

Разработка лекарственной формы мафедина в виде лиофилизата для парентерального введения

О. А. Терентьева^{1,2*}, В. А. Вайнштейн¹, В. В. Тихонова¹, А. К. Уэйли¹, М. А. Трофимов^{1,3},
В. А. Приходько^{1,2}, Л. В. Шигарова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтерева» Российской академии наук, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук», 194021, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корп. 3, литер А

*Контактное лицо: Терентьева Оксана Андреевна. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

ORCID: О. А. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>; В. А. Вайнштейн – <https://orcid.org/0000-0003-2304-7605>; В. В. Тихонова – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>;

А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; М. А. Трофимов – <https://orcid.org/0000-0002-7749-0054>; В. А. Приходько – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;

Л. В. Шигарова – <https://orcid.org/0000-0002-9578-6418>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 02.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) являются важнейшей медико-социальной проблемой современной неврологии, поскольку имеют самые высокие показатели заболеваемости, смертности и инвалидизации среди населения. Растущая заболеваемость ЦВЗ в результате старения населения во всем мире требует срочной разработки терапевтических, диагностических и профилактических средств. Однако разработка лекарственных препаратов для лечения заболеваний мозга имеет ограничения за счет наличия гематоэнцефалического барьера, который защищает мозг от попадания большинства молекул из кровотока в центральную нервную систему (ЦНС). В ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете» Минздрава России был синтезирован агонист альфа-2-адренорецепторов мафедина, который может быть использован как нейропротекторное и нейрореабилитационное средство при черепно-мозговой травме, обладает мягким психостимулирующим и анксиогенным действием.

Цель. Разработка лекарственной формы мафедина с целью улучшения его проникающей способности в ЦНС и увеличения стабильности в готовой лекарственной форме.

Материалы и методы. Субстанция мафедина [6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия]; лецитин, спен-60, твин-80, полоксамер 188, маннитол, токоферола ацетат, аскорбиновая кислота, метилхлорид (МХ), диметилсульфоксид, ацетонитрил, кислота трифторуксусная. Тонкую эмульсию мафедина получали обработкой ультразвуком. Готовую лекарственную форму получали лиофильным высушиванием. Остаточные растворители определяли методом газовой хроматографии на газовом хроматографе. Количественное содержание мафедина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Размер частиц эмульсии и дзета-потенциал определяли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS.

Результаты и обсуждение. Получена готовая лекарственная форма мафедина в виде лиофилизата, представляющая собой пористую таблетку светло-желтого цвета, без запаха. Средняя масса сухой таблетки составила $(0,17 \pm 0,01)$ г с содержанием мафедина (26 ± 1) мг. Содержание воды в лиофилизате составило 3,85 %. Количественное содержание МХ в лиофилизате соответствовало требованиям, предъявляемым к содержанию остаточных растворителей. Время восстановления лиофилизата в первичную эмульсию составляло 3–5 секунд. Восстановленная дисперсия имела желтый цвет, не имела запаха, не расслаивалась в течение 2 суток при хранении. pH восстановленной ЛФ составляло 7,34. Средний размер частиц – $164,7 \pm 6,4$ нм, дзета-потенциал – –32 мВ.

Заключение. Разработанная лекарственная форма стабильна по физико-химическим и фармацевтическим показателям и предназначена для экспериментального изучения на моделях в качестве нейропротекторного и нейрореабилитационного средства.

Ключевые слова: мафедина, лиофилизат, лекарственная форма, криопротектор, маннитол, нейропротекция

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. А. Вайнштейн разработали план эксперимента. О. А. Терентьева провела эксперимент, получила готовую лекарственную форму мафедина. В. В. Тихонова определяла остаточные растворители в лиофилизате. А. К. Уэйли определял количественное содержание мафедина. М. А. Трофимов определял размер частиц и потенциал эмульсии. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Тихонова В. В., Уэйли А. К., Трофимов М. А., Приходько В. А., Шигарова Л. В. Разработка лекарственной формы мафедина в виде лиофилизата для парентерального введения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):88–94. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-88-94](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-88-94)

