом дважды. Получают 45,0 г гидрохлорида цитизинилгроссгемина в виде порошка. Гидрохлорида цитизинилгроссгемина сушат сначала на фильтре под вытяжной вентиляцией в течение 2 часов, а затем переносят в фарфоровую чашку и сушат их в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С и давлении -0,08-(-0,09) мРа до постоянной массы.

Гидрохлорид цитизинилгроссгемина должен иметь вид порошка от белого до светло-кремового цвета, без запаха, состава $C_{26}H_{33}O_5ClN_2$ с т. пл. 196 до 198 °С. Выход 93 %.

Таким образом, разработана технология получения субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина, обеспечивающая количественный выход качественного целевого продукта.

6.2.1 Спецификация качества и стандартизация субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Разработан проект АНД (Приложение М) на субстанцию гидрохлорида цитизинилгроссгемина, который составлен на основании результатов анализов 5 серий опытной партии, в соответствии с требованиями ГФ РК. Результаты исследования физико-химических характеристик субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина представлены в таблице 24.

Описание. Порошок от белого до светло-кремового цвета, без запаха.

Растворимость. Растворим в спирте этиловом 96 %, легко растворим в воде очищенной, практически нерастворим в эфире диэтиловом, хлороформе.

Идентификация. Определение проводят методом абсорбционной спектрофотометрии в инфракрасной области (ГФ РК I, т. 1, 2.2.24).

А. Инфракрасный спектр субстанции, снятый в дисках с калия бромидом *P* (3 мг субстанции с 300 мг калия бромида *P*), в области от 3800 до 600 cm^{-1} должен иметь полосы поглощения: 3386 (ОН), 3078, 2926 (С-Н), 2583 (N-H), 1768 (С=О γ -лактона), 1736 (С=О), 1635 (С=C).

В. Определение проводят методом абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях (ГФ РК I, т. 1, 2.2.25).

Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01% раствора субстанции в 96% этаноле *P*, снятый на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм, в области от 200 до 350 нм должен иметь максимум при длине волны (202 ± 2) нм. В качестве компенсационного раствора используют 95% этанол *P*.

С. При добавлении к 0.02 г субстанции одной капли раствора ванилина *P* в кислоте серной *P* появляется фиолетовое окрашивание (терпеноиды).

Примечание. Приготовление раствора ванилина в кислоте серной. 0.1 г ванилина *P* растворяют в 10 мл кислоты серной *P*.

Таблица 24 - Показатели качества субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Показатели качества	Методы испытаний	Нормы отклонений	Серия				
			4	5	6	7	8
1	2	3	010917	020917	030917	051017	061017
Описание	Визуально	Порошок от белого и до светло-кремового цвета, без запаха.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Растворимость	ГФ РК I, т. 1, 1.4	Растворим в спирте этиловом 96 %, легко растворим в воде очищенной, практически нерастворим в эфире диэтиловом, хлороформе.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация: - гидрохлорид цитизинилгроссгемина	ИК-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, 2.2.24	Инфракрасный спектр поглощения субстанции, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 см ⁻¹ , должен иметь характеристические полосы поглощения при 3386 (ОН), 3078, 2926 (С-Н), 2583 (N-H), 1768 (С=О γ-лактона), 1736 (С=О), 1635 (С=C).	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
- гидрохлорид цитизинилгроссгемина	УФ-спектрофотометрия, ГФ РК I, т. 1, 2.2.25	Ультрафиолетовый спектр поглощения 0.01 % раствора препарата в 95 % спирте этиловом Р в области от 200 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны (202 ±2) нм.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
- терпеноиды	В соответствии с АНД	При добавлении к 0.02 г субстанции одной капли раствора ванилина в кислоте серной появляется фиолетовое окрашивание.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
- хлориды		0,02 г субстанции дает характерную реакцию на хлориды	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Температура плавления	ГФ РК I, т. 1, 2.2.14	От 196°С до 198°С.	196-198	197-198	196-198	196-198	196-198
Вода	ГФ РК I, т. 1, 2.5.12	Не более 0.5 %	0,31	0,29	0,29	0,30	0,29
Остаточные количества органических растворителей (этанол)	ГХ, ГФ РК I, т. 1, 2.2.28	Не более 0.1 %	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02

Продолжение таблицы 24

1	2	3	4	5	6	7	8
Родственные примеси	ВЭЖХ ГФ РК I, т. 1, 2.2.29	Не более 2.0 %.	1,51	1,47	1,52	1,49	1,49
Количественное определение	В соответствии с АНД	Не менее 97.0 %.	97,67	97,77	98,45	98,06	98,35
Сульфатная зола	ГФ РК I, т. 1, 2.4.14	Не более 0.1%	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03
Тяжелые металлы	ГФ РК I, т. 1, 2.4.8	Не более 0.001 %	0,0008	0,0007	0,0008	0,0007	0,0008
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 В. В 1 г субстанции допускается наличие не более 10 ⁵ аэробных бактерий и 10 ⁴ грибов. Не более 10 ³ энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий в 1 г. В 1 г субстанции не допускается наличие <i>Escherichia coli</i> . Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г.	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Упаковка	В соответствии с АНД	См. утвержденный макет упаковки	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Маркировка	В соответствии с АНД	На этикетке указывают страну-производителя, наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак и адрес, название субстанции на латинском, государственном и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой и транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Транспортирование	ГОСТ 17768-90 Е	В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Хранение	В соответствии с АНД	В защищенном от света месте при температуре не выше 300С.	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Срок хранения	В соответствии с АНД	2 года					

Раствор используют свежеприготовленным.

0.02 г субстанции дает характерную реакцию на хлориды (ГФ РК I, т. 1, 2.4.4).

0.02 г субстанции дает характерную реакцию на ацетаты.

Температура плавления. От 196°C до 198°C (ГФ РК I, т. 1, 2.2.14).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0.5% (ГФ РК I, т. 1, 2.2.32).

Родственные примеси. По 20 мкл испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-детектором в условиях описанных в разделе «Количественное определение» (ГФ РК I, т. 1, 2.2.29).

На хроматограмме испытуемого раствора сумма площадей всех дополнительных пиков, кроме основного не должна превышать 2.0%.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13.

Субстанция в условиях испытания не обладает антимикробным действием.

В 1 г субстанции допускается наличие не более 10^5 аэробных бактерий и 10^4 грибов (суммарно), 10^3 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий. Не допускается наличие *Escherichia coli* в 1 г субстанции и *Salmonella* в 10 г субстанции.

Остаточные количества органических растворителей. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.28).

150.0 мг субстанции растворяют в 3 мл раствора внутреннего стандарта (испытуемый раствор).

По 0.2 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка капиллярная ZB-5 размером 30 м x 0.25 мм, покрытой сополимером 5% - фенил - 95% - диметилполисилоксана с толщиной пленки 0.25 мм;
- газ-носитель: аргон P, скорость 20 см³ /мин;
- водород - 40 см³ /мин;
- воздух - 400 см³ /мин;
- температура колонки 30°C;
- температура детектора 120°C;
- температура испарителя 100°C.

