

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.04/30.12.2019. Far.32.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

ТУРСУНОВ ХУРШИД ОБИТОВИЧ

«ВАРИКОЗНЕТ» ГЕЛИНИНГ СИФАТИНИ НАЗОРАТ ҚИЛИШ
УСУЛЛАРИНИ ИШЛАБ ЧИҚИШ

15.00.02- фармацевтик кимё ва фармакогнозия

ФАРМАЦЕВТИКА ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент -2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of the abstract doctor of philosophy dissertation (PhD)

Турсунов Хуршид Обитович

«Варикознет» гелининг сифатини назорат қилиш усуллари ишлаб
чиқиш..... 3

Турсунов Хуршид Обитович

Разработка методов контроля качества геля «Варикознет» 21

Tursunov Khurshid Obitovich

Development of quality control methods for «Varikosnet» gel..... 39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works 42

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.04/30.12.2019. Far.32.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

ТУРСУНОВ ХУРШИД ОБИТОВИЧ

«ВАРИКОЗНЕТ» ГЕЛИНИНГ СИФАТИНИ НАЗОРАТ ҚИЛИШ
УСУЛЛАРИНИ ИШЛАБ ЧИҚИШ

15.00.02- фармацевтик кимё ва фармакогнозия

ФАРМАЦЕВТИКА ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент -2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2020.2.PhD/Far70 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Тошкент фармацевтика институтида бажарилган.
Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.pharmi.uz) ва «Ziyonet» Ахборот таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Шарипов Авез Тўймуродович
фармацевтика фанлари доктори, доцент

Расмий оппонентлар:

Урманова Флюра Фаридовна
фармацевтика фанлари доктори, профессор

Нишанбаев Сабир Зарипбаевич
кимё фанлари доктори, катта илмий ходим

Етакчи ташкилот:

Тошкент кимё технология институти

Диссертация ҳимояси Тошкент фармацевтика институти ҳузуридаги DSc.04/30.12.2019. Far.32.01 рақамли илмий кенгашнинг 2022 йил «___» _____ соат ___ даги мажлисида бўлиб ўтади (манзил: 100015, Тошкент ш., Миробод тумани, Ойбек кўчаси, 45-уй. Тел.: (+99871) 256-37-38; факс: (+99871) 256-45-04; e-mail: info@pharmi.uz.

Диссертация билан Тошкент фармацевтика институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (___ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100015, Тошкент ш., Миробод тумани, Ойбек кўчаси, 45-уй. Тел.: (+99871) 256-37-38.

Диссертация автореферати 2022 йил «___» _____ куни тарқатилди
(2022 йил «___» _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

К.С.Ризаев

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси, т.ф.д.

Ё.С.Кариева

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий котиби, фарм.ф.д., профессор

Ф.Ф.Урманова

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, фарм.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилотининг маълумотига кўра аҳоли орасида юрак-қон томир патологиялари 2019 йилнинг ўзида 9,0 млн. инсоннинг ўлимига сабаб бўлган ва ушбу кўрсаткич бўйича касалликлар ичида биринчи ўринни эгаллайди. Шунинг учун ушбу фармакотерапевтик таъсирга эга дори воситаларни номенклатураси кенгайтириш, уларни сифатини ҳалқаро талаблар даражасида таъминлаш, янги замонавий таҳлил усулларини ишлаб чиқиш, специфик фаоллигини ва безарарлигини исботлаш мақсадида клиник олди синовларни ўтказиш муҳим аҳамият касб этади.

Ҳозирги кунда жаҳон миқёсида органик бирикмалардан юрак-қон томир веноз тромбози ва бавосил касалликларини олдини олиш ва даволашда қўлланиладиган дори воситалар олиш, сифатини назорат қилиш усулларини ишлаб чиқиш, турғунлигини аниқлаш бўйича илмий тадқиқотларга катта эътибор қаратилмоқда. Бу борада, эсин ва табиий олтингугурт сақлаган органик бирикмалар композициясини олиш, стандартлашнинг замонавий усулларини яратиш, унинг турли дори шаклини ишлаб чиқариш, фармакологик хоссаларини аниқлаш, барқарорлиги ва яроқлилик муддатини белгилашга алоҳида эътибор берилмоқда.

Республикамизда сўнги йилларда соғлиқни сақлаш соҳасидаги ислохотларнинг асосий йўналиши бўлган аҳоли ўртасида соғлом турмуш тарзини шакллантириш, уларни безарар, ҳалқаро меъёрий ҳужжатлар талабларига мос келувчи сифатли дори воситалар билан таъминлаш бўйича муайян натижаларга эришилмоқда. 2022-2026 йилларга мўлжалланган Янги Ўзбекистоннинг тараққиёт стратегиясининг тўртинчи йўналишида «Мамлакатда ишлаб чиқариладиган дори-дармон ва тиббиёт воситаларининг улушини 80 фоизга етказиш¹...» каби долзарб вазифалар белгиланган. Бу борада импорт маҳсулотлар ҳажмини ва таркибини оптималлаштириш, маҳаллий корхоналар томонидан турли фармакотерапевтик гуруҳга оид препаратларни ассортиментини кенгайтириш, жумладан, дори воситаларни сифатини таъминлаш учун таҳлилнинг ишончли ва замонавий усулларидан фойдаланиш бўйича илмий тадқиқотлар олиб бориш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йил 21 январдаги ПФ-55-сон «2022-2026 йилларда республиканинг фармацевтика тармоғини жадал ривожлантиришга оид кўшимча чора-тадбирлар тўғрисида»ги фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2019 йил 6 майдаги ПҚ-4310-сон «Тиббиёт ва фармацевтика таълими ва илм-фани тизимини янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги, 2019 йил 30 декабрдаги ПҚ-4554-сон «Ўзбекистон Республикаси фармацевтика тармоғида ислохотларни чуқурлаштиришга доир кўшимча чора-тадбирлар тўғрисида» қарорлари,

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йил 28-январдаги 60-сон «2022-2026 йилларга мўлжалланган Янги Ўзбекистоннинг тараққиёт стратегияси» тўғрисидаги фармони

Вазирлар Маҳкамасининг 2019 йил 18 сентябрдаги 788-сон «Фармацевтика соҳасига зарур амалиётлар (GxP) талабларини жорий этиш бўйича кўшимча чора-тадбирлар тўғрисида»ги қарори ва мазкур фаолиятга оид бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялари ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Маҳалий сохта каштан, *Allium L.* туркумига мансуб ўсимликлар таркибидан гликозидлар, олтингугурт сақлаган органик бирикмаларни ажратиб олиш, кимёвий тузилишини, биологик фаолигини аниқлаш ва дори шакллари технологияларини ишлаб чиқиш бўйича республикаимиз олимлари, жумладан С.Н.Аминов, Ҳ.У.Алиев, А.Н.Юнусхўжаев, Х.К.Джалилов, Н.К.Абубакиров, Н.Д.Абдуллаев, М.У.Усубаев, Г.Т.Мавлонов, Ҳ.М.Комилов, Ф.Ф.Урманова, В.Р.Ҳайдаров, Н.Қ.Олимов каби олимлар илмий тадқиқот ишларини олиб борганлар.

Дунё миқёсида сохта каштан уруғидан биологик фаол моддаларни ажратиб олиш ва ўрганиш соҳасида J.W.Kim, L. Fang, L.Varinská, H.Kimura, Z.Zhang, T.Konoshima, J.M.Burke, L.Radojevic, M.Yoshikawa, X.J.Wu, H.Matsuda, F.M.Michelini томонидан олиб борилган илмий тадқиқотлар катта аҳамиятга эга. E.Block, M. Keusgen, Miitsch-Eckner, J.E.Lancaster, Gabriella Corea, M.Lars, Mogren, Y.Takaishi, Mary L.Parker каби олимлар *Allium L.* туркумига мансуб ўсимлик турли органларидан олтингугурт сақлаган органик бирикмалар ажратиб олиш ва биологик фаоллигини ўрганиш бўйича илмий изланишлар олиб борганлар. Мустақил давлатлар ҳамдўстлиги (МДХ) мамлакатларида ушбу ўсимликларнинг кимёвий таркибини исботлаш, уларнинг биологик фаоллигини ўрганиш ҳамда улар асосида дори воситаларини яратиш бўйича А.М.Косян, Л.С.Аков, В.А.Куркин, Ж.Алексин, Д.Цветков каби олимлар томонидан амалга оширилган тадқиқотлар маълум.

Бироқ ушбу соҳада кўплаб изланишлар олиб борилганига қарамадан маҳаллий хомашёлар - сохта каштан ва *Allium cepa L.* ларнинг биологик фаол моддалари асосида комбинирланган антитромбоген, капиллярпротекторлик таъсирга эга дори воситасини ишлаб чиқиш ва уни стандартлаш бўйича тадқиқотлар олиб борилмаган.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Тошкент фармацевтика институтининг «Маҳаллий доривор ўсимликлар ва координацион бирикмалар асосида оригинал дори воситаларини ишлаб чиқиш ва тиббиёт амалиётига татбиқ этиш» илмий-тадқиқот ишлари режаси ҳамда МУЗ-2015-807063625-сонли «Маҳаллий хомашёларни кўллаб антитромбоген юмшоқ дори шаклларидаги технологиясини ишлаб чиқиш» (2016-2017 йй) мавзусидаги ёш олимлар амалий лойиҳаси доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади. Маҳаллий сохта каштан хомашёсидан эсцин субстанциясини олиш, стандартлаш, ҳамда унинг асосидаги «Варикознет» гелининг сифатини назорат қилиш усуллари ишлаб чиқишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

сохта каштан уруғидан эсцин субстанциясини олишнинг оптимал усулини ишлаб чиқиш;

янги усулда ажратиб олинган эсцин субстанцияси фракцияларга ажратиш, уларни замонавий юқори самарали суюқлик хроматография масс-спектрометрияси усулида таҳлилини амалга ошириш;

эсцин ва аллтромбосепин субстанциялари асосидаги «Варикознет» гелининг сифатини назорат қилиш усуллари ишлаб чиқиш ва тегишли меъёрларни белгилаш;

«Варикознет» гелини барқарорлигини ўрганиш ва яроқлилик муддатини белгилаш;

тадқиқот натижаларини умумлаштириш ва улар асосида тавсия этилаётган дори воситалари учун меъёрий ҳужжатлар лойиҳаларини ишлаб чиқиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида сохта каштан уруғи, эсцин субстанцияси, олтингугурт сақлаган органик бирикмалар ва «Варикознет» дори воситаси олинган.

Тадқиқотнинг предмети сохта каштандан ажратиб олинган эсциннинг изомер таркибини аниқлаш, эсцин ва унинг асосида олинган «Варикознет» дори воситасини сифатини назорат қилиш ва стандартлаштириш усуллари иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотлар жараёнида экстракция, юпка қатламли ва юқори самарали суюқлик хроматографиялари (ЮҚХ ва ЮССХ), инфрақизил (ИК), юқори самарали суюқлик хроматография масс-спектрометрия (ЮССХ-МС), спектрофотометрия (СФ), газ-суюқлик хроматография масс-спектрометрия (ГСХ-МС), шунингдек, гликозидлар кимёси ва фармацевтик таҳлилнинг анъанавий усулларидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор сохта каштан уруғидан эсцин субстанцияси олинган ва унинг таркибидаги изомерлари ҳамда ҳосилаларининг сифат ва миқдорий таркиби фракцияларга ажратилган ҳолда ЮССХ-МС усулида аниқланган;

илк бор антитромботик ва капиллярпротекторлик таъсир кўрсатувчи эсцин ва олтингугурт сақлаган органик бирикмалар композицияси асосида «Варикознет» гелининг стандартлаш усуллари ишлаб чиқилган, чинлиги ва сифатига оид меъзонлар аниқланган;

«Варикознет» гели учун таклиф этилган миқдорий таҳлил усули ICH Topic Q2 (R1) «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» талаблари бўйича валидация қилинган;

«Варикознет» гелининг антитромбоген, капиллярпротекторловчи хусусиятлари ва безарарлиги аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

«Варикознет» гели таркибидаги олтингугурт сақлаган органик бирикмалар миқдори спектрофотометрик усулда аниқланган;

«Варикознет» гелининг турғунлиги ва сақланиш шароити табиий сақлаш усули ёрдамида белгиланган;

«Варикознет» гели чет элда ишлаб чиқариладиган аналоглари (Троксерутин ва Гепарин) дан терапевтик фаоллиги жиҳатидан устунлиги аниқланган;

сохта каштан хомашёси, эсцин субстанцияси ва «Варикознет» дори воситасининг меъёрий-хужжатлар лойиҳалари ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. Олинган натижаларнинг ишончлилиги даражаси замонавий физик-кимёвий, статистик ва фармакологик таҳлил усуллардан, шунингдек, натижаларни статистик ишлашда дисперсияли таҳлил қилинганлиги (ANOVA), Вилкоксон-Манн-Уитнинг U-мезони ва Стюдентнинг t-мезонларидан фойдаланганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти Ўзбекистон шароитида етиштирилган сохта каштан уруғларидан эсцин субстанцияси ажратиб олинганлиги ва кўп компонентли «Варикознет» гель дори воситаси таркибидаги фаол моддалар сифат ва миқдорий таҳлили учун юқори сезгирлик ва аниқликка эга бўлган спектрофотометрия, юқори самарали суюқлик хроматография, юқори самарали суюқлик хроматография масс-спектрометрия усуллари ишлаб чиқилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти олинган эсцин субстанцияси ва «Варикознет» дори воситаси учун «TEMUR MED FARM» МЧЖ билан ҳамкорликда меъёрий хужжатлар ишлаб чиқилганлиги ҳамда тиббиёт амалиётига татбиқ этиш мақсадида ЎзР ССВ «Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш» Давлат маркази ДУКга тақдим этилганлиги билан изоҳланади, уларнинг тасдиқланиши капиллярпротекторлик хусусиятига эга импорт ўрнини босувчи препаратлар номенклатурасини кенгайтиришга хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. «Варикознет» гелининг сифатини назорат қилиш усуллари ишлаб чиқиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