Development of a Mafedine Lyophilizate for Parenteral Use

Oksana A. Terentyeva^{1,2*}, Victor A. Vainshtein¹, Victoria V. Tikhonova¹, Andrei K. Whaley¹,
Mikhail A. Trofimov^{1,3}, Veronika A. Prikhodko^{1,2}, Larisa V. Shigarova¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

² N. P. Bekhtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, 9, Akad. Pavlova str., St. Petersburg, 197376, Russia

³ Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, 8/3A, Khlopina str., St. Petersburg, 194021, Russia

© Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Тихонова В. В., Уэйли А. К., Трофимов М. А., Приходько В. А., Шигарова Л. В., 2021

© Terentyeva O. A., Vainshtein V. A., Tikhonova V. V., Whaley A. K., Trofimov M. A., Prikhodko V. A., Shigarova L. V., 2021

*Corresponding author: Oksana A. Terenteva. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

ORCID: Oksana A. Terenteva – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>; Victor A. Vainshtein – 0000-0003-2304-7605; Victoria V. Tikhonova – <https://orcid.org/0000-0002-1184-6453>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Mikhail A. Trofimov – <https://orcid.org/0000-0002-7749-0054>; Veronika A. Prihodko – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; Larisa V. Shigarova – <https://orcid.org/0000-0002-9578-6418>.

Received: 20.10.2021

Revised: 02.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Cerebrovascular disease (CVD) is the most important medical and social problem of modern neurology because they have the highest rates of morbidity, mortality and disablement in the population. The growing incidence of CVD as a result of an aging population worldwide requires the emergent development of therapeutics, diagnostic and preventive tools. However, the development of drugs for the treatment of brain diseases has limitations due to the presence of the blood-brain barrier, which protects the brain against most molecules from the bloodstream entering the central nervous system. At the St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia the alpha-2 adrenergic agonist mafedine was synthesized, which has mild psychostimulant and anxiogenic effects and which may be used in the treatment of traumatic brain injury as a neuroprotective agent.

Aim. The development of a dosage form of mafedine in order to improve its penetration into the central nervous system.

Materials and methods. Mafedine (pharmaceutical substance) [6-oxo-1-phenyl-2-(phenylamino)-1,6-dihydropyrimidin-4-olate sodium] (St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia); lecithin, span-60, Tween-80, Poloxamer 188, mannitol, vitamin E, ascorbic acid, methylene chloride, dimethyl sulfoxide, acetonitrile, trifluoroacetic acid. The fine emulsion of mafedine was obtained by ultrasound. The dosage form of mafedine was obtained by freeze drying. Residual solvents were determined by gas chromatography. Quantitative analysis of mafedine was performed by high-performance liquid chromatography. Particle size and zeta potential of emulsion were determined on a Zetasizer Nano ZS.

Results and discussion. Lyophilizate of mafedine was obtained and presenting as a light yellow porous, odorless tablet. The average mass of dry tablet was $(0,17 \pm 0,01)$ g with mafedine content is (26 ± 1) mg. The water content in the lyophilizate was 3,85 %. The quantity of methylene chloride in the lyophilizate correspond to the requirements for residual solvent content. The reconstitution time of lyophilizate into a primary emulsion was 3–5 seconds. The reconstituted dispersion was yellow, odorless, and did not break within 2 days during storage. The pH of the reconstituted emulsion was 7,34. The average particle size was $(164,7 \pm 6,4)$ nm, the zeta potential was –32 mV.

Conclusion. The developed dosage form is stable according to its physicochemical and pharmaceutical characteristics and is suitable for experimental study on models as a neuroprotective and neurorehabilitation agent.

Keywords: mafedine, lyophilizate, dosage form, cryoprotectant, mannitol, neuroprotection

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Victor A. Vainshtein designed the experiment plan. Oksana A. Terenteva carried out the experiment and obtained the finished dosage form of mafedine. Victoria V. Tikhonova determined the residual solvents in the lyophilizate. Andrei K. Whaley determined the quantitative analysis of mafedine. Mikhail A. Trofimov determined particle size and emulsion zeta potential. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Tikhonova V. V., Whaley A. K., Trofimov M. A., Prihodko V. A., Shigarova L. V. Development of a mafedine lyophilizate for parenteral use. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4–1):88–94. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-88-94](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-88-94)

