

# Исследования в области разработки состава и технологии капсул с сухим экстрактом астаксантина для медикаментозной профилактики и комплексного лечения глаукомы

**Быкова Е. М.**

*младший научный сотрудник*

**Румянцева Е. В.**

*научный сотрудник*

**Рудько Е.А.**

*к.фарм.н., начальник отдела*

**Кочкина Н. В.**

*к.биол.н., заведующая лабораторией*

**Аксёнов А. В.**

*к. техн. наук, доцент, заведующий лабораторией*

*ФГУП «Научный центр «Сигнал», 107014, г. Москва, ул. Большая Оленья, 8*

**Автор для корреспонденции:** Быкова Елена Михайловна; **e-mail:** bykova2016.bykova@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Аннотация

В статье представлены результаты экспериментальных исследований по разработке оптимального состава и технологии получения капсул с сухим экстрактом астаксантина из морских водорослей *Haematococcus pluvialis*, для медикаментозной профилактики и комплексного лечения глаукомы. Полученные капсулы соответствуют требованиям Государственной Фармакопеи XIII издания, предъявляемым к данной лекарственной форме.

**Ключевые слова:** астаксантин, гранулят, влажное гранулирование, твердые желатиновые капсулы, глаукома

**doi:** 10.29234/2308-9113-2018-6-4-48-57

## Введение

В соответствии с данными Всемирной Организации Здравоохранения в последние годы участились случаи мультифакторного хронического заболевания глаз – глаукомы. По прогнозам на 2030 г. количество больных составит свыше 20 млн человек [11,13,15].

Данное заболевание опасно тем, что оно характеризуется нарушением гидродинамики глаза с повышением внутриглазного давления, развитием оптической нейропатии и

является одной из основных причин развития неизлечимой слепоты [12,13,15,18]. Одним из основных факторов развития глаукомы является нарушение процессов тканевого дыхания и перекисного окисления липидов [1,14,18], поэтому актуальным является создание лекарственных средств для медикаментозной профилактики и комплексной терапии глаукомы на основе антиоксидантов (АО) [2,8,9,12 15].

Среди высокоактивных АО особое место занимает каротиноид астаксантин (АК), синтезируемый микроводорослью *Haematococcus Pluvialis* [6,8,12,15]. АК имеет два дополнительных атома кислорода на каждом из шестичленных колец, за счет чего он никогда не превращается в прооксидант, тем самым не причиняет вред организму [5,17,19]. При этом он обладает в сотни раз более сильными антиоксидантными свойствами в сравнении с другими известными веществами: в 500 раз сильнее витамина Е, в 560 – катехинов зеленого чая, в 800 – коэнзима Q10, в 3000 – витамина С [3,16,19]. В связи с этим, экспериментальное обоснование возможности получения лекарственных препаратов на основе природного АК, который представляет собой сухой экстракт астаксантина (далее СЭА), полученный из морских водорослей *Haematococcus pluvialis*, является перспективным [3,12,15,20,21].

## Цель исследования

Цель настоящего исследования – обоснование и разработка состава, технологии и оценка качества капсул с сухим экстрактом астаксантина.

## Материалы и методы

В качестве действующего вещества был использован 4% СЭА «AstaReal» производства Fuji Chemical Industries Co., Ltd (Япония), представляющий собой мелкокристаллический порошок ярко-красного цвета, растворимый в воде.

В качестве вспомогательных веществ, влияющих на биодоступность астаксантина и на фармацевтические характеристики разрабатываемой лекарственной формы, были выбраны связующие вещества: крахмал картофельный фармацевтический (Fluka, CAS №: 9005-25-8), карбоксиметилцеллюлоза натрия (Na КМЦ) (Sigma-Aldrich, CAS №: 9004-32-4), поливинилпирролидон (ПВП) – 400 (Sigma-Aldrich, CAS №: 9003-39-8) и ПВП-1000 (Sigma-Aldrich, CAS №: 9003-39-8) [4,10].