«Антикоагулянтлик, антиагрегантлик ва капиллярпротекторлик таъсирга эга бўлган фармацевтик композиция» га Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтиро патенти олинган (№IAP 06098, 24.12.2019 й). Натижада, маҳаллий хомашёлар асосида янги комбинирланган таркибли юмшоқ дори шаклини ишлаб чиқариш имконини берган;

эсцин субстанцияси учун корхона фармакопоя мақоласи ЎзР ССВ «Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш» Давлат маркази ДУКга рўйхатдан ўтказиш учун топширилган («Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш» Давлат маркази ДУКнинг 2021 йил 8 октябрдаги 686-сон хати, Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2018 йил 15

октябрдаги 8н-3/280-сон хати). Ушбу меъёрий хужжатнинг тасдиқланиши импорт ўрнини босувчи маҳалий хомашёлар асосида олинган субстанциялар ассортиментини кенгайтириш имконини беради;

«Варикознет» дори воситаси учун корхона фармакопея мақоласи ЎзР ССВ «Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш» Давлат маркази ДУКга рўйхатдан ўтказиш учун топширилган («Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш» Давлат маркази ДУКнинг 2021 йил 8 октябрдаги 686-сон хати, Соғлиқни сақлаш вазирлигининг 2018 йил 15 октябрдаги 8н-3/280-сон хати). Ушбу меъёрий хужжатларнинг тасдиқланиши антикоагулянтлик, антиагрегантлик ва капиллярпротекторлик дори воситаларни ишлаб чиқариш имконини беради.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 2 та халқаро ва 3 та республика илмий-амалий анжуманларда муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 10 та илмий иш чоп этилган, жумладан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг фалсафа доктори (PhD) даражасини олиш учун асосий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 5 та мақола, шулардан 4 та республикада ва 1 та хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, адабиётлар шарҳи, учта боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 101 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

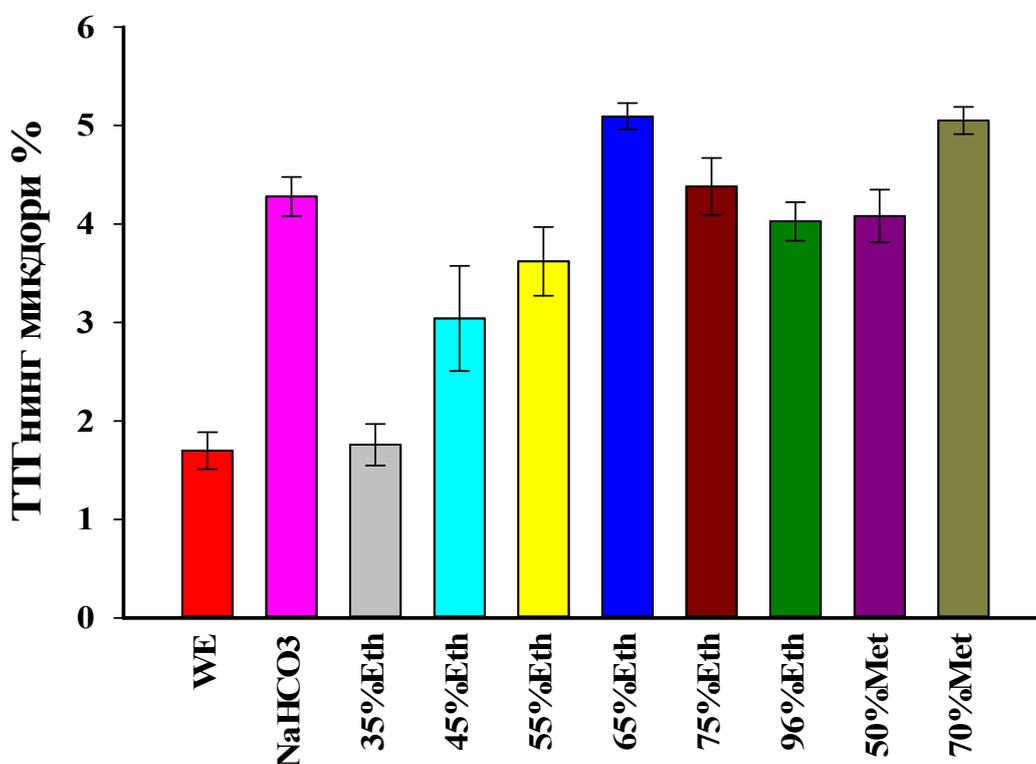
Кириш қисмида мавзунинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотларнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган², муаммонинг ўрганилганлик даражаси, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Сурункали веноз етишмовчилигини касаллигини тахлили ва фармакотерапияси**» деб номланувчи бобида веноз етишмовчилиги касаллигининг келиб чиқиш сабаблари ва унинг оқибатида келиб чиқадиган асоратлари ҳақида маълумот келтирилган, касаликнинг фармакодинамикаси ҳамда унга кетадиган сарф харажатлар тўғрисида тўхталиб ўтилган. Шунингдек, бу бобда Ўзбекистон Республикаси Давлат

² Муаллиф Тошкент фармацевтика институтининг профессори, кимё фанлари доктори, Ўзбекистон фан арбоби С.Н.Аминовга (1938-2020 йй.) диссертация ишини бажарилишида яқиндан кўрсатган ёрдами учун ўзининг самимий миннатдорчилигини билдиради.

реестрига киритилган веноз етишмовчилиги касаллигини даволаш учун ишлатиладиган ҳамда сохта каштаннинг фармацевтиядаги аҳамияти ва унинг асосида яратилган дори воситаларининг таҳлили ёритилган.

Диссертациянинг «Тадқиқотларда фойдаланилган хомашё ва тадқиқот усуллари» номли иккинчи бобида сохта каштан уруғидан спиртли экстракт олиш учун экстрагент ва унинг концентрациясининг таъсири ўрганилган. Экстракция жараёни учун экстрагент танлаш мақсадида қуйидаги изланишлар амалга оширилди. Пўст қисмидан тозаланган каштан уруғлари 3-4 мм ўлчамгача майдаланди. Сўнгра оптимал экстрагент танлаш учун 35, 45, 55, 65, 75 ва 96% концентрацияли Этил спирти билан биргаликда 50 ва 70% концентрацияли метанол, 0,5 моль/л натрий гидрокарбонат эритмаларидан ҳамда сувдан фойдаланилди. Турли экстрагентларнинг сохта каштан уруғлари таркибидаги тритерпен гликозид (ТТГ)ларни экстракциялаш хусусияти 1-расмда келтирилган.



1-расм. Сохта каштан биологик фаол моддаларини ажралишида турли эритувчилар табиати ва концентрациясининг таъсири

1-расмдан кўришиб турибдики, дастлаб спиртнинг концентрацияси ошиши билан экстрактда ТТГлар миқдори ошиб борди лекин этанолнинг концентрацияси 65% дан ошиши билан экстрактдаги ТТГ миқдори камайиб борди. Чунки унинг таркибидаги ТТГлар спирт-сув аралашмасида яхши эрийди. Бундан кўришиб турибдики, этанолнинг ТТГ яхши эрита оладиган концентрацияси 65% экан. Шунингдек, 70% метанол ва натрий гидрокарбонат

эритмаси ҳам хомашё таркибидаги ТТГ ни яхши эритди. Лекин метанол заҳарли ва иқтисодий жиҳатдан қиммат эритувчи ҳисобланади.

Шундай қилиб, экстракция жараёни учун 65% этанол оптимал экстрагент сифатида танланди.

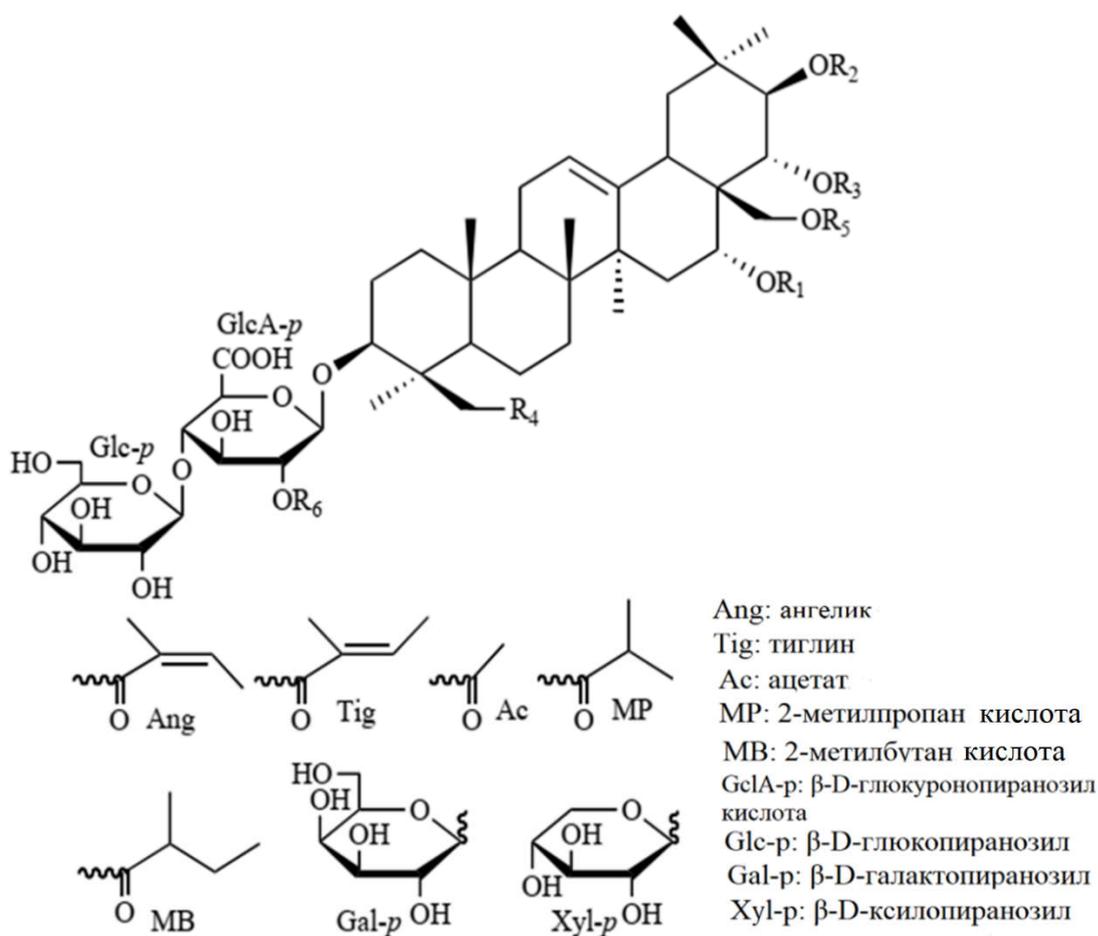
Будан ташқари ушбу бобда сохта каштан уруғидан олинган экстракт таркибидаги тритерпен гликозидларнинг сифат ва миқдор кўрсаткичларини аниқлашнинг ЮҚХ, ЮССХ, ЮССХ-МС, аллтромбосепин субстанцияси таркибидаги олтингугурт сақлаган органик бирикмаларнинг сифат ва миқдор кўрсаткичларини аниқлашнинг спекрофотометрия, ЮССХ-МС, ГСХ-МС услублари баён қилинган.

Диссертациянинг «**Варикознет гель таркибига киритилган дастлабки хомашёларни стандартлаш**» деб номланган учинчи бобда сохта каштан мевасини стандартлаш, сохта каштан ўсимлиги уруғини таркибидаги тритерпен гликозидларининг таҳлили, сохта каштан уруғидан эсцин субстанциясини олиш, эсцин субстанциясининг физик-кимёвий ва технологик хоссаларини ўрганиш, эсцин субстанциясининг тритерпен гликозидларини стандартлаш, эсцин субстанциясини биологик фаоллигини ўрганиш, аллтромбосепин субстанциясини стандартлаш бўйича олиб борилган тадқиқот натижалари баён қилинган.

Сохта каштан уруғларидан олинган сапонинлар ва уларнинг ҳосилалари препаратив ЮССХ ёрдамида ажратиб олинди. Изоляция қилинган компонентлар МС-ни манфий ионли режимда таҳлил ўтказилди. Ўзбекистонда (Тошкет шаҳри) етиштирилган табиий каштан уруғлари таркибидаги тритерпен гликозидлар миқдори $5,2 \pm 1,3\%$ эканлиги аниқланди (эсцинга қайта ҳисобланган). Бундан ташқари Ғазалкент шаҳри (Тошкент вилояти) ва Истанбул шаҳри (Туркия) етиштирилган сохта каштан уруғлари таркибидаги ТТГ миқдори ўрганилди. Бунда турли шаҳарларда етиштирилган сохта каштан уруғлари таркибидаги ТТГ миқдори Тошкент ($5,2 \pm 1,3\%$), Ғазалкент ($5,04 \pm 1,2\%$), Истанбул ($3,94 \pm 1,4\%$) кетма-кетлигида камайиб бориши аниқланди.

Каштан уруғлари спиртли экстрактини босқичли тозалашлардан сўнг эсцин сапонинлари (ЭС) ажратиб олинди (3-расм). Бу хроматограммадаги чўққилар уруғ экстракти хроматограммасидаги чўққиларга нисбатан анча камайганлиги ва эсцин стандарт намунаси хроматограммасига (4-расм) ўхшаш чўққилар ҳосил бўлганлигини кўриш мумкин.

ESI-МС орқали ўтказилган таҳлиллар шуни кўрсатдики, масса/зарядлари $[M-H]^-$ 1129, 1099, 1131, 1113, 1089, 1087, 1117 ва 1057 бўлган бирикмалар аниқланди. Сапонинлар ва ҳосилаларининг кимёвий тузилишини тасдиқлаш учун ушбу бирикмаларнинг структуравий таҳлиллари масс-спектрдан ташқари адабиётлардаги 1H ЯМР ва ^{13}C ЯМР маълумотларидан фойдалиниб амалга оширилди (1-жадвал, 2 ва 5-расмлар).