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) являются важнейшей медико-социальной проблемой современной неврологии, поскольку имеют самые высокие показатели заболеваемости, смертности и инвалидизации среди населения, особенно во время пандемии COVID-19 [1–3]. Растущая заболеваемость ЦВЗ в результате старения населения во всем мире требует срочной разработки терапевтических, диагностических и профилактических средств [4]. Однако разработка лекарственных препаратов (ЛП) для лечения заболеваний мозга имеет ограничения за счет наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который представляет собой уникальную регулируемую систему капилляров головного мозга, защищающую мозг, предотвращая попадание большинства молекул из

кровотока в центральную нервную систему (ЦНС) [5]. Таким образом, в отличие от других органов человеческого тела, более 98 % малых молекул и почти 100 % больших терапевтических молекул не могут попасть в мозг через систему кровообращения.

Одним из путей доставки лекарственных веществ в ЦНС в обход ГЭБ является их доставка через систему кровообращения в результате кратковременного нарушения ГЭБ, вызванного биологическими, химическими или физическими воздействиями. Однако эти способы доставки лекарств в ЦНС не получили широкого распространения, поскольку они рискованны, дороги или не подходят для лечения менее локализованных заболеваний ЦНС [6, 7].

Одним из способов минимизировать вышеупомянутые побочные эффекты является создание условий и систем доставки лекарственных веществ, улучша-

ющих проницаемость ГЭБ. Одним из первых способов повышения проницаемости ГЭБ для гидрофильных веществ была техника изменения осмотического давления вблизи ГЭБ за счет введения раствора маннитола. Гипертонический раствор маннитола вызывает дегидратацию эпителиальных клеток, что приводит к раскрытию эпителиальных плотных соединений и увеличению проницаемости ГЭБ.

Для нервной ткани характерно высокое содержание липидов. Поэтому введение в состав лекарственной формы (ЛФ) липидов увеличивает сродство лекарственных веществ к нервным тканям.

Наиболее перспективным методом увеличения проницаемости ГЭБ является создание нано- и микроразмерных систем доставки. Доставляя вещества к заданной мишени, носители лекарственных веществ увеличивают специфичность и эффективность проводимой терапии, снижая их токсическое действие.

В ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете» Минздрава России был синтезирован агонист альфа-2-адренорецепторов 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия (мафедин) (патент РФ 2669555), который может быть использован как нейропротекторное и нейрореабилитационное средство при черепно-мозговой травме, обладает мягким психостимулирующим и анксиогенным действием.

В серии пилотных экспериментов на различных видах животных мафедин (в виде основания) оказывал выраженный гипотензивный эффект, обусловленный активацией центральных альфа-2-адренорецепторов. В отличие от другого альфа-2-агониста клонидина, мафедин обладал более длительным, равномерным и продолжительным действием, не вызывал синдрома отмены, а также в значительно меньшей степени угнетал центральную нервную систему [8]. На основании указанных особенностей механизма действия данного соединения было сделано предположение о наличии у него потенциальной нейропротекторной активности. Позднее механизм действия мафедина был уточнен в эксперименте на рыбах *Danio rerio*, и в качестве его основной молекулярной мишени были предложены центральные адренорецепторы альфа-2С-подтипа, воздействием на которые объяснялось его мягкое психостимулирующее действие [9].

На модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс натриевая соль мафедина (2,5 мг/кг) при курсовом введении в течение 1 недели уменьшала объем повреждения головного мозга и выраженность воспалительных процессов в области повреждения, а также улучшала восстановление общей двигательной активности животных и функции передних и задних конечностей [10]. Введение мафедина способствовало нормализации межполушарных связей отделов коры, отдаленных от области повреждения, а также внутримушарных связей здорового полушария на

7-й день после травмы. Помимо этого, препарат оказывал положительное влияние на динамику рефлекторных ответов коры головного мозга при фото- и соматосенсорной стимуляции в острый период ЧМТ [11].

