

Разработка таблеток для приема внутрь на основе дигидрокверцетина и оценка их общетоксического действия

С. А. Абдулраззак¹, А. Н. Воробьев¹✉, Н. И. Сеницына¹, И. В. Шарутин¹, О. В. Меньшова¹,
Е. В. Елизарова¹, Ю. В. Иванов¹, А. С. Карамян¹, Р. А. Абрамович², О. Г. Потанина²,
К. М. Саканян³

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

³ ООО «Национальный центр стандартных образцов», 117186, Россия, г. Москва, ул. Нагорная, д. 3а, пом./ком. I/24–34, 36

✉ Контактное лицо: Воробьев Александр Н. E-mail: alek_san2007@mail.ru

ORCID: С. А. Абдулраззак – <http://orcid.org/0000-0001-6169-7575>; А. Н. Воробьев – <http://orcid.org/0000-0002-7182-9911>; Н. И. Сеницына – <http://orcid.org/0000-0001-8564-497X>;
И. В. Шарутин – <http://orcid.org/0000-0002-6005-4962>; О. В. Меньшова – <http://orcid.org/0000-0001-6770-7770>; Е. В. Елизарова – <http://orcid.org/0000-0003-3361-7157>;
Ю. В. Иванов – <http://orcid.org/0000-0003-3787-8717>; А. С. Карамян – <http://orcid.org/0000-0003-2112-673X>; Р. А. Абрамович – <http://orcid.org/0000-0003-1784-881X>;
О. Г. Потанина – <http://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; К. М. Саканян – <http://orcid.org/0000-0002-2028-2776>.

Статья поступила: 17.01.2022

Статья принята в печать: 20.05.2022

Статья опубликована: 25.05.2022

Резюме

Введение. Дигидрокверцетин – флавоноид, обладающий широким спектром фармакологической активности. Установлен его позитивный терапевтический профиль при хронической венозной недостаточности, хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме, для предупреждения инсульта. Его использование приводит к улучшению течения атеросклероза и болезни Альцгеймера. Кроме того, для него характерны радиопротекторное, противовоспалительное, противоаллергическое, репаративное, гепатопротекторное действия. В настоящее время лекарственных препаратов, содержащих дигидрокверцетин, на отечественном фармацевтическом рынке нет. Однако выраженный терапевтический потенциал дигидрокверцетина экономическая и технологическая доступность его субстанции свидетельствуют об актуальности разработки лекарственных форм на основе настоящей молекулы.

Цель. Разработка оптимального состава и технологии таблеток на основе дигидрокверцетина и оценка их физико-химических свойств, общетоксического действия и безопасности.

Материалы и методы. Таблетки получали методом прямого прессования на лабораторном ротационном прессе XS press (Robert Bosch GmbH, Германия). Сыпучесть и насыпную плотность порошков определяли на приборе ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия). Испытания таблеток на прочность и геометрические размеры проводили на тестере SOTAX HT1 (SOTAX AG, Швейцария), истираемость таблеток определяли на тестере SOTAX F2 (SOTAX AG, Швейцария), распадаемость определяли на тестере DISI-A Touch (CHARLES ISCHI AG, Швейцария). Использована субстанция дигидрокверцетина компании ООО «Химия Древесины». В качестве вспомогательных веществ использовали силикатированную целлюлозу, предназначенную для прямого прессования, аэросил 200, натрия крахмала гликолят и магния стеарат. Качественное и количественное содержание дигидрокверцетина в таблетках определяли с использованием ВЭЖХ-УФ (Agilent 1260 Infinity II). Таблетки растворяли в определенном объеме подвижной фазы, а затем фильтровали раствор (0,22 мкм шприцевые фильтры PTFE, VWR, США). Использовали следующие реактивы: ацетонитрил для хроматографии и кислоту фосфорную концентрированную, ч.д.а., ГФ РФ XIV, ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы». Подвижную фазу А получали растворением 40 мл ацетонитрила в воде очищенной. В качестве подвижной фазы Б использовали 1%-й раствор фосфорной кислоты. Хроматографирование пробы объемом 10 мкл в течение 30 мин осуществляли на колонке Luna C18 150 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм при температуре колонки 35 °С, скорости потока – 1 мл/мин. Использовали УФ-детектор, 290 нм. Градиентные условия: время, мин – 0; подвижная фаза А-80; подвижная фаза Б-20. Определение острой, подострой токсичности и местно-раздражающего действия проводили по общепринятой методике согласно ГФ РФ XIV на половозрелых самцах и самках белых мышей и крыс в лаборатории патоморфологии и лекарственной токсикологии ЦКП (НОЦ) РУДН. Исследование проводили на 36 здоровых половозрелых аутбредных мышах с массой тела 18–20 г и на 30 здоровых половозрелых аутбредных крысах массой тела 180–200 г. Изучаемые таблетки вводили животным однократно внутривентрикулярно при помощи атравматического зонда в виде суспензии, приготовленной на 1%-й крахмальной слизи. Препаратом сравнения служила 1%-я крахмальная слизь. Длительность наблюдения за лабораторными животными составляла 14 дней при исследовании острой токсичности и 30 дней при оценке подострой. Ежедневно проводили клинический осмотр животных, оценивали физиологические показатели, фиксировали состояние. Выбор доз осуществлялся согласно уже имеющимся данным о токсичности требованиям, описанным в нормативной документации OECD № 425. Подробный клинический осмотр животного осуществляется в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации. Частота осмотра зависела от выраженности картины интоксикации, но не реже чем на 2-й, 7-й и 14-й день эксперимента. Масса тела регистрировалась непосредственно перед введением на 2-е, 7-е сутки и непосредственно перед эвтаназией. Ежедневно визуально регистрировались отклонения в потреблении животными корма и воды в групповых посадочных клетках. Лишение корма производилось в ночь перед эвтаназией. Животные лишались корма, но не воды. Животных подвергали эвтаназии помещением в эксикационную камеру с эфиром через 14 дней после введения изучаемого препарата и препарата сравнения.

Результаты и обсуждение. Определены технологические характеристики субстанции дигидрокверцетина для реализации технологического процесса изготовления таблеток на его основе. Установлено, что субстанция дигидрокверцетина имеет очень плохую сыпучесть. Для улучшения технологических свойств субстанции использовали 4 вида вспомогательных веществ, позволяющие улучшить технологические свойства действующего вещества. Подобраны условия хроматографирования для определения дигидрокверцетина в таблетках методом ВЭЖХ-УФ. Определена летальная доза при однократном введении, оценены токсические эффекты при многократном

© Абдулраззак С. А., Воробьев А. Н., Сеницына Н. И., Шарутин И. В., Меньшова О. В., Елизарова Е. В., Иванов Ю. В., Карамян А. С., Абрамович Р. А., Потанина О. Г., Саканян К. М., 2022
© Abdulrazzak S. A., Vorobyev A. N., Sinitsyna N. I., Sharutin I. V., Menshova O. V., Elizavova E. V., Ivanov Yu. V., Karamyan A. S., Abramovich R. A., Potanina O. G., Sakanyan K. M., 2022

повторном введении препарата «Дигидрокверцетин» в лекарственной форме таблетки для приема внутрь. На лабораторных животных оценено местно-раздражающее действие препарата при пероральном применении. В ходе проведенных экспериментов установлено отсутствие местно-раздражающего действия при применении таблеток на основе дигидрокверцетина, при определении класса токсичности препарат отнесен к III классу «умеренно токсичных» веществ. На основании результатов субхронического эксперимента можно рассчитать индекс безопасности (ИБ) воспроизведенного препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» при применении в клинике в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Заключение. В результате проведенных исследований разработаны состав и технология таблеток на основе дигидрокверцетина. Установлено, что оптимальная композиция для изготовления таблеток с дигидрокверцетином методом прямого прессования должна содержать наполнитель силикатированную целлюлозу, натрия крахмала гликолят, глидант аэросил и скользящий агент – магния стеарат. В ходе таблетирования подобраны режимы прессования. Оптимальная сила прессования – 5 кН. Глубина наполнения составила – 7 мм. Оптимальное разведение пуансонов оказалось равным 2,5 мм. Скорость ротора была постоянной и составляла 15 об/мин. Скорость работы питателя 25 об/мин. Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-УФ для идентификации и определения количественного содержания дигидрокверцетина в таблетках. Показано, что на хроматограмме таблеток помимо основного пика определяются пики биофлавононов эриодиктиола и кверцетина. Это может способствовать расширению спектра фармакологической активности полученных таблеток. Проведена оценка общетоксического действия и безопасности таблеток дигидрокверцетина. Установлена среднесмертельная доза препарата (LD_{50}), которая при пероральном применении мышам соответствовала 159 мг/кг. Внутривенное применение на протяжении месяца изучаемых таблеток в дозе 100 и 200 мг/кг не вызывает патологических изменений во внутренних органах подопытных животных. При изучении гематологических и биохимических показателей крови, а также массы внутренних органов на различных сроках введения достоверных различий с группой контрольных животных не выявлено.