Гранулирование осуществляли в смесителе с планетарной мешалкой PRS Erweka GmbH (Германия) перемешиванием СЭА с водным раствором связующего компонента до получения однородной комкующейся массы. Влажную массу помещали в бункер гранулятора для влажного гранулирования FGS Erweka GmbH (Германия) с размером

отверстий сетки 2 мм. Полученный гранулят раскладывали слоем до 1 см на полки сушильного шкафа FED 53 Binder GmbH (Германия) и сушили 40 мин при температуре  $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ , после чего повторно пропускали через бункер гранулятора с размером отверстий сетки 2 мм, отсеивали от частиц размером меньше 0,2 мм и досушивали фракцию с размером частиц более 0,2 и менее 2 мм в сушильном шкафу до остаточной влажности около 2%.

Оценку технологических характеристик полученных гранулятов проводили по следующим показателям: гранулометрический состав – определяли с использованием сит с размером ячеек 0,2 и 2 мм, сыпучесть – на приборе для измерения сыпучести гранулированных материалов GTB Erweka GmbH (Германия), насыпную плотность – на приборе для определения насыпной плотности гранулятов SVM 223 Erweka GmbH (Германия).

Фасовку полученного гранулята производили в капсулы размера 00 с использованием ручной капсулонаполняющей машины ProFiller 1100 Custom Capsules Pvt. Ltd. For Torpac, Inc. (Индия). Оценку качества капсул проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0005.15 ГФ XIII издания по следующим показателям: однородность массы дозированных лекарственных форм, распадаемость, растворение.

Среднюю массу капсул измеряли путем взвешивания на аналитических весах XP 56 Mettler Toledo (Швейцария); отклонение от средней массы рассчитывали с использованием программы MS Excel 2016.

Оценку распадаемости проводили на тестере распадаемости ZT 322 Erweka GmbH (Германия).

Количественное определение АК, а также однородность дозирования разрабатываемой лекарственной формы оценивали путем определения содержания действующего вещества в каждой отобранной для испытания единице препарата. Количественное определение активного компонента проводили методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием на масс-спектрометре с орбитальной ионной ловушкой QExactive Thermo Scientific (Германия).

Для биофармацевтической оценки капсул с СЭА использовали тест «Растворение». Анализ проводили методом «Лопастная мешалка» с использованием тестера растворимости DT 820 Erweka GmbH (Германия).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2016.

## Результаты и обсуждение

Для выбора технологии изготовления капсул с СЭА были определены следующие технологические характеристики субстанции: сыпучесть без вибрации и с вибрацией, насыпная плотность до и после уплотнения. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Технологические свойства СЭА**

Характеристики, единицы измерения	Результаты
Внешний вид	Мелкокристаллический порошок ярко-красного цвета
Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup> : - без уплотнения - с уплотнением	0,169 ± 0,005 0,287 ± 0,011
Сыпучесть, угол естественного откоса, °: - без вибрации - с вибрацией	41 (удовлетворительная) 32 (хорошая)
Размер частиц	Менее 0,2 мм

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что СЭА обладает низкой насыпной плотностью как без уплотнения, так и с уплотнением. Это свидетельствует о возможности возникновения проблем как с работой оборудования при расфасовке СЭА в капсулы, так и с самой однородностью дозирования. В связи с этим, для повышения насыпной плотности и однородности дозирования при разработке лекарственной формы СЭА в виде твердых желатиновых капсул проводили экспериментальные исследования по созданию гранулята. Так как СЭА является веществом природного происхождения, использовать способ гранулирования методом прессования не представляется возможным. Поэтому был проведен ряд экспериментальных исследований по подбору оптимального состава для получения гранулята СЭА методом влажного гранулирования. С этой целью исследовалось влияние различных связующих веществ, входящих в состав увлажняющего раствора в концентрации 1, 3 и 5%: крахмала, На КМЦ, ПВП-400 и ПВП-1000.