Мафедин подвергается гидролизу и разлагается на свету, поэтому при разработке ЛФ применялась технология лиофилизации, в процессе которой происходит удаление растворителя из замороженного образца. Однако в процессе замораживания и лиофилизации с образцами могут происходить нежелательные физические процессы, поэтому необходимо использовать криопротекторы. В качестве криопротекторов чаще всего используют многоатомные спирты (маннитол, сорбитол) и сахара (трегалоза, сахароза, лактоза) [12]. Маннитол наиболее распространенный криопротектор, применяемый в технологии лиофилизации из-за экономической доступности и способности не кристаллизоваться во время замораживания, сохраняя микроскопическую структуру лиофилизата [13, 14].

Целью данного исследования являлась разработка ЛФ мафедина с целью улучшения его проникающей способности в ЦНС и увеличения стабильности в готовой ЛФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция: мафедин [6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия] (ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России) (рисунок 1); вспомогательные вещества: лецитин Ультралек Р (ADM, США), сорбитана моностеарат (спен-60) RADIAMULS SORB® (OLEON NV, Бельгия), твин-80 (Merck, Германия), полоксамер 188 (Merck, Германия), маннитол 100 SD Pearlitol (Roquette, Франция), токоферола ацетат (Марбиофарм, Россия), аскорбиновая кислота (ЗАО «ФП Мелиген», Россия); реактивы: метилхлорид (МХ) (АО «Экос-1», Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (АО «Экос-1», Россия), ацетонитрил (J.T. Baker, Польша), кислота трифторуксусная (ТФУ) х.ч. (Chemical-Line, Россия).

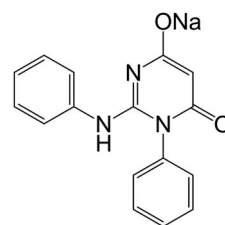


Рисунок 1. Структурная формула мафедина

Figure 1. The structural formula of mafedine

Оборудование: лиофильная сушилка FreeZone 4.5 Labconco, США; ультразвуковая ванна Сапфир – ТТЦ (РМД) ООО «Сапфир», Россия; центрифуга MPW-351;

pH метр Аквилон PH 410; магнитная мешалка IKA C-MAG HS 7; климатическая камера Memmert HPP 110; весы аналитические Сартотосм CE 224-С; анализатор частиц Zetasizer Nano ZS; титратор волюмометрический Easy KFV, Mettler Toledo; хроматограф газовый Shimadzu GC-2010Plus, Япония (детектор ионизационно-пламенный, колонка RTX-1301, 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм); высокоэффективный жидкостной хроматограф Prominence LC-20 Shimadzu, Япония (диодно-матричный детектор SPD-M20A, автосемплер SIL-20A), обращенно-фазовая колонка SUPELCOSIL LC-18 (250*4,6) с зернением 5 мкм; система очистки воды «Arium mini» (Sartorius, Германия).

Стабильность мафедина в растворе в зависимости от pH.

Для оценки влияния pH раствора на стабильность мафедина готовили образцы смешиванием 5 мл фосфатных буферных растворов с значением pH от 3,91 до 9,18 с шагом 0,5 и 0,05 г субстанции мафедина. Все образцы помещались в климатическую камеру при температуре 40 °С и относительной влажности воздуха 35,5 %, где выдерживались в течение 15 суток. Стабильность мафедина в растворах оценивали визуально по изменению окраски.

Приготовление эмульсии мафедина.

Приготовление водного раствора: в стеклянный флакон с ацетатным буферным раствором pH 6,5 (1000 мл воды очищенной, 0,159 г ледяной уксусной кислоты, 20,055 г ацетата натрия тригидрата) или водой для инъекций последовательно вносили маннитол, полоксамер 188, твин 80, аскорбиновую кислоту, мафедин, вакуумировали и растворяли при перемешивании на магнитной мешалке. Полученный раствор фильтровали через фильтр 0,45 мкм под давлением.

Приготовление раствора в МХ: в стеклянном флаконе в МХ растворяли лецитин, спен 60, токоферола ацетат.

Готовый раствор МХ приливали к водному раствору, энергично перемешивая взбалтыванием. Полученную эмульсию озвучивали в ультразвуковой ванне без нагревания в течение 15 минут. После получения стабильной эмульсии, МХ отгоняли в вытяжном шкафу при озвучивании и температуре 70 °С в течение 15 минут до исчезновения специфического запаха МХ.

Исследуемые составы приведены в таблице 1.

Получение лиофилизата.