Ключевые слова: таблетки, дигидрокверцетин, прямое прессование, вспомогательные вещества, ВЭЖХ-УФ, острая токсичность, многократное введение, местно-раздражающее действие

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

Вклад авторов. С. А. Абдулраззак провел эксперимент по разработке состав и технологии. А. Н. Воробьев написал текст статьи. Н. И. Синицына сделала обзор литературы, участвовала в написании текста. И. В. Шарутин, О. В. Меньшова участвовали в разработке методики ВЭЖХ. Е. В. Елизарова провела статистическую обработку данных. А. С. Карамян участвовала в написании текста, проведении доклинических испытаний. Р. А. Абрамович осуществила дизайн исследования. Ю. В. Иванов, К. М. Саканян проводили обработку данных. О. Г. Потанина участвовала в методологии и в дизайне исследования.

Для цитирования: Абдулраззак С. А., Воробьев А. Н., Синицына Н. И., Шарутин И. В., Меньшова О. В., Елизарова Е. В., Иванов Ю. В., Карамян А. С., Абрамович Р. А., Потанина О. Г., Саканян К. М. Разработка таблеток для приема внутрь на основе дигидрокверцетина и оценка их общетоксического действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):126–138. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-126-138>

Development of Dihydroquercetin-based Oral tablets and Evalution of the General Toxic Effect

Sayed A. Abdulrazzak¹, Alexander N. Vorobyev¹✉, Nina I. Sinitsyna¹, Igor V. Sharutin¹, Olga V. Menshova¹, Ekaterina V. Elizarova¹, Yuriy V. Ivanov¹, Arfenya S. Karamyan¹, Rimma A. Abramovich², Olga G. Potanina², Karen M. Sakanyan³

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

² Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

³ LLC "National Center for Reference Materials", 3a/24–34, 36, Nagornaya str., Moscow, 117186, Russia

✉ Corresponding author: Alexander N. Vorobyev. E-mail: alek_san2007@mail.ru

ORCID: Sayed A. Abdulrazzak – <http://orcid.org/0000-0001-6169-7575>; Alexander N. Vorobyev – <http://orcid.org/0000-0002-7182-9911>;

Nina I. Sinitsyna – <http://orcid.org/0000-0001-8564-497X>; Igor V. Sharutin – <http://orcid.org/0000-0002-6005-4962>; Olga V. Menshova – <http://orcid.org/0000-0001-6770-7770>;

Ekaterina V. Elizarova – <http://orcid.org/0000-0003-3361-7157>; Yuriy V. Ivanov – <http://orcid.org/0000-0003-3787-8717>; Arfenya S. Karamyan – <http://orcid.org/0000-0003-2112-673X>;

Rimma A. Abramovich – <http://orcid.org/0000-0003-1784-881X>; Olga G. Potanina – <http://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; Karen M. Sakanyan – <http://orcid.org/0000-0002-2028-2776>.

Received: 17.01.2022

Revised: 20.05.2022

Published: 25.05.2022

Abstract

Introduction. Dihydroquercetin is a flavonoid from the group of flavanones with a wide spectrum of pharmacological activity. Its positive therapeutic profile was established for chronic venous insufficiency, chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma, for the prevention of stroke. Its use leads to an improvement in the course of atherosclerosis and Alzheimer's disease. In addition, it is characterized by radio-protective, antidote, anti-inflammatory, anti-allergic, reparative, hepatoprotective effects. Currently, there are no drugs containing dihydroquercetin on the domestic pharmaceutical market. However, the pronounced therapeutic potential of dihydroquercetin, the economic and technological availability of its substance indicate the relevance of the development of dosage forms based on this molecule.

Aim. Development of the optimal composition and technology of tablets based on dihydroquercetin and assessment of their physico-chemical properties, general toxic effect and safety.

Materials and methods. The tablets were obtained by direct compression on a laboratory rotary XS press (Robert Bosch GmbH, Germany). The flowability and bulk density of the powders were checked by tester ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Germany). Tablets hardness and geometric dimensions were checked by tester SOTAX HT1 (SOTAX AG, Switzerland), the friability of the tablets was checked by tester SOTAX F2 (SOTAX AG, Switzerland), disintegration time was checked by tester DISI-A touch (CHARLES ISCHI AG, Switzerland). Pharmaceutical substance dihydroquercetin of the company "Khimiya Drevesiny" was used as an active pharmaceutical substance. Silicated cellulose for direct compression, aerosil 200, sodium starch glycolate and magnesium stearate were used as excipients. The qualitative and quantitative content of dihydroquercetin in tablets was determined using HPLC-UV (Agilent 1260 Infinity II). The tablets were dissolved in a certain volume of the mobile phase, and then the solution was filtered (0.22 microns PTFE syringe filters, VWR, USA). The following reagents were used: acetonitrile for chromatography and concentrated phosphoric acid, "BDA", Russian Pharmacopoeia XIV, OFS.1.3.0001.15 "Reagents. Indicators". Determination of acute, subacute toxicity and local irritant effect was carried out according to the generally accepted method according to Russian Pharmacopoeia XIV on mature male and female white mice and rats in the laboratory of Pathomorphology and Drug toxicology of the Central Research Laboratory (REC) of the RUDN. The

study was performed on 36 healthy sexually mature outbred mice with a body weight of 18–20 g and on 30 healthy sexually mature outbred rats with a body weight of 180–200 g. The drug is administered to animals once intragastrically with the help of an atraumatic probe in the form of a suspension prepared from crushed DQV tablets on 1 % starch gel. The comparison preparation was 1 % starch gel. The duration of observation of laboratory animals is 14 days for the study of acute toxicity and 30 days for the assessment of subacute. Daily clinical examination of the animals was performed, physiological parameters were evaluated, and the condition was recorded. The choice of doses was carried out according to the already available data on toxicity requirements described in the OESD regulatory documentation No. 425. A detailed clinical examination of the animal is carried out in the holding cage, in the hands and in the open area. Note the manifestation and expression, where acceptable, of signs of intoxication. The frequency of the examination depends on the severity of the intoxication pattern, but not less often than on the 2nd, 7th and 14th day of the experiment. Body weight is recorded immediately, on the 2nd, 7th day, and immediately before euthanasia. Deviations in the consumption of feed and water by the animals in the group planting cages are recorded visually on a daily basis. Food deprivation is performed the night before euthanasia. Animals are deprived of food, but not water. The animals are subjected to euthanasia by being placed in an ether-containing desiccation chamber 14 days after the administration of the study drug and the reference drug.