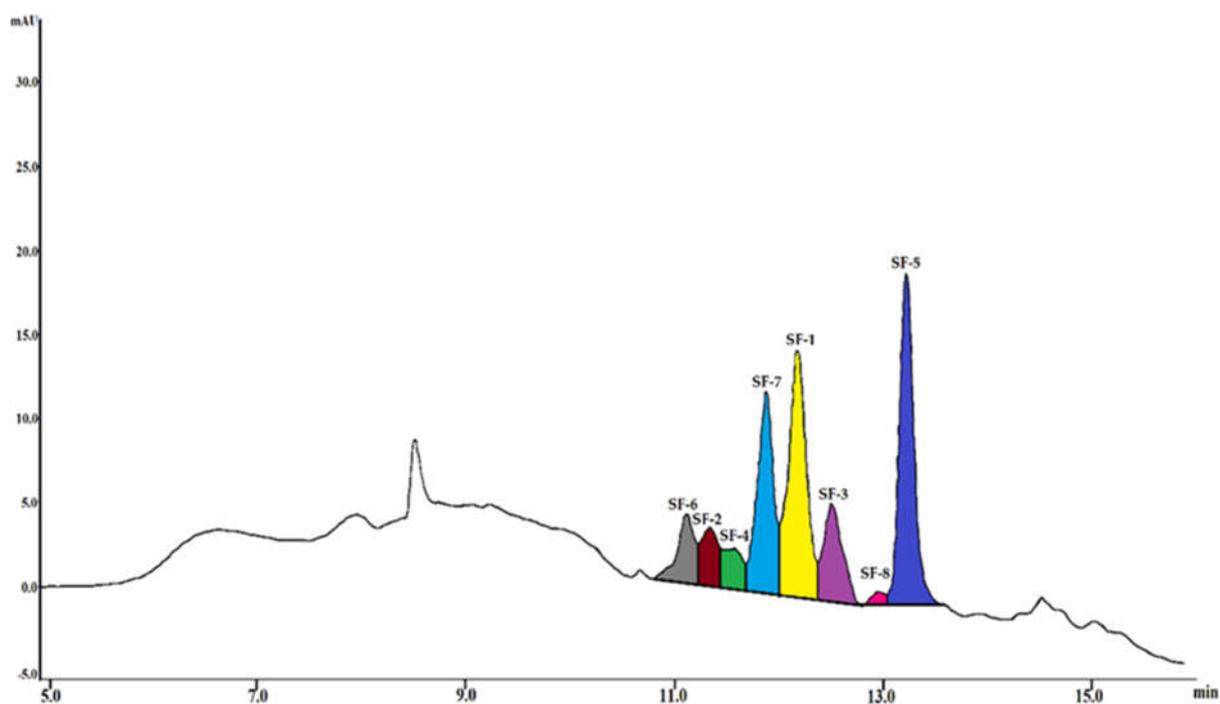
2-расм. Эсциннинг изомерлари ва ҳосилалари

1-жадвал.

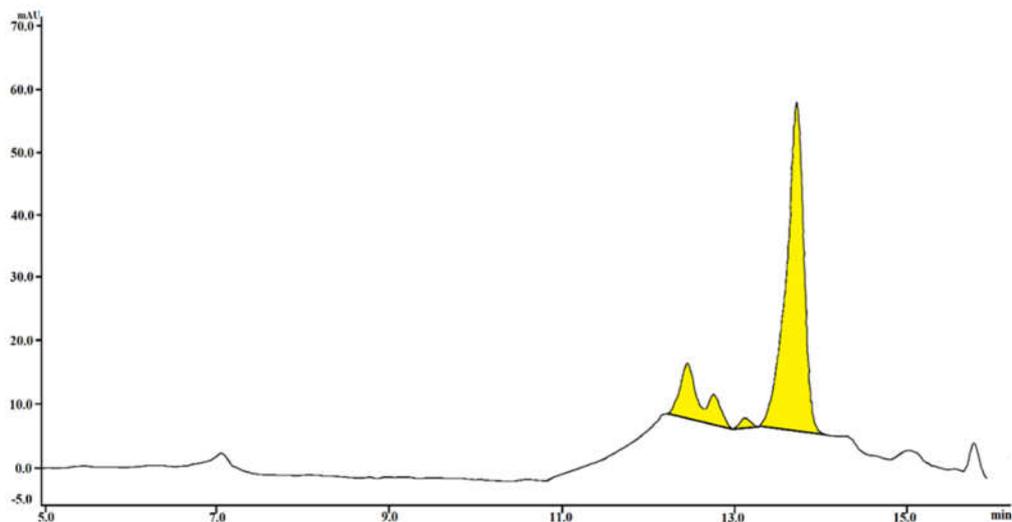
Сохта каштан уруғларидан ажратилган эсцин сапонинларининг фракциялари таркиби

Фракцияларнинг шартли номланиши	Ушланиш вақти дақ	Эсцин сапонинларининг номланиши	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	m/z; аем [M-H] ⁻
SF-1	11,941	Эсцин Ia	H	Tig	Ac	OH	H	Glc-p	1129
		Эсцин Ib	H	Ang	Ac	OH	H	Glc-p	
		Эсцин IVc	H	H	Tig	OH	Ac	Glc-p	
		Эсцин IVd	H	H	Ang	OH	Ac	Glc-p	
		Эсцин VIb	Ang	Ac	H	OH	H	Glc-p	
		Изоэсцин Ia	H	Tig	H	OH	Ac	Glc-p	
		Изоэсцин Ib	H	Ang	H	OH	Ac	Glc-p	
		Изоэсцин VIIa	H	Tig	H	OH	Ac	Gal-p	
SF-2	10,791	Эсцин IIa	H	Tig	Ac	OH	H	Xyl-p	1099
		Эсцин IIb	H	Ang	Ac	OH	H	Xyl-p	
		Изоэсцин IIa	H	Tig	H	OH	Ac	Xyl-p	
		Изоэсцин IIb	H	Ang	H	OH	Ac	Xyl-p	

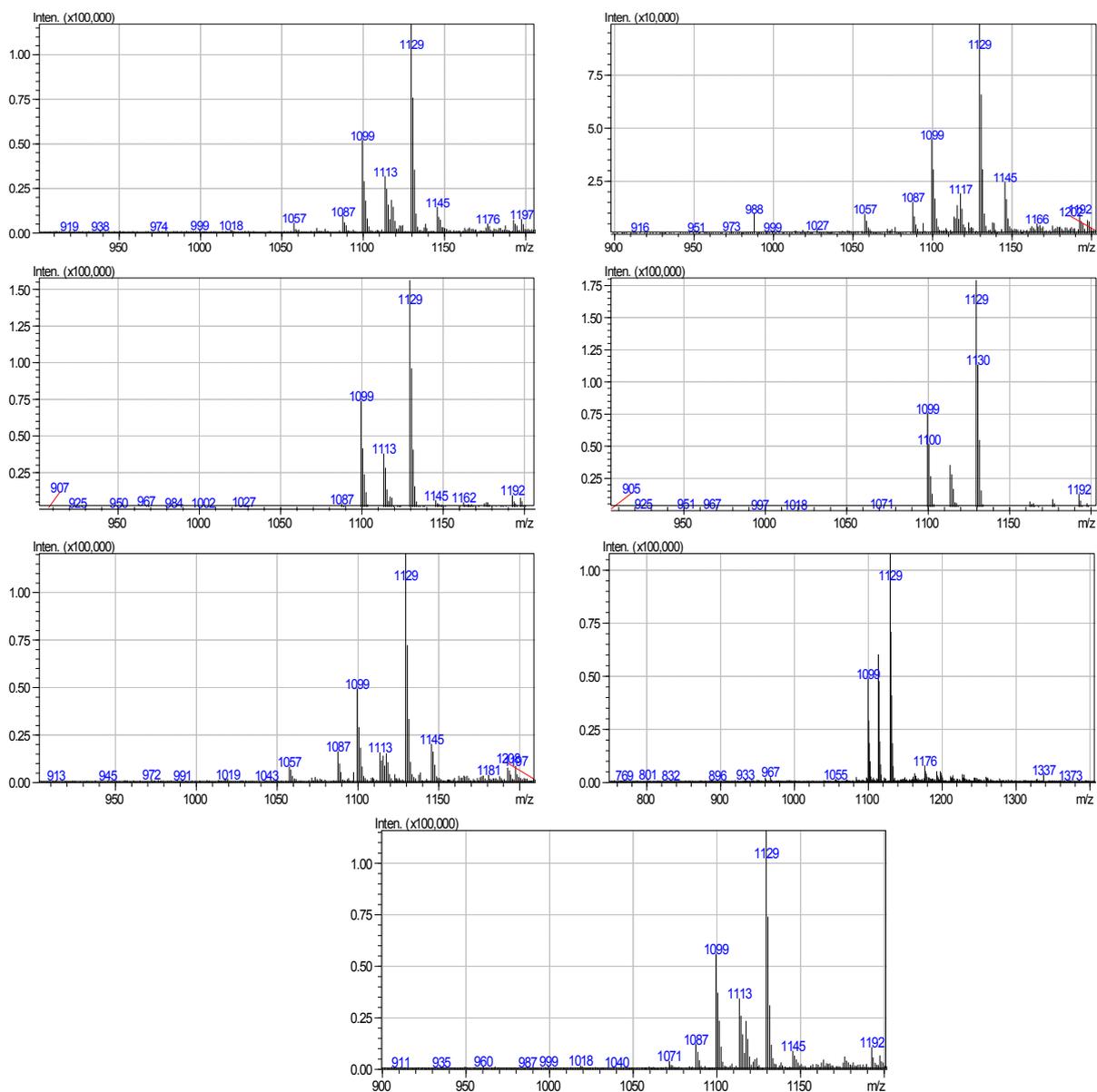
SF-3	11,343	Эсцин IIIa	H	Tig	Ac	H	H	Gal-p	1113
		Эсцин IIIb	H	Ang	Ac	H	H	Gal-p	
		Изоэсцин IIIa	H	Tig	H	H	Ac	Gal-p	
		Изоэсцин IIIb	H	Ang	H	H	Ac	Gal-p	
		Изоэсцин VIIa	H	Ang	H	H	Ac	Glc-p	
SF-4	10,782	Эсцин IV	H	Ac	Ac	OH	H	Glc-p	1089
SF-5	13,210	Эсцин IVe	H	H	H	OH	Tig	Glc-p	1087
		Эсцин IVf	H	H	H	OH	Ang	Glc-p	
		Эсцин IVg	H	H	Tig	OH	H	Glc-p	
		Эсцин IVh	H	H	Ang	OH	H	Glc-p	
		Деацетилэсцин Ia	H	Tig	H	OH	H	Glc-p	
		Деацетилэсцин Ib	H	Ang	H	OH	H	Glc-p	
SF-6	10,343	Эсцин V	H	MP	Ac	OH	H	Glc-p	1117
		Изоэсцин V	H	MP	H	OH	Ac	Glc-p	
SF-7	10,938	Эсцин VI	H	MB	Ac	OH	H	Glc-p	1131
		Изоэсцин VIa	H	MB	H	OH	Ac	Glc-p	
SF-8	12,587	Деацетилэсцин IIa	H	Tig	H	OH	H	Xyl-p	1057
		Деацетилэсцин IIb	H	Ang	H	OH	H	Xyl-p	



3-расм. Тозаланган эсцин сапонинлар намунасининг ЮССХ-ДМД профили



4-расм. Эсцин стандарт намунасиниг ЮССХ-ДМД профили



5-расм. Эсциннинг изомерлари ва ҳосилаларининг масса зарядлари

ЮССХ-МС асосида саккизта чўққилар гуруҳи идентификация қилинган. ТТГларнинг ушланиш вақти 12,02-15,17 дақиқани ташкил этади. ТИС хроматограммалар асосида SF-1 нинг ушланиш вақти 13,2 дақиқадан 14,3 дақиқагача, SF-2 нинг ушланиш вақти 12,8 дақиқадан 15,1 дақиқагача, SF-3 нинг ушланиш вақти 12,7 дақиқадан 14,0 дақиқагача, SF-4 нинг ушланиш вақти 12,1 дақиқа, 12,4 дақиқа, SF -5 нинг ушланиш вақти 11,5 дақиқадан 11,9 дақиқагача, SF -6 нинг ушланиш вақти 13,0 дақиқадан 14,2 дақиқагача, SF-7 нинг ушланиш вақти 12,8 дақиқадан 13,6 дақиқагача, SF -8 нинг ушланиш вақти 12,0 дақиқадан 12,3 дақиқагача (3 ва 4-расмлар) эканлигини кўриш мумкин.

Эсцинни 4 хил изомерлар (Ia, Ib, IIa, IIб), дезацетилэсцин эса 2 хил (I, II) кўринишида учрайди. Юқоридаги ЮССХ-МС профилларини таҳлил қилиб, 11,186, 11,391 дақиқалардаги ушланиш вақтлари эсциннинг Ia ва Ib изомерларига мос келади. Шунингдек, 11,945, 12,242 ва 12,559 ушланиш вақтлари эсциннинг IIa, IIб изомерларига тўғри келади. 12,979 ва 13,268 ушланиш вақтлари эса дезацетилэсцин I га мос келади (1- жадвалга қаралсин). Бу бирикмалар сохта каштан уруғларига хос бирикмалар бўлиб, каштан асосида олинган дори воситаларни стандартлашни ушбу бирикмалар йиғиндиси билан амалга ошириш мумкин. Чунки бу бирикмалар ўзаро бир-бирдан ажратиш амалий жиҳатдан анча мураккаб.

Сохта каштан уруғи асосида олинган эсцин субстанциясининг сифатини тегишли меъерий ҳужжатлар асосида текширилди ва олинган натижалар 2 - жадвалда келтирилган.