Эмульсию разливали во флаконы по 1 мл и замораживали в лиофильной сушилке при температуре –50 °С в течение 24 ч, после чего высушивали в глубоком вакууме в течение 2 суток. Полученный лиофилизат укупоривали пробками.

Параметры контроля качества полученного лиофилизата.

1. Однородность массы определяли в соответствии ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм».
2. Остаточную влажность определяли в соответствии ОФС.1.2.3.0002.15 «Определение воды» методом Карла Фишера по методике А.

Таблица 1. Состав опытных эмульсий мафедина

Table 1. Experimental compositions of mafenine emulsions

| Состав Composition | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|---|-----|-----|-----|-----|
| | Состав в % по массе Substance content, w/w | | | | |
| Мафедин Mafenine | 5 | 10 | 15 | 15 | 15 |
| Лецитин Lecithin | 10 | 15 | 20 | 20 | 20 |
| Сухая желчь Dry bile | 3 | 3 | – | – | – |
| Аскорбиновая кислота Ascorbic acid | – | – | – | 1 | – |
| Спен 60 Span-60 | 2 | – | 2 | 2 | 2 |
| Твин-80 Tween-80 | 1 | – | 2 | 2 | 2 |
| Полоксамер 188 Poloxamer 188 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Маннитол Mannitol | 58 | 51 | 40 | 39 | 40 |
| Токоферола ацетат Vitamin E | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Итого Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Объем растворителя на 5 г сухих веществ, мл Solvent volume/5g substances | | | | | |
| МХ Methylene chloride | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Вода для инъекций Water for injections | 30 | 30 | 30 | – | – |
| Ацетатный буфер pH = 6,5 Sodium acetate buffer pH = 6,5 | – | – | – | 30 | 30 |

3. Время диспергирования лиофилизата водой для инъекций.
4. Описание цвета восстановленной ЛФ проводилось визуальным методом.
5. Размер частиц и дзета-потенциал восстановленной ЛФ определяли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS.
6. Определение водородного показателя (pH) восстановленной ЛФ проводили в соответствии ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия».
7. Качественное и количественное содержание МХ проводили в соответствии с ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители». Режим работы термостата колонки: 20 минут от начала анализа поддерживалась температура 40 °С, затем со скоростью 10 °С/мин температура увеличивалась до 240 °С и оставалась такой на протяжении 20 минут. 0,2 г (точная навеска) анализируемой субстанции мафедина помещали в пенициллиновый флакон, растворяли в 5 мл ДМСО, укупоривали

под обкатку. Далее термостатировали в сушильном шкафу при температуре 85 °С 20 минут, отбирали 1 мл газовой фазы и вводили в инжектор хроматографа.

8. Количественное определение мафедина в субстанции проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при длине волны 278 нм. Анализы проводили на обращенно-фазовой колонке при температуре 40 °С со скоростью потока 1 мл/мин. Ввод пробы объемом 10 мкл осуществлялся автосамплером.

В качестве стандарта применяли субстанцию мафедина, полученную путем химического синтеза на базе лаборатории органического синтеза ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета» Минздрава России и очищенную путем растворения, фильтрации через фильтр 0,22 мкм и сублимационной сушки. Для подвижной фазы использовали ацетонитрил класса ВЭЖХ, воду деионизированную, полученную с помощью системы очистки воды, и ТФУ в качестве добавки.

Исследования проводили в градиентном режиме, используя в качестве подвижной фазы «А» деионизированную воду с 0,1 % об. ТФУ и в качестве подвижной фазы «В» ацетонитрил с 0,1 % об. ТФУ (таблица 2).

Таблица 2. Программа градиента хроматографического анализа

Table 2. Gradient chromatographic analysis program

| Время, мин Time, min | % элюента В в подвижной фазе Percentage of eluent B in the mobile phase |
|-------------------------|--|
| 0 | 5% |
| 5,0 | 5% |
| 45,75 | 100% |
| 50,0 | 100% |
| 60,0 | 5% |
| 65,0 | 5% |

Время удерживания в приведенных условиях составило ($21,84 \pm 0,01$) мин (рисунок 2).