Results and discussion. The technological characteristics of the substance of dihydroquercetin for the implementation of the technological process of making tablets based on it have been determined. It has been found that the substance dihydroquercetin has very poor flowability. Four types of excipients were used to improve the technological properties of the active substance. In the course of tableting, the pressing modes were selected. The optimal pressing force was 5 kN. The depth of filling was – 7 kN. The optimal distance between of the punches was 2.5 mm. The rotor speed was constant at 15 rpm. The speed of the feeder is 25 rpm. Chromatography conditions were selected for the determination of dihydroquercetin in tablets by HPLC-UV method. The lethal dose for a single administration was determined, and the toxic effects of repeated administration of the drug dihydroquercetin in the dosage form of an oral tablet were evaluated. The local irritant effect of the drug during oral administration was evaluated in laboratory animals. In the course of the conducted experiments, the absence of a local irritant effect was established when using tablets based on dihydroquercetin, when determining the toxicity class, the drug is assigned to the III class of "Moderately toxic" substances.

Conclusion. The formulation and technology of tablets based on dihydroquercetin have been developed. It was found that the optimal composition for the manufacture of tablets with dihydroquercetin by direct compression should contain a filler silicated cellulose, sodium starch glycolate, aerosilglidant and a sliding agent – magnesium stearate. The HPLC-UV technique for identification and determination of the quantitative content of dihydroquercetin in tablets has been developed and validated. It is shown that in addition to the main peak, the peaks of bioflavones of eriodictyol and quercetin are determined on the chromatogram of tablets. This may contribute to the expansion of the spectrum of pharmacological activity of the tablets obtained. On the basis of the developed composition and production technology of tablets based on dihydroquercetin, an assessment of the general toxic effect and safety of the preparation based on bioflavonoids of the Daurian leaflet was carried out. The average lethal dose of the drug (LD_{50}) was established, which, when administered orally to mice, corresponded to 159 mg/kg. During the study, the clinical picture of intoxication was evaluated. With intragastric administration of the drug, at a dose of 159 mg/kg, the death of 50 % of the animals in the experimental group was observed.

Keywords: tablets, dihydroquercetin, direct compression, excipients, HPLC-UV, acute toxicity, repeated administration, local irritant effect

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. Sayed A. Abdulrazzak conducted an experiment on the development of composition and technology. Alexander N. Vorobyev wrote the text of the article. Nina I. Sinitsyna reviewed the literature review, text writing. Igor V. Sharutin, Olga V. Menshova participated in the development of HPLC technique. Ekaterina V. Elizarova performed statistical data processing. Arfenya S. Karamyan participated in writing the text, conducting preclinical trials. Rimma A. Abramovich designed the study. Yuriy V. Ivanov, Karen M. Sakanyan carried out data processing. Olga G. Potanina participated in the methodology and study design.

For citation: Abdulrazzak S. A., Vorobyev A. N., Sinitsyna N. I., Sharutin I. V., Menshova O. V., Elizarova E. V., Ivanov Yu. V., Karamyan A. S., Abramovich R. A., Potanina O. G., Sakanyan K. M. Development of dihydroquercetin-based oral tablets and evaluation of the general toxic effect. *Drug development & registration*. 2022;11(2):126–138. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-126-138>

ВВЕДЕНИЕ

Дигидрокверцетин представляет собой растительный флавоноид, относящийся к группе флавоноидов. Повышенный интерес последних лет к настоящей молекуле вызван широким спектром фармакологических эффектов, что позволяет использовать настоящее соединение в терапии заболеваний различного генеза [4–6]. Являясь активным антиоксидантом, дигидрокверцетин обезвреживает активные формы кислорода. Причем уровень антиоксидантной активности данного соединения сопоставим с таковой каротиноидов и α -токоферола [7]. Накопленный опыт клинического использования дигидрокверцетина ука-

зывает на его эффективность при ряде серьезных патологий, в числе которых: хроническая венозная недостаточность, предупреждение инсульта. Отмечалась также позитивная динамика при болезни Альцгеймера и атеросклероза [8]. У пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмой дигидрокверцетин способствовал более полному восстановлению показателей внешнего дыхания [7, 9].

Дигидрокверцетин действует на определенные противоопухолевые механизмы и обладает противовирусной активностью [8]. Вектор его фармакологических эффектов включает также противовоспа-

лительное, противоаллергическое, репаративное, гепатопротекторное направления [8, 10]. Он способен восстановить тонус кровеносных сосудов и капилляров и нормализовать кровоток, восстановить слизистую желудка [11].

Однако несмотря на отмеченный внушительный терапевтический потенциал дигидрокверцетина, лекарственных препаратов на его основе на отечественном фармацевтическом рынке не зарегистрировано, хотя существует ряд биологически активных добавок. При этом источники получения дигидрокверцетина достаточно велики и легко доступны в экономическом и технологическом плане. Основное сырье для получения субстанции дигидрокверцетина – комлевая часть лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) или лиственницы даурской (*L. dahurica* Turcz.). Запасы данных растений в России обширны, позволяют получать субстанцию дигидрокверцетина для промышленных целей [4, 11]. Анализ субстанции дигидрокверцетина также не вызывает особенных затруднений, он реализуется методом ВЭЖХ [11].

Таким образом, принимая во внимание терапевтический потенциал дигидрокверцетина и доступность получения его субстанции, разработка лекарственных форм на его основе представляется актуальной задачей.

Учитывая вышеизложенное, **целью настоящего исследования** явилась разработка оптимального состава и технологии таблеток с дигидрокверцетином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Таблетки получали методом прямого прессования на лабораторном роторном прессе XS press (Robert Bosch GmbH, Германия). Сыпучесть и насыпную плотность порошков определяли на приборе ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия). Испытания таблеток на прочность и геометрические размеры проводили на тестере SOTAX HT1 (SOTAX AG, Швейцария), истираемость таблеток проверяли на тестере SOTAX F2 (SOTAX AG, Швейцария), распадаемость проверяли на тестере DISI-A Touch (CHARLES ISCHI AG, Швейцария).

Использована субстанция дигидрокверцетина компании ООО «Химия Древесины». В качестве вспомогательных веществ использовали силикатированную целлюлозу, предназначенную для прямого прессования, аэросил 200, натрия крахмала гликолят и магния стеарат.

Качественное и количественное содержание дигидрокверцетина в таблетках определяли с использованием ВЭЖХ-УФ (Agilent 1260 Infinity II). Таблетки растворяли в определенном объеме подвижной фазы, а затем фильтровали раствор (0,22 мкм шприцевые фильтры PTFE, VWR, США). Использовали следующие реактивы: ацетонитрил для хроматографии и кислоту фосфорную концентрированную (ч.д.а., ГФ РФ XIV, ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы») [12].

Определение острой, подострой токсичности и местно-раздражающего действия проводили по общепринятой методике согласно ГФ РФ XIV на половозрелых самцах и самках белых мышей и крыс в лаборатории патоморфологии и лекарственной токсикологии ЦКП (НОЦ) РУДН [12]. Исследование проводили на 36 здоровых половозрелых аутбредных мышках с массой тела 18–20 г. Изучаемые таблетки вводили животным однократно внутрижелудочно при помощи атравматичного зонда в виде суспензии, приготовленной на 1%-м крахмальном геле. Препаратом сравнения служил 1%-й крахмальный гель. Длительность наблюдения за лабораторными животными составляла 14 дней при исследовании острой токсичности и 30 дней при оценке подострой. Ежедневно проводили клинический осмотр животных, оценивали физиологические показатели, фиксировали состояние.

Выбор доз осуществлялся согласно уже имеющимся данным о токсичности требованиям, описанным в нормативной документации OESD № 425 [1, 2]. Подробный клинический осмотр животного осуществляется в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации. Частота осмотра зависела от выраженности картины интоксикации, но не реже чем на 2-й, 7-й и 14-й день эксперимента. Масса тела регистрировалась непосредственно перед введением на 2-е, 7-е сутки и непосредственно перед эвтаназией. Ежедневно визуально регистрировались отклонения в потреблении животными корма и воды в групповых посадочных клетках. Лишение корма производилось в ночь перед эвтаназией. Животные лишались корма, но не воды. Животных подвергали эвтаназии помещением в эксикационную камеру с эфиром через 14 дней после введения изучаемого препарата и препарата сравнения [2, 3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определены технологические характеристики субстанции дигидрокверцетина, представленные в таблице 1.

