

Казахский Национальный Медицинский Университет  
имени С.Д. Асфендиярова

УДК 615.7:615.322:615.012/.014

На правах рукописи

**ЖАПАРКУЛОВА КАРЛЫГАШ АЛТЫНБЕКОВНА**

**Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе  
растительного сырья *Ziziphora bungeana***

6D074800 – Технология фармацевтического производства

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:  
д.фарм.н., доцент Сакипова З.Б.,  
к.фарм.н., доцент Бимурзаев А.А.,  
PhD, профессор фармакогнозии  
Самир Росс

Республика Казахстан  
Алматы, 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

	<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....</b>	5
	<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....</b>	6
	<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	7
<b>1</b>	<b>РАСТЕНИЯ РОДА ЗИЗИФОРА КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ.....</b>	11
1.1	Краткая ботаническая характеристика видов рода Зизифора.....	11
1.2	Распространение и фитоценотические особенности произрастания растений рода Зизифора.....	13
1.3	Аспекты применения растений рода Зизифоры в официальной и этномедицине.....	13
1.4	Химический состав растений рода Зизифора как элемент структурно-логического обоснования «вещество - фармакологическая активность».....	15
1.5	Перспектива внедрения практики культивирования и заготовки сырья зизифоры Бунге в соответствии с требованиями Надлежащей практики культивирования и сбора лекарственных растений (GACP).....	21
	Выводы по первому разделу.....	22
<b>2</b>	<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	23
2.1	Объекты исследования .....	23
2.2	Методы исследования растительного сырья зизифоры Бунге.....	23
2.3	Метод газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС)	27
2.4	Методики стандартизации фитосубстанции зизифоры Бунге.....	27
2.5	Методы токсико-фармакологических исследований фитосубстанции зизифоры Бунге.....	30
2.6	Методы оценки качества адгезивной дентальной пасты с маслом зизифоры Бунге.....	35
<b>3</b>	<b>СТАНДАРТИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЗИЗИФОРА БУНГЕ ТРАВА.....</b>	36
3.1	Заготовка травы зизифоры Бунге .....	36
3.2	Органографические и анатомические диагностические признаки З. Бунге.....	37
3.3	Определение фармако-технологических параметров и фармакопейных показателей качества растительного сырья зизифоры Бунге.....	43

3.4	Получение эфирного масла из травы З. Бунге.....	45
3.4.1	Изучение компонентного состава эфирного масла З. Бунге .....	47
3.4.2	Разработка методик качественного и количественного определения пулегона в эфирном масле З. Бунге.....	49
3.4.3	Валидация и верификация аналитических методик .....	50
3.5	Разработка спецификации качества травы З.Бунге.....	60
3.6	Изучение стабильности травы методом долгосрочных испытаний.....	64
	Выводы по третьему разделу.....	75
<b>4</b>	<b>ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФИТОСУБСТАНЦИИ З. БУНГЕ.....</b>	<b>77</b>
4.1	Разработка оптимальной технологии получения эфирного масла З. Бунге.....	78
4.1.1	Изучение фармакопейных характеристик эфирного масла	79
4.1.2	Разработка спецификации качества эфирного масла З. Бунге.....	81
4.1.3	Изучение стабильности эфирного масла З. Бунге.....	83
4.2	Разработка оптимальной технологии получения густого экстракта З.Бунге в докритических условиях.....	91
4.2.1	Получение густого экстракта из травы З. Бунге.....	91
4.2.2	Изучение компонентного состава густого экстракта З. Бунге.....	93
4.2.3	Изучение фармакопейных критериев густого углекислого экстракта З.Бунге.....	96
4.2.4	Разработка спецификации качества густого углекислого экстракта З.Бунге.....	97
	Выводы по четвертому разделу.....	99
<b>5</b>	<b>ТОКСИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИТОСУБСТАНЦИИ З. БУНГЕ.....</b>	<b>100</b>
5.1	Изучение антимикробной, активности эфирного масла и густого экстракта З. Бунге.....	100
5.2	Изучения влияния эфирного масла и густого экстракта З. Бунге на канабиноидные и опиоидные рецепторы .....	104
5.3	Изучение острой токсичности и местнораздражающего действия фитосубстанций З.Бунге.....	105
	Выводы по пятому разделу.....	112
<b>6</b>	<b>ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА АДГЕЗИВНОЙ ДЕНТАЛЬНОЙ ПАСТЫ С МАСЛОМ З. БУНГЕ.....</b>	<b>113</b>
6.1	Разработка оптимального состава адгезивной дентальной пасты.....	113