После высушивания проводили оценку технологических свойств полученных гранулятов. В результате проведенного исследования на этапе первого отсева перед окончательной сушкой были исключены из дальнейшего исследования грануляты на основе 1 и 2% растворов крахмала и ПВП-400, т. к. наблюдался сильный распад гранул – фракция гранул с размером менее 0,2 мм составляла более 40% (табл. 2) и ПВП-1000 в концентрации 3 и 5% – наблюдалось сильное склеивание гранул с образованием крупных агломератов размером более 2 мм (табл. 2).

**Таблица 2. Фракционный состав гранулятов СЭА в зависимости от количества и вида связующих веществ**

Номер образца (гранулята)	Связующее вещество	Концентрация раствора связующего вещества, %	Фракционный состав гранулята, %		
			Менее 0,2 мм	От 0,2 до 2 мм	Более 2 мм
1	крахмал	1	45	51	4
2		3	38	59	3
3		5	4	93	3
4	Na КМЦ	1	5	91	4
5		3	3	92	5
6		5	4	92	4
7	ПВП-400	1	46	51	3
8		3	35	60	5
9		5	5	91	4
10	ПВП-1000	1	3	93	4
11		3	3	64	33
12		5	5	50	45

На следующем этапе оценивали насыпную плотность и сыпучесть гранулятов №№ 3-6, 9 и 10 (табл. 3).

**Таблица 3. Показатели насыпной плотности и сыпучести гранулятов СЭА в зависимости от количества и вида связующих веществ**

Номер гранулята	Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup>		Сыпучесть, угол естественного откоса, °	
	без уплотнения	с уплотнением	без вибрации	с вибрацией
3	0,365 ± 0,052	0,404 ± 0,047	31	28
4	0,217 ± 0,061	0,235 ± 0,018	39	37
5	0,395 ± 0,007	0,473 ± 0,023	35	30
6	0,408 ± 0,014	0,481 ± 0,075	30	28
9	0,221 ± 0,025	0,242 ± 0,074	32	26
10	0,243 ± 0,012	0,267 ± 0,052	44	40

Проведенный анализ данных технологических характеристик гранулятов показал, что составы №№ 3, 5, 6 и 9 обладают хорошей сыпучестью, а составы №№ 4 и 10 – удовлетворительной; при этом составы №№ 4, 9 и 10 имели низкую насыпную плотность. Таким образом, для капсулирования были отобраны составы №№ 3, 5 и 6. Полученные капсулы подвергали контролю качества согласно требованиям ГФ XIII издания [7]. При этом содержание АК в пересчете на чистый АК составляло 8 мг на одну капсулу, что соответствует 200 мг исследуемых гранулятов. Выбор дозировки действующего вещества базировался на анализе литературных данных о терапевтической эффективности АК в профилактике и комплексном лечении глаукомы [2,5,8,20]. Результаты оценки качества капсул с СЭА с составами №№ 3, 5 и 6 представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Показатели качества капсул с СЭА**

Показатели качества	Номер гранулята			Согласно требованиям ГФ XIII
	3	5	6	
Отклонение от средней массы, %	3,25	-4,62	3,84	$\pm 10,00$
Распадаемость, мин	5,38	7,25	29,42	Не более 30 мин

По результатам оценки качества предпочтение было отдано капсулам с гранулятами №№ 3 и 5, поскольку они имеют меньшее время распадаемости в сравнении с гранулятом № 6.

Результаты изучения скорости и полноты высвобождения АК из капсул в зависимости от состава по тесту «Растворение» представлены в таблице 5.

**Таблица 5. Результаты высвобождения АК из капсул (%) в зависимости от состава**

Время, мин	Состав № 3	Состав № 5
5	$51,90 \pm 2,12$	$35,15 \pm 2,51$
10	$76,19 \pm 3,78$	$63,24 \pm 3,01$
15	$97,52 \pm 3,44$	$98,14 \pm 2,75$

Установлено, что уже к 15-ой минуте происходит высвобождение более 95% АК из капсул обоих составов.