Содержание этилацетата (X) в субстанции, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot S_{on} \cdot f}{S_{in} \cdot S_0 \cdot m},$$

S_{wp} – среднее значение площадей пиков этилацетата, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_{wir} – среднее значение площадей пиков внутреннего стандарта, вычисленное из хроматограмм раствора сравнения;

S_{wip} – среднее значение площадей пиков внутреннего стандарта, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_{wr} – среднее значение площадей пиков этилацетата, вычисленное

из хроматограмм раствора сравнения;

m – масса навески препарата, в миллиграммах;

V_0 – объем этилацетата в растворе сравнения, в миллилитрах;

ρ – плотность этилацетата;

P – содержание этилацетата в СО этилацетата, в процентах;

3 – разведение;

f – расчетный фактор, равный

$$f = \frac{V_0 \cdot \rho \cdot 3 \cdot P}{100}$$

Содержание этилацетата в субстанции должно быть не более 0.1%.

Количественное определение. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.29).

0.1000 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл подвижной фазы: *метанол P - вода P* (1:1), растворяют при нагревании на водяной бане и охлаждают. Доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

По 20 мкл полученного раствора и раствора сравнения хроматографируют на жидкостном хроматографе получая не менее 5 хроматограмм в следующих условиях:

- колонка размером 4,6 x 150 мм, заполненная "Zorbax SB-C18," с размером частиц 5 мкм;

- подвижная фаза: *метанол P - вода P* (1:1), дегазированная любым удобным способом;

- детектирование при длине волны 214 нм;

- скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин;

- температура колонки – 20° С.

Содержание гидрохлорид цитизинилгроссгемина в субстанции, в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot (100 - W)}$$

где S_1 - среднее значение площадей пика гидрохлорид цитизинилгроссгемина на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 - среднее значение площадей пика гидрохлорид цитизинилгроссгемина на хроматограмме раствора сравнения гидрохлорид цитизинилгроссгемина;

m_0 – навеска гидрохлорид цитизинилгроссгемина в граммах;

m_1 - навеска субстанции гидрохлорид цитизинилгроссгемина в граммах;

P – содержание гидрохлорид цитизинилгроссгемина в субстанции хлорацетилгроссгемина в процентах.

W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

Содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в субстанции, в пересчете на

цитизинилгроссгемина (в сухом сырье) должно быть не менее 0.2%.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Проверка пригодности хроматографической системы: Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

-эффективность аналитической колонки, рассчитанная по пику образца гидрохлорид цитизинилгроссгемина на хроматограмме гидрохлорид цитизинилгроссгемина, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок;

-относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика гидрохлорид цитизинилгроссгемина на хроматограмме гидрохлорид цитизинилгроссгемина при 5 повторных инъекциях должно быть не более 2 %;

-коэффициент асимметрии пика, рассчитанный для пика гидрохлорид цитизинилгроссгемина на хроматограмме гидрохлорид цитизинилгроссгемина должен быть не более 2.

По результатам анализа содержание $C_{26}H_{33}O_5ClN_2$ (гидрохлорид цитизинилгроссгемина) в исследуемых образцах субстанции гидрохлорид цитизинилгроссгемина составляет 97-99 % (рисунок 12).

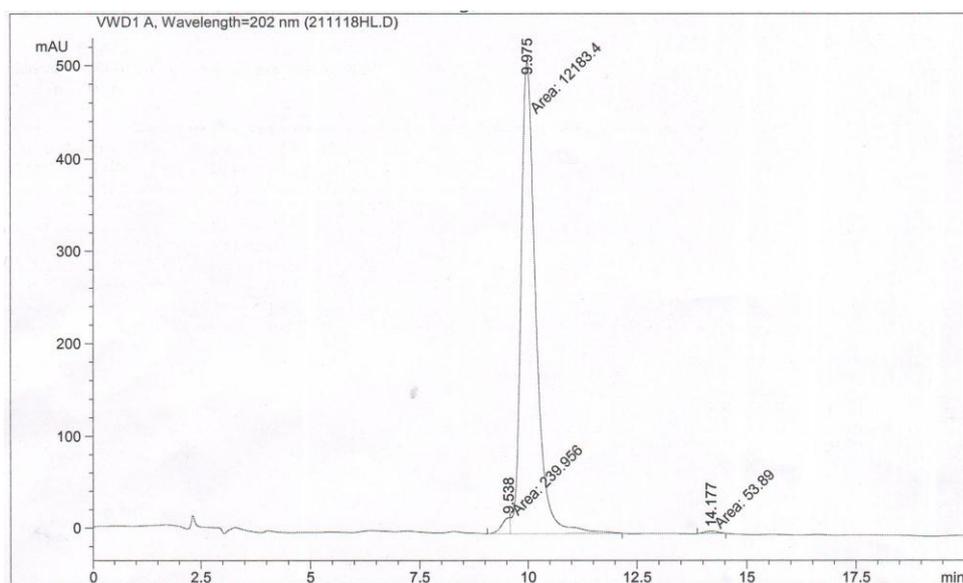


Рисунок 12 - Хроматограмма субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Изучение стабильности субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина проведено нами при естественных условиях.

На хранение были заложены 5 серий опытных образцов гидрохлорид цитизинилгроссгемина.

Основными показателями качества гидрохлорид цитизинилгроссгемина в процессе хранения были внешний вид, растворимость, температура плавления, посторонние примеси, количественное определение, микробиологическая чистота.

Контроль основных показателей качества проводили через каждые 6 месяцев в течение 2,5 лет. На основании результатов исследований (таблица 25) срок хранения субстанции гидрохлорид цитизинилгроссгемина 2 года.

Таблица 25 - Результаты исследования стабильности субстанции гидрохлорид цитизинилгроссгемина

Номер серии	Дата анализа	Описание	Растворимость	Идентификация	Температура плавления	Вода	Остаточные количества органических растворителей (этанол)	Родственные примеси	Количественное определение
Серия 010116	18.01.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,30	0,02	0,23	99,45
	18.04.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,30	0,02	0,23	99,45
	18.07.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,30	0,02	0,23	99,45
	18.10.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,31	0,02	0,23	99,44
	18.01.17	соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,22	99,45
	18.04.17	соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,22	99,45
	18.07.17	не соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,22	99,45
Серия 020116	19.01.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,29	0,03	0,21	99,47
	19.04.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,29	0,02	0,21	99,48
	19.07.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,29	0,02	0,21	99,48
	19.10.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,30	0,02	0,21	99,47
	19.01.17	соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,30	0,02	0,21	99,47
	19.04.17	соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,22	99,45
	19.07.17	не соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,23	99,44
Серия 010216	01.02.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,30	0,03	0,25	99,42
	02.05.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,30	0,02	0,24	99,44
	02.08.16	соответствует	соответствует	соответствует	196-198	0,31	0,02	0,24	99,43
	02.11.16	соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,24	99,43
	02.02.17	соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,24	99,43
	02.05.17	соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,24	99,43
	02.08.17	не соответствует	соответствует	соответствует	197-199	0,31	0,02	0,24	99,43

6.2.2 Разработка опытно-промышленного регламента на производство субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

На основании полученных данных, разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина (Приложение Н).

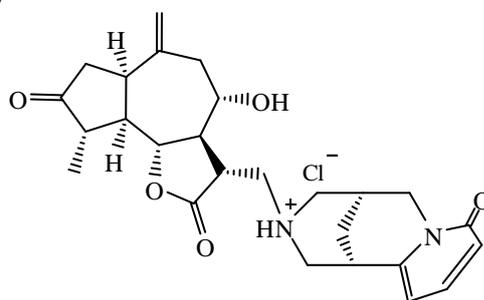
Наименования продукции. Субстанция гидрохлорида цитизинилгроссгемина.

Основное назначение продукции. Субстанция для производства лекарственного средства антигельминтного действия.