2-жадвал

Сохта каштан уруғи асосида олинган эсцин субстанциясининг сифат кўрсаткичларини аниқлаш натижалари

№	Кўрсаткичлар	Меъёр ҳужжат бўйича талаб (ЎзР ДФ)	Аниқланди
1.	Тасвирланиши	Оқиш ёки оқиш сарғимтир рангли, ўзига хос ҳидли масса	Мос келади
2.	Чинлиги	Хроматографик пластинкага (Мерк, Германия) калибрланган капилляр орқали суюлтирилган эсцин белгиланган нуқтага томизилди ва қуритилди. Кўзгалувчи фаза: хлороформ: сувсиз сирка кислота: метанол: тозаланган сув (60:32:12:8). Камерани тўйинтириш учун 30 дақиқа қолдирилди. Старт чизиғидан бошлаб, 12 см ўлчаб, финиш чизиғи белгиланади. Кўзгалувчан фаза финиш чизиғигача кўтарилгандан сўнг, хроматография жараёни тўхтилади ва пластинкани чиқариб олинади. Унга қуритилмасдан 3%ли	Мос келади

		темир (III) хлорид эритмаси пуркалади ва 100 – 105°C ҳароратда қуритиш шкафида 10 дақиқа давомида қуритилади. Сўнгра УБ лампада 366 нм тўлқин узунлигида таҳлил қилинади. Эсцин стандарт намунаси ва текширилувчи намунада бинафша рангли доғ кўринади. Шунингдек, ТТГ да бошқа соҳаларда ҳам доғлар пайдо бўлади.	
3.	Қуритилгандан сўнг йўқотилган масса, %	5,0 г масса 100±5°C ҳароратда доимий оғирликка қадар қуритилади. Қуритишдаги масса йўқотиш 2% дан ортмаслиги керак.	1,23
4.	Оғир металллар, %	Аниқлаш 1,0 г экстрактда олиб борилади. Таҷриба натижалари 0,001% дан ортмаслиги керак.	Мос келади
5.	ТТГ миқдори, %	Спектрофотометрик усул (540 нм тўлқин узунлиги). эсцин субстанцияси таркибидаги ТТГ йиғиндиси эсцинга нисбатан 95,0% дан кам бўлмаслиги керак.	97,12
		ЮССХ-МС усули. Эсцин субстанцияси таркибидаги ТТГ йиғиндиси эсцинга нисбатан 95,0% дан кам бўлмаслиги керак.	97,49

Эсцин субстанцияси таркибидаги ТТГ миқдорий таҳлили келтирилган услуб бўйича ЮССХ-МС (LC-MS 2020 Shimadzu) ускунасига 5 марта юборилиб амалга оширилди.

Эсцин ва унинг изомер ҳосилалари 10,988-15,166 дақиқалар оралиғида ажралган. Уларнинг идентификацияси масс-спектрлари орқали амалга оширилди. Миқдорий таҳлил учун уларнинг чўққиси майдонлари йиғиндиси бўйича амалга оширилди. Эсцин субстанцияси сифатини тегишли меъёрий ҳужжатлар асосида текширилди ва олинган натижалар МҲ талабларига тўла мос келиши аниқланди

Диссертациянинг «**Маҳаллий хомаёлар асосидаги «Варикознет» гел дори шаклини стандартлаш**» деб номланувчи бобида «Варикознет» гел дори шаклининг таркиби, унинг сифатини назорат қилиш усуллари ишлаб чиқиш, барқарорлиги ва сақланиш муддатини белгилаш. «Варикознет» гелнинг ўткир захарлиги, капиллярпротекторлик ва антитромботик фаоллигини ўрганиш натижалари диссертациянинг илова қисмида келтирилган.

Эсцин ва Аллтромбосепин субстанциялари асосида 3-жадвалда келтирилган таркибли гель тайёрланди, ҳамда шартли равишда «Варикознет» деб номланди.

3-жадвал

«Варикознет» гелининг 100 г дори шакли учун таркиб

Ингредиентлар	Миқдори г
Аллтромбосепин	1,00
Эсцин	0,15
Ёрдамчи моддалар	
Диметилсульфоксид	1,00
Нипагин	0,10
Гель асоси	97,75

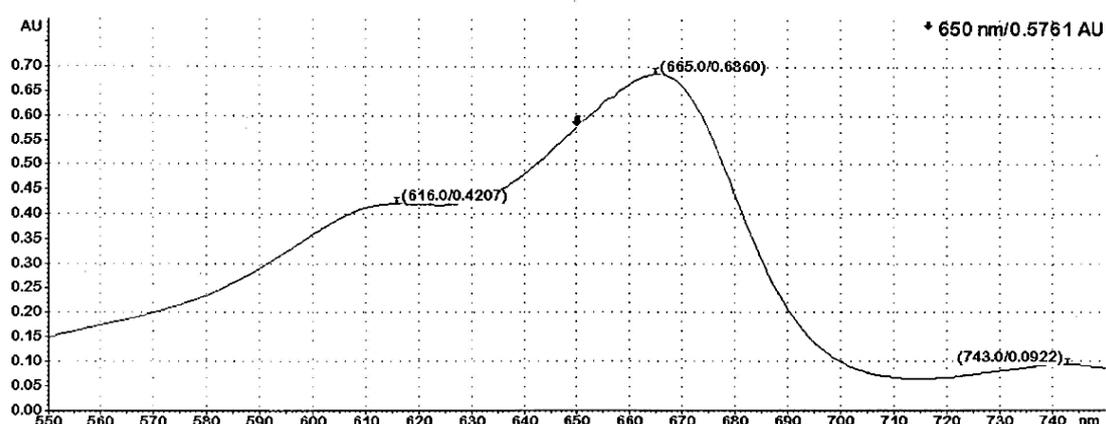
3-жадвалдан кўришиб турибдики, таркибга диметилсульфоксид ва нипагин қўшилган. Диметилсульфоксид кўпгина юмшоқ дори шакллари таркибига биологик фаол моддаларни ўтказувчанлигини яхшилаш мақсадида қўшилади. Нипагин эса гелининг барқарорлигини узоқ вақт сақлаш учун хизмат қилади. Юқорида қайд этилган гелининг термик ва коллоид турғунлигини ўрганиш ва фармакологик скрининг натижаларига кўра юқоридаги таркиб танлаб олинди. Кейинги тадқиқотларда уларнинг фармако-токсикологик хусусиятлари ва яроқлилиқ муддатини аниқлаш бўйича изланишлар олиб борилди. Антитромботик ва капиллярларни мустаҳкамловчи таъсирлари ва барқарорлиги бўйича таркиб ижобий натижалар кўрсатди.

Гел таркибидаги олтингурут сақлаган органик бирикмалар миқдорини спектрофотометрик усулда аниқлаш.

Бунинг учун препаратнинг 5,0 г (аниқ тортим) миқдorigа 15 мл этил спирти ва 1 мл сирка кислота солиб, аралаштирилади. Сўнгра 25 мл ҳажмли колбага филтрлаб ўтказилди. Колба белгисигача спирт билан етказилди. Ҳосил бўлган филтратдан 5 мл олиб, устига 2 мл натрий цинкатнинг ишқорий эритмаси қўшилди, сўнгра аралашма қуриштириш жавонида 200°C ҳароратда қурилди, ҳосил бўлган куруқ қолдиқ дастлаб эксикаторда совутилди, сўнгра 60 мл сирка кислотанинг 2% ли эритмаси билан эритилиб 100 мл колбага ўтказилди ва устига 5 мл 0,5 моль/л темираммонийли аччиқтош, 5 мл 0,1% п-амино-N,N-диметиланилин солинди. 15 дақиқадан сўнг ўлчов колбасидаги эритманинг ҳажми тозаланган сув билан белгисигача етказилди. Қатлам қалинлиги 1 см бўлган кюветада 665 нм тўлқин узунлигида оптик зичлиги ўлчанди. Олинган эритма назорат эритма билан солиштирилган ҳолда спекрофотометр (Agilent Technologies АҚШ) текширилди. Текширувлар асосида олинган спектр 6-расмда келтирилган. Спектрда 2 та максимум 616 ва 665 нм тўлқин узунликларида кузатилди. Миқдорий таҳлил кўп ютилишни намоён қилаётган 665 нм тўлқин узунлигида олиб борилди. Олинган натижалар 4-жадвалда келтирилган.

4-жадвалдан кўришиб турибдики, 100 г «Варикознет» гели таркибидаги олтингурут сақлаган органик бирикмалар (ОСОБ) йиғиндиси ўртача 4,673 мг, шунингдек тажрибанинг ўртача нисбий хатолиги 2,01% ни ташкил этди.

Шу билан бирга «Варикознет» гели таркибидаги тритерпен гликозидлар миқдорини спектрофотометрик усулда аниқланди.



6-расм. Варикознет гели таркибидаги ОСОБ асосида ҳосил қилинган N, N, N', N' – тетраметилтиониннинг нур ютиш спектри

4-жадвал

«Варикознет» гели таркибидаги ОСОБ йиғиндисини СФ усулда миқдорий таҳлил натижалари

Тортим, г	ОСОБ йиғиндисини, мг/100 г	Метрологик тавсифи
5,0002	4,52	$\bar{X} = 4,673$; $F = 4$ $S^2 = 1,2909$; $S = 1,1361$; $\Delta X = 3,1585$; $\Delta \bar{X} = 1,4125$; $\varepsilon = 4,47\%$; $\bar{\varepsilon} = 2,01\%$
5,0007	4,62	
5,0008	4,66	
5,0008	4,66	
5,0014	4,70	

Текширилувчи эритмани тайёрлаш. 5,0 г (а.т.) препарат чинни косачага солиб, сув ҳаммомида қуруқ қолдиқ қолгунча қиздирилади. Совутилгандан сўнг 10 мл 0,1 моль/л хлорид кислота билан аралаштирилди ва 250 мл ҳажмли ажратгич воронкага ўтказилади. Сўнгра чинни косача яна 2 марта (1-марта 10 мл 0,1 моль/л хлорид кислота, 2-марта 20 мл пропанол-1 билан) ювиб ажратгич воронкадан ўтказилди.

Бирлаштирилган кислотали муҳитли эритма 50 мл хлороформ солиб, 2 дақиқа давомида аралаштирилади. Сўнгра 30,0 мл 0,1 моль/л хлорид кислота, 20 мл пропанол-1 ва 50 мл хлороформ солиб, яна 2 дақиқа давомида аралаштирилади. Аралашма икки қисмга ажралгандан сўнг, пастки фаза филтрлаб туби думалоқ қолба ўтказилади. Сўнгра уни вакуум остида 50°C ҳароратда қуюлтирилади. Олинган қуюқ масса қуруқ қолдиқ ҳосил бўлгунча вакуум остида қурилади.

Ҳосил қилинган қуруқ қолдиқ 2 марта 10 млдан эфир билан ювилади ва филтрланади. Филтрат ташлаб юборилади. Эфирдан тўла халос бўлган

қолдиқ, 3 марта сувсиз сирка кислота билан экстракцияланади ҳамда филтрланади. Филтрат 50 мл ҳажмли ўлчов колбасига ўтказилади ва белгисигача сувсиз сирка кислота билан етказилади.

Учта қопқокли пробиркалар олиниб, уларга мос равишда стандарт ва текширилувчи эритмалар солинади (учинчи пробиркага назорат эритма тайёрлаш учун). Ҳар бир пробиркага 3 мл темир (III) хлориднинг сирка кислотадаги эритмаси ва 1 мл сувсиз сирка кислота солинади, сўнгра қопқоғи ёпилиб, сув ҳаммомида 60°C ҳароратда 25 дақиқа давомида ушлаб турилади. Сўнгра совутилади ва қатлам қалинлиги 10 мм бўлган кварц кюветасига солиб, 540 нм тўлқин узунлигида оптик зичлик ўлчанади.

Стандарт намуна эритмасини тайёрлаш. 25 мг эсцин 100 мл ҳажмли ўлчов колбасига ўтказилиб, сувсиз сирка кислота билан эритиб олинади. Сўнгра белгисигача сувсиз сирка кислота билан етказилади.

Варикознет гели таркибидаги ТТГ йиғиндисини (мг/100 г) ҳисоблаш формуласи куйидагича:

$$X = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot G}{D_0 \cdot a_1 \cdot 100};$$

бунда; X- ТТГ миқдори, мг; D_1 – текширилувчи эритманинг оптик зичлиги; D_0 – стандарт намуна эритмасининг оптик зичлиги; a_1 – препаратнинг тортими, г; a_0 – стандарт намуна тортими, г;

«Варикознет» гели таркибидаги ТТГ йиғиндисини СФ усулида аниқлаш натижалари 5- жадвалда келтирилган.

5-жадвал

«Варикознет» гели таркибидаги ТТГ йиғиндисини СФ усулда миқдорий таҳлил натижалари

Тортим, г	ТТГ йиғиндисини, мг/100 г	Метрологик тавсифи
5,0006	150,5	$\bar{X} = 151,04$; $F=4$ $S^2=0,223$; $S=0,4645$; $\Delta X=1,2950$; $\Delta \bar{X}=0,5819$; $\varepsilon= 5,90\%$; $\bar{\varepsilon}= 2,84\%$
5,0011	150,9	
5,0014	151,0	
5,0018	151,4	
5,0019	151,7	

Жадвалдан кўриниб турибдики, 100 г «Варикознет» гели таркибидаги ТТГ йиғиндисини ўртача 151,04 мг, шунингдек тажрибанинг ўртача нисбий хатолиги 2,84% ни ташкил этди.

Ишлаб чиқилган миқдорий таҳлил усуллари хусусийлик, танланганлик, қайтарилувчанлик, чизиқлилиги, тўғрилиги, аниқлилик каби валидацион кўрсаткичлар бўйича валидацияланган.

«Варикознет» гелининг ЎЗР ДФ талаблари бўйича сифатини назорат қилиш усуллари ишлаб чиқилди. Олиб борилган тажрибалар натижасида

«Варикознет» гели барча кўрсаткичлар бўйича тегишли меъёрлари аниқланди. Препаратнинг сифатини назорат қилиш орқали МХ талабларига тўла мос келиши аниқланди.

Тадқиқотлар натижасида ишлаб чиқилган «Варикознет» гелининг капиллярпротекторлик фаоллиги ксилолни бўёқ билан қўлланилган моделида чақирилди. Капилляр фаоллик мезони критерияси сифатида (соннинг) яллиғланган қисмини кўкариш вақти (дақиқалар) олинди. Бу капиллярларни назоратдагиларга қиёсан ўтказиш даражасини ифода этади. Олинган натижаларга кўра, текширилувчи препарат статистик аниқлик даражасида яллиғланган соҳа кўкариш вақти нисбатан узайганини кўрсатди. Тажриба натижаларидан «Варикознет» гели, ишонарли капилляр протекторлик фаолликка эга эканлиги аниқланди. Тадқиқотлар «Троксерутин Софарма» гели билан қиёсий солиштириб олиб борилган.