Значения индекса Карра, приведенные в таблице 1, находятся в пределах 30, что характеризует очень плохую сыпучесть субстанции дигидрокверцетина. Субстанции с такой плохой сыпучестью не пригодны для прямого прессования. Сыпучесть дигидрокверцетина можно улучшить влажной грануляцией растворами пленкообразователей и последующей калибровкой гранулята через сито. Однако это усложняет и удорожает технологический процесс получения таблеток. Поэтому целесообразным явилось использование наполнителей, позволяющих улучшить технологические свойства действующего вещества для обеспечения технологии прямого прессования. В ходе экспериментов по выбору состава и количест-

венного содержания ингредиентов, входящих в состав таблеток, было выбрано оптимальное соотношение веществ, обеспечивающих получение таблеток методом прямого прессования, и качество которых отвечает требованиям ГФ РФ XIV. В таблице 2 приведен состав таблеток дигидрокверцетина.

Таблица 1. Технологические характеристики субстанции дигидрокверцетина

Table 1. Technological characteristics of the substance dihydroquercetin

Наименование показателя Characteristic name	Значение Value		
	№ серии субстанции Substance batch number		
	040319	061219	010220
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл Bulk density before compaction, g/ml	0,376	0,372	0,380
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл Bulk density after seal, g/ml	0,537	0,541	0,545
Сыпучесть (d воронки = 10 мм, 15 мм, 25 мм), г/с Bulk (d Funnels = 10 mm, 15 mm, 25 mm), g/s	Отсутствует Not applicable	Отсутствует Not applicable	Отсутствует Not applicable
Коэффициент Хауснера Hausner coefficient	1,42	1,45	1,43
Индекс Карра Carr index	30	28,8,0	27,8

Таблица 2. Состав таблеток дигидрокверцетина

Table 2. Formulation of dihydroquercetin tablets

Наименование сырья Name of component	Количество в одной таблетке Amount per tablet	
	мг mg	%
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin	20,0	11,11
Силикатинизированная МКЦ (PROSOLV SMCC 90) Siliconized MCC	149,2	82,06
Натрия крахмала гликолят (VIVASTAR P) Sodium starch glycolate	9,0	5,00
Аэросил 200 Aerosil 200	1,5	0,83
Магния стеарат Magnesium stearate	1,8	1,00
Общая масса Total amount	180,0	100,00

Как следует из данных, приведенных в таблице 3, в состав таблеток входят 4 вида вспомогательных веществ. Около 82 % от массы таблетки составил наполнитель – силикатированная микрокристалличе-

ская целлюлоза, так как этот тип МКЦ имеет повышенную сыпучесть. Для улучшения сыпучести дигидрокверцетина и его распределения в смеси использовали аэросил 200. Дезинтегрант – натрия крахмала гликолят вводили в состав в количестве 5 %. В качестве лубриканта использовали магния стеарат (1 %).

В таблице 3 представлены результаты изучения технологических свойств массы для таблетирования.

Инструментально были определены насыпной объем порошковой массы до и после уплотнения, а также скорость ее истечения через воронку диаметром 10 мм. Были рассчитаны коэффициенты и плотность до и после уплотнения.

Таблица 3. Физико-химические и технологические показатели массы для таблетирования

Table 3. Physicochemical and technological parameters of tablet mixes

Наименование показателя Characteristic name	Значение Value
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл Bulk density before compaction, g/ml	0,54 ± 0,03
Насыпная плотность после уплотнения 1250, г/мл Bulk density after sealing 1250, g/ml	0,64 ± 0,01
Коэффициент прессуемости Compressibility coefficient	15,5 ± 0,5
Сыпучесть (d воронки = 10 мм), с/100 г Flowability (d funnels = 10 mm), s/100 g	19,0 ± 0,2
Коэффициент Хауснера Hausner ratio	1,18 ± 0,5
Индекс Карра Carr index	15,6 ± 0,05
Влага, % Moisture content, %	6,88 ± 0,01

Как видно из данных таблицы 3, значения коэффициента прессуемости соответствуют значениям индекса Карра. Таблеточная масса обладала приемлемой сыпучестью, так как значение индекса Карра было незначительно, более 15. Силы когезии полученной таблеточной массы были не велики.

Полученные смеси таблетировали, используя пресс-инструмент 8 мм. В таблице 4 представлены результаты контроля качества полученных таблеток.

В ходе таблетирования подбирали режимы прессования. Сила прессования менялась в диапазоне от 10 до 2 кН, оптимальное составило – 5 кН. В диапазоне от 10 до 6 мм подбирали глубину наполнения, оптимум был достигнут при значении 7 мм. Разведение пуансонов изменяли в интервале от 1,2 до 3,0 мм. Качественные таблетки получались при разведении пуансонов, равным 2,5. Скорость ротора составляла 15 об/мин. Скорость работы питателя изменяли от 30 до 20 об/мин.

Таблица 4. Физико-химические и технологические показатели таблеток дигидрокверцетина

Table 4. Physicochemical and technological parameters of dihydroquercetin tablets

Наименование показателя Characteristic name	Значение Value
Описание: таблетки – гладкие, желтого цвета со светло-коричневыми вкраплениями, двояковыпуклые, круглые, сладковатого вкуса, со слабым специфическим древесным запахом Description: Tablets – smooth, yellow with light brown inclusions, double puff, round, sweet taste, with a weak specific wood smell	Соответствует Description matches
Средняя масса и однородность по массе, 180 мг ± 7,5 % Average mass and uniformity by mass, 180 mg ± 7.5 %	180,9 мг; (–1,7 %; +4,0 %)
Диаметр, мм Diameter, mm	8,00 ± 0,43
Высота, мм Height, mm	3,8 ± 0,35
Прочность, N Hardness, N	120 ± 6
Истираемость, % Friability, %	99,8 ± 0,5
Распадаемость, мин Disintegration, min	5 ± 1
Влага, % Moisture content, %	5,8 ± 0,20
Содержание дигидрокверцетина, мг, не менее 18 и не более 22 Dihydroquercetin content, mg, not less than 18 and not more than 22	20 ± 1
Однородность дозирования, AV ≤ 15 Content uniformity, AV ≤ 15	2,9 (весовым методом) Weight method
Растворение, не менее 75 % за 45 мин Solubility, at least 75 % for 45 min	97,2 ± 4,3
Родственные примеси: • дигидрокемперол ≤ 7,5 %; • единичная примесь ≤ 2,0 %; • сумма примесей ≤ 10,0 % Related impurities: • dihydrocamperol 7.5 %; • single impurity 2.0 %; • sum of impurities 10.0 %	дигидрокемперол – 4,5 %; единичная примесь – 1,1 %; сумма примесей – 5,6 %; dihydrocamperol – 4.5 %; single impurity – 1.1 %; total impurities – 5.6 %

Производство таблеток осуществлялось в соответствии с требованиями GMP в помещениях класса чистоты D по стандартной технологической схеме. Процесс производства таблеток дигидрокверцетина включает следующие стандартные процедуры:

- ✓ Взвешивание сырья.
- ✓ Требуемое количество дигидрокверцетина смешивают с аэросилом 200 для уменьшения сил когезии между молекулами субстанции с целью улучшения технологических характеристик таблеточной смеси.
- ✓ Смесь просеивают через сито 500 мкм для более равномерного смешения с целью улучшения сыпучести и однородности дозирования и загружают в

смеситель типа «Пьяная бочка», затем добавляют натрия крахмала гликолят, перемешивают пять минут. Затем в смеситель добавляют половину количества силикатинизированной МКЦ и смешивают в течение 10 минут, потом добавляют оставшуюся силикатинизированную МКЦ и перемешивают смесь в течение 40 минут.