Краткое описание внешнего вида и физико-химических свойств продукции:

гидрохлорид цитизинилгроссгемина [гидрохлорид 13-цитизинил-3-оксо-8-гидрокси-1,5,7 α ,4,8,11 β (H) -гвай-10(14)-ен-6,12-олида].

Химическая формула:



(31)



М.м. 489

Описание. Порошок от белого до светло-кремового цвета, без запаха. Содержание основного вещества не менее 97 %.

Растворимость. Растворим в спирте этиловом 96 %, легко растворим в воде очищенной, практически нерастворим в эфире диэтиловом, хлороформе.

Подлинность. Инфракрасный спектр поглощения субстанции гидрохлорид цитизинилгроссгемина, полученный в дисках с калия бромидом (3 мг препарата в 300 мг калия бромида), в области от 3800 до 600 cm^{-1} , должен иметь характеристические полосы поглощения при 3386 (ОН), 3078, 2926 (С-Н), 2583 (N-H), 1768 (C=O γ -лактона), 1736 (C=O), 1635 (C=C).

При добавлении к субстанции капли раствора ванилина в кислоте серной, раствор окрашивается в фиолетовый цвет (терпеноиды).

Ультрафиолетовый спектр 0,001 % раствора субстанции гидрохлорид цитизинилгроссгемина в этиловом спирте 96 % в области от 190 нм до 400 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны (202 \pm 2) нм.

Чистота и подлинность гроссгемина определяется методом ВЭЖХ на приборе Hewlett PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме и составляет не менее 97 %. Время удерживания гидрохлорид цитизинилгроссгемина: 10,0 \pm 1,0 мин.

Условия проведения качественного анализа методом обращенно-фазовой ВЭЖХ:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈, 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: метанол-вода (1:1);
- детектирование при длине волны 202 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обработку результатов проводят с использованием программного обеспечения ChemStation.

Температура плавления. От 196 до 198 °С.

1.4 Нормативные требования к упаковке, маркировке, транспортированию и хранению.

1.4.1 Упаковка. По 0.1 кг или 0.2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78. Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

1.4.2 Маркировка. На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название препарата на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96.

1.4.3 Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е.

1.4.4 Хранение. В прохладном, защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С.

1.4.5 Срок годности 2 года.

На рисунке 13 представлена химическая схема производства субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина.

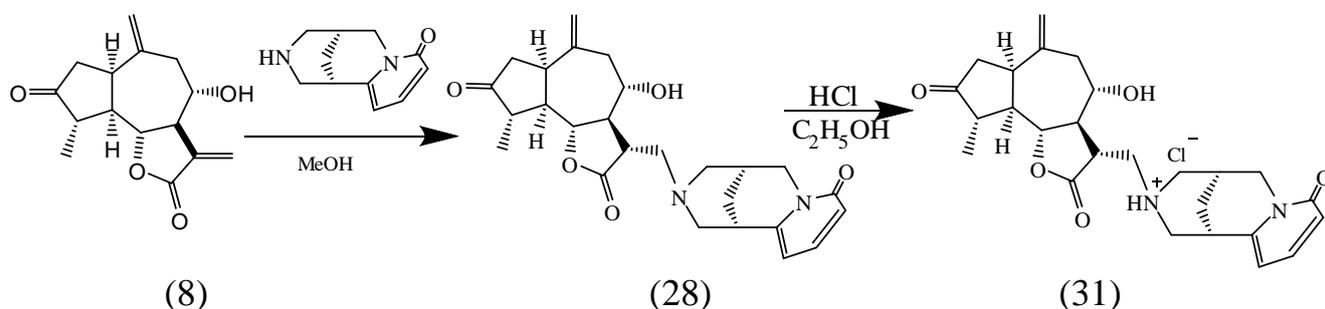


Рисунок 13 - Химическая схема производства субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Технологическая схема производства субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина представлена на рисунке 14.

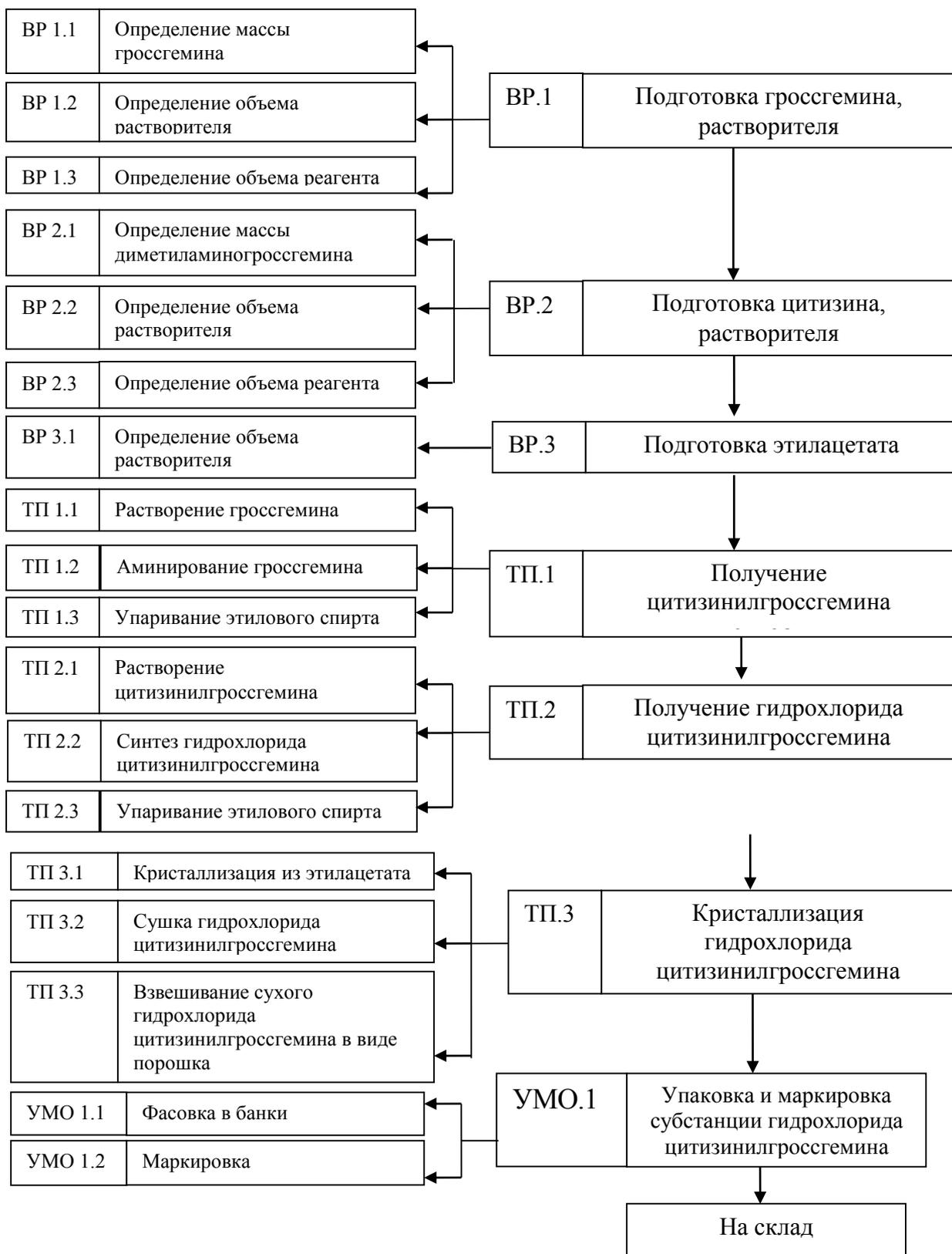


Рисунок 14 - Технологическая схема производства субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Аппаратурная схема производства субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина приведена на рисунке 15.