Количественное определение мафедина в субстанции проводилось методом абсолютной градуировки по площади пиков. Для построения калибровочной кривой были подготовлены 5 стандартных растворов мафедина следующих концентраций: 0,0014; 0,0033; 0,0047; 0,0061 и 0,0080 мг/мл, на основе анализа которых создавался калибровочный график зависимости концентрации вещества от площади его хроматографического пика. В результате уравнение регрессии имело вид:

$$y = 16040000x - 77079,9; R^2 = 0,9999.$$

С целью определения количественного содержания мафедина в ЛФ определенное количество субстанции мафедина полностью растворяли в смеси EtOH:H₂O (3:1). Полученный раствор ЛФ затем переносился в мерную колбу на 25 мл, где доводили объем до метки исходной смесью EtOH:H₂O (3:1). После чего из мерной колбы отбиралась проба на ВЭЖХ анализ.

Для определения доли мафедина в ЛФ, оставшегося в воде после полного разрушения суспензии, определенное количество ЛФ сперва суспензировалась в 1 мл дистиллированной воды, а затем центрифугировалась при 12 000 об/мин в течении 10 минут. Впоследствии, из полученного супернатанта отбиралась проба на ВЭЖХ анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субстанция мафедина представляет собой белый порошок, без вкуса, запаха и видимых включений, является гигроскопичной и поглощает влагу из окружающей среды при хранении, легко растворима в воде, практически нерастворима в МХ, бутилацетате, петролейном эфире. Содержание воды в субстанции составляло ($5,54 \pm 0,21$) %.

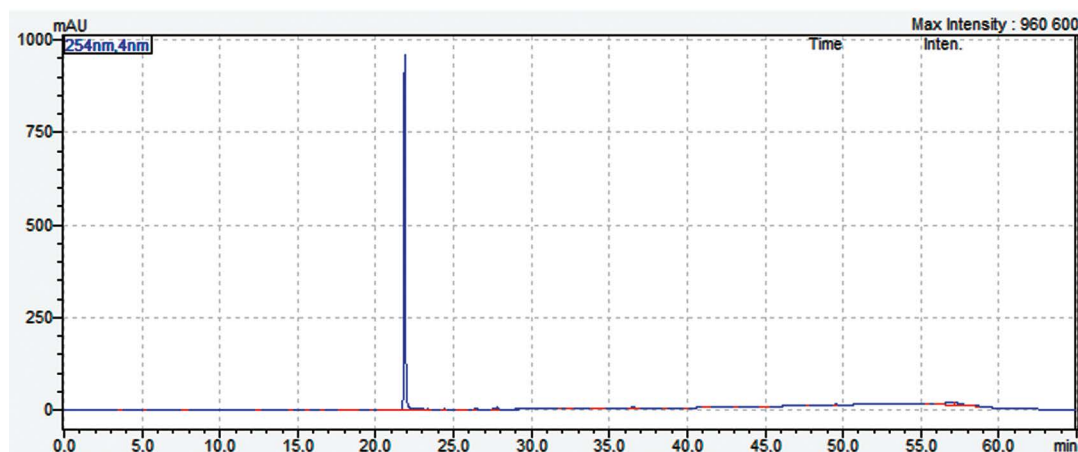


Рисунок 2. Хроматограмма стандартного образца мафедина

Figure 2. The chromatogram of a standard sample of mafedine

Мафедин стабилен в растворах в интервале pH от 6,5 до 7,5. Поэтому эмульсию готовили в ацетатном буферном растворе pH 6,5.

Для предотвращения окисления мафедина добавляли кислоту аскорбиновую, однако наличие ее в составе усиливало появление сиреневой окраски, вероятно, из-за проявления прооксидантных свойств. В конечный состав ЛФ аскорбиновую кислоту не вводили.

Эмульсии, содержащие желчь, расслаивались без какого-либо физического воздействия. Эмульсии состава № 3 и № 5 имели желтый цвет, цвет лецитина, а эмульсия, содержащая в составе аскорбиновую кислоту, была оранжевого цвета.

Стабильность эмульсий проверяли центрифугированием при скорости 1000, 2000 и 4000 об/мин в течение 10 минут. Состав № 5 показал стабильность и не расслаивался, в то время как состав № 3 расслоился при центрифугировании со скоростью 1000 об/мин.