- ✓ Магния стеарат перед добавлением в смесь для таблетирования просеивают через сито 500 мкм для более равномерного опудривания смеси для таблетирования.
- ✓ В смеситель добавляют предварительно просеянный магния стеарат и перемешивают еще 5 минут в смесителе типа «Пьяная бочка».
- ✓ Отбирают из полученной таблеточной массы пробу и отдают на анализ содержания дигидрокверцетина и однородность дозирования.
- ✓ Смесь таблетуют на таблеточном прессе. Каждые 10 минут делают межоперационный контроль и проверяют качество таблеток.

В результате проведенных исследований разработаны состав и технология таблеток на основе дигидрокверцетина.

Технологическая схема производства таблеток с дигидрокверцетином представлена на рисунке 1.

Установлено, что оптимальная композиция для изготовления таблеток с дигидрокверцетином методом прямого прессования должна содержать наполнитель – силикатированную целлюлозу, дезинтегрант – натрия крахмала гликолят, глйдант – аэросил и скользящий агент – магния стеарат. В ходе таблетирования подобран режим прессования.

Методом ВЭЖХ-УФ по разработанной и валидированной методике определяли наличие и количественное содержание дигидрокверцетина в таблетках.

На рисунке 2 представлены хроматограммы СО, на рисунке 3 изображена хроматограмма таблеток дигидрокверцетина.

В ходе исследований было показано, что на хроматограмме таблеток помимо основного пика определяются пики биофлавононов эриодиктиола и кверцетина. Для обнаруженных родственных примесей разработана и валидирована методика, установлены нормы. Найденные вещества, являясь флавоноидами, вносят вклад в суммарную фармакологическую активность полученных таблеток.

Разработанные таблетки были исследованы на безопасность. Установленные зависимые от доз летальные эффекты исследуемого препарата представлены в таблице 5.

Как следует из данных таблицы 5, для лабораторных мышей ЛД₅₀ исследуемых таблеток дигидрокверцетина составила 159 мг на кг массы животного, что позволило отнести препарат к III классу «Умеренно токсично» по «Классификации степеней токсичности по Hodge и Sterner» [3].

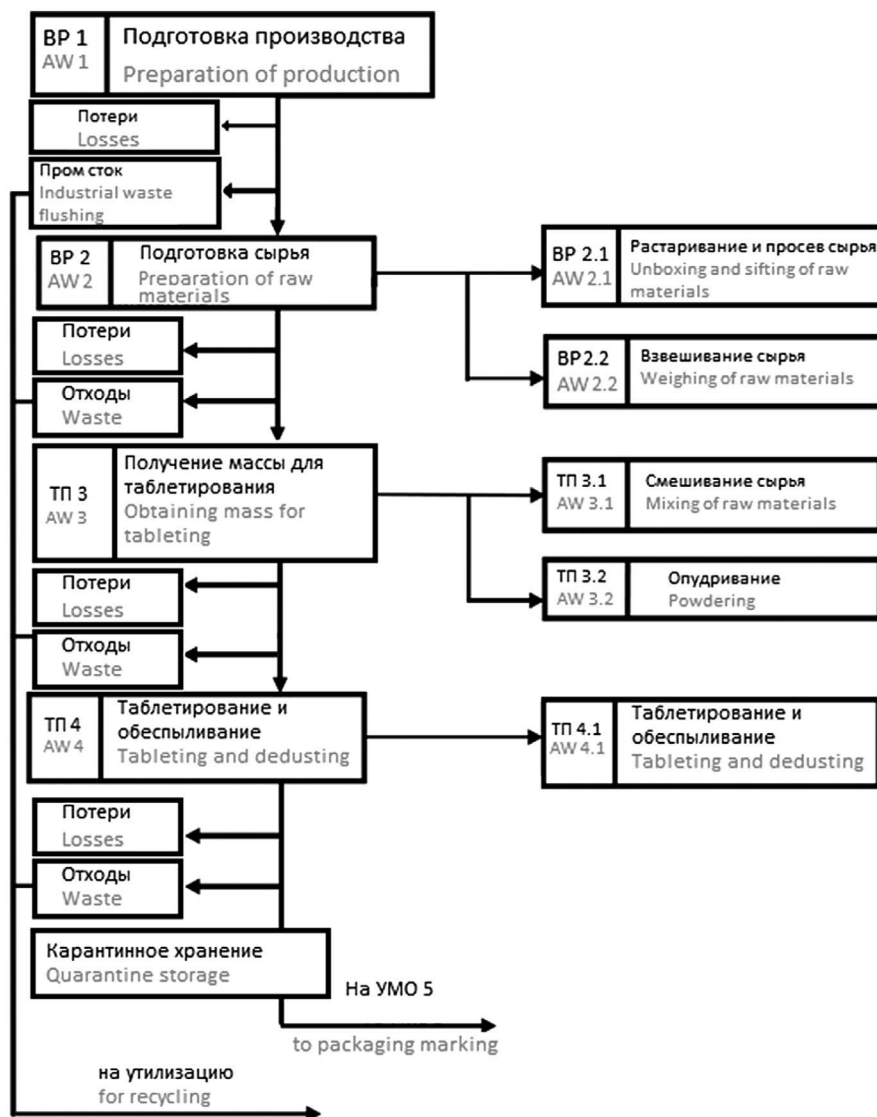


Рисунок 1. Технологическая схема производства таблеток с диgidрокверцетином

Figure 1. Technological process map of tablets with dihydroquercetin

Таблица 5. Токсичность изучаемого препарата при однократном в/ж введении мышам-самцам (пало/всего)

Table 5. Toxicity of the studied drug with intragastric administration to male mice (palo/total)

Введенная доза, мг/кг Administered dose, mg/kg	50	100	159	200	250
Таблетки дигидрокверцетина 20 мг Dihydroquercetin tablets	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6
Контроль Control	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6

При проведении исследования оценивалась клиническая картина интоксикации. В дозе 100 мг/кг у мышей токсических проявлений зафиксировано не было. При в/ж введении препарата в дозе 159 мг/кг наблюдалась гибель 50 % животных в подопытной группе. При вскрытии животных визуально было от-

мечено поражение желудочно-кишечного тракта (эрозии, геморрагия), избыточное скопление газов, истончение стенок желудка и кишечника; застойные явления в легких и печени, гиперемия легких и печени.

При анализе изменения массы тела белых мышей при однократном внутрижелудочном введении исследуемых таблеток диgidрокверцетина в различных группах достоверно значимых изменений не выявлено.

Результаты взвешивания выживших животных приведены в таблице 6.

После окончания эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии. Морфометрическую оценку параметров органов животных осуществляли с помощью весов Unigram ET-T (ООО «ПетВес», Россия), с последующим вычислением массовых коэффициентов. Результаты вычисления массовых коэффициентов приведены в таблице 7.