Изложение технологического процесса

Стадии вспомогательных работ

ВР.1 - Подготовка гроссгемина, растворителя

ВР 1.1 Определение массы гроссгемина

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2.1 кг, цена деления 0.01 г) 30,0 г (точная навеска) гроссгемина и передают на ТП 1.1.

ВР 1.2 Определение объема растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,3 л метилового спирта и передают на ТП 1.1.

ВР 1.3 Определение объема реагента

Отмеряют мерным цилиндром 25 г цитизина и передают на ТП 1.2.

ВР.2 - Подготовка цитизина, растворителя

ВР 2.1 Определение массы цитизина

Взвешивают на весах общего назначения марки ME-2100 (Германия, предел измерения 2.1 кг, цена деления 0.01 г.) 30,0 г. (точная навеска) цитизинилгроссгемина и передают на ТП 2.1.

ВР 2.2 Определение объема растворителя. Отмеряют мерным цилиндром 0,3 л этилового спирта и передают на ТП 2.1.

ВР 2.3 Определение объема реагента

Отмеряют мерным цилиндром 0,06 л соляной кислоты и передают на ТП 2.1.

ВР.3 - Подготовка этилацетата

ВР 3.1 Определение объема растворителя

Отмеряют мерным цилиндром 0,5 л этилацетата и передают на ТП 3.1.

Стадии технологического процесса

ТП.1 – Получение цитизинилгроссгемина

ТП 1.1 Растворение гроссгемина. 30,0 г гроссгемина растворяют в 300 мл метаноле при перемешивании и передают ТП 1.2.

ТП 1.2 Аминирование гроссгемина

К спиртовому раствору гроссгемина добавляют 25,0 г цитизина и оставляют на сутки при перемешивании. Ход реакции контролируют по ТСХ. По окончании реакции спиртовой раствор цитизинилгроссгемина передают на ТП 1.3.

ТП 1.3 Упаривание метилового спирта

Растворитель упаривают в вакууме на роторном испарителе.

Получают 32,0 г бесцветного кристаллического вещества состава $C_{26}H_{32}O_5N_2$ с т. пл. 261-263 °С. Выход 62 %. Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.1), а именно, на получение 0,3 кг цитизинилгроссгемина составляют 15 рабочих дней.

ТП.2 - Получение гидрохлорида цитизинилгроссгемина

ТП 2.1 Растворение цитизинилгроссгемина

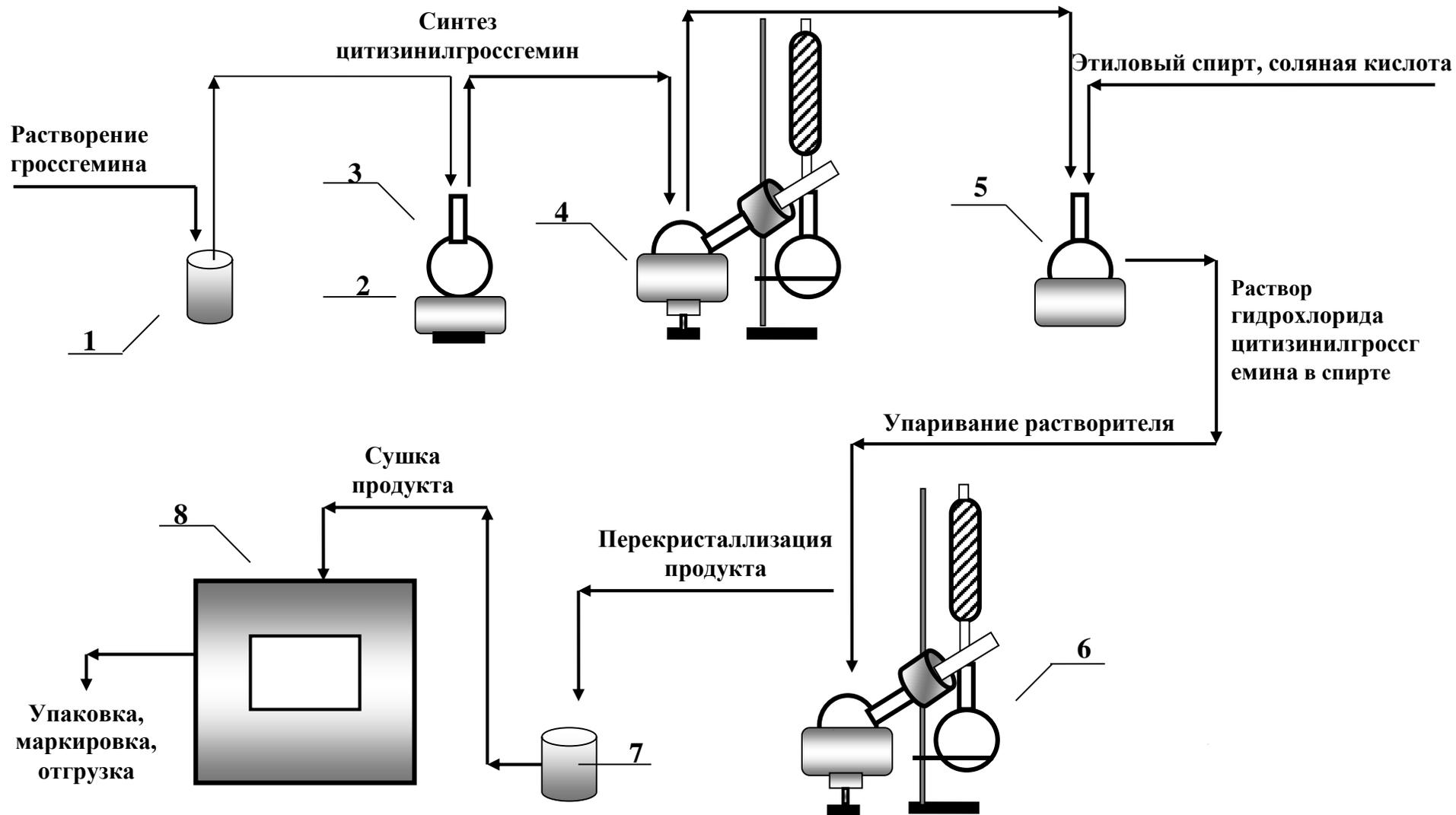


Рисунок 15 - Аппаратурная схема получение субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина

30,0 г цитизинилгроссгемина растворяют в 300 мл этиловом спирте при перемешивании и передают ТП 2.2.

ТП 2.2 Синтез гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Раствор цитизинилгроссгемина в этиловом спирте и при перемешивании приливают к нему 10,2 мл соляной кислоты, оставляют на сутки при комнатной температуре. Ход реакции контролировали по ТСХ. По окончании реакции раствор гидрохлорида цитизинилгроссгемина в спирте передают на ТП 2.3.

ТП 2.3 Упаривание этилового спирта

Растворитель упаривают в вакууме на роторном испарителе.

Получают 50,0 г маслообразного вещества от коричневого цвета, которое передают на ТП 3.

ТП.3 - Кристаллизация гидрохлорида цитизинилгроссгемина

ТП 3.1 Кристаллизация из этилацетата

К полученному маслообразному гидрохлорида цитизинилгроссгемина приливают 0,5 л этилацетата и перемешивают. гидрохлорида цитизинилгроссгемина выпадает в виде порошка, который промывают этилацетатом дважды.

