Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Факультет хімії та фармації
Кафедра фармакології та технології ліків

Дипломна робота

на здобуття ступеня вищої освіти магістра

на тему: «**Розробка лікарської форми та дослідження її фармакологічної активності»**

«Dosage form development and research of its pharmacological activity»

Виконав: студент денної форми навчання
спеціальності 102 Хімія
Цісак Анатолій Анатолійович

Керівник: д. мед. н., проф. Грицук О.І.________
(підпис)
Рецензент: к.х.н., доц. Менчук В.В.

Рекомендовано до захисту:
протокол засідання кафедри
№ ___ від ___ _______ 20__ р.

Завідувач кафедри
______д.мед. н., проф. Грицук О.І.
(підпис)

Захищено на засіданні екзаменаційної комісії
протокол № ____від «____»________ 20__ р.
Оцінка ____________/__________/________
(за національною шкалою, за шкалою ECTS,бал)

Голова екзаменаційної комісії
__________ д. х. н., проф. Шевченко О.В.
(підпис)

Одеса – 2023

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена теоретичному обґрунтуванню та експериментальному вирішенню проблеми цілеспрямованого пошуку та розробки складу лікарських засобів на основі природної лікарської сировини з широким спектром фармакологічної активності.

Опрацьовано й узагальнено інформацію про сучасний стан виробництва екстрактів та особливості їх технології.

Проведено Pass-аналіз основних хімічних сполук листя розмарину та встановлено широкий спектр їх фармакологічної активності.

Екстракцію біологічно активних речовин із листя розмарину, що росте в Одеській області України, проводили в апараті Сокслета. Умови екстракції були розраховані на основі результатів скринінгових досліджень та за допомогою математичного моделювання методом повного факторного експерименту, який заснований на регресійному аналізі. Так, було визначено, що оптимальними умовами для вилучення суми поліфенольних сполук є екстракція при температурі 68°С, використовуючи як екстрагент 60% спирт етиловий протягом 32 хвилин при співвідношенні сировини та екстрагенту як 1:8. Вміст поліфенольних сполук визначали спектрофотометрично та методом високоефективної рідинної хроматографії (для стандартизації отриманого сухого екстракту), результати експериментальних досліджень статистично обробляли. Представлено технологічну схему отримання сухого екстракту та представлено всі необхідні розрахунки, показано, що вміст сполук поліфенольної природи в отриманому екстракті складає 28,5%.

На основі отриманого екстракту розроблено лікарську форму у вигляді емульсії з вмістом екстрактивних речовин 1,5% та проаналізовано рівень її анксіолітичної та антидепресивної активності на стандартних фармакологічних моделях («Чорно-біла камера», «Метод Порсолта»).

Робота викладена на 68 сторінках, містить 5 рисунків, 11 таблиць, 2 схеми, наведено посилання на 49 джерел літератури.

ЗМІСТ

ВСТУП

Застосування лікарських рослин у лікуванні захворювань має багатовікову традицію. Кожної хвилини в результаті фотосинтезу на нашій планеті утворюється близько 10 тис. т зеленої органічної маси. Це дало можливості, ще з давнини, виявити в багатьох рослинах лікарські властивості.

У складі рослин містяться біологічно (фармакологічно) активні речовини, які в організмі людини або тварин викликають певний терапевтичний ефект, впливаючи на ті або інші органи. У рослинах вони зазвичай містяться в невеликій кількості, зате володіють сильною дією на організм людини.

Спеції і прянощі — це природні біологічно активні добавки, здатні зробити харчування цілющим і досконалим. Спеції-це насіння, листя, коріння, стебла, кора і квіти пряних рослин. У них містяться вітаміни і мінеральні речовини необхідні організму людини для повноцінної життєдіяльності [1].

В останні роки інтерес до спецій зріс в зв'язку з тим, що багато з них мають високу антиоксидантну активність. Вони стали додатковим джерелом природних антиоксидантів: флавоноїдів, фенольних кислот, таннінів, алкалоїдів, фенольних дитерпенів і вітамінів [2].

Природні антиоксиданти в спеціях допомагають боротися з окислювальним стресом - надмірним вмістом реакційних кисневих і азотних сполук, включаючи і вільні радикали, в біологічних рідинах людини.