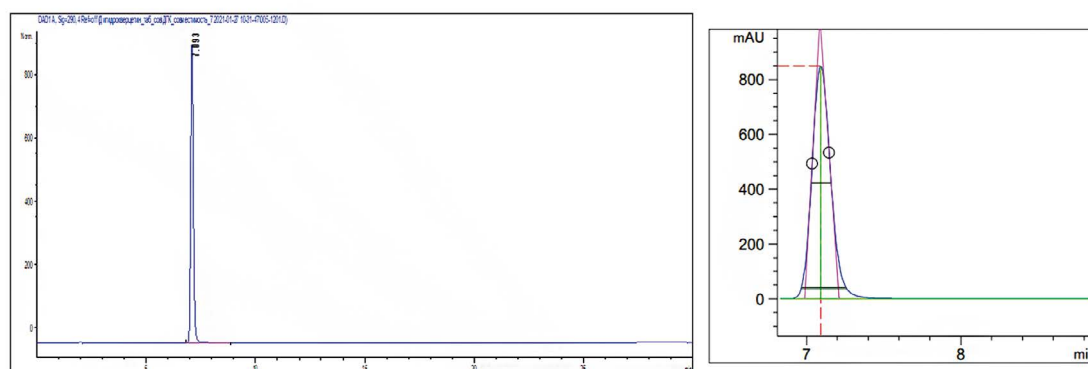
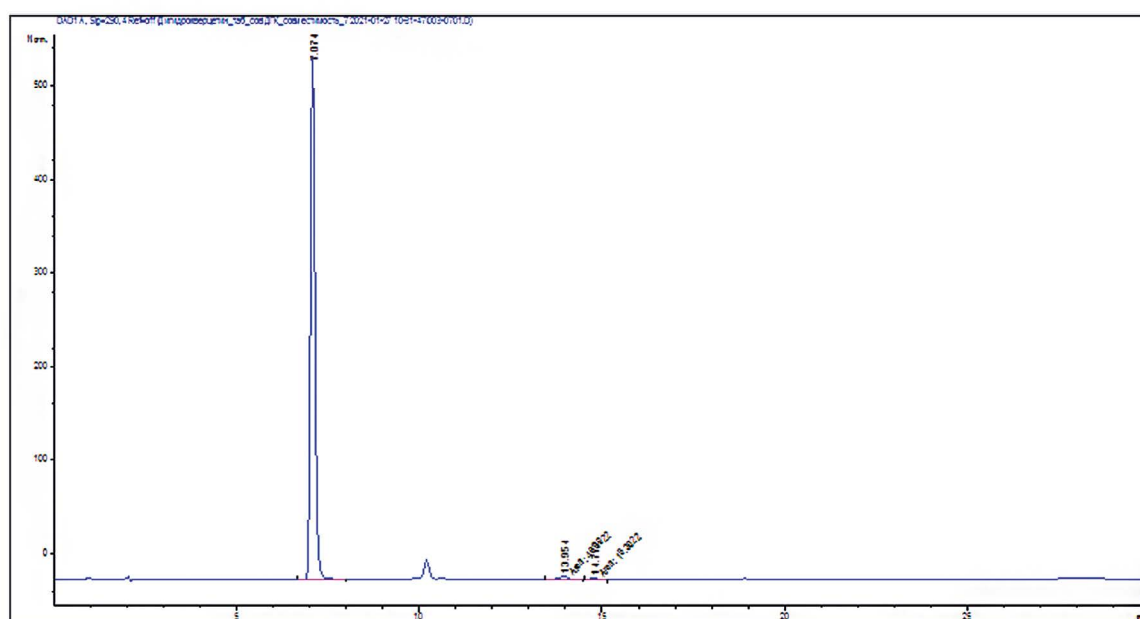
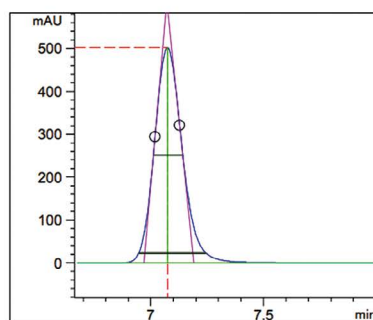


Рисунок 2. Хроматограмма стандартного образца дигидрокверцетина

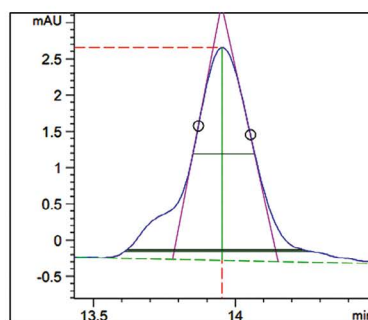
Figure 2. Chromatogram of dihydroquercetin Reference standard



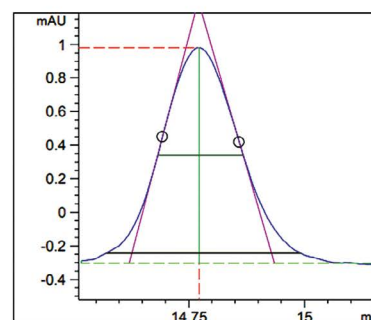
A
A



Б
B



В
C



Г
D

Рисунок 3. Хроматограмма таблеток дигидрокверцетина

а – общий вид; б – дигидрокверцетин; в – эридиктиол; г – кверцетин

Figure 3. Chromatogram of dihydroquercetin tablets

а – general view; б – dihydroquercetin; в – eridictiol; г – quercetin

Таблица 6. Влияние однократного введения изучаемого препарата на массу тела белых мышей при внутрижелудочном введении (г), ($n = 6$)

Table 6. The effect of a single administration of the studied drug on the body weight of white mice with intragastric administration (g), ($n = 6$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Время наблюдения Observation time			
		Фон Background	2-й день 2nd day	7-й день 7th day	14-й день 14th day
Таблетки дигидрохверцетина 20 мг Dihydroquercetin tablets 20 mg	50	18,0* $\pm$ 1,2	19,1* $\pm$ 0,2	23,5* $\pm$ 0,2	29,2* $\pm$ 0,5
	100	18,6* $\pm$ 1,4	19,0* $\pm$ 0,1	23,2* $\pm$ 0,4	29,3* $\pm$ 0,6
	159	19,1* $\pm$ 1,3	19,2* $\pm$ 0,5	–	–
	200	18,0* $\pm$ 0,4	–	–	–
	250	18,5* $\pm$ 0,3	–	–	–
Контроль Control	Плацебо Placebo	18,8* $\pm$ 0,4	19,6* $\pm$ 0,5	23,5* $\pm$ 0,4	29,8* $\pm$ 0,5

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 6$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 6$, the p values when calculating the D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 7. Массовые коэффициенты (МК) органов белых мышей при однократном введении изучаемого препарата (%), ($n = 6$)

Table 7. Mass coefficients (MC) of organs of white mice with a single administration of the studied drug (%), ($n = 6$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Органы $M \pm m$ Organs $M \pm m$							
		Сердце Heart	Легкие с трахеей Lungs with trachea	Тимус Thymus	Печень Liver	Селезенка Spleen	Почка Kid	Надпочечник (левый) Adrenal gland (left)	Семенники Testicles
Дигидрохверцетин Dihydroquercetin	50	0,63* $\pm$ 0,03	0,81* $\pm$ 0,02	0,21* $\pm$ 0,03	5,57* $\pm$ 0,09	1,80* $\pm$ 0,08	1,78* $\pm$ 0,09	0,02* $\pm$ 0,009	1,69* $\pm$ 0,09
	100	0,65* $\pm$ 0,06	0,69* $\pm$ 0,03	0,19* $\pm$ 0,01	5,17* $\pm$ 0,22	1,76* $\pm$ 0,05	1,80* $\pm$ 0,05	0,02* $\pm$ 0,001	1,79* $\pm$ 0,07
	159	0,71* $\pm$ 0,06	0,68* $\pm$ 0,03	0,20* $\pm$ 0,01	5,11* $\pm$ 0,22	1,65* $\pm$ 0,05	1,62* $\pm$ 0,05	0,01* $\pm$ 0,001	1,65* $\pm$ 0,07
	200	0,69* $\pm$ 0,06	0,70* $\pm$ 0,03	0,21* $\pm$ 0,01	4,91* $\pm$ 0,22	1,71* $\pm$ 0,05	1,60* $\pm$ 0,05	0,03* $\pm$ 0,001	1,59* $\pm$ 0,07
	250	0,72* $\pm$ 0,06	0,70* $\pm$ 0,03	0,19* $\pm$ 0,01	4,87* $\pm$ 0,22	1,41* $\pm$ 0,05	1,50* $\pm$ 0,05	0,02* $\pm$ 0,001	1,72* $\pm$ 0,07
Контроль Control	Плацебо Placebo	0,73* $\pm$ 0,04	1,06* $\pm$ 0,05	0,19* $\pm$ 0,01	5,22* $\pm$ 0,19	1,50* $\pm$ 0,07	1,62* $\pm$ 0,06	0,01* $\pm$ 0,001	1,15* $\pm$ 0,1

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 6$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 6$, the p values when calculating the D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Массовые коэффициенты органов белых мышей при однократном внутрижелудочном введении исследуемого препарата при дозе 100 мг/кг относительно контрольной группы показывают уменьшение массовых коэффициентов легких на 18% ($D_n = 0.152$, $p > 0,05$ при $n = 6$ и $\alpha = 5\%$) и увеличение массовых коэффициентов почек на 23% ($D_n = 0.152$, $p > 0,05$ при $n = 6$ и $\alpha = 5\%$);

Данные изменения массовых коэффициентов органов белых мышей были обусловлены токсическим действием высоких доз изучаемого препарата.