Получают 45,0 г гидрохлорида цитизинилгроссгемина в виде порошка. Полученный продукт передают на ТП 3.2.

ТП 3.2 Сушка гидрохлорида цитизинилгроссгемина

Гидрохлорид цитизинилгроссгемина сушат сначала на фильтре под вытяжной вентиляцией в течение 2 часов, а затем переносят в фарфоровую чашку и сушат их в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С и давлении $-0,08(-0,09)$ мРа до постоянной массы. гидрохлорида цитизинилгроссгемина должен иметь вид порошка от белого до светло-кремового цвета, без запаха, состава $C_{26}H_{33}O_5ClN_2$ с т. пл. 196 до 198 °С. Выход 93 %.

Температуру плавления определяют в открытом капилляре на приборе для определения температуры плавления (ПТП).

Качественный анализ субстанции гроссгемина проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C₁₈, 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 1:1;
- детектирование при длине волны 202 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Обсчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Общие затраты времени на проведение данной стадии (ТП.4), а именно,

на получение 1,0 кг субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина с чистотой не менее 97,0 % составляют 30 рабочих дней.

Стадии упаковки, маркировки, отгрузки

УМО.1 - Упаковка и маркировка субстанции гидрохлорида цитизинилгросс-гемина

УМО 1.1 Фасовка в банки

По 0.1 кг или 0.2 кг в банки из стекломассы типа БВ-1000-63-ОС или БВ-2000-90-ОС по ОСТ 64-2-71-80. Банки укупоривают навинчиваемыми пластмассовыми крышками типа 1.1 с прокладками типа 2.1 по ОСТ 64-2-87-81 или ТУ 64-2-269-78.

Крышку и часть горловины обтягивают пергаментом по ГОСТ 1341-97, обвязывают нитками хлопчатобумажными по ГОСТ 6309-93 и заливают парафином по ГОСТ 23683-89. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку заворачивают в бумагу оберточную по ГОСТ 7625-86.

УМО 1.2 Маркировка

На этикетки указывают страну, предприятие-изготовитель, его товарный знак и адрес, название субстанции на государственном, латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности. Маркировка групповой упаковки и транспортной тары по ГОСТ 14192-96. Затем препарат передают на склад.

На базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» организовано опытное производство субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина (Приложения О, П, Р).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований можно сделать следующие **выводы**:

1. Определены сырьевые запасы и при этом, установлено, что ежегодный объем заготовки лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего в сообществах, произрастающих на территории Центрального Казахстана, составляет от 11,9 до 21,8 ц/га. По внешним признакам, микроскопическим характеристикам, количественному содержанию фармакологически активного соединения гроссгемина и результатам товароведческого анализа растительное сырье *Chartolepis intermedia* Boiss. соответствует нормативному документу.

2. Впервые проведена ультразвуковая экстракция хартолеписа среднего и определены оптимальные условия, обеспечивающие количественное извлечение гроссгемина из растительного сырья.

3. Впервые разработана экономичная технология получения субстанции гроссгемина из спиртового экстракта хартолеписа среднего, применение которой, за счет исключения использования дорогостоящих растворителей на стадиях экстракции и выделения, позволило сократить продолжительность и повысить производительность технологического процесса, в результате снизить себестоимость целевого продукта в 9 раз; проведена оценка качества субстанции гроссгемина, подтверждено ее соответствие нормативному документу. Разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство субстанции гроссгемина (ОПР-ФД 65005037Р-11-15).

4. Впервые на основе гроссгемина синтезированы хлорацетилгроссгемин и гидрохлорида цитизинилгроссгемина, строение которых установлены на основании ИК-, УФ-, масс-, ЯМР ^1H , ^{13}C -спектров, двумерной спектроскопии ЯМР ^1H - ^1H , ^{13}C - ^1H (COSY, COLOC), данных элементного анализа; по результатам изучения биологической активности, выявлено, что хлорацетилгроссгемин обладает высокой цитотоксичностью в отношении острой моноцитарной лейкемии, при умеренной токсичности, а гидрохлорид цитизинилгроссгемина в эксперименте *in vivo* проявляет выраженное антигельминтное действие против гельминтов из семейства *Nematodae*. Хлорацетилгроссгемин предложен в качестве субстанции для разработки нового противоопухолевого средства и рекомендован для расширенных доклинических испытаний, а гидрохлорид цитизинилгроссгемина предложен в качестве субстанции для создания нового лекарственного средства антигельминтного действия.

5. Разработаны технологии получения фармакологически активных субстанций на основе гроссгемина, позволяющие производить необходимое количество хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина соответствующего качества.

6. Разработаны спецификации качества и проведена стандартизация субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина,

изучена их стабильность; разработаны проекты АНД на субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина.

7. Разработаны и утверждены опытно-промышленные регламенты на производство субстанции хлорацетилгроссгемина (ОПР-ФД65005037Р-12-17) и субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина (ОПР-ФД65005037Р-13-17); на базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» организовано опытное производство субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина для доклинических испытаний.

Оценка полноты решения поставленных задач. Поставленные задачи по исследованию сырьевых запасов на территории Центрального Казахстана и оценке качества лекарственного растительного сырья хартолеписа среднего; ультразвуковой экстракции хартолеписа среднего и определению оптимальных условий количественного извлечения гроссгемина из растительного сырья; разработке экономичной технологии получения гроссгемина из хартолеписа среднего; синтезу новых модифицированных производных на основе гроссгемина, установлению строения и исследованию их биологических свойств; разработке технологий получения субстанций хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина; разработке нормативной документации на субстанции хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина в виде проектов АНД и опытно-промышленных регламентов на производство, выполнены полностью.

Рекомендации и исходные данные по конкретному использованию результатов. Результаты диссертации, полученные в ходе проведенных исследований, имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Усовершенствована технология получения субстанции гроссгемина из спиртового экстракта хартолеписа среднего; на основе гроссгемина синтезированы хлорацетилгроссгемин и гидрохлорид цитизинилгроссгемина, обладающие практически ценными свойствами, строение которых установлены на основании спектральных данных; разработаны технология получения и опытно-промышленный регламент производства хлорацетилгроссгемина - субстанции для создания нового лекарственного средства противоопухолевого действия, разработан проект АНД и проведена стандартизация субстанции хлорацетилгроссгемина, изучена ее стабильность; разработаны технология получения и опытно-промышленный регламент производства гидрохлорида цитизинилгроссгемина - субстанции для создания нового лекарственного препарата антигельминтного действия, разработан проект АНД и проведена стандартизация субстанции гидрохлорида цитизинилгроссгемина, изучена ее стабильность; разработанные технологии внедрены на базе ТОО «Карагандинский фармацевтический завод» и организовано опытное производство субстанций гроссгемина, хлорацетилгроссгемина и гидрохлорида цитизинилгроссгемина. Результаты данной диссертационной работы могут быть использованы в фармации, фармацевтической химии и технологии лекарств.

Оценка технико-экономической эффективности внедрения.