ХУЛОСАЛАР

1. Илк бор Ўзбекистонда етиштириладиган сохта каштан уруғларини чуқурлаштирилган фитокимёвий ўрганиш натижасида капиллярпротекторлик фаолликка эга доривор хомашёнинг янги манбаси таклиф этилди.

2. Маҳалий хомашё асосида 95% дан кам бўлмаган тозаликдаги эсцин субстанциясини олиш усули ишлаб чиқилиб, унинг таркибидаги тритерпен гликозидлар массасига кўра 8 та фракцияга ажратилган ҳолда яллиғланишга қарши таъсири стуруктурадаги С-28 даги радикалга боғлиқлиги исботланди.

3. Эсцин субстанциясининг сифат назорати, стандартлаштириш ва валидациялаш кўрсаткичлари учун СФ, ЮҚХ, ЮССХ ва ЮССХ-МС усуллари тавсия этилди. Тадқиқотлар натижасида субстанциянинг сифат меъёрлари белгиланди.

4. Биринчи марта эсцин субстанцияси ва олтингугурт сақлаган органик бирикмалар асосида олинган комплекс таъсирга эга «Варикознет» гелининг сифат ва миқдор кўрсаткичларини аниқлаш учун юқори самарали суюқлик хроматографияси масс-спектроскопия усули таклиф этилди.

5. «Варикознет» гелининг миқдорий таҳлили учун ишлаб чиқилган аналитик усуллар қуйидаги валидацион кўрсаткичлар: хусусийлик, танланганлик, қайтариловчанлик, чизиклилик, тўғрилиқ, аниқлиқ бўйича валидация қилинди. Ушбу мезонлардан фойдаланган ҳолда илк бор татбиқ қилинаётган дори воситаси учун “чинлиги” ва “миқдорий таҳлил” бўлимлари таклиф қилинди.

6. «Варикознет» дори воситасининг безарарлиги ҳамда антитромбоген ва капиллярпротекторлик фаоллиги, шу билан бирга яроқлилик муддати экспериментал асосланиб, белгиланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSC. 04/30.12.2019. FAR.32.01 ПО
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ТАШКЕНТСКОМ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ИНСТИТУТЕ**

ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ТУРСУНОВ ХУРШИД ОБИТОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ГЕЛЯ
«ВАРИКОЗНЕТ»**

15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент -2022

Тема диссертации доктора философии (PhD) по фармацевтическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером В.2020.2. PhD/Far70.

Диссертация выполнена в Ташкентском фармацевтическом институте.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице научного совета (www.pharmi.uz) и информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziyounet.uz).

Научный руководитель: **Шарипов Аvez Туймуродович**
доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Урманова Флюра Фаридовна**
доктор фармацевтических наук, профессор

Нишанбаев Сабир Зарипбаевич
доктор химических наук, старший научный сотрудник

Ведущая организация: **Ташкентский химико-технологический институт**

Защита диссертации состоится « ___ » _____ 2022 г в ___ часов на заседании научного совета DSc.04/30.12.2019.Far.32.01 при Ташкентском фармацевтическом институте (адрес: 100015, г. Ташкент, Мирабадский район, ул. Айбека, 45. Тел.: (99871) 256-37-38, факс: (99871) 256-45-04, e-mail: pharmi@pharmi.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-ресурсном центре Ташкентского фармацевтического института (регистрационный номер ___) по адресу: 100015, г. Ташкент, Мирабадский район, ул. Айбека, 45. Тел.: (99871) 256-37-38.

Автореферат диссертации разослан « ___ » _____ 2022 года
(реестр протокола № ___ от « ___ » _____ 2022 года).

К.С. Ризаев

Председатель научного совета по
присуждению ученых степеней, д.м.н.

Ё.С. Кариева

Ученый секретарь научного совета
по присуждению ученых степеней,
д.фарм.н., профессор

Ф.Ф.Урманова

Председатель научного семинара
при научном совете по присуждению
ученых степеней, д.фарм.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. По данным Всемирной организации здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания среди населения только в 2019 году стали причиной смерти 9,0 миллионов человек и по данным показателям занимают первое место среди других заболеваний. Поэтому важное значение имеет расширение номенклатуры лекарственных средств данного фармакотерапевтического действия, обеспечение их качества на уровне международных требований, разработка новых современных методов анализа, проведение доклинических испытаний с целью доказательства их специфической активности и безопасности.

В настоящее время в мире уделяется большое внимание научным исследованиям по получению лекарственных средств из органических соединений, применяемых для профилактики и лечения сердечно-сосудистых венозных тромбозов и геморроя, разработке методов контроля их качества и установлению стабильности. В связи с этим особое внимание придаётся созданию композиций серосодержащих органических соединений и эсцина, разработке современных методов стандартизации различных лекарственных форм на их основе, определению фармакологических свойств, установлению стабильности и сроков годности.

В последние годы в республике достигнуты определенные результаты по формированию здорового образа жизни среди населения, обеспечению его качественными лекарственными средствами, соответствующими требованиям международных нормативных документов, что является основным направлением реформ в сфере здравоохранения. В четвертом направлении стратегии развития Нового Узбекистана на 2022-2026 гг были отмечены важные задачи, такие как «Доведение доли лекарственных и медицинских средств отечественного производства до 80 процентов...»¹. В этом связи важно проведение научных исследований по оптимизации объема и состава импортируемой продукции, расширению ассортимента препаратов различных фармакотерапевтических групп местными предприятиями, в том числе использованию надежных и современных методов анализа для обеспечения качества лекарственных средств.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан УП-55 от 21 января 2022 года «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли республики в 2022 - 2026 годах», Постановлениями Президента Республики Узбекистан ПП-4310 от 6 мая 2019 года «О мерах по дальнейшему развитию системы медицинского и фармацевтического образования и науки», ПП-4554 от 30 декабря 2019 года «О дополнительных мерах по углублению реформ в фармацевтической отрасли Республики Узбекистан», Постановлением Кабинета Министров

¹Указ Президента РУз от 28.01.2022 г № УП-60 «О Стратегии развития Нового Узбекистана на 2022-2026 годах»

Республики Узбекистан № 788 от 18 сентября 2019 года «О дополнительных мерах по внедрению в фармацевтическую отрасль требований к необходимым практикам (GxP)», а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики VI. «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы. Научные исследования по выделению гликозидов и серосодержащих органических соединений из конского каштана, *Allium L.*, определению их химической структуры, биологической активности и разработке технологий лекарственных форм проводились такими учеными нашей республики, как С.Н.Аминов, Х.У.Алиев, А.Н.Юнусходжаев, Х.К.Джалилов, Н.К.Абубакиров, Н.Д.Абдуллаев, М.У.Усубаев, Г.Т.Мавлонов, Х.М.Комилов, Ф.Ф.Урманова, В.Р.Хайдаров, Н.К.Олимов.

В мировом масштабе большого внимания заслуживают научные исследования в области выделения и изучения биологически активных веществ из семян конского каштана, проведенные такими учеными, как J.W. Kim, L. Fang, L. Varinská, H. Kimura, Z. Zhang, T. Konoshima, J.M. Burke, L. Radojevic, M. Yoshikawa, X.J. Wu, H. Matsuda, F.M. Micheli. Учеными E.Block, M. Keusgen, Miitsch-Eckner, J.E. Lancaster Gabriella Corea, M. Lars, Mogren, Y. Takaishi, Mary L. Parker проведены работы по выделению и изучению биологической активности серосодержащих органических соединений из органов растений, относящихся к роду *Allium L.* Известны исследования таких ученых стран СНГ, как А.М.Косян, Л.С.Аков, В.А. Куркин, Дж.Алексин, Д.Цветков в области выделения биологически активных веществ из представителей рода *Allium L.*, изучения их биологической активности и создания лекарственных средств на их основе.

Однако, несмотря на многочисленные исследования в данной области, до настоящего времени не проводились работы по разработке и стандартизации лекарственного средства антитромбогенного, капилляропротекторного действия на основе биологически активных веществ из местного сырья - конского каштана и *Allium cepa L.*

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами высшего образовательного учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Ташкентского фармацевтического института «Разработка и внедрение в медицинскую практику оригинальных лекарственных средств на основе местных лекарственных растений и координационных соединений», а также в рамках прикладного проекта молодых ученых МУЗ-2015-807063625 «Разработка технологии антитромбогенных мягких лекарственных средств с использованием местного сырья» (2016-2017 гг.).

Целью исследования является получение и стандартизация субстанции эсцин из отечественного сырья конского каштана и разработка методов контроля качества геля «Варикознет» на ее основе.

Задачи исследования:

разработка оптимального метода получения субстанции эсцина из семян конского каштана;

фракционирование субстанции эсцина, полученной новым методом, и анализ с помощью современной высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии;

разработка методов контроля качества и установление соответствующих норм геля «Варикознет» на основе субстанций эсцина и аллтромбосепина;

изучение стабильности геля «Варикознет» и определение срока его годности;

обобщение результатов исследования и разработка на их основе проектов нормативных документов для рекомендуемого лекарственного средства.

Объектом исследования служили семена конского каштана, субстанция эсцин, серосодержащие органические соединения, а также лекарственное средство «Варикознет».

Предметом исследования является определение изомерного состава эсцина, выделенного из конского каштана, а также разработка методов контроля качества и стандартизация эсцина и лекарственного препарата «Варикознет» на его основе.

Методы исследования. При выполнении настоящего исследования использованы экстракция, тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография (ТСХ и ВЭЖХ), инфракрасная (ИК), высокоэффективная жидкостная хроматография масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС), спектрофотометрия (СФ), газожидкостная хроматография масс-спектрометрия (ГЖХ-МС), а также общеизвестные методы фармацевтического анализа и химии гликозидов.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые из семян каштана выделена субстанция эсцин и путем разделения ее на фракции определен качественный и количественный состав изомеров и производных методом ВЭЖХ-МС;

впервые разработаны методы стандартизации геля «Варикознет» на основе композиции эсцина и серосодержащих органических соединений, обладающего антитромботическим и капилляропротекторным действием, критерии его подлинности и качества;

предлагаемый для геля «Варикознет» метод количественного анализа валидирован в соответствии с требованиями ICH Topic Q2 (R1) «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology»;

определены антитромботические, капилляропротекторные свойства и безопасность геля «Варикознет».

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

методом спектрофотометрии определено количественное содержание

серосодержащих органических соединений в геле «Варикознет»;

установлены стабильность и условия хранения геля «Варикознет» с использованием метода естественного хранения;

установлено, что гель «Варикознет» по терапевтической эффективности превосходит зарубежные аналоги (троксерутин и гепарин);

разработаны проекты нормативных документов на сырье конского каштана, субстанцию эсцин и гель «Варикознет».

Достоверность результатов исследования. Степень достоверности полученных результатов определяется использованием современных физико-химических, статистических и фармакологических методов анализа, а также использованием дисперсионного анализа при статистической обработке результатов (ANOVA), применения U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни и T-критерия Стьюдента.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования заключается в выделении субстанции эсцин из семян конского каштана, произрастающего на территории Узбекистана, а также разработке высокочувствительных методов спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии для качественного и количественного анализа активных веществ в составе многокомпонентного лекарственного средства – геля «Варикознет».

Практическая значимость результатов исследования состоит в том, что совместно с ООО «TEMUR MED FARM» разработаны нормативные документы для субстанции эсцин и лекарственного средства «Варикознет» и представлены в ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РУз для получения разрешения на использования в медицинской практике. Их утверждение послужит расширению номенклатуры импортозамещающих препаратов капилляропротекторного и антитромботического действия.

Внедрение результатов исследования. На основе научных результатов, полученных при разработке методов контроля качества геля «Варикознет»:

получен патент на изобретение Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (№IAP 06098, 24.12.2019 г.) на «Фармацевтическую композицию, обладающую антикоагулянтным, антиагрегантным и капиллярпротекторным действием». В результате это позволило производить мягкую лекарственную форму с новым комбинированным составом на основе местного сырья;

фармакопейная статья предприятия на субстанцию эсцин представлена для регистрации в ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РУз (письмо ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» №686 от 8 октября 2021 года, письмо

Министерства здравоохранения 8н-3/280 от 15 октября 2018 года). Утверждение данного нормативного документа предоставит возможность расширить ассортимент импортозамещающих субстанций, полученных на основе отечественного сырья;

фармакопейная статья предприятия на гель «Варикознет» представлена для регистрации в ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РУз (письмо ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» №686 от 8 октября 2021 года, письмо Министерства здравоохранения 8н-3/280 от 15 октября 2018 года). Утверждение данного нормативного документа предоставит возможность производства лекарственного средства, обладающего антикоагулянтным, антиагрегантным и капиллярпротекторным действием.

Апробация результатов исследования. Результаты настоящего исследования обсуждены на 2 международных и 3 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 5 научных статей в научных изданиях, рекомендованных ВАК Республики Узбекистан для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора философии (PhD), в том числе 4 статьи опубликованы в республиканских и 1 статья в зарубежном журналах.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, трех глав, выводов, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 101 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы, определены цели, задачи, объект и предмет исследования, соответствие ее приоритетным направлениям науки и техники², изложены степень изученности проблемы, научная новизна и практические результаты исследования, научная и практическая значимость результатов, достоверность результатов исследования, внедрение в практику полученных результатов, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации, озаглавленной «**Анализ и фармакотерапия хронической венозной недостаточности**» представлена информация о причинах венозной недостаточности и ее последствиях, фармакодинамике заболевания и затрат на эти исследования. В этой главе также показано медицинское значение конского каштана и созданных на его основе

² Автор выражает искреннюю благодарность профессору Ташкентского фармацевтического института, доктору химических наук, Заслуженному деятелю наук Узбекистана С.Н. Аминову (1938-2020) за активное содействие в реализации диссертации.

препаратов, используемых для лечения венозной недостаточности, внесенных в Государственный реестр Республики Узбекистан.