Внутрижелудочное применение препарата «Дигидрохверцетин, таблетки 20 мг» в течение 30 дней в дозе 100 и 200 мг/кг не вызывало у крыс изменений основных интегральных показателей.

Животные были активны, имели опрятный внешний вид. Потребление сухого корма и воды крыса-

ми I–III группы соответствовало контрольным показателям. В течение субхронического эксперимента ни в одной из экспериментальных групп не отмечено гибели животных.

В течение эксперимента наблюдали за испытываемыми животными, еженедельно регистрировали изменения массы тела. Прирост массы тела на сроке 2 недели у подопытных животных, получавших препарат «Дигидрохверцетин», не отличался от прироста массы тела контрольных животных.

Еженедельно проводили подсчет суточного потребления корма и воды. Количество потребления корма и воды крысами, получавшими вышеуказанные препараты, статистически не отличалось от показателей животных в контрольных группах.

В таблице 8–11 представлены данные по влиянию изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» на основные биохимические показатели и на активность ферментов крови крыс. Исследование проводилось на биохимическом автоматическом анализаторе ILAB 650 (Instrumentation Laboratory, США).

Было отмечено достоверное повышение АЛТ на 18 % ($D_n = 0.152$, $p > 0,05$ при $n = 5$ и $\alpha = 5\%$) в группе подопытных животных, получавших препарат «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» в дозе 200 мг/кг, что согласуется с установленными эффектами и токсическим воздействием высоких доз.

Достоверно значимых изменений в показателях крови не выявлено, незначительные колебания не являются критичными, не выходят за пределы физиологической нормы. Как видно из представленных выше данных, препараты как изучаемый, так и препарат сравнения в испытанной дозе не оказывают резко негативного влияния на основные биохимические показатели крови и активность ферментов плазмы крови.

На основании результатов субхронического эксперимента можно рассчитать индекс безопасности (ИБ) исследуемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» при применении в клинике в соответствии с прилагаемой инструкцией (крысы – доза 200 мг/кг; длительность введения – 30 дней; суточная доза для человека – 3,5 мг/кг; коэффициент пересчета с крысы на человека –6,5).

Расчетный безопасный курс (РБК) препарата в днях равен:

$$\text{РБК} = \frac{200 \text{ мг/кг} \cdot 30}{3,5 \text{ мг/кг} \cdot 6,5} = 269.$$

Индекс безопасности (ИБ), представляющий собой соотношение расчетного курса и курса применения препарата в клинике в соответствии с инструкцией, составляет:

$$\text{ИБ} = \frac{269}{10} = 27.$$

Достоверно значимых изменений в показателях массы внутренних органов не выявлено, незначительные колебания не выходят за пределы нормы.

Таким образом, внутрижелудочное применение на протяжении месяца изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» в дозе 100 и 200 мг/кг не вызывает патологических изменений во внутренних органах подопытных животных. При изучении гематологических и биохимических показателей крови, а также массы внутренних органов на различных сроках введения «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» достоверных различий с группой контрольных животных не выявлено.

Таблица 8. Влияние изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самцов, (фон) ($M \pm m$)

Table 8. Effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" on the main biochemical parameters of the peripheral blood of male rats, (background) ($M \pm m$)

Фон, ммоль/л Background, mmol/l		Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase
		ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	M ± m	4,96* ± 0,20	60,5* ± 1,9	2,04* ± 0,11	160,7* ± 2,2	60,1* ± 2,9	38,6* ± 1,7	4,62* ± 0,12	57,3* ± 2,3	193,6* ± 3,5	66,3* ± 3,4	207,4* ± 5,9
200 мг/кг 200 mg/kg	M ± m	5,05* ± 0,22	58,5* ± 3,1	2,05* ± 0,10	165,1* ± 3,1	61,5* ± 2,1	39,2* ± 2,3	4,95* ± 0,13	54,3* ± 2,4	192* ± 4,4	62,7* ± 2,8	205,6* ± 5,1
Контроль Control												
M ± m		5* ± 0,15	60* ± 2,1	1,72* ± 0,10	165,8* ± 3,76	59,2* ± 2,4	44,2* ± 2,1	4,83* ± 0,19	58,2* ± 2,0	192,8* ± 5,4	66,9* ± 2,2	188,6* ± 3,8

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At the level of significance $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the values of p in the calculation of indicators D_n , X^2 exceeded.

* At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating the D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 9. Влияние изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг» на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самцов, (через 30 дней) ($M \pm m$)

Table 9. The effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" on the main biochemical parameters of the peripheral blood of male rats, (after 30 days) ($M \pm m$)

30 дней, ммоль/л 30 days, mmol/l		Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase
		ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	M ± m	5,18* ± 0,24	64,5* ± 2,3	1,88* ± 0,12	164,9* ± 3,4	63,3* ± 3,5	40,5* ± 2,4	4,6* ± 0,16	54,9* ± 2,7	187,4* ± 5,1	62,8* ± 2,0	197,1* ± 3,9
200 мг/кг 200 mg/kg	M ± m	5,12* ± 0,24	62,4* ± 2,7	1,96* ± 0,12	163,3* ± 2,8	62,9* ± 2,0	37,4* ± 2,3	4,54* ± 0,11	59,1* ± 1,6	188,5* ± 5,1	64* ± 2,2	201,8* ± 3,1
Контроль Control												
M ± m		4,98* ± 0,17	58,2* ± 1,3	1,79* ± 0,10	168,3* ± 3,50	61,2* ± 1,5	41,7* ± 2,0	4,9* ± 0,09	58,9* ± 2,1	184,2* ± 3,3	69,9* ± 2,9	189,7* ± 4,9

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 10. Влияние изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки, 20 мг» на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самок, (фон) ($M \pm m$)

Table 10. Effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" on the main biochemical parameters of the peripheral blood of female rats, (background) ($M \pm m$)

Фон, ммоль/л Background, mmol/l	Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase	
	мкмоль/л μmol/l	мкмоль/л μmol/l	мкмоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	M ± m	4,71* ± 0,16	60,5* ± 1,2	1,88* ± 0,14	165,5* ± 3,1	60,3* ± 2,3	39,6* ± 2,1	4,55* ± 0,11	56,7* ± 3,1	194,8* ± 4,6	65,5* ± 2,6	190,8* ± 6,1
200 мг/кг 200 mg/kg	M ± m	4,9* ± 0,13	58,7* ± 2,1	1,91* ± 0,09	163,4* ± 2,3	63,3* ± 2,1	38,5* ± 1,7	4,66* ± 0,14	61,7* ± 1,6	182,1* ± 4,8	68,9* ± 2,1	189,9* ± 4,8
Контроль Control												
M ± m	4,92* ± 0,16	60,3* ± 1,8	1,82* ± 0,08	163,7* ± 2,60	65,3* ± 1,7	59,6* ± 1,7	4,66* ± 0,13	58,7* ± 2,1	189,5* ± 4,4	66,4* ± 3,2	186,3* ± 4,4	