Результаты диссертация, содержат новые технологические, экономические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие фармацевтической науки и отечественного фармацевтического производства. Применение разработанной технология получения субстанции гроссгемина, путем исключения использования дорогостоящих растворителей на стадиях экстракции и выделения, позволило сократить продолжительность и повысить производительность технологического процесса, и при этом, существенно снизить себестоимость целевого продукта - в 9 раз; проведена оценка качества субстанции гроссгемина, подтверждено ее соответствие нормативному документу; хлорацетилгроссгемин предложен в качестве субстанции для разработки нового лекарственного средства противоопухолевого действия и рекомендован для расширенных доклинических испытаний; гидрохлорид цитизинилгроссгемина предложен в качестве субстанции для создания нового лекарственного средства антигельминтного действия.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области. В целом, научно-методический уровень представленной диссертационной работы соответствует современным аналогам, опубликованным в открытой научной печати. По материалам диссертации получен 1 патент РК, получено 1 положительное решение на выдачу патента РК, опубликованы 4 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан; 7 статей в зарубежных научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus; тезисы 7 докладов, из них тезисы 3 докладов на международных конференциях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sulsen V.P., Martino V.S. Sesquiterpene Lactones.-Switzerland: Springer, 2018.-371p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-78274-4>.
2. Zhong-Nan Wu, Yu-Bo Zhang, Neng-Hua Chen, Mo-Jiao Li, Man-Mei Li, Wei Tang, Ling Zhuang, Yao-Lan Li, Guo-Cai Wang Sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their anti-inflammatory activities //Phytochemistry.-2017.-137.-P. 81-86.
3. Jie-Wei Wu, Chun-Ping Tang, Yao-Yao Cai, Chang-Qiang Ke, Li-Gen Lin, Sheng Yao, Yang Ye Cytotoxic germacrane-type sesquiterpene lactones from the whole plant of *Inula cappa* // Chinese Chemical Letters.- 2017.-Vol.28. -P. 927-930.
4. Beerkman A.C., Wierenga P.K., Woerdenbag H.J. et al Artemisinin derived sesquiterpene lactones as potential antitumor compounds: cytotoxic action against bone marrow and tumor cells //Planta Medical.-1998.-Vol.64.-P.615-619.
5. Adekenov S.M. PCT Int. Appl. WO 9848.789 //Chem. Abstr., 1999.-Vol.130.-P.480.
6. Vajs V., Todorovic N., Ristic M. et al. Guaianolides from *Centaurea nicolai*: antifungal activity //Phytochemistry.-1999.-Vol.52.-P.383
7. Lu Li, Hongchun Liu, Chunping Tang, Sheng Yao, Changqiang Ke, Chenghui Xu, Yang Ye Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Artemisia anomala* //Phytochemistry Letters.-2017.-Vol.20.-P. 177-180.
8. Hai-bo Wu, Hai-bin Wu, Wen-shu Wang, Ting-ting Liu, Mu-ge Qi, Jin-chao Feng, Xin-yuan Li, Yi Liu Insecticidal activity of sesquiterpene lactones and monoterpenoid from the fruits of *Carpesium abrotanoides* //Industrial Crops and Products.-2016.-Vol.92.-P.77–83.
9. Takuya Ito, Simayijiang Aimaiti, Nwet Nwet Win, Takeshi Kodama, Hiroyuki Morita New sesquiterpene lactones, vernonilides A and B, from the seeds of *Vernonia anthelmintica* in Uyghur and their antiproliferative activities //Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.-2016.-Vol.26.-P.3608-3610.
10. Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. Изво: М.: ГЭОТАР-Мед, 2009.-С.504-506.
11. Пат. 202468 СССР. Способ получения тауремизина / К.С. Рыбалко, А.И. Баньковский, Р.И. Евстратова, В.А. Горелый; опубл. 23.11.67. Бюл. №195.
12. Пат. 577034 СССР. Способ получения сесквитерпеновых лактонов / П.П. Хворост, Д.Г. Колесников, Н.Ф. Комиссаренко, Г.В. Оболещева, А.И. Видюкова, Я.И. Хаджай, М.М. Лучкова, В.П. Георгиевский, Л.Д. Дегтяров, В.В. Зинченко; опубл.25.10.77. Бюл. № 39.
13. Пат. 727646 СССР. Способ получения алантолактона / Н.В. Плеханова, С.А. Луговская, Г.П. Федорченко; опубл. 15.04.80. Бюл. №14.
14. Милман И.А. Аланто- и изоалантолактон //Химия природ. соедин. – 1990. -№3.- С.307.

15. Пат. 1710062 СССР. Способ получения сесквитерпеновых лактонов / Н.Ф. Бабаев, С.В. Серкерев, опубл.07.02.1992. Бюл. №5.
16. Trendafilova A., Chaney Ch., Todorova M. Ultrasound-assisted extraction of alantolactone and isoalantolactone from *Inula helenium* roots. //Pharmacognosy magazine.-2010.- Vol.23, №6.-P. 234-237.
17. Беляков К.В., Попов Д.М. Получение алантолактона стандартного образца //Фармация.-2004.-1.-P. 37.
18. Георгиевский В.П. Технология и стандартизация лекарств. - Харьков: Рирег, 1996. - Т.1. - 749 с.
19. Хабаров И.А. технология производства артемизинина из сырья полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) //Фармацевтический бюллетень.-2016.-№1-2.-С.89-93.
20. Martinez-Correa H.A., Bitencourt R.G., Kayano A.V., Magalhães P.M., Costa F. T.M., Cabral F.A. Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water //Industrial Crops and Products.- 2017.-Vol.95.-P. 535-542.
21. Lin Y.-L., Yang C.-C., Hsu H.-K., Hsu S.-L., Chang C.-M.J., Response surface methodology to supercritical fluids extraction of artemisinin and the effects on rathepatic stellate cell *in vitro* //J. Supercrit. Fluids.-2006.-39.-P.48-53.
22. Quispe-Condori S., Sanchez D., Foglio M.A., Rosa P.T.V., Zetzi C., Brunner G., Meireles M.A.A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. leaves using supercritical carbon dioxide. //J. Supercrit. Fluids.-2005.-36.-P.40-48.
23. Misra H., Mehta D., Mehta B.K., Jain D.C. Microwave-assisted extraction studies of target analyze artemisinin from dried leaves of *Artemisia annua* L.//Org. Chem. Int.-2013.-P.1-6.
24. Tzeng T.C., Lin Y.L., Jong T.T., Chang C.M.J. Ethanol modified supercritical fluids extraction of scopoletin and artemisinin from *Artemisia annua* L. //Sep. Purif. Technol.-2007.-56.-P.18-24.
25. Della Porta G., Reverchon E., Benakis A. Extraction and fractionation of antimalaric drugs by supercritical fluid. -Ninth Meeting on Supercritical Fluids.-2004.-P.1-6.
26. Kohler M., Haerdi W., Christen P., Veuthey J.L. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide //J. Chromatogr. 1997.- 785.-P. 353-360.
27. Briars R., Paniwnyk L. Effect of ultrasound on the extraction of artemisinin from *Artemisia annua*. //Industrial Crops and Products. – 2013.-I.42.-P.595-600.
28. Zhang H., Zhang L., Hu X., Zhou Y., Ding C., Yang R., Wang X., Li D. Optimization of ultrasound-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. by response surface methodology. -Sep. Sci. Technol.-2014.-I.49.-P.673-681.
29. Пат. 101205232A CN. Technical new method for extracting artemisinin from sweet wormwood plants by ultrasonic assistance. Guojun Wang, Xiao Ruan, Qiang Wang.; опубл. 25.06.08.

30. Пат. 6685972A US. Process for isolating artemisinin from *Artemisia annua* /Kumar Sushil, Gupta Shiv Kumar, Singh Digvijay, Gupta Madan Mohan, Jain Dharam Chand, Kahol Atul Prakash, Khanuja Suman Preet, Singh Ram Govind; опубл. 02.10.03.