Из данных, представленных в таблицах 4 и 5, следует, что капсулы с СЭА обоих составов отвечают требованиям ОФС.1.4.1.0005.15 ГФ XIII издания, предъявляемым к лекарственным формам в виде капсул. Окончательный выбор состава капсул с СЭА будет сделан на основании оценки фармакокинетических параметров в опытах *in vivo*.

## Заключение

В результате проведенных исследований разработаны состав и технология получения СЭА в форме твердых желатиновых капсул, предназначенных для медикаментозной профилактики и комплексного лечения глаукомы. Технология заключается в получении гранулята СЭА с 3% раствором Na КМЦ или 5% раствором крахмала методом влажного гранулирования с последующим его капсулированием.

## Список литературы

- Опенкова Е.Ю. и др. Анализ состояния биохимических показателей в сыворотке крови и слезной жидкости у больных первичной открытоугольной глаукомой. *Клиническая лабораторная диагностика* 2013; (5): 8-11.
- Филина А.А. Антиоксидантная терапия первичной глаукомы. *Вестник офтальмологии* 1994; (1): 33-35.

3. Сазонтова Т.Г. Антиоксиданты и прооксиданты – две стороны одного целого. Ч. 1. *Профилактика today*; 2007: 18-23.
4. Сеткина С.Б., Хишова О.М. Биофармацевтические аспекты технологии лекарственных средств и пути модификации биодоступности. *Вестник ВГМУ* 2014; 13 (4): 162-172.
5. Самойлова М.В. Влияние астаксантина как сильнейшего антиоксиданта на организм человека. *Здоровье и образование в XXI веке* 2015; (1): 102-107.
6. Печинский С.В., Курегян А.Г. Влияние каротиноидов на иммунитет. *Химико-фармацевтический журнал* 2013; 47 (10): 3-8.
7. Государственная фармакопея РФ XIII издания. Том II. FEMB.RU: Федеральная электронная медицинская библиотека. 2015. URL: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_2/HTML](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML) (дата обращения: 17.07.2018).
8. Капелли Б., Цисевски Дж. Р. Природный Астаксантин: король каротиноидов. Пер. с англ. М. Ворсановой. М.: НПО "Источник долголетия", 2008. 160 с.
9. Газизова И.Р. Коррекция митохондриальной дисфункции как основа нейропротекции при глаукоме. *Офтальмологические ведомости* 2011; 4 (4): 63-69.
10. Меньшутин Н.В., Мишина Ю.В., Алвес С.В. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. Т. 1. М.: Издательство БИНОМ, 2012. 328 с.
11. Нестеров А.П. Глаукома. М.: Медицина, 1995. 295 с.
12. Черных В.В. и др. Особенности патогенеза первичной открытоугольной глаукомы с нормализованным внутриглазным давлением, новые подходы к комплексному лечению. *Бюллетень СО РАМН* 2014; 34 (3): 6-12.
13. Нестеров А.П. Первичная открытоугольная глаукома: патогенез и принципы лечения. *Клиническая офтальмология* 2000; (1): 4-5.
14. Залеская Т.И., Авер В.В., Мандрик К.А. Перекисное окисление белков плазмы крови у больных глаукомой. *Оригинальные исследования. Журнал ГрГМУ* 2007; (3): 66-68.
15. Мосунова Е.П. и др. Современные подходы к фармакотерапии возрастной офтальмопатологии. *Вятский медицинский вестник* 2009; (2): 20-26.
16. Ураков А.Л., Уракова Н.А., Чернова Л.В. Способ скрининга антигипоксантов. *Успехи современного естествознания* 2014; (9): 24-27.
17. Печинский С.В., Курегян А.Г. Структура и биологические функции каротиноидов. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2013; (9): 4-15.
18. Петров С.Ю. и др. Этиология первичной глаукомы: современные теории и исследования. *Офтальмологические ведомости* 2015; 8 (2): 47-56.
19. Iwamoto T., Hosada K., Hirano R., Kurata H., Matsumoto A., Mikki W., Kamiyama M., Itakura H., Yamamoto S., Kondo K. Inhibition of low-density lipo-protein oxidation by astaxanthin. *Journal of Atherosclerosis thrombosis* 2000; 7 (4): 216-222.
20. Sandesh Kamath B. Biotechnological production of microalgal carotenoids with reference to astaxanthin and evaluation of its biological activity. Dis. by D.Ph. Department of Biotechnology of University of Mysore, India, 2007.