Стабильность эмульсии № 5 проверяли также методом замораживания-оттаивания. Для этого эмульсию замораживали в этаноле при -25°C и оттаивали при комнатной температуре. Проводили 4 таких последовательных цикла. Эмульсия не расслоилась, что говорит о ее высокой стабильности.

Леофильно высушенная эмульсия состава № 5 представляла собой пористую таблетку светло-желтого цвета, без запаха; и была предложена в качестве готовой ЛФ для приготовления суспензии. Средняя масса сухой таблетки составила $(0,17 \pm 0,01)$ г с содержанием мафедина (26 ± 1) мг. Содержание воды в леофилизате составило 3,85 %.

Количественное содержание МХ в леофилизате было 0,013 %, что соответствует требованиям, предъявляемым к содержанию остаточных растворителей 2 класса опасности.

Леофилизат восстанавливали в первичную эмульсию водой для инъекций, время диспергирования составляло 3–5 секунд. Восстановленная дисперсия имела желтый цвет, не имела запаха, не расслаивалась в течение 2 суток при хранении. pH восстановленной ЛФ составляло 7,34, что соответствует pH крови. Средний размер частиц восстановленной ЛФ составил $164,7 \pm 6,4$ нм, дзета-потенциал – -32 мВ, что свидетельствует о том, что эмульсия стабильна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная лекарственная форма стабильна по физико-химическим и фармацевтическим показателям, по своим характеристикам может быть пригодна для парентерального введения, и при наличии способности проникать через ГЭБ обеспечить улучшенную проницаемость мафедина в ЦНС, где он будет оказывать свое терапевтическое действие. Однако для подтверждения фармакологи-

ческих свойств данной лекарственной формы необходимо его экспериментальное изучение на живых системах в качестве нейропротекторного и нейрореабилитационного средства.

ЛИТЕРАТУРА

- Li Y., Li M., Wang M., Zhou Y. et al. Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study. *Stroke and vascular neurology*. 2020;5(3):279–284. DOI: 10.1136/svn-2020-000431.
- Singh A. K., Gillies C. L., Singh R., Singh A., Chudasama Y., Coles B., Seidu S., Zaccardi F., Davies M. J., Khunti K. Prevalence of comorbidities and their association with mortality in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes obesity and metabolism*. 2020;22(10):1915–1924. DOI: 10.1111/dom.14124.
- Pranata R., Huang L., Lim M. A., Wahjoepramono E. J., July J. Impact of cerebrovascular and cardiovascular diseases on mortality and severity of COVID-19 – systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*. 2020;29(8):104949. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104949.
- Shah R., Wilkins E., Nichols M., Kelly P., El-Sadi F., Wright F. L., Townsend N. Epidemiology report: trends in sex-specific cerebrovascular disease mortality in Europe based on WHO mortality data. *European heart journal*. 2019;40:755–764. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy378.
- Mańkiewicz M. A., Szarmach A., Sabisz A., Cudała W. J., Szurowska E., Winkiewski P. J. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16:15. DOI: 10.1186/s12974-019-1403-x.
- Skorobogatova A. I., Terent'eva O. A., Vainstein V. A., Okovityi S. V., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Targeted transport as a promising method of drug delivery to the central nervous system: A Review. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):845–851. DOI: 10.1007/s11094-019-02088-8.
- Новикова А. А., Кезимана П., Станишевский Я. М. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):134–138.
- Анисимова Н. А. Фармакологическая активность мафедина: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 1984. Доступно по: <https://e-catalog.nlb.by/Record/BY-NLB-rr36182120000>. Ссылка активна на 02.12.2021.
- Sysoev Yu. I., Meshalkina D. A., Petrov D. V., Okovityi S. V., Musienko P. E., Kalueff A. V. Pharmacological screening of a new alpha-2 adrenergic receptor agonist, mafedine, in zebrafish. *Neurosci Lett*. 2019;701:234–239. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.03.001.
- Сысоев Ю. И., Дараев С. Г., Кубарская Л. Г., Гайкова О. Н., Узюгбунам Б. Ч., Модисе К., Маквана Т. Л., Оковитый С. В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(1):62–77. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
- Sysoev Yu. I., Prihodko V. A., Chernyakov R. T., Ildiyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sci*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
- Блинская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В., Минаев С. В. Создание леофилизата ГК-2 для приготовления раствора для инъекций с применением полиолов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;2(23):26–31.
- Краснюк И. И., Тарасов В. В., Козлова Ж. М., Степанова О. И., Краснюк (мл.) И. И., Кугач В. В. Выбор криопротектора для леофилизации трикаиона-а. *Вестник фармации*. 2019;1(83):49–53.
- Liao X., Krishnamurthy R., Suryanarayanan R. Influence of processing conditions on the physical state of mannitol-implications in freeze-drying. *Pharmaceutical research*. 2007;24:370–376. DOI: 10.1007/s11095-006-9158-3.