31. Пат. 103694249A CN. Production technology for extracting artemisinin from *Artemisia annua* L. /Hu Canhua, Lei Yurong.; опубл. 02.04.14.

32. Пат. 102617591A CN. Method for producing artemisinin from *Artemisia annua* serving as Chinese herbal medicine /Xiao Yuan, Dongbin Zhou, Junfei Gao, Chujin Shu; опубл. 01.08.12.

33. Пат. 103664988A CN. Extraction and separation method for artemisinin. / Li Zhipin; опубл. 20.01.16.

34. Пат. 102219790A CN. Green extraction process for artemisinin /Shengqun Huang, Wugou Liu, Zongyan Huang, Huaxing Tan, Xueping Kong; опубл. 19.10.11.

35. Пат. 104628739A CN. Extraction technology of artemisinin /Tan Binfeng; опубл. 20.05.15.

36. Пат. 1931860A CN. Process of extracting, separating and purifying artemisinin from sweet wormwood herb / Gang Xu, Liang Deng, Yaping Zhao; опубл. 19.08.09.

37. Пат. 20100331553 US. Process for manufacturing artemisinin / Villanova Luciano, Villanova Azzurra, Cisale Felicia, Villanova Luigi; опубл. 30.12.10.

38. Пат. 104140433A CN. Artemisinin preparation method / Lan He; опубл. 12.11.14.

39. Пат. 103647480A CN. Method for extracting artemisinin and application of artemisinin / Nanjing Zelang Medical Technology Co. Ltd.; опубл. 25.12.13.

40. Пат. 10336056 A 1 DE. Extracting pharmacological agent from *Artemisia annua* L., useful for treating cancer and AIDS in addition to malaria, comprises using carbon dioxide at relatively low temperature and pressure /Doebel Katrin, Sandau Petra, Franke Horst, Pulz Otto.; опубл. 24.02.05.

41. Пат. 103333178A CN. Method for preparing antimalarial active compound artemisinin through direct column chromatography / Chen Yegao, Ma Yanfang, Cui Guangxin; опубл. 02.10.13.

42. Пат. 2015328617 US. Method and device for the synthesis of artemisinin / Seeberger Peter, Kopetzki Daniel, Lirvesque Francois.; опубл. 19.11.13.

43. Patent 6.242.617.B1 USA, Jun.5.2001; Patent 0946565 European, 15.10.2003; Patent 697 2504.9-08 Deutschen, 23.10.03; Patent 97 947 981.3 Swiss, (CH) EP 0946565; Patent ZL 2006 8 0055852.4 China, 26.12.12 Adekenov S.M. Method and device for production of lyophilized hydrochloride-1(10) β -epoxy-13-dimethylamino-5,7 α ,6,11 β (H)-guaia-3(4)-en-6,12-olide.

44. Пат. 32482 РК. Способ комплексной переработки сырья полыни гладкой / С.М.Адекенов, Е.Г. Толоконников, Х.И. Итжанова, А.Н. Жабоева В.С. Корнеев, И.А.Хабаров; опубл. 15.11.2017. Бюл. № 21.

45. Rasmussen U., Christensen S.B., Sandberg F. Thapsigargine and thapsigargicine, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. //Acta Pharm. Suec. – 1978. – Vol. 15. – P. 133-140.
46. Appendino G., Prosperini S., Valdivia C., Ballero M., Colombano G., Billington R.A., Genazzani A.A., Sterner O. SERCA-Inhibiting Activity of C-19 Terpenolides from *Thapsia garganica* and Their Possible Biogenesis //J. Nat. Prod. – 2005. – Vol. 68. – P. 1213-1217.
47. Ollivier A., Grougnet R., Cachet X., Meriane D., Ardisson J., Boutefnouchet S., Deguin B. Large scale purification of the SERCA inhibitor Thapsigargin from *Thapsia garganica* L. roots using centrifugal partition chromatography //J Chromatogr B. – 2013. - Vol. 926. – P. 16– 20.
48. Kishkentayeva A.S., Adekenov S.M., Drašar P.B Production technologies of pharmacologically active sesquiterpene lactones //Eurasian chemico-technological journal.-2018.- Vol.20(№4).-P.325-333.
49. Рыбалко К.С., Шейченко В.И. Строение гроссгемина – сесквитерпенового лактона из *Grossheimia macrocephala* (Muss.-Puschk) D. Sosn et Takht.// ЖОХ.-1965.- 3.-С.580.
50. Barbetti P., Fardella G., Chiappini I., Scarcia V., Furlani Candiani A. New cytotoxic guaianolides and derivatives from *Grosheimia macrocephala* //Farmaco Ed. Sci.-1985.-Vol. 40, №10.-P.755-769.
51. Samek Z., Holub M., Vokáč K., Droždž B., Jommi G., Gariboldi P., Corbella A. On terpenes. CCXIX. The structure of grosheimin// Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 1972. –Vol. 37, №8. – P. 2611-2629.
52. Popova A.I., Rybalko K.S., Evstratova R.I., Prisyazhnyuk N.P. Сесквитерпеновые лактоны из *Artemisia lagocephala*, *A.schrenkiana* и *Grossheimia ossica* //Химия природ. соедин.-1974.-№4.-P.528.
53. Grabarczyk H., Makowska B. Isolation of grosheimin from the herb of *Venidium decurrens* Less. //Pol. J. Pharmacol. Pharm.-1973.-Vol.25, №5.-P.477-479.
54. Адекенов С.М., Айтуганов К.А., Кагарлицкий А.Д., Рахимов К.Д., Верменичев С.М. Гроссгемин из *Chartolepis intermedia* и *Centaurea ruthenica* // Хим. Фарм. журнал.-1986.-№8.-С.938-942.
55. Пат. 2665975 РФ. Способ выделения 3-оксо-8 α -гидрокси-1,5,7 α ,4,8 β (H)-гвай-10(14),11(13)-диен-12,6-олида /И.П. Каминский, М.В. Белоусов, Т.В. Кадырова, М.С. Юсубов, А.М. Гурьев; опубл. 05.09.18. Бюл. №25.
56. Gonzalez A.G., Garcia Marrero B., Breton J.L. Terpenoids de las compuestas X. Estructure de la grosshemina, lipidiol e isolipidiol lactonas de la *Amberboa lippii* DC y su possible esterequimica //Anales de Quimica.-1970.-P.799-811.

57. Rustaiyan A., Niknejad A., Zdero C., Bohlmann F. A guaianolide from *Centaurea behen* //Phytochemistry.- 1981. – Vol.20, №10. – P.2427-2429.

58. Gonzalez A.G., Bermejo J., Massanet G.M. Aportacion al estudio quimiotaxonomico del genero *Centaurea*, determinacion estructurales de la lactona sesquiterpenicas presentes en *Centaureas* de Canarias y de la peninsula iberica //Rev. Latinoamer. Quim. -1977.-Vol.8.-P.176-180.

59. Yayli N., Baltaci C., Gok Y., Aydin E., Uguncu O. Sesquiterpene lactones from *Centaurea helenioides* Boiss. //Turkish Journal of Chemistry.-2006.-Vol.30.-P.229-233.

60. Ивасенко С.А. Химическая модификация и биологическая активность сесквитерпеновых лактонов α -сантонина и гроссгемина: автореф. ... канд. хим. наук: 02.00.10. – Караганда, 2004. - 24 с.