Во второй главе диссертации, озаглавленной «**Материалы и методы, использованные в исследовании**», показано влияние концентрации экстрагента при получении экстракта из семян конского каштана. Для выбора экстрагента проведены следующие исследования. Очищенные семена каштана измельчали до размера 3-4 мм. Для выбора оптимального экстрагента использовали 50 и 70% растворы метанола, растворы гидрокарбоната натрия 0,5 моль/л и воду в сочетании с 35, 45, 55, 65, 75 и 96% этиловым спиртом. Экстракционные свойства тритерпеновых гликозидов (ТТГ) семян конского каштана при использовании различных экстрагентов показаны на рисунке 1.

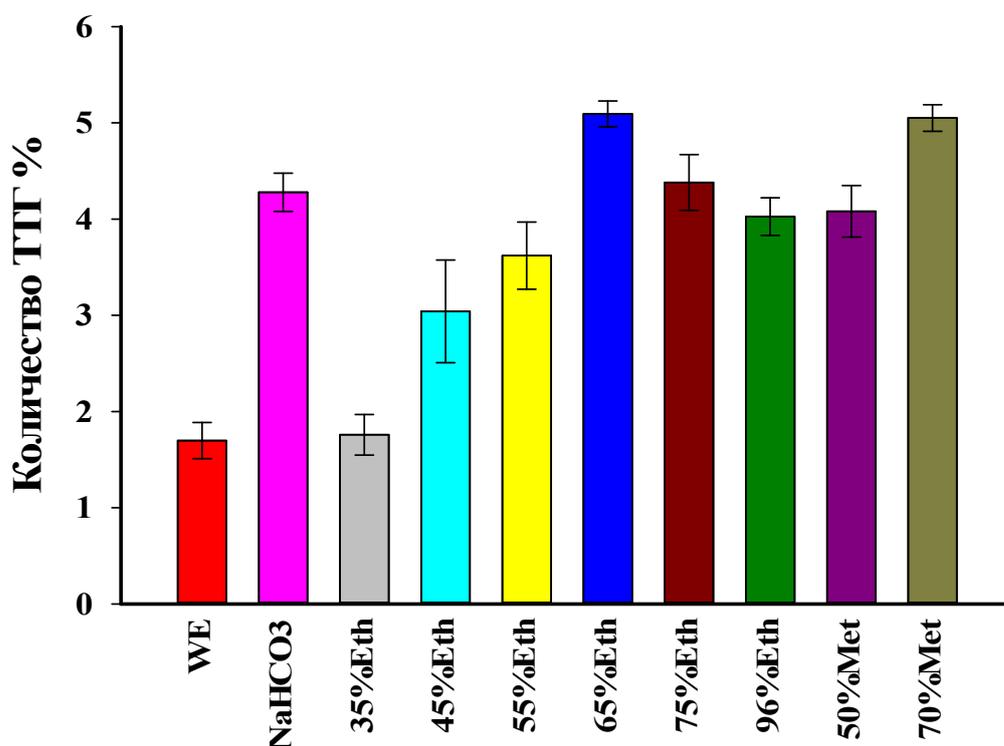


Рис. 1. Влияние природы и концентрации различных растворителей на разделение биологически активных веществ в конском каштане.

Как видно из рисунка 1, первоначально содержание ТТГ в экстракте увеличивалось с увеличением концентрации спирта, но когда концентрация этанола составила 65%, содержание ТТГ в экстракте снижалось, поскольку ТТГ хорошо растворимы в водно-спиртовой смеси. Как видно, концентрация этанола, в котором ТТГ могут хорошо растворяться, составляет 65%. Кроме того, 70% раствор метанола и гидрокарбоната натрия хорошо извлекали ТТГ из сырья, однако, метанол является токсичным и экономически дорогим растворителем.

Таким образом, в качестве оптимального экстрагента для процесса экстракции был выбран 65% этанол.

В этой главе такие описываются методы определения качественных и количественных показателей тритерпеновых гликозидов в экстракте семян конского каштана - ТСХ, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, а также методы определения качества и количества серосодержащих органических соединений в составе аллтромбосепина - спектрофотометрия, ВЭЖХ-МС, ГЖХ-МС.

Во третьей главе диссертации, озаглавленной «Стандартизация сырья, входящего в состав геля «Варикознет»», приведены материалы по стандартизации плодов конского каштана, анализ тритерпеновых гликозидов семян конского каштана, получение субстанции эсцина из семян конского каштана, результаты изучения физико-химических и технологических свойств эсцина, биологическая активность субстанции эсцина, а также результаты исследования по стандартизации субстанции аллтромбосепина.

Сапонины и их производные из семян конского каштана выделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Выделенные компоненты анализировали в режиме отрицательных ионов МС. Содержание тритерпеновых сапонинов в натуральных семенах каштана, выращенного в Узбекистане (г. Ташкент), составило $5,2 \pm 1,3\%$ (в пересчете на эсцин). Кроме того, было изучено содержание ТТГ в семенах конского каштана, выращенного в Газалкенте (Ташкентская область) ($5,04 \pm 1,2\%$) и Стамбуле (Турция) ($3,94 \pm 1,4\%$). Как видно из полученных данных, сыре конского каштана, выращенного в условиях г. Ташкента, превосходит другие источники по содержанию ТТГ.

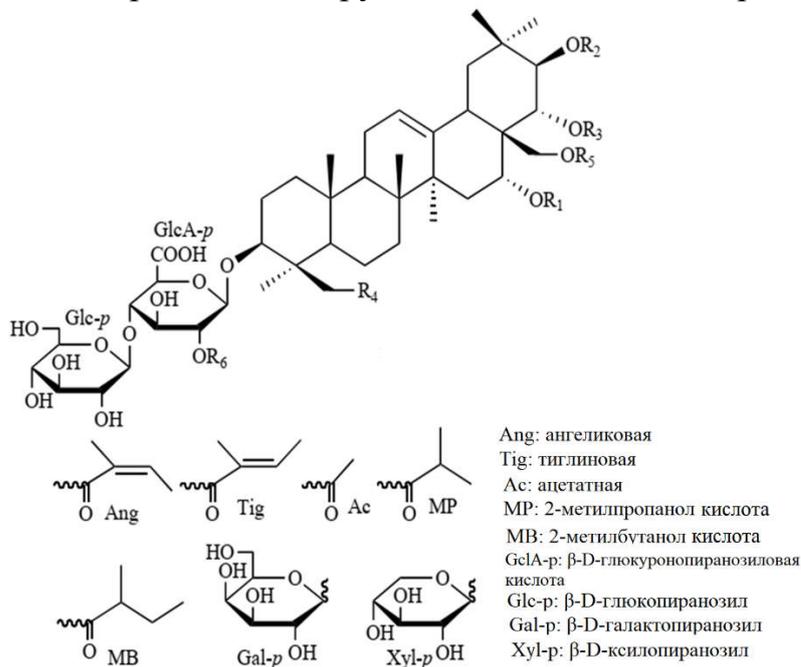


Рис. 2. Изомеры и производные эсцина.

После ступенчатой очистки спиртового экстракта семян каштана были выделены сапонины эсцина. На рис. 3 можно видеть, что пики на хроматограмме намного меньше, чем пики на хроматограмме экстракта семян, и что образуются пики, подобные стандартной хроматограмме образца (рис. 2). Анализ с помощью ESI-МС показал, что масс-спектры определялись как соединения с массами/зарядами $[M-H]^-$ - 1129, 1099, 1131, 1113, 1089, 1117 и

1057. Для подтверждения химической структуры сапонинов и их производных был проведен структурный анализ этих соединений с использованием литературных данных ¹НЯМР и ¹³С ЯМР (таб.1, рис. 2 и 5).

Таблица 1

Фракционные группы сапонинов эсцина, выделенные из семян конского каштана

Условное наименование фракции	Время удерживания, мин.	Название производных эсцина	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	m/z; аем [М-Н] ⁻
СФ-1	11,941	Эсцин Ia	H	Tig	Ac	OH	H	Glc-p	1129
		Эсцин Ib	H	Ang	Ac	OH	H	Glc-p	
		Эсцин IVc	H	H	Tig	OH	Ac	Glc-p	
		Эсцин IVd	H	H	Ang	OH	Ac	Glc-p	
		Эсцин VIb	Ang	Ac	H	OH	H	Glc-p	
		Изоэсцин Ia	H	Tig	H	OH	Ac	Glc-p	
		Изоэсцин Ib	H	Ang	H	OH	Ac	Glc-p	
		Изоэсцин VIIa	H	Tig	H	OH	Ac	Gal-p	
СФ-2	10,791	Эсцин IIa	H	Tig	Ac	OH	H	Xyl-p	1099
		Эсцин IIb	H	Ang	Ac	OH	H	Xyl-p	
		Изоэсцин IIa	H	Tig	H	OH	Ac	Xyl-p	
		Изоэсцин IIb	H	Ang	H	OH	Ac	Xyl-p	
СФ-3	11,343	Эсцин IIIa	H	Tig	Ac	H	H	Gal-p	1113
		Эсцин IIIb	H	Ang	Ac	H	H	Gal-p	
		Изоэсцин IIIa	H	Tig	H	H	Ac	Gal-p	
		Изоэсцин IIIb	H	Ang	H	H	Ac	Gal-p	
		Изоэсцин VIIa	H	Ang	H	H	Ac	Glc-p	
СФ-4	10,782	Эсцин IV	H	Ac	Ac	OH	H	Glc-p	1089
СФ-5	13,210	Эсцин IVe	H	H	H	OH	Tig	Glc-p	1087
		Эсцин IVf	H	H	H	OH	Ang	Glc-p	
		Эсцин IVg	H	H	Tig	OH	H	Glc-p	
		Эсцин IVh	H	H	Ang	OH	H	Glc-p	
		Деацетилэсцин Ia	H	Tig	H	OH	H	Glc-p	
		Деацетилэсцин Ib	H	Ang	H	OH	H	Glc-p	
СФ-6	10,343	Эсцин V	H	MP	Ac	OH	H	Glc-p	1117
		Изоэсцин V	H	MP	H	OH	Ac	Glc-p	
СФ-7	10,938	Эсцин VI	H	MB	Ac	OH	H	Glc-p	1131
		Изоэсцин VIa	H	MB	H	OH	Ac	Glc-p	
СФ-8	12,587	Деацетилэсцин IIa	H	Tig	H	OH	H	Xyl-p	1057
		Деацетилэсцин IIb	H	Ang	H	OH	H	Xyl-p	

На основе ВЭЖХ-МС были идентифицированы восемь групп пиков. Время удерживания ТТГ колеблется от 12,02 до 15,17 мин. Согласно хроматограммам ТИС, время удерживания СФ-1 от 13,2 до 14,3 мин, СФ-2 составляет от 12,8 до 15,1 мин, СФ-3 от 12,7 до 14,0 мин, СФ-4 от 12,1 до 12,4

мин, СФ-5 от 11,5 до 11,9 мин, СФ-6 от 13,0 до 14,2 мин, СФ-7 от 12,8 до 13,6 мин, СФ-8 от 12,0 до 12,3 мин (рис. 3, 4).