6.2	Технология получения адгезивной дентальной пасты с маслом З.Бунге.....	116
6.3	Изучение критериев оценки качества адгезивной дентальной с маслом З.Бунге.....	116
	Выводы по шестому разделу.....	
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	128
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	131
	<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b> .....	141

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:  
ICH Q8(R2) «Pharmaceutical Development»

Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т.1. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. - 592 с.

Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т.2. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. - 720 с.

Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т.3. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2014. - 720 с.

European Pharmacopoeia.6-th edition. Strasburg (Germany): Council of Europe, 2007.

European Pharmacopoeia.8-th edition. Nordlingen (Germany): Council of Europe, 2014.

СТ РК 1613-2006 «Надлежащая лабораторная практика. Основные положения»

СТ РК 1616-2006 «Производство лекарственных средств. Надлежащая производственная практика. Основные положения»

Кодекс Республики Казахстан о здоровье и системе здравоохранения от 18 сентября 2009 года № 193-IV

Приказ Министра здравоохранения РК № 745 от 19 ноября 2009 года «Об утверждении Инструкции по проведению доклинических исследований и (или) испытаний фармакологических и лекарственных средств в Республике Казахстан».

Приказ Министра здравоохранения РК от 19 ноября 2009 года № 754 Об утверждении Правил составления, согласования и экспертизы нормативно-технического документа по контролю за качеством и безопасностью лекарственных средств.

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 18 ноября 2009 года № 735 Об утверждении Правил государственной регистрации, перерегистрации и внесения изменений в регистрационное досье лекарственного средства, изделий медицинского назначения и медицинской техники.

Постановление Правительства Республики Казахстан от 23 декабря 2011 года № 1595 Об утверждении Правил хранения и транспортировки лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники в условиях, обеспечивающих сохранение их безопасности, эффективности и качества.

Постановление Правительства Республики Казахстан от 25 августа 2015 года № 680 «Об утверждении Правил производства и контроля качества, а также проведения испытаний стабильности и установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники».

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АНД	– Аналитический нормативный документ
БАВ	– Биологически активные вещества
ВР	– Вспомогательная работа
ГФ РК	– Государственная Фармакопея Республики Казахстан
ГЖХ	- Газожидкостная хроматография
ЕФ	– Европейская Фармакопея
ЛС	– Лекарственное средство
ЛФ	– Лекарственная форма
ЖЛФ	– Жидкая лекарственная форма
СП	– Спецификация качества
НД	– Нормативная документация
ГОСТ	– Государственный отраслевой стандарт
СТ	– Стандарт организации
ОСТ	– Отраслевой стандарт
ТП	– Технологический процесс
ТСХ	- Тонкослойная хроматография
УМО	– Упаковка, маркировка
ЛЭК	– Локальный этический комитет
ЛРС	– Лекарственное растительное сырье
GMP	– Goodmanufacturingpractice (надлежащая производственная практика)
GLP	– Goodlaboratorypractice (надлежащая лабораторная практика)
GCP	- Goodclinicalppractice (надлежащая клиническая практика)
ICH	- International Council for Harmonisation (Международный совет по гармонизации)
He	- Hematoxylin eosin
СОЖ	- Слизистая оболочка желудка

## ВВЕДЕНИЕ

**Общая характеристика работы.** Настоящая диссертационная работа посвящена фармацевтической разработке лекарственных средств на основе растительного сырья зизифора Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz.), изучению профиля их фармакологической активности и безопасности.

**Актуальность темы исследования:** На сегодняшний день одним из приоритетных направлений развития Республики Казахстан является расширение ассортимента фармацевтической индустрии за счет производства фитопрепаратов на основе отечественного сырья. Решение этой задачи возможно путем внедрения в практику научных разработок на основе природного сырья РК, имеющих достаточные возобновляемые промышленные запасы.