Антиоксидантна активність спецій пов'язана з їх хімічним складом, в першу чергу, з присутністю в них поліфенольних сполук [3].

Перспективним об’єктом дослідження є розмарин, оскільки ця сировина використовується як спеція під час приготування їжі, а з літературних джерел відомо, що він містить ряд біологічно активних речовин і, як наслідок, має певний спектр фармакологічної активності.

Метою роботи було встановити оптимальні умови екстракції поліфенольних сполук з листя розмарину, представити технологію одержання сухого екстракту, розробити лікарську форму на основі сухого екстракту та здійснити дослідження її анксіолітичної та антидепресивної активності.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні задачі:

- Проаналізувати можливий спектр фармакологічної активності екстрактивних речовин з листя розмарину за допомогою програмного забезпечення Pass-online.

- Здійснити екстракцію БАР з листя розмарину, обґрунтувавши технологію та підібрані умови екстракції, що забезпечують високий вихід сполук поліфенольної природи.

- Дослідити вміст та концентрацію поліфенольних сполук методом ВЕРХ.

- Представити технологічну схему отримання сухого екстракту та здійснити всі розрахунки.

- Розробити склад та представити технологію виготовлення емульсії на основі отриманого сухого екстракту листя розмарину.

- Дослідити рівень антидепресивної та анксіолітичної активності розробленої лікарської форми.

Наукова новизна

В результаті комплексного дослідження було оптимізовано технологічні умови екстракції БАР з листя розмарину, досліджено вміст різних груп та деяких індивідуальних сполук методом ВЕРХ, представлено технологію одержання сухого екстракту та здійснено його стандартизацію за вмістом суми поліфенольних сполук (28,5%). На основі одержаного сухого екстракту розроблено компонентний склад емульсії та досліджено рівень її анксіолітичної та антидепресивної активності *in vivo* в дозі 150 мг/кг.

Практична цінність

Здійснене дослідження дозволило визначити хімічний склад досліджуваної рослинної сировини та спрогнозувати можливий спектр фармакологічної активності.

Одержаний екстракт з листя розмарину демонструє високий рівень анксіолітичної та антидепресивної активності, що може бути використано для подальших досліджень з метою визначення повного спектру фармакологічної активності.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено аналіз найважливіших хімічних сполук, виявлених в листі розмарину, за допомогою програмного забезпечення Pass-online та представлено широкий спектр можливої фармакологічної активності екстрактивних речовин з листя розмарину.

2. Визначено оптимальні умови екстракції під впливом 4-х вхідних факторів на основі результатів скринінгових досліджень та за допомогою математичного моделювання та показано, що оптимальними умовами для вилучення суми поліфенольних сполук є екстракція при температурі 68°C, використовуючи як екстрагент 60% спирт етиловий протягом 32 хвилин при співвідношенні сировини та екстрагенту як 1:8.

3. Проведено ідентифікацію та кількісне визначення сполук поліфенольної природи методом високоефективної рідинної хроматографії та встановлено, що концентрація суми поліфенольних сполук в зразках екстракта листя розмарину складає 2849,33 мкг/мл.

4. Представлено технологічну схему отримання сухого екстракту та показано, що вміст сполук поліфенольної природи в отриманому сухому екстракті складає 28,5%.

5. Розроблено компонентний склад та прописано технологію виготовлення лікарської форми у вигляді емульсії з вмістом екстрактивних речовин 1,5%.

6. Показано, що розроблена емульсія на основі екстрактивних речовин листя розмарину має високий рівень анксіолітичної активності в тесті «Чорно-біла камера», оскільки її введення сприяє збільшенню кількості виглядувань та переходів між відсіками (в середньому по групі на 85 та 95%, відповідно), при цьому достовірно знижується показник знаходження в темному відсіку до 68 % в порівнянні з контролем, що доводить пригнічення страху та тривоги.

7. Встановлено, що в тесті вимушеного плавання по Порсолту спостерігається статистично значиме зниження часу іммобілізації тварин, на

30% по відношенню до контролю, що доводить наявність антидепресивної активності розробленої емульсії на основі екстрактивних речовин листя розмарину в дозі 150 мг/кг.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Surh Y.J., Chemopreventive phenolic compounds in common spices, Taylor&Francis, New York, 2006, pp.197-219.