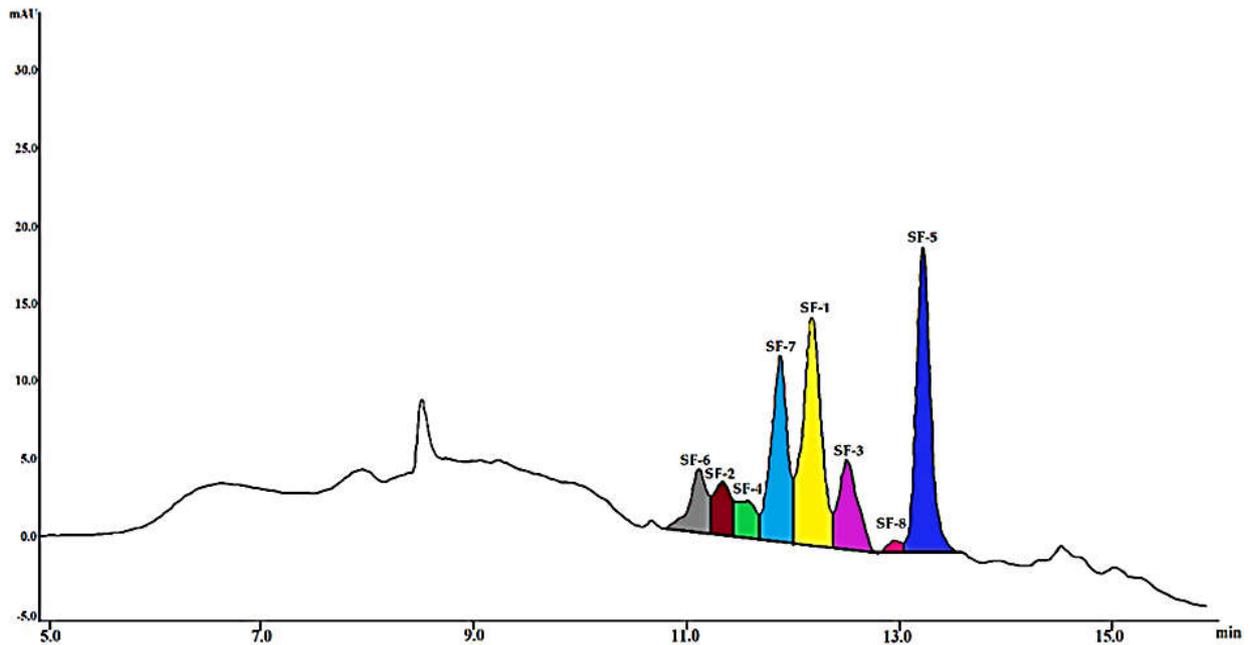


Рис. 3. ВЭЖХ-ДМД профиль образца очищенных сапонинов эсцина

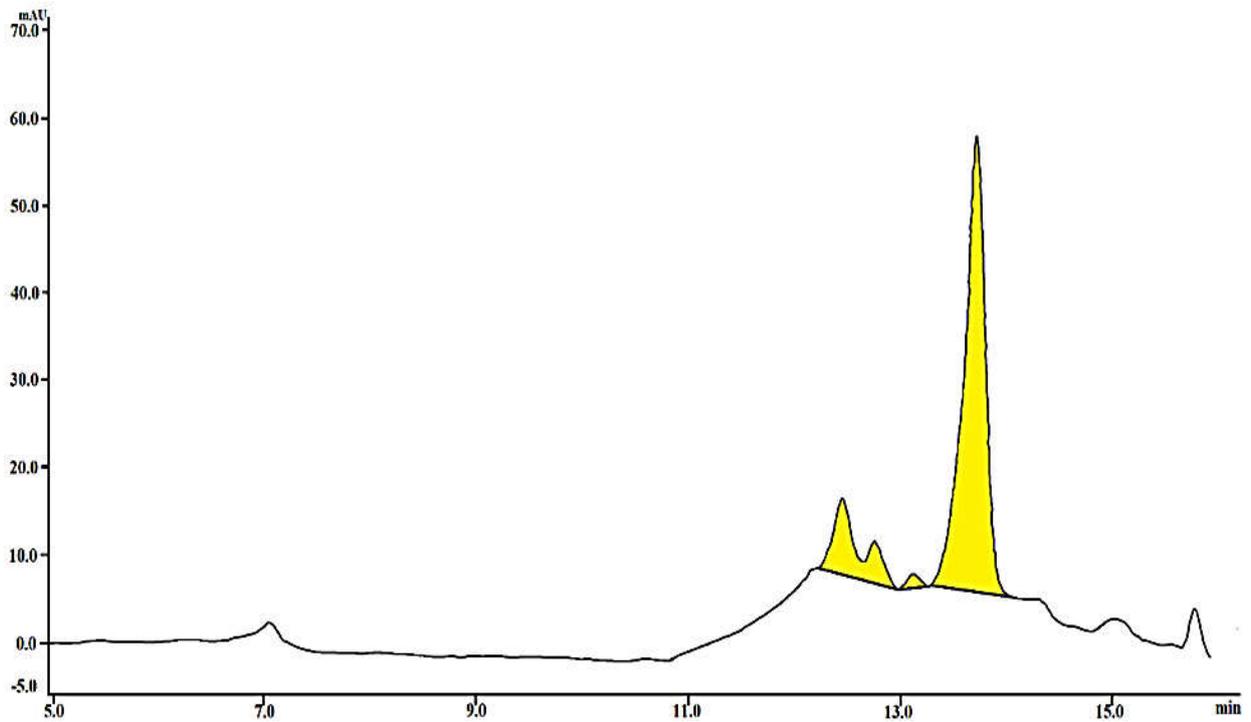


Рис. 4. ВЭЖХ-ДМД профиль стандартного образца эсцина

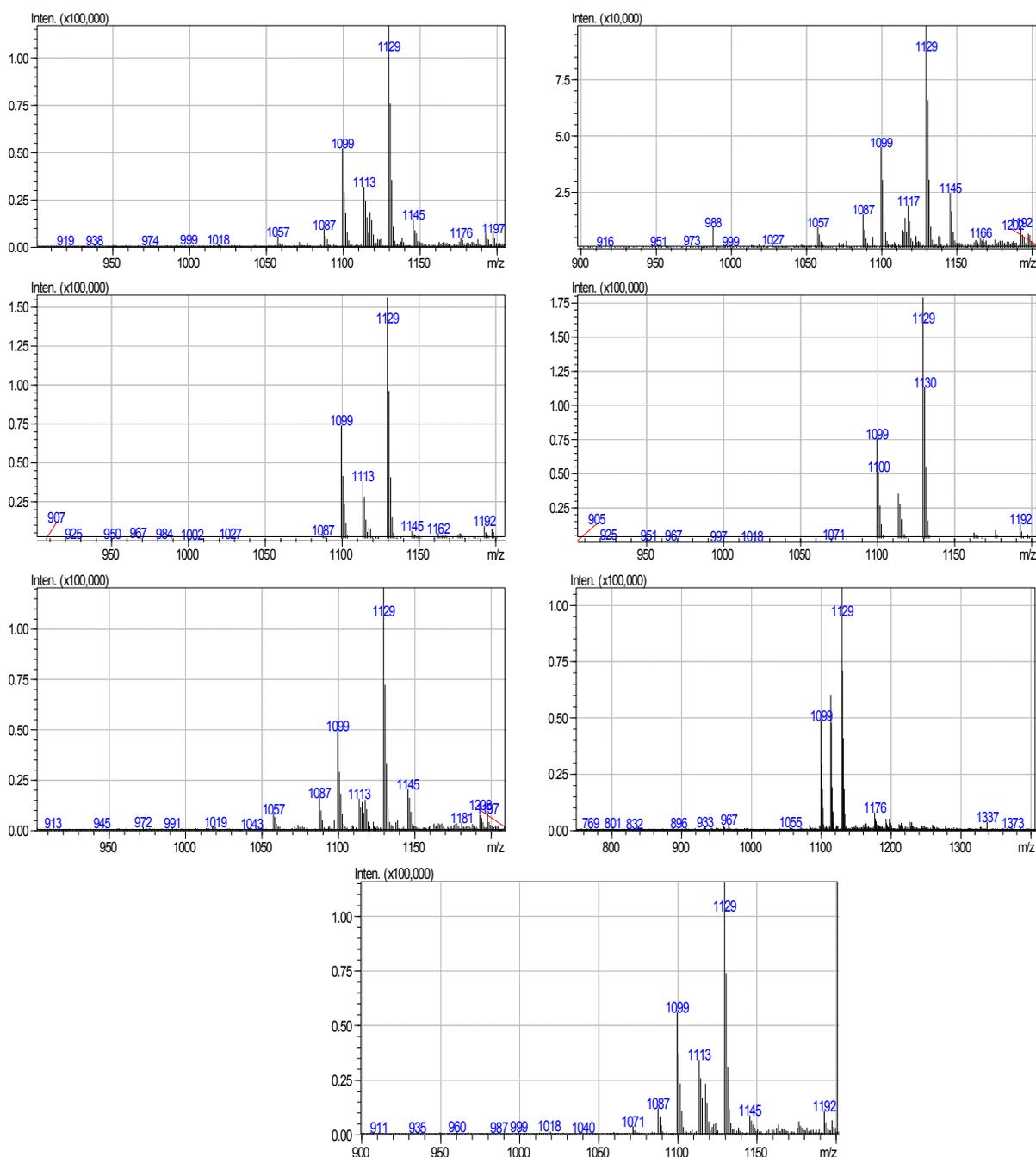


Рис. 5. Массовые заряды изомеров и производных эсцина

Эсцин встречается в форме 4 различных изомеров (Ia, Ib, IIa, IIb), а дезацетилэсцин - в 2 различных формах (I, II). При анализе приведенных выше профилей ВЭЖХ-МС установлено, что время удерживания 11,186, 11,391 мин. соответствует изомерам Ia и Ib эсцина. Кроме того, времена удерживания 11,945, 12,242 и 12,559 мин. соответствуют изомерам IIa, IIb эсцина. Время удерживания 12,979 и 13,268 мин. соответствует времени удерживания дезацетилэсцина I (табл1). Эти соединения являются специфичными для семян конского каштана, поэтому стандартизация лекарственных средств на основе каштана может быть проведена с помощью комбинации этих соединений, так как разделение их друг от друга на практике намного сложнее.

Качество субстанции эсцина, полученной из семян конского каштана, определяли на основании соответствующих нормативных документов. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты определения качественных показателей субстанции эсцина, полученной на основе семян конского каштана

№	Показатели	Требование нормативного документа (ГФ РУЗ)	Определено
1.	Описание	Беловатая или беловато-желтоватая характерная масса без запаха.	Соответствует
2.	Подлинность	На хроматографическую пластинку (Merk, Германия) наносят капилляром спиртовой раствор эсцина, высушивают и хроматографируют в системе: хлороформ-безводная уксусная-кислота-метанол-очищенная вода (60: 32: 12: 8). Финишную линию обозначают на расстоянии 12 см от стартовой линии. По окончании хроматографирования пластинку обрабатывают 3 % раствором железа (III) хлорида и сушат в сушильном шкафу при 100-105°C в течение 10 мин, после чего анализируют в УФ-лампе при 366 нм. Стандартный и тестовый образцы эсцина показывают пурпурное пятно, которое должно иметь одинаковое значение Rf. Пятна также появляются в других областях ТТГ.	Соответствует
3.	Потеря в массе при высушивании, %	5,0 г субстанциям сушат до постоянной массы при температуре 100 ± 5 °С. Потеря в массе не должна превышать 2%.	1,23
4.	Тяжелые металлы, %	Определение проводят в 1,0 г субстанции. Содержание тяжелых металлов не должно превышать 0,001%.	Соответствует
5.	Сумма ТТГ, %	Спектрофотометрический метод (длина волны 540 нм). Содержание суммы ТТГ в субстанции эсцина должно быть не менее 95,0% в пересчете на эсцин.	97,12
		Метод ВЭЖХ-МС. Содержание суммы ТТГ в субстанции эсцина должно быть не менее 95,0% в пересчете на эсцин.	97,49

Количественный анализ ТТГ в субстанции эсцина проводили 5 раз с использованием прибора LC-МС 2020.

Эсцин и его изомерные производные были разделены за 10,988–15,166 мин. Их идентификация была произведена с помощью масс-спектров. Количественный анализ проводился по сумме площадей их пиков. Качество субстанции эсцин было определено на основании соответствующих нормативных документов, полученные результаты были признаны полностью соответствующими их требованиям.

В главе IV диссертации «**Стандартизация гелевой лекарственной формы «Варикознет» на основе местного сырья»** представлены состав и технология гелевой лекарственной формы «Варикознет», разработка методов контроля качества, определение стабильности и срока годности. Результаты изучения токсичности, капилляропротекторной и антитромботической активности геля «Варикознет» приведены в приложении к диссертации.

На основе субстанций Эсцин и Аллтромбосепин был приготовлен гель с составом, и условным названием называется «Варикознет», приведенным в таблице 3.

Таблица 3

Состав на 100 г лекарственной формы геля «Варикознет»

Ингредиенты	Количество, г
Аллтромбосепин	1,00
Эсцин	0,15
Вспомогательное вещество	
Диметилсульфоксид	1,00
Нипагин	0,10
Основа геля	97,75

Как видно из таблицы 3, в композицию были добавлены диметилсульфоксид и нипагин. Диметилсульфоксид добавляют во многие мягкие лекарственные формы для улучшения проницаемости биологически активных веществ. Нипагин же служит для сохранения стабильности геля в течение длительного времени. Состав геля был выбран результате изучения термической, коллоидной стабильности и фармакологического скрининга. В последующем были проведены исследования по определению фармакотоксикологических свойств и срока годности геля. В частности, композиция показала положительные результаты с точки зрения антитромботического и капиллярноукрепляющего действия и стабильности. Этот состав получил условное название «Варикознет».

Определение количества серосодержащих органических соединений в геле спектрофотометрическим методом.

Для этого к 5,0 г (точная навеска) препарата добавляют 15 мл этилового спирта, 1 мл уксусной кислоты и перемешивают. Затем раствор фильтруют в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем колбы доводят спиртом до метки. К 5 мл полученного фильтрата добавляют 2 мл щелочного раствора цинката натрия. Смесь сушат в сушильном шкафу при температуре 200°C. Полученный сухой остаток сначала охлаждают в эксикаторе, затем растворяют в 60 мл 2% раствора уксусной кислоты и переносят в колбу вместимостью 100 мл, добавляют 5 мл 0,5 моль/л раствора железоаммонийных квасцов, 5 мл 0,1%

раствора п-амино N, N-диметиланилина. Через 15 мин объем раствора в мерной колбе доводят до метки очищенной водой. Оптическую плотность измеряют при длине волны 665 нм в кювете с толщиной слоя 1 см на спектрофотометре (Agilent Technologies, США) по сравнению с контрольным раствором. Спектр испытуемого раствора показан на рисунке 6. В нем наблюдаются 2 максимума при 616 и 665 нм. Количественный анализ проводился при длине волны 665 нм, которая показала максимальное поглощение. Результаты представлены в таблице 4.

Из таблицы и видно, что среднее содержание СОС в 100 г геля «Варикознет» составило 4,673 мг, при этом средняя относительная погрешность эксперимента составила 2,01%.

Количество тритерпеновых гликозидов в геле «Варикознет» также определяли спектрофотометрически.

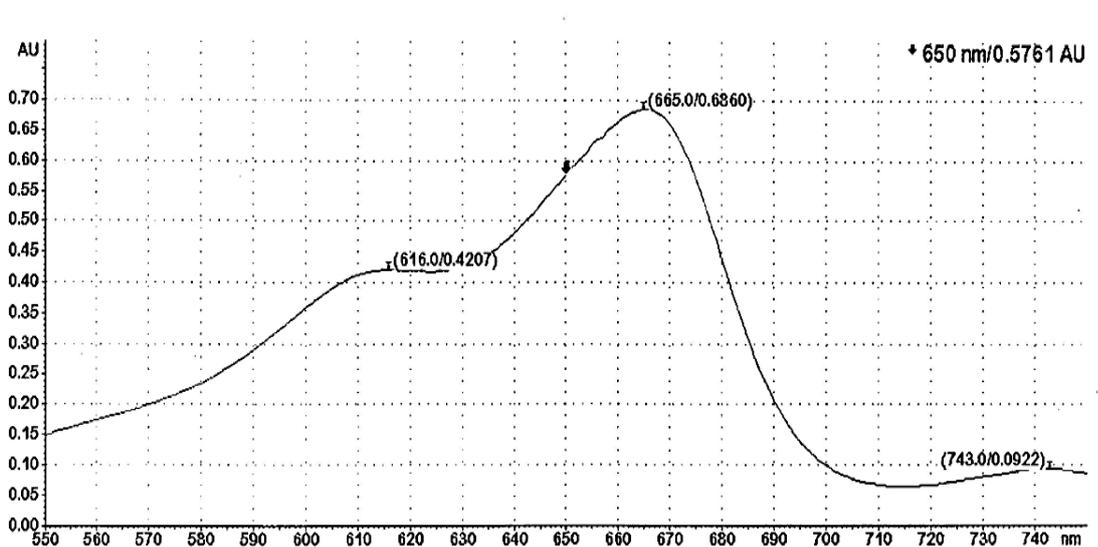


Рис. 6. Спектр поглощения света N, N, N', N' - тетраметилтиона, образованного на основе СОС в геле «Варикознет»

Таблица 4

Результаты определения количественного содержания СОС в геле «Варикознет» СФ методом

Навеска, г	Сумма СОС, мг/100 г	Метрологические характеристики
5,0002	4,52	$\bar{X} = 4,673$; $F=4$ $S^2=1,2909$; $S=1,1361$; $\Delta X=3,1585$; $\Delta \bar{X}=1,4125$; $\varepsilon=4,47\%$; $\bar{\varepsilon}=2,01\%$
5,0007	4,62	
5,0008	4,66	
5,0008	4,66	
5,0014	4,70	

Приготовление испытуемого раствора. 5,0 г (точная навеска) препарата помещают в фарфоровую посуду и нагревают на водяной бане до тех пор, пока

не останется сухой остаток. После охлаждения смешивают с 10 мл 0,1 моль/л кислоты хлористоводородной и переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл. Затем фарфоровую чашку промывают еще 2 раза; 1 раз 10 мл раствора 0,1 моль/л кислоты хлористоводородной, 2 раз - 20 мл пропанола-1. Далее водной раствор отделяют в делительной воронке.