Флора Казахстана насчитывает около 6000 видов высших растений. Из них, свыше 1500 видов характеризуются лекарственными свойствами. Более 60 наименований лекарственных растений - включены в Государственную Фармакопею РК, остальные - требуют полномасштабного и глубокого изучения. К таким малоизученным растениям, применение которого ограничено только народной медициной, относится зизифора Бунге. Данное растение используют как кардиологическое, гипотензивное, болеутоляющее, успокаивающее и ранозаживляющее средство.

Известны попытки внедрения в фармацевтическую практику лекарственного растения зизифора Бунге отечественными учеными Джумагалиевой Ф.Д., Бимурзаевым А.А [1,2]. Однако, это растение по сей день не имеет официального статуса как лекарственное средство, т.е. не является официальным и не включено в ГФ РК.

Поэтому, учитывая потребность фармацевтической промышленности РК в фитопрепаратах на основе отечественного сырья, системное исследование сырья зизифора Бунге и разработка качественных, безопасных и эффективных лекарственных средств на его основе в соответствии современным надлежащим требованиям фармакопеи, является актуальным.

**Цель исследования:** Фармацевтическая разработка (состав, технология и стандартизация) отечественных лекарственных средств на основе растительного сырья зизифора Бунге с изучением профиля их фармакологической активности и безопасности.

### **Задачи исследования**

- Фармакогностическое и фармакотехнологическое изучение растительного сырья – травы зизифоры Бунге
- разработка критериев качества и стандартизация травы зизифоры Бунге в соответствии фармакопейным требованиям ГФ РК
- разработка оптимальной технологии и стандартизация новых фитосубстанций зизифоры Бунге: эфирное масло и экстракт густой

- изучение фармакологической активности и исследование профиля безопасности фитосубстанций (эфирное масло и экстракт густой) зизифоры Бунге
- фармацевтическая разработка адгезивной дентальной пасты с эфирным маслом зизифоры Бунге.

**Объекты исследования:** Объектами исследования являются - трава зизифоры Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz.), фитосубстанции, полученные на ее основе (эфирное масло и экстракт густой) и адгезивная дентальная паста с маслом зизифоры Бунге.

#### **Методы исследования**

Стандартные физические, физико-химические, фармакогностические, фармако-технологические, фармакологические, биологические, статистические фармакопейные и нефармакопейные методы.

#### **Научная новизна**

Впервые проведено полномасштабное исследование травы зизифоры Бунге в качестве исходного сырья для разработки качественных, эффективных и безопасных лекарственных средств.

Впервые разработан способ получения эфирного масла из травы зизифоры Бунге с высоким содержанием действующего вещества – пулегона (61%).

Впервые из углекислотного экстракта зизифоры Бунге выделены два соединения класса тритерпенов.

Впервые по результатам биологического скрининга установлены анальгезирующая и антимикробная активность фитосубстанций зизифоры Бунге. Новизна подтверждена заявками на полезную модель: «Способ получения углекислотного экстракта из травы зизифоры Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz.) в виде фармацевтической субстанции, обладающей активностью к каннабиоидным и опиоидным рецепторам и антимикробной активностью» (заявка № 2016/0111.2) и «Эфирное масло из травы зизифоры Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz.), обладающее антимикробной активностью и активностью к каннабиоидным и опиоидным рецепторам» (заявка № 2016/0112.2).

Впервые предложена фармацевтическая разработка нового лекарственного средства для стоматологии - адгезивной дентальной пасты с маслом зизифоры Бунге.

#### **Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту**

- Стандартизация травы зизифоры Бунге в соответствии фармакопейными требованиям ГФ РК и внедрение его в официальную медицину.
- Технология производства и стандартизация новых фитосубстанций зизифоры Бунге: эфирное масло и экстракт густой
  - Определение анальгезирующей и антимикробной активности фитосубстанции зизифора Бунге.
  - Оценка безопасности фитосубстанции зизифора Бунге.



- Фармацевтическая разработка адгезивной дентальной пасты с маслом З. Бунге.

### **Практическая значимость исследования**

На основании проведенных исследований предложена и внедрена в практическую фармацию инструкция по сбору и сушке травы зизифора Бунге.

Предложены методики стандартизации сырья, фитосубстанции зизифоры Бунге.