2. Peter K.V. Handbook of Herbs and Spices, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, 2001, Vol. 2. pp. 332.

3. Charles D.J., Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources, Springer, USA, 2013, Vol. 8, 612 p.

4. Carocho M., Ferreira I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives //Food and chemical toxicology. – 2013. – Т. 51. – С. 15-25.

5. Yen G. C., Duh P. D., Tsai H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid //Food chemistry. – 2002. – Т. 79. – №. 3. – С. 307-313.

6. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E //Analytical biochemistry. – 1999. – Т. 269. – №. 2. – С. 337-341.

7. Kiokias S., Proestos C., Varzakas T. A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts //Current Research in Nutrition and Food Science Journal. – 2016. – Т. 4. – №. Special Issue Carotenoids March 2016. – С. 25-37.

8. Maqsood S. et al. Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: a detailed review //Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2014. – Т. 13. – №. 6. – С. 1125-1140.

9. European vector of development of the modern scientific researches: collective monograph / Lidiia Eberle, Alona Kobernik PHARMACOLOGICAL STUDY OF OINTMENT BASED ON ZINGIBER OFFICINALE EXTRACT. –

2nd ed. – Riga, Latvia : “Baltija Publishing”, 2021. – P. 1-21. ISBN: 978-9934-26-077-3 DOI: https://doi.org/10.30525/978-9934-26-077-3

10. Bhutani M.K., Bishnoi M., Kulkarni S.K. Antidepressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes //Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2009. V. 92. №. 1, pp. 39–43.

11. Ларіонов В.Б., Цісак А.О., Бєнєт С.С. Поліфенольний статус та антиоксидантна активність трави *Thymus serpyllum L.* Вісник ОНУ. Хімія. - Том 28, випуск 1(84) 2023. – С.75-84

12. Еберле Л.В. Фармакологічне дослідження екстракту Acorus calamus L. / Л.В. Еберле, А.О. Цісак, О.І. Грицук, І.М. Радаєва, О.В. Устянська, О.І. Александрова // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2023. – №1.

13. Dragland S., Senoo H., Wake K., Holte K. et al., J Nutr., 2003, Vol. 133, pp. 1286-1290.

14. Assayed M.E., Immunopharmacol Immunotoxicol, 2010, Vol. 32, pp. 284-296.

15. Shaik Y.B., Castellani M.L., Perrella A., Conti F et al., J Biol Regul Homeost Agents, 2006, Vol. 20, pp. 47-52.

16. El Babili F., Bouajila J., Souchard J.P., Bertrand C. et al., J Food Sci., 2011, Vol. 76, pp. 512-518.

17. Ried K., J Nutr., 2016, Vol. 146, pp. 389396.

18. Dearlove R.P., Greenspan P., Hartle D.K., Swanson R.B. et al., J Med Food., 2008, Vol. 11, pp. 275-281.

19. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Ćebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complement Altern Med. 2014;14:225

20. Jonatas Rafael de Oliveira, Samira Esteves Afonso Camargo & Luciane Dias de Oliveira. Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. Journal of Biomedical Science. Volume 26, 5. 2019.

21. Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. J Ethnopharmacol. 2019;229:29–45.

22. Karthik D, Viswanathan P, Anuradha CV. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2011;58:514–21

23. Fernández LF, Palomino OM, Frutos G. Effectiveness of Rosmarinus officinalis essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life. J Ethnopharmacol. 2014;151:509–16

24. Menghini L, Genovese S, Epifano F, Tirillini B, Ferrante C, Leporini L. Antiproliferative, protective and antioxidant effects of artichoke, dandelion, turmeric and rosemary extracts and their formulation. Int J Immunopathol Pharmacol. 2010;23(2):601–10.

25. Abdelhalim A, Karim N, Chebib M, Aburjai T, Khan I, Johnston GA, et al. Antidepressant, anxiolytic and antinociceptive activities of constituents from Rosmarinus Officinalis. J Pharm Sci. 2015;18:448–59.

26. El Saied Azab A. Nephro-protective effects of curcumin, rosemary, and propolis against gentamicin-induced toxicity in Guinea pigs: morphological and biochemical study. Am J Clin Exp Med. 2014;2:28.