Объединенный раствор кислой среды добавляют к 50 мл хлороформа и интенсивно перемешивают в течение 2 мин. Затем добавляют 30,0 мл 0,1 моль/л раствор хлористоводородной кислоты, 20 мл пропанола-1, 50 мл хлороформа и перемешивают еще 2 мин. После разделения смеси на две части нижнюю фазу фильтруют и переносят в круглодонную колбу, и конденсируют в вакууме при 50°C. Полученную густую массу сушат под вакуумом до образования сухого остатка.

Полученный сухой остаток дважды промывают 10 мл эфира и фильтруют. Фильтрат отбрасывают. Полностью свободный от эфира остаток экстрагируют 3 раза безводной уксусной кислотой и фильтруют. Фильтрат переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки безводной уксусной кислотой.

В три пробирки с крышками помещают соответственно стандартный и испытуемый растворы (третья пробирка для приготовления контрольного раствора). В каждую пробирку добавляют по 3 мл раствора железа хлорида (III) в уксусной кислоте и 1 мл безводной уксусной кислоты, закрывают крышку и выдерживают на водяной бане при 60°C в течение 25 мин. Затем охлаждают и измеряют оптическую плотность при длине волны 540 нм, в кварцевой кювете толщиной слоя 10 мм.

Приготовление стандартного раствора. 25 мг эсцина в мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в безводной уксусной кислоте. Затем доводят объем колбы до метки безводной уксусной кислотой.

Содержание суммы ТТГ (мг / 100 г) в геле «Варикознет» рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 50 \cdot G}{D_0 \cdot a_1 \cdot 100},$$

где; X- количество ТТГ, мг; D_1 - оптическая плотность исследуемого раствора; D_0 - оптическая плотность раствора стандартного образца; A_1 - масса препарата, г; A_0 - стандартный размер образца, г;

Результаты определения содержания ТТГ в геле «Варикознет» СФ методом приведены в таблице 5.

Из приведенной таблицы видно, что сумма ТТГ в 100 г геля «Варикознет» составила в среднем 151,04 мг, а средняя относительная погрешность эксперимента - 2,84%.

Валидацию разработанного метода проводили по показателям: специфичность, селективность, линейность, воспроизводимость, правильность, точность метода.

**Результаты количественного определения ТТГ в геле «Варикознет»
СФ методом.**

Навеска, г	Сумма ТТГ, мг/100 г	Метрологические характеристики
5,0006	150,5	$\bar{X}=151,04$; $F=4$
5,0011	148,9	$S^2=0,223$;
5,0014	151,0	$S=0,4645$;
5,0018	151,4	$\Delta X=1,2950$;
5,0019	151,7	$\Delta \bar{X}=0,5819$; $\varepsilon=5,90\%$; $\bar{\varepsilon}=2,84\%$

Разработаны методики контроля качества геля «Варикознет» в соответствии с требованиями ГФ РУз. В результате экспериментов для геля «Варикознет» были определены соответствующие нормы по всем показателям. При контроле качества препарата было определено, что он полностью соответствует требованиям НД.

При определении специфической активности геля «Варикознет» на капилляропротекторной модели использовали краситель ксилол. За критерий активности капилляров принимали время (минуты) посинения воспаленной области. Согласно полученным результатам, исследуемый препарат показал статистически достоверную продолжительность времени образования посинения на воспаленной области. Результаты экспериментов показали, что гель «Варикознет» обладает более надежной капилляропротекторной активностью, чем гель «Троксерутин Софарма».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате углубленного фитохимического исследования семян конского каштана, выращиваемого в Узбекистане, был предложен новый источник лекарственного сырья с капилляропротекторной активностью.

2. Разработан метод получения субстанции эсцина на основе отечественного сырья не менее 95% чистоты. Доказано, что противовоспалительное действие тритерпеновых гликозидов, разделенных на 8 фракций в зависимости от их массы, зависит от радикала при С-28 в структуре эсцина.

3. Предложены методы СФ, ТСХ, ВЭЖХ ва ВЭЖХ-МС для контроля качества, стандартизации и валидации субстанции эсцина. В результате исследований установлены нормы качества субстанции.

4. Впервые для определения качественных и количественных показателей геля «Варикознет», полученного на основе субстанции эсцина и серосодержащих органических соединений, предложен метод высокоэффективный жидкостной хромато-масс-спектрологии.

5. Аналитические методы, разработанные для количественного анализа геля «Варикознет», валидированы по показателям: специфичность, селективность, линейность, воспроизводимость, правильность, точность. С использованием данных критериев были разработаны разделы «подлинность» и «количественный определение» НД для рекомендуемого впервые лекарственного средства.

6. Экспериментально установлены безопасность, антитромбогенное и капилляропротекторное свойства, а также срок годности лекарственного средства «Варикознет».

**SCIENTIFIC COUNCIL DSC.04/30.12.2019.FAR.32.01
ON CONFERMENT OF SCIENTIFIC DEGREES
AT THE TASHKENT PHARMACEUTICAL INSTITUTE**

TASHKENT PHARMACEUTICAL INSTITUTE

TURSUNOV KHURSHID OBITOVICH

**DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS FOR
«VARIKOSNET» GEL**

15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy

**DISSERTATION ABSTRACT
OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY(PhD) ON PHARMACEUTICAL SCIENCES**

Tashkent – 2022

The title of the dissertation of doctor of philosophy (PhD) on pharmaceutical sciences has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration number of B2020.2.PhD/Far70

The dissertation has been prepared at the Tashkent pharmaceutical institute.

The abstract of the dissertation is posted in three languages (Uzbek, Russian, English (resume)) on the website of the Scientific Council (www.pharmi.uz) and on the website of "ZiyoNet" information and education portal: www.ziynet.uz.

Scientific supervisors: **Sharipov Avez Tuymuradovich**
Doctor of Pharmaceutical Sciences, associate professor

Official opponents: **Urmanova Flura Faridovna**
Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor
Nishanbayev Sabir Zaripbayevich
Doctor of Chemical Sciences, senior researcher

Leading organization: **Tashkent institute of Chemistry and Technology**

Defense will take place on « ___ » _____ 2022 at ___ at the meeting of the Scientific Council DSC.04/30.12.2019.Far.32.01 at the Tashkent pharmaceutical institute (address: 100015, Tashkent city, Mirabad district, Aibek st., 45. Tel.: (+99871) 256-37-38, fax: (+99871) 256-45-04, e-mail: info@pharmi.uz).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Tashkent pharmaceutical institute (№ ___). Address: 100015, Tashkent city, Mirabad district, Aibek st., 45. Tel.: (+99871) 256-37-38.

Abstract of the dissertation is distributed on « ___ » _____ 2022.
(Protocol at the register № ___ dated « ___ » _____ 2022).

K.S. Rizaev
Chairman of scientific council on conferment of scientific degrees, D.M.Sc.

Y.S. Karieva
Scientific secretary of scientific council on conferment of scientific degrees, D.Pharm.Sc., professor

F.F. Urmanova
Deputy chairman of scientific seminar Under scientific council on conferment of scientific degrees, D.Pharm.Sc., professor

INTRODUCTION (dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD))

The aim of the research is to obtain and standardize the escin substance from the local horse chestnut, and development methods for quality control of the "Varikoznet" gel developed on its basis.

The objects of research are horse chestnut seeds, escin substances obtained from the plant, sulfur-containing organic compounds, and the "Varikoznet" gel.

The scientific novelty of the research is as follows:

The escin substance was obtained from the seeds of horse chestnut for the first time and qualitative and quantitative composition of isomers and derivatives of it was determined by the method of HPLC-MS by dividing them into fractions;

Standardization methods of the "Varikoznet" gel have been developed on the basis of an organic compounds composition that store escins and sulfur which have an antithrombotic and capillary protective effect for the first time;

The method of quantitative analysis proposed for the "Varikoznet" gel has been validated in accordance with the requirements of ICH Topic Q2 (R1) "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology";

The antithrombotic, capillary-protective properties and safety of the "Varikoznet" gel were determined.

Implementation of the research results on the scientific results basis obtained by development of quality control methods of "Varikoznet" gel:

A patent for "pharmaceutical composition with an anticoagulant, antiaggregant and capillary procoagulant effect" was obtained from the Agency of Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan (№IAP 06098, 24.12.2019). As a result, it made it possible to produce a form of soft drugs with a new combined composition on the basis of local homeopaths;

Pharmaceutical article of escin substance was submitted to SUE "State center for Expertise and Standardization of medicines, medical devices and medical equipment" Agency for the development of the pharmaceutical industry under the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan for registration (SUE "State center for Expertise and Standardization of medicines, medical devices and medical equipment" letter №686 from 8.10.2021, letter №.8N-3/280 from 15.10.2018 of the Ministry of Health). The approval of this normative document makes it possible to expand the assortment of medicines and drugs obtained from local materials as substitutions for imported ones;

Pharmaceutical article of "Varikoznet" drug was submitted to SUE "State center for Expertise and Standardization of medicines, medical devices and medical equipment" Agency for the development of the pharmaceutical industry under the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan for registration (SUE "State center for Expertise and Standardization of medicines, medical devices and medical equipment" letter №686 from 8.10.2021, letter №.8N-3/280 from 15.10.2018 of the Ministry of Health). The approval of this normative document will provide an opportunity for the production of a drug with anticoagulant, antiaggregant and capillary-protective effects.

The structure and volume of the dissertation The dissertation consists of an introduction, four chapters, a conclusion, a list of references and an appendix. The volume of the dissertation is 101 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть, I part)

1. Турсунов Х.О., Аминов С.Н., Шарипов А.Т. «Варикознет» гелини сифатини назорат қилиш усулларини ишлаб чиқиш //Фармацевтика журнали. -Ташкент. -2017. -№3. -Б.64-69. (15.00.00., №2).

2. Имамалиев Б.А., Аминов С.Н., Шарипов А.Т., Турсунов Х.О. Изучение острой токсичности и местно-раздражающего действия геля «Варикознет» //Фармацевтический журнал. -Ташкент. -2017.-№2. -С.122-126. (15.00.00., №2).

3. Турсунов Х.О., Мавлонов Г.Т., Шарипов А.Т. Селективная экстракция изомерных сапонинов и стандартизация препаратов конского каштана //Фармацевтический журнал. – Ташкент. 2020.-№3.-Б.16-20. (15.00.00. №2).

4. Sharipov A., Tursunov Kh., Fazliev S., Azimova B., Razzokov J. Hypoglycemic and anti-inflammatory effects of triterpene glycoside fractions from aeculus hippocastanum seeds //Molecules.-2021.-Vol.26.-P.3784. (Scopus IF-4,7)

5. Турсунов Х.О., Болтабаева Г.Э., Вохидов Б.Б., Каримова З.Н., Шарипов А.Т. Махаллий доривор ўсимлик хомашёси асосида эсин субстанциясини олиш ва стандартлаштириш //Ўзбекистон фармацевтик хабарномаси. -2021. -№2. -Б. 43-50. (15.00.00. №4).

II бўлим (II часть; II part)

6. Sharipov A.T., Abdufattoeva M. Sh, Tursunov Kh.O. "Varikoznet" gelium determine the amount of sulfur organic compounds //Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIV International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Student. - Kharkov, 2017.- Vol.1-P.149.

7. Турсунов Х.О., Шарипов А.Т., Мавлонов Г.Т., Аминов С.Н. Хромато-масс-спектрометрия тритерпеновых гликозидов конского каштана //“Фармация: Материалы Республиканской научно-практической конференции "Наука, образование, инновации и производство" (с международным участием). -Ташкент.-2017.- С.353-354.

8. Турсунов Х.О., Шарипов, А.Т., Аминов С.Н. Разработка состава и технология геля «Варикознета» //Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів»: матеріали IV Міжнар. наук.-практ. конф. (12-13 березня 2020 року).- Харков.-2020.-С.566.

9. Турсунов Х.О., Мавлонов Г.Т., Шарипов А.Т. Селективная экстракция изомерных сапонинов и стандартизация препаратов конского каштана //“Современное состояние фармацевтической промышленности: проблемы и перспективы” международная научно-практическая конференция -Ташкент.-2020.-С.276-277.

10. Lutfillokhonov M.Kh., Vokhidov B.B., Tursunov Kh.O., Sharipov A.T. A new approach to the standardization of drugs based on horse chestnut. //Материалы республиканской научно-практической конференции с международным участием учёных на тему «Актуальные проблемы химической технологии» - Ташкент.-2021.-С.469-470.

Автореферат «Фармацевтика журнали» тахририятида тахрирдан ўтказилиб,
ўзбек, рус ва инглиз тилларидаги матнлар ўзаро мувофиқлаштирилди.

Босмахона лицензияси:



9338

Бичими: 84x60 ¹/₁₆. «Times New Roman» гарнитураси.
Рақамли босма усулда босилди.
Шартли босма табағи: 3,5. Адади 100 дона. Буюртма № 26/22.

Гувоҳнома № 851684.
«Тірографф» МЧЖ босмахонасида чоп этилган.
Босмахона манзили: 100011, Тошкент ш., Беруний кўчаси, 83-уй.