Разработаны и внедрены в практическую фармацию нормативно-технические документы, спецификации качества, АНД, лабораторные и опытно-промышленные технологические регламенты на сырье, фитосубстанции и лекарственную форму зизифоры Бунге.

На государственную экспертизу подано регистрационное досье растительного сырья «зизифоры Бунге трава» в РГП на ПХВ «Национальный Центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники».

### **Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы доложены и опубликованы в материалах: II международной научно-практической конференции «Интеграция фармацевтической науки, образования и практики на современном этапе» (г. Алматы 2013 г.); IV Всеукраинской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Современные возможности стоматологии» (г. Луганск, 2014 г.); Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств» (г. Харьков 2014 г.); I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, 2014 г.), Всероссийской международной научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.), XV международной конференции ботанических наук (г. Оксфорд, США, 2015 г.); международной конференции «Pharmacytodayandtomorrow – TheoryandPractice» (г. Люблин, Польша, 2015 г.); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.), XVI международной конференции ботанических наук с участием Американского общества фармакогнозии (г. Оксфорд, США, 2016 г.); международной научно-практической конференции «Инновационные достижения в современной фармации и медицине» (г. Шымкент, 2016 г.).

### **Сведения о публикациях:**

По результатам исследований опубликовано 23 научных работ, в том числе:

- статьи в международных журналах, входящих в базы данных Scopus и WebofScience – 3;

- статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки РК - 6;

- статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации – 3;

- тезисы на международных научно-практических конференциях (США, Польша, Украина, Россия, Казахстан) – 9;

- заявки на изобретение полезной модели – 2;

#### **Связь задач исследований с планом научных программ**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова и научного проекта «Этнофармацевтические изучения флоры Казахстана»

#### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, содержит 45 таблиц, 53 рисунка, список литературы, включающий 129 источников, а также 11 приложений. Работа состоит из введения, обзора источников, раздела 2 посвященного материалам и методам исследования, 4-х разделов собственных исследований, выводов.

# 1 РАСТЕНИЯ РОДА ЗИЗИФОРА КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ

## 1.1 Краткая ботаническая характеристика видов рода Зизифора

Род Зизифора (*Ziziphora* L.) семейства Губоцветные (*Lamiaceae*) включает в себя около 30 видов. Латинское название *Ziziphora*, предположительно, произошло от арабского (или индусского) «Zizi» и греческого слова «-pherein» или «-phoros» – нести, несущий. В средней Азии зизифора известна как «кикоты» или «райхан гул», в персидских странах также распространено название «kakuti-e kuhi».

На территории Казахстана произрастают следующие виды рода Зизифора: зизифора Бунге (*Ziziphora bungeana*), зизифора памироалайская (*Ziziphora pamiroalaica*), зизифора пахучковидная (*Ziziphora clinopodoides*), зизифора тонкая (*Ziziphora tenuior*), зизифора Выходцевского (*Ziziphora vichodceviana*), зизифора прерванная (*Ziziphora interrupta*) [1].

Растения рода Зизифора - однолетние или многолетние, травянистые или суб-кустарниковые растения. Их листья расположены на коротких черешках или почти сидячие; листовая пластинка абаксиально утолщенная. Цветки разбросаны по пазухам листьев или сгущены в верхушечные плотные головчатые соцветия; цветочные листья такие же, как стеблевые или меньших размеров. Чашечки встречаются узко-цилиндрические, от прямых до слегка изогнутых, с 13 жилками, покрытые ворсинками, кольчатые в сужении, с 2 губами, с 3-х зубчатой верхней и 2-х зубчатой нижней губой; зубцы почти одинаковые по размеру, расположены близко друг к другу, редко расходящиеся после опыления. Конец венчика цветка 2-х губчатый: верхняя губа прямая, цельнокрайная, на верхушке выемчатая; нижняя губа вытянутая, 3-х лепестковая, а средний лепесток более узкий, чем округлые боковые лепестки. Передние тычинки длинные, достигающие верхней губы венчика, задние тычинки рудиментарны, короткие или отсутствуют; клетки пыльника узкие и длинные, только 1 или 2 из них развиты, а другие, как правило, сводятся к придатку или отсутствуют. Игольчатая верхушка неравномерно расщеплена надвое и задний лепесток короткий. Цветет начиная с конца июня до сентября. Плоды – яйцевидные, гладкие орешки [2, p.342].