21. Shiratori K., Ogami K., Nitta T. The effects of Astaxanthin on Accommodation and Asthenopia-Efficacy-Identification Study in Healthy Volunteers. *Clinical Medicine* 2005; 21 (6): 637-650.

## Research on Development of Composition and Technology of Capsules with Dry Extract of Astaxanthin for Medicamental Prevention and Complex Treatment of Glaucoma

**Bykova E. M.**

*Junior Researcher*

**Rumiantseva E. V.**

*Researcher*

**Rud'ko E. A.**

*PhD, Department Head*

**Kochkina N. V.**

*PhD, Laboratory Head*

**Aksenov A. V.**

*PhD, Assistant Professor, Laboratory Head*

*Scientific Center "Signal", 107014, Moscow, Bolshaya Olen'ya str., 8*

**Corresponding Author:** Bykova Elena Michailovna.; **e-mail:** bykova2016.bykova@yandex.ru

**Conflict of interest.** None declared.

**Funding.** The study had no sponsorship.

### Summary

The article presents the results of experimental studies on the development of the optimal composition and technology for production of capsules with dry extract of astaxanthin from seaweed *Haematococcus pluvialis*, for medicamental prevention and complex treatment of glaucoma. The resulting capsules meet the requirements of the State Pharmacopoeia (XIII edition) for the dosage form.

**Keywords:** astaxanthin, granulate, wet granulation, solid gelatin capsules, glaucoma

### References

1. Openkova E.Yu. et al. Analiz sostoyaniya biohimicheskikh pokazatelej v syvorotke krovi i sleznoj zhidkosti u bol'nyh pervichnoj otkrytougol'noj glaukomoj [Analysis of the state of biochemical parameters in the serum and tear fluid in patients with primary open-angle glaucoma]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Clinical laboratory diagnostics]* 2013; (5): 8-11. (In Russ.)
2. Filina A.A. Antioksidantnaya terapiya pervichnoj glaukomy [Antioxidant Therapy for Primary Glaucoma] *Vestnik oftal'mologii [Ophthalmological Bulletin]* 1994; (1): 33-35. (In Russ.)
3. Sazontova T.G. Antioksidanty i prooksidanty – dve storony odnogo celogo. Ch. 1 [Antioxidants and prooxidants – two sides of one whole. Pt. 1]. *Profilaktika today [Prevention today]* 2007: 18-23. (In Russ.)
4. Setkina S.B., Hishova O.M. Biofarmaceuticheskie aspekty tekhnologii lekarstvennyh sredstv i puti modifikacii biodostupnosti [Biopharmaceutical aspects of drug technology and ways of modifying bioavailability]. *Vestnik VGMU* 2014; 13 (4): 162-172. (In Russ.)