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

Таблица 11. Влияние изучаемого препарата «Дигидрокверцетин, таблетки 20 мг», покрытые пленочной оболочкой, на основные биохимические показатели периферической крови крыс-самок, (через 30 дней) ($M \pm m$)

Table 11. Effect of the studied drug "Dihydroquercetin, tablets, 20 mg" film-coated on the main biochemical parameters of the peripheral blood of female rats, (after 30 days) ($M \pm m$)

30 дней, ммоль/л 30 days, mmol/l		Мочевина Urea	Креатинин Creatinine	Общий билирубин Total bilirubin	АСТ Aspartate aminotransferase	АЛТ Alanine aminotransferase	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	Глюкоза Glucose	Общий белок Total protein	КФК Creatine kinase	ГГТ Gamma-glutamyl transpeptidase	Амилаза Amylase
		ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	ммоль/л μmol/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	ммоль/л mmol/l	г/л g/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l	Ед/л unit/l
N		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Дигидрокверцетин Dihydroquercetin												
100 мг/кг 100 mg/kg	$M \pm m$	5,02* ± 0,16	59* ± 2,1	1,85* ± 0,12	169,5* ± 3,3	65,4* ± 1,9	40,4* ± 2,1	4,71* ± 0,11	55,6* ± 1,6	187,3* ± 6,3	67,6* ± 2,9	195* ± 5,5
200 мг/кг 200 mg/kg	$M \pm m$	4,9* ± 0,17	60,1* ± 1,6	1,82* ± 0,12	167* ± 2,5	63,8* ± 2,6	41,9* ± 2,4	4,72* ± 0,13	57,8* ± 2,7	191,1* ± 4,0	69,4* ± 3,5	194,7* ± 2,8
Контроль Control												
$M \pm m$		4,95* ± 0,22	60* ± 1,7	1,61* ± 0,11	166,2* ± 2,49	10* ± 2,6	57,4* ± 1,6	4,93* ± 0,17	58,3* ± 2,2	183,9* ± 6,2	69,2* ± 3,4	194* ± 4,1

Примечание. * При уровне значимости $\alpha = 5\%$ и $n = 5$, значения p при расчете показателей D_n , X^2 превышали 0,05 при сравнении изучаемых групп между собой.

Note. * At a significance level of $\alpha = 5\%$ and $n = 5$, the p values when calculating D_n , X^2 indicators exceeded 0.05 when comparing the studied groups with each other.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработаны состав и технология таблеток на основе дигидрокверцетина. Установлено, что оптимальная композиция для изготовления таблеток с дигидрокверцетином методом прямого прессования должна содержать наполнитель силикатированную целлюлозу, натрия крахмала гликолят, глидант аэросил и скользящий агент – магния стеарат. В ходе таблетирования подобраны режимы прессования. Оптимальной силой прессования явилась 5N. Глубина наполнения составила – 7. Оптимальное разведение пуансонов оказалось равным 2,5. Скорость ротора была постоянной и составляла 15 об/мин. Скорость работы питателя 25 об/мин.

Разработана и валидирована методика ВЭЖХ-УФ для идентификации и определения количественного содержания дигидрокверцетина в таблетках. Показано, что на хроматограмме таблеток помимо основного пика определяются пики биофлавононов эриодиктиола и кверцетина. Для обнаруженных родственных примесей установлены нормы. Найденные вещества, являясь флавоноидами, вносят вклад в суммарную фармакологическую активность полученных таблеток.

Проведена оценка общетоксического действия и безопасности таблеток дигидрокверцетина. Установлена среднесмертельная доза препарата (LD_{50}), которая при пероральном применении мышам соответствовала 159 мг/кг. При проведении исследования оценивалась клиническая картина интоксикации. При в/ж введении препарата в дозе 159 мг/кг наблюдалась гибель 50 % животных в подопытной группе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прозоровский В. Б., Прозоровская М. П., Демченко В. М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. *Фармакология и токсикология*. 1978;41(4):497–502.
2. Christudas S., Baojun X. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry*. 2019; 166:112066. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112066.
3. Трахтенберг И. М. Проблемы нормы в токсикологии. М.: Медицина; 1991. 203 с.
4. Бабкин В. А., Остроухова Л. А., Малков Ю. А., Иванова С. З., Онучина Н. А., Бабкин Д. В. Биологически активные вещества древесных лиственных. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2001;3:363–367.
5. Chen X., Gu N., Xue C., Li B. R. Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Molecular medicine reports*. 2018;17(2):3239–3245. DOI: 10.3892/mmr.2017.8271.
6. Yang C. L., Lin Y. S., Liu K. F., Peng W. H., Hsu C. M. Hepatoprotective mechanisms of taxifolin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Nutrients*. 2019;11:2655. DOI: 10.3390/nu1112655.

7. Yoon K. D., Lee J. Y., Kim T. Y., Kang H., Ha K. S., Ham T. H., Ryu S. N., Kang M. Y., Kim Y. H., Kwon Y. I. In vitro and in vivo anti-hyperglycemic activities of taxifolin and its derivatives isolated from pigmented rice (*Oryza sativa* L. cv. Superhongmi). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020;68(3):742–750. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b04962.
8. Topal F., Nar M., Gocer H., Kalin P., Kocyigit U. M., Gülçin İ., Alwasel S. H. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(4):674–683. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057723.
9. Zhang Y., Yu J., Dong X. D., Ji H. Y. Research on characteristics, antioxidant and antitumor activities of dihydroquercetin and its complexes. *Molecules*. 2017;23(1):20. DOI: 10.3390/molecules23010020.
10. Гуськова Т. А. Токсикология лекарственных средств. М.: Русский врач; 2003. 133 с.
11. Wang W., Ma B.-L., Xu C.-G., Zhou X.-J. Dihydroquercetin protects against renal fibrosis by activating the Nrf2 pathway. *Phytomedicine*. 2020;69:1531854. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153185.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 3. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018. 5004 с.
4. Babkin V. A., Ostroukhova L. A., Malkov Yu. A., Ivanova S. Z., Onuchina N. A., Babkin D. V. Biologically active substances of larch wood. *Chemistry for sustainable development*. 2001;3:363–367. (In Russ.)
5. Chen X., Gu N., Xue C., Li B. R. Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Molecular medicine reports*. 2018;17(2):3239–3245. DOI: 10.3892/mmr.2017.8271.
6. Yang C. L., Lin Y. S., Liu K. F., Peng W. H., Hsu C. M. Hepatoprotective mechanisms of taxifolin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Nutrients*. 2019;11:2655. DOI: 10.3390/nu1112655.
7. Yoon K. D., Lee J. Y., Kim T. Y., Kang H., Ha K. S., Ham T. H., Ryu S. N., Kang M. Y., Kim Y. H., Kwon Y. I. In vitro and in vivo anti-hyperglycemic activities of taxifolin and its derivatives isolated from pigmented rice (*Oryza sativa* L. cv. Superhongmi). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020;68(3):742–750. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b04962.
8. Topal F., Nar M., Gocer H., Kalin P., Kocyigit U. M., Gülçin İ., Alwasel S. H. Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016;31(4):674–683. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057723.
9. Zhang Y., Yu J., Dong X. D., Ji H. Y. Research on characteristics, antioxidant and antitumor activities of dihydroquercetin and its complexes. *Molecules*. 2017;23(1):20. DOI: 10.3390/molecules23010020.
10. Guskova T. A. Toxicology of drugs. Moscow: Russkiy vrach; 2003. 133 p. (In Russ.)
11. Wang W., Ma B.-L., Xu C.-G., Zhou X.-J. Dihydroquercetin protects against renal fibrosis by activating the Nrf2 pathway. *Phytomedicine*. 2020;69:1531854. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153185.
12. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. V. 3. Moscow: Ministerstvo zdoravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. 5004 p. (In Russ.)

REFERENCES