Зизифора Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz.) -ароматные полукустарники с деревянистыми корнями. Стебли многочисленные, отчасти восходящие до полупрямостоячих, длиной 12-30 см, одревесневающие у основания, ветвистые, плотные книзу, опушены, особенно в верхней части. Черешки опушены; листья узколанцетные, редко яйцевидные (5-15×1,5-6 мм), полугладкие или опушенные, заметно утолщенные, основания слабо клиновидные, цельнокрайные, верхушка от острой до слегка округлой. Цветки собраны в шаровидные или полушаровидные концевые головки; цветочные листья уменьшаются, в основном, по возрастанию или по горизонтали. Ножка длиной 1-3 мм. Чашечка трубчатая 5 (7) мм, слабо утолщенная; зубцы острые и почти одинаковые.

Венчик розовый 8 мм, трубка опушенная и боковые лепестки круглые. Как правило, 2 тычинки продуктивны, а задние тычинки короткие или отсутствуют. Период цветения обычно в августе-сентябре [2, p.342].

Зизифора пахучковидная (*Ziziphora clinopodoides*): Корневище толстое и деревянистое. Стебли многочисленные, простые, прямые, длиной 8-40 см, редко ветвистые, но ветвистые вверху, несколько восходящие, покрытые короткими, нагнутыми вниз волосками. Листья черешковые, яйцевидные или продолговато-яйцевидные, 10-25 мм длиной, шириной 3-10 мм, с цельным или нечетко редко зубчатым краем. Листья точечно-железистые, гладкие или слабо покрытые короткими волосками. Цветки собраны в плотные верхушечные головки-соцветия, окруженные мелкими прицветными листьями. Чашечка покрыта короткими волосками, венчик 10-12 мм длиной, розовый или светло-лиловый снаружи, короткопушистый, трубка вдвое длиннее отгиба, верхняя губа - продолговато-овальная, на верхушке выемчатая, средняя часть нижней губы почти такой же формы и покрытая ворсинками, а боковые лопасти косояйцевидные [2, p.342].

Зизифора тонкая (*Ziziphora tenuior*): Как правило, однолетнее травянистое растение. Стебли тонкие, прямостоячие, 5-15 (до 25) см длиной, густо покрыты изогнутыми короткими волосками. Листья линейно-ланцетные или ланцетные, 0,7-1,5 (до 2,5) см × 1-4 мм, гладкие или мелко бороздчатые, неясно железистые, суженные к основанию, цельнокрайные, реснитчатые, заостренные. Имеет 2-6 цветных мутовок, рыхлых или плотных, собранных в колосовидные соцветия 2-11 (до 15) см; прицветные листья намного длиннее цветов, с реснитчатыми краями. Цветоножка 1,5-4 мм. Чашечка узкоцилиндрическая, слегка изогнутая к низу, 5-7 мм, зубцы короткие, туповатые. Венчик 1 см в длину, с чуть выставленной трубкой. Есть две плодородные тычинки; пыльники в виде яйцевидного, направленного вниз придатка. Зизифора тонкая семейства губоцветные цветет в августе [2, p.342].

Зизифора памироалайская (*Ziziphora pamiroalaica*) - обычно ароматические полукустарники с прочными деревянистыми, скрученными корнями. Стебли многочисленные, растущие из деревянистого основания, красноватые, слабые или крепкие, восходящие или стелющиеся, извилистые, длиной 7-30 см, покрытые мелкими, слегка изогнутыми жестковатыми волосками. Черешок длиной до 3 мм; листовая пластинка продолговато-яйцевидная или полукруглая, согнутая, опушенная и выражено железистая, с сужающимся основанием, цельнокрайная или 1-2 зубчатая, тупая или слегка заостренная. Корзинки шаровидные, 1,2-2,8 см в диаметре и компактные; цветочные листья не длиннее чашечки и отогнутые. Чашечка зеленая или красноватая, 4-6 мм длиной, покрытая длинными, плотными, вялыми белыми волосками по всей длине. Венчик розовый, с чуть выставленной трубкой, с большой расширенной частью. Тычинки сильно выставленные и пыльники фиолетовые [3, с.434-437].