5. Samojlova M.V. Vliyanie astaksantina kak sil'nejshego antioksidanta na organizm cheloveka [Effect of astaxanthin as the strongest antioxidant on the human body]. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke [Health and education in the 21st century]* 2015; (1): 102-107. (In Russ.)
6. Pechinskij S.V., Kuregyan A.G. Vliyanie karotinoidov na immunitet [The effect of carotenoids on immunity]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal [Chemical and Pharmaceutical Journal]* 2013; 47 (10): 3-8. (In Russ.)
7. Gosudarstvennaya farmakopeya RF XIII izdaniya. Tom II. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII Edition. Vol. 2]. FEMB.RU: Federal'naya ehlektronnaya medicinskaya biblioteka [FEMB.RU: Federal Electronic Medical Library] 2015. URL: [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_2/HTML](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML) Cited: 17.07.2018. (In Russ.)
8. Kapelli B., Cisevski G.R. Prirodnyj Astaksantin: korol' karotinoidov [Natural Astaxanthin: the king of carotenoids]. Moscow: NPO "Istochnik dolgoletiya", 2008. (In Russ.)
9. Gazizova I.R. Korrekciya mitohondrial'noj disfunkcii kak osnova nejroprotekcii pri glaukome [Correction of mitochondrial dysfunction as the basis of neuroprotection in glaucoma]. *Oftal'mologicheskie vedomosti [Ophthalmologic Vedomosti]* 2011; 4 (4): 63-69. (In Russ.)
10. Men'shutina N.V., Mishina Yu.V., Alves S.V. Innovacionnye tekhnologii i oborudovanie farmacevticheskogo proizvodstva. T. 1 [Innovative technologies and equipment for pharmaceutical production. Vol. 1]. Moscow: BINOM, 2012. (In Russ.)
11. Nesterov A.P. Glaukoma [Glaucoma]. Moscow: Medicina, 1995. (In Russ.)
12. Chernyh V.V. et al. Osobennosti patogeneza pervichnoj otkrytougol'noj glaukomy s normalizovannym vnutriglaznym davleniem, novye podhody k kompleksnomu lecheniyu [Features of the pathogenesis of primary open-angle glaucoma with normalized intraocular pressure, new approaches to complex treatment]. *Byulleten' SO RAMN [SO RAMN Bulletin]* 2014; 34 (3): 6-12. (In Russ.)
13. Nesterov A.P. Pervichnaya otkrytougol'naya glaukoma: patogeneza i principy lecheniya [Primary open-angle glaucoma: pathogenesis and treatment principles]. *Klinicheskaya oftal'mologiya [Clinical Ophthalmology]* 2000; (1): 4-5. (In Russ.)
14. Zalesskaya T.I., Aver V.V., Mandrik K.A. Perekisnoe okislenie belkov plazmy krovi u bol'nyh glaukomoj [Peroxidation of plasma proteins in patients with glaucoma]. *Original'nye issledovaniya. Zhurnal GrGMU [Original Studies. Journal of GrGMU]* 2007; (3): 66-68. (In Russ.)
15. Mosunova E.P. et al. Sovremennye podhody k farmakoterapii vozrastnoj oftal'mopatologii [Modern approaches to pharmacotherapy of age-related ophthalmopathology]. *Vyatskij medicinskij vestnik [Vyatka Medical Bulletin]* 2009; (2): 20-26. (In Russ.)
16. Urakov A.L., Urakova N.A., Chernova L.V. Sposob skrininga antigipoksantov [Method for screening of antihypoxants]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya [Successes of modern natural sciences]* 2014; (9): 24-27. (In Russ.)
17. Pechinskij S.V., Kuregyan A.G. Struktura i biologicheskie funkcii karotinoidov [Structure and biological functions of carotenoids]. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii [Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry]* 2013; (9): 4-15. (In Russ.)
18. Petrov S.Yu. et al. Ehtiologiya pervichnoj glaukomy: sovremennye teorii i issledovaniya [Etiology of primary glaucoma: current theories and research]. *Oftal'mologicheskie vedomosti [Ophthalmologic Vedomosti]* 2015; 8 (2): 47-56. (In Russ.)
19. Iwamoto T., Hosada K., Hirano R., Kurata H., Matsumoto A., Mikki W., Kamiyama M., Itakura H., Yamamoto S., Kondo K. Inhibition of low-density lipo-protein oxidation by astaxanthin. *Journal of Atherosclerosis thrombosis* 2000; 7 (4): 216-222.

20. Sandesh Kamath B. Biotechnological production of microalgal carotenoids with reference to astaxanthin and evaluation of its biological activity. Dis. by D.Ph. – Department of Biotechnology of University of Mysore, India, 2007.
21. Shiratori K., Ogami K., Nitta T. The effects of Astaxanthin on Accommodation and Asthenopia-Efficacy-Identification Study in Healthy Volunteers. *Clinical Medicine* 2005; 21 (6): 637-650.