REFERENCES

1. Li Y., Li M., Wang M., Zhou Y. et al. Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study. *Stroke and vascular neurology*. 2020;5(3):279–284. DOI: 10.1136/svn-2020-000431.
2. Singh A. K., Gillies C. L., Singh R., Singh A., Chudasama Y., Coles B., Seidu S., Zaccardi F., Davies M. J., Khunti K. Prevalence of comorbidities and their association with mortality in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes obesity and metabolism*. 2020;22(10):1915–1924. DOI: 10.1111/dom.14124.
3. Pranata R., Huang I., Lim M. A., Wahjoepramono E. J., July J. Impact of cerebrovascular and cardiovascular diseases on mortality and severity of COVID-19 – systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*. 2020;29(8):104949. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104949.
4. Shah R., Wilkins E., Nichols M., Kelly P., El-Sadi F., Wright F. L., Townsend N. Epidemiology report: trends in sex-specific cerebrovascular disease mortality in Europe based on WHO mortality data. *European heart journal*. 2019;40:755–764. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy378.
5. Małkiewicz M. A., Szarmach A., Sabisz A., Cubala W. J., Szurawska E., Winklewski P. J. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16:15. DOI: 10.1186/s12974-019-1403-x.
6. Skorobogatova A. I., Terent'eva O. A., Vainstein V. A., Okovityi S. V., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Targeted transport as a promising method of drug delivery to the central nervous system: A Review. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):845–851. DOI: 10.1007/s11094-019-02088-8.
7. Novikova A. A., Kezimana P., Stanishevskiy Ya. M. Methods of obtaining liposomes, used as drug delivery systems. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;2(2):134–138. (In Russ.)
8. Anisimova H. A. *Pharmacologicheskaya aktivnost' mafedina* [Mafedine pharmacological activity] [dissertation]. St. Petersburg; 1984. Available at: <https://e-catalog.nlb.by/Record/BY-NLB-rr36182120000>. Accessed: 02.12.2021. (In Russ.)
9. Sysoev Yu. I., Meshalkina D. A., Petrov D. V., Okovityi S. V., Musienko P. E., Kalueff A. V. Pharmacological screening of a new alpha-2 adrenergic receptor agonist, mafedine, in zebrafish. *Neurosci Lett*. 2019;701:234–239. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.03.001.
10. Sysoev Yu. I., Dagaev S. G., Kubarskaya L. G., Gajkova O. N., Uzuegbunam B. Ch., Modise K., Makvana T. L., Okovityi S. V. Neuroprotective activity of the alpha-2 adrenergic agonist mafedine on model of traumatic brain injury in rats. *Biomed*. 2019;15(1):62–77. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
11. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Idiyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sci*. 2021;11:981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
12. Blynskay E. V., Tishkov S. V., Alekseyev K. V., Minaev S. V. Creation of liophilisate of GK-2 for preparation of solution for injections with use of polyols. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;2(23):26–31. (In Russ.)
13. Krasnyuk I. I., Tarasov V. V., Kozlova Zh. M., Stepanova O. I., Krasnyuk I. I. (jn), Kuhach V. V. The choice of a cryoprotector for tritacain-α lyophilization. *Vestnik farmacii = Pharmacy Bulletin*. 2019;1(83):49–53.
14. Liao X., Krishnamurthy R., Suryanarayanan R. Influence of processing conditions on the physical state of mannitol-implications in freeze-drying. *Pharmaceutical research*. 2007;24:370–376. DOI: 10.1007/s11095-006-9158-3.