27. Tabassum N, Hamdani M. Plants used to treat skin diseases. Pharmacogn Rev. 2014;8:52–60

28 . Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / О.В. Стефанов. – Київ: МОЗ України. Державний фармакологічний центр. – 2001. – 527 с.

29 . БІОЕТИЧНА ЕКСПЕРТИЗА ДОКЛІНІЧНИХ ТА ІНШИХ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ, ЩО ВИКОНУЮТЬСЯ НА ТВАРИНАХ / Резніков О.Г., Соловйов А.І., Добреля Н.В., Стефанов О.В // Метод. реком. – Київ. – 2006. – 28с.

30. Кисличенко В. С. Визначення впливу кратності екстракції на вихід біологічно активних речовин з трави грициків звичайних / В. С. Кисличенко, В. Ю. Кузнєцова, Ю. С. Колісник // Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення ЛП: матеріали I Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 7–8 листоп. 2014 р. – Х : Видавництво НФаУ, 2014. – С. 86 - 87.

31. Еберле Л.В. Аналіз фенольних сполук в екстракті з плодів горіху чорного (Juglans nigra L). методом високоефективної рідинної хроматографії. / Л.В. Еберле, А.О. Цісак, І.М. Радаєва, А.С. Казанцева // Фармацевтичний журнал. – 2023. – №2.

32. Wang L.-H., Li W.-H. General method for determining of flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector // Хим.-фарм. журн. – 2007. – 41. – № 4. – С. 46–51.

33. Кобернік А.О., Еберле Л.В., Гросу А.А. Хроматографічний аналіз поліфенольних сполук в екстракті Acorus calamus. // Міжнародна науково-практична конференція «Scientific research in xxi century Ottawa», Canada.11 – 12 листопада 2021 р. С. 357 – 359.

34. Porsolt R. D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R. D. Porsolt, M. Le Pinchon, M. Jalfre // Nature. – 1977. – Vol. 266. – P. 730–732.

35. J. Harro. Measurement of exploratory behavior in rodents: In: Methods in Neurosciences (V. 14, Paradigms for the Study of Behavior), Ed. P.M.Conn, Academic Press, San Diego, New York. – 1993. – P. 359-377.

36. Calatayud F. Emotional reactivity in mice, a case of nongenetic heredity / F. Calatayud, C. Belzung // Physiol. Behav. – 2001. – V. 74. – P. 355-362.

37 . Crawley J.N. Exploratory behavior models of anxiety in mice / J.N.Crawley // Neurosci. Biobehav. Revs. – 1985. - N 9. – P. 33-44.

38. J. Harro. Measurement of exploratory behavior in rodents: In: Methods in Neurosciences (V. 14, Paradigms for the Study of Behavior), Ed. P.M.Conn, Academic Press, San Diego, New York. – 1993. – P. 359-377.

39. Crawley J.N. Exploratory behavior models of anxiety in mice / J.N. Crawley // Neurosci. Biobehav. Revs. – 1985. - N 9. – P. 33-44.

40. File S.E. Factors controlling measures of anxiety and responces to novelty in the mouse / S.E. File // Behav. BrainRes. – 2001. – V. 125. – P. 151-157.

41 . Яковенко В.К. НАУКОВО-ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ РОСЛИННОГО ПРЕПАРАТУ ТА ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ В.К. Яковенко, І.А. Вишневський // КЛІНІЧНА ФАРМАЦІЯ. — 2013. — Т. 17, №1. – С.50-56.

42. European Pharmacopoeia. 8 edition. Volume 2. - Strasbourg, 2014. — 2133 с.

43 . Hossain M.A. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown Thymus vulgaris / M.A. Hossain, K.A. AL-Raqmi, Z.H. AL-Mijizy et al. // Asian Pac J Trop Biomed. – 2013. – 9. – P. 705–710.

44. Matteo M. Pusceddu Mediterranean natural extracts improved cognitive behavior in zebrafsh and healthy rats and ameliorated lps-induced cognitive impairment in a sex dependent manner / Matteo M. Pusceddu, Julia Hernandez-Baixauli, Francesc Puiggrós et al. // Behavioral and Brain Functions (2022) 18:5 https://doi.org/10.1186/s12993-022-00190-8.