61. Ивасенко С.А. Технология оригинальных лекарственных препаратов на основе природных сесквитерпеновых лактонов и их стандартизация: автореф. ... докт. фарм. наук: 15.00.01., 15.00.02. - Караганда: Фитохимия, 2010. - 42 с.

62. Флора Казахстана. Том 9, Алма-Ата, 1966, 640 с.

63. Адекенова А.С. Отечественные стандартные образцы гроссгемина, цинаропикрина и гармина для контроля качества производства оригинальных лекарственных средств: дис. ...док. философии PhD: 6D110400.-Караганда: КГМУ, 2016.- 144 с.

64. Nowak G., Drożdż B., Holub M. Sesquiterpene lactones. XXXII. Guaianolides in species from the genus *Chartolepis* Cass. //Acta Societatis Botanicorum Poloniae.-1986.-Vol 55, №2.-P.233-238.

65. Rial C., Novaes P., Varela R.M., Molinillo J.M. G., Macias F.A. phytotoxicity of cardoon (*Cynara cardunculus*) allelochemicals on standard target species and weeds //Journal of Agricultural and Food Chemistry.-2014.-Vol.62.-P.6699-6706.

66. Yae E., Yahara S., El-Aasr M., Ikeda T., Yoshimitsu H., Masuoka Ch., Ono M., Hide I., Nakata Y., Nohara T. Studies on the constituents of whole plants of *Youngia japonica* //Chem. Pharm. Bull. – 2009.- Vol.57, №7.-P.719-723.

67. Bruno M., Bancheva S., Rosselli S. Sesquiterpenoids in subtribe *Centaureinae* (Cass.) Dumort (tribe *Cardueae*, *Asteraceae*): Distribution, ¹³C NMR spectral data and biological properties //Phytochemistry.-2013.-Vol. 95.- P. 19-93.

68. Nowak G. A chemotaxonomic study of sesquiterpene lactones from subtribe *Centaureinae* of the *Compositae* //Phytochemistry.-1992.-Vol.31, №7.-P.2363-23681.

69. Положительное решение от 27.09.2018г. по заявке 2017/0564.1 от 01.07.2017 Способ экстракции хартолеписа среднего (*Chartolepis intermedia* Boiss.) /Адекенов С.М., Кишкентаева А.С., Атажанова Г.А.

70. Рыбалко К.С. Природные сесквитерпеновые лактоны.-Москва: Медицина, 1978.-320с.

71. Adekenov S.M., Aituganov K.A., Chemical transformations of some sesquiterpene lactones // In book: «12th Conference on isoprenoids». - Prague. - 1987. - P. 165.

72. Ivashenko S.A., Kulyjasov A.T., Adekenov S.M. Synthesis of grossgemines quaternary ammonium salts //V International symposium on chemistry of natural compounds.- Tashkent, 2003.- P. 226.

73. Джалмаханбетова Р.И., Ивасенко С.А., Кулыясов А.Т., Хасенов Б.Б., Курманкулов Н.Б., Адекенов С.М. Фосфорпроизводные природных лактонов. Синтез новых диалкилфосфонатов гроссгемина //Химия природ. соедин.-2004.-№4.-С.303-306.

74. Kishkentayeva A.S., Adekenov S.M., Atazhanova G.A., Gerd-Volker Röschenthaler Synthesis of grosheimin fluoroderivatives // Czech Chem. Soc. Symp. Ser. (The International Scientific and Practice Conference (Achievements and prospects for the Development of Phytochemistry) 13.-2015.-P.221-223.

75. Петкевич С.К., Кишкентаева А.С., Рязанцев О.Г., Дикусар Е.А., Клецков А.В., Козлов Н.Г., Атажанова Г.А., Адекенов С.М., Поткин В.И. Синтез 5-арилизоксазол-и 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоксилатов природных спиртов, фенола и его синтетических аналогов // Ж. орган. химии.-2014.-Т.50, Вып.9.-С.1366-1371.

76. Dikusar E.A., Potkin V.I., Petkevich S.K., Kletskov A.V., Kozlov N.G., Ryazantsev O.G., Kishkentaeva A.S., Atazhanova G.A., Adekenov S.M. The analysis of correlation between biological activity of isoxazole and isothiazole derivatives and odor of initial substances // In book: «X International symposium on the chemistry of natural compounds». - Tashkent. - 2013. - P. 357.

77. Kishkentayeva A.S., Khassenova A.B., Atazhanova G.A., Adekenov S.M. New chloro-derivatives of grosheimin // In Book 24th Conference on Isoprenoids, Bialystok, Poland, September 9-12, 2018. – P.136.

78. Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Mitchell P.T., Kishkentaeva A.S., Shaimerdenova Zh.R., Atazhanova G.A., Adekenov S.M., Quinn M.T. The natural sesquiterpene lactones arglabin, grosheimin, agracin, parthenolide, and estafiatin inhibit T cell receptor (TCR) activation //Phytochemistry. - 2018(146). - P.36-46.

79. Патент на изобретение РК №32588 от 12.12.2017 Адекенов С.М., Атажанова Г.А., Кишкентаева А.С. 8α -хлорацетокси-3-оксо-5,7 α ,4,6,8 β (H)-гвай-10(14), 11(13)-диен-6,12-олид, обладающий цитотоксичностью.

80. Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Kishkentaeva A.S., Shaimerdenova Zh.R., Atazhanova G.A., Adekenov S.M., Kirpotina L.N., Quinn M.T. Inhibition of T Cell Antigen Receptor Activation by Semi-Synthetic Derivatives of Sesquiterpene

Lactones and Molecular Modeling of Their Interaction with Glutathione and Kinase ZAP-70 // *Molecules*.-2019.-№24.-P.350-367.

81. Кишкентаева А.С., Шульц Э.Э., Гатилов Ю.В., Патрушев С.С., Карим С., Атажанова Г.А., Адекенов С.М. Синтетические трансформации сесквитерпеновых лактонов.10. Синтез 13-арилгвайанолидов // *Химия гетероцикл. соед.*-2016.-52(10).-P.788-796. (A.S. Kishkentayeva, E.E. Shults, S.S. Patrushev, S. Karim, Yu.V.Gatilov, G.A. Atazhanova, S.M. Adekenov Synthetic transformations of sesquiterpene lactones 10*. Synthesis of 13-arylguaianolides // *Chem. Heterocycl. Compd.*- 2016.-52(10).-P.788-796.

82. Kishkentayeva A.S., Shults E.E., Ivasenko S.A., Atazhanova G.A., Adekenov S.M. 13-aryl-substituted derivatives of grosheimin // *Chemicke Listy*.-2014.-s124.

83. Kishkentayeva A.S., Nazarova O.A., Abdigalyмова B.A., Gatilov Ju.V., Atazhanova G.A., Adekenov S.M. Azirdinederivative of grosheimin// *Book of abstracts 6-th Russian-Korean Conference «Current Issues of Biologically Active Compound Chemistry and Biotechnology»* (Novosibirsk, 2015).-P.205.

84. Kishkentayeva A.S., Abdygalyмова B.A., Seydakhmetova R.B., Atazhanova G.A., Adekenov S.M. Bimolecular compounds on the basis of guaianolides and their biological activity // *11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds.-Turkey. Antalya. -2015.-P.276.*

85. Адекенов С.М., Кишкентаева А.С., Шаймерденова Ж.Р., Атажанова Г.А. Бимолекулярные соединения на основе природных метаболитов // *Химия природ. соед.* - 2018.-№3-P.394-399.