Зизифора Выходцевского (*Ziziphora vichodceviana*) имеет простые, черешковые листья, цветы зигоморфные, околоцветник спайнолепестный из 5 лепестков [3, с.434-437].

Зизифора прерванная (*Ziziphora interrupta*)-черешки листьев просто прикреплены, околоцветник имеет зигоморфные цветы из 5 лепестков [3, с.434-437].

## **1.2 Распространение и фитоценоотические особенности произрастания растений рода Зизифора**

Род Зизифора (*Ziziphora*L.)распространен преимущественно на территории Средиземноморья, Ближнего Востока, Центральной Азии, Западного Китая, Монголии, Восточной Сибири и Кавказа. Встречаются на лугах, щебенистых и каменистых склонах, скалистых берегах рек, в основном в горной местности.

Типичными местами обитания являются горные склоны, щебнистые участки, луга, полупустынные районы Синьцзяна, Казахстана, Кыргызстана, России, Таджикистана, Туркменистана и Узбекистана, но также зизифора тонкая может встречаться в некоторых засушливых районах южной Европы [2].

Зизифора Бунге произрастает на щебнистых горных склонах, в полупустынных районах, или на песчаных пляжах, на высоте 700-1100 м над уровнем моря в районах Синьцзяна (Китай), Казахстана, Кыргызстана, Монголии, России, Таджикистана, Туркменистана и Узбекистана [2].

Зизифора пахучковиднаярастет, как правило, на открытых каменистых и щебнистых склонах холмов и гор, на каменистых берегах рек, а также на степных лугах [2].

Зизифора памироалайская встречается в щебнистых районах, долинах и ущельях Синьцзяна, Казахстана и Таджикистана.

## **1.3 Аспекты применения растений рода Зизифоры в официальной и этномедицине**

Зизифора пахучковидная хорошо известна в традиционной китайской медицине под названием «губная ваниль», «листовая» или «горная мята». Согласно древнекитайской энциклопедии по медицине «Материя Медика», в Китае она использовалась в качестве успокаивающего средства[4].Известно ее использование для лечения учащенного сердцебиения, бессонницы, озноба, лихорадки и отеков. Она, как правило, применяется в виде отвара (чая), полученного путем заваривания 15-18 г сырья кипящей водой.

Зизифора пахучковидная в Синьцзяне (Китай) используется для лечения лихорадки и головной боли [5].Это лекарственное растение также используется в традиционной уйгурской медицине для лечения болезни сердца, высокого кровяного давления, астмы, потливости, сердцебиения, бессонницы, отеков, кашля, бронхита, абсцесса легких и других заболеваний. [6, 7]. Листья, цветы и стебли зизифоры пахучковидной часто используются в качестве пряностей или добавок в пищу для получения сильного аромата и вкуса [8]. Зизифора пахучковидная хорошо известна своим антибактериальным действием [9].

Этот вид зизифоры часто используется также в турецкой и иранской («kakuti-e Кухи» - персидское название зизифоры пахучковидной согласно

Veikmohammadi (2011) народной медицине в основном в качестве настоев с седативным и ветрогонным действием. Антисептическое и ранозаживляющее действие также хорошо известно [7,10]. В Анатолии (Турция) Зизифора пахучковидная используется в качестве ароматической специи. Растение известно как «Kirnanesi» и применяется как ароматический чай для лечения желудочно-кишечных расстройств, а также как ветрогонное, антисептическое и ранозаживляющее свойств [7]. Кроме того, оно используется в качестве кулинарного продукта для изготовления специального сыра [11,12].

Зизифора тонкая (на казахском языке известная как «раушангүл» и «kakuti») [9], используется в народной медицине для лечения лихорадки, дизентерии, гинекологических инфекций и как болеутоляющее средство. Она используется также для купирования различных желудочно-кишечных расстройств, особенно как ветрогонное или противодиарейное средство. Способность купировать приступы тошноты обуславливают наличием эфирного масла и его основных компонентов: пулегона, тимола, ментона /изоментона и пиперитона [13]. Зизифора тонкая содержит большое количество эфирного масла, что означает, что она является хорошим сырьевым источником пулегона, который широко используется в пищевой и фармацевтической промышленности [14, 15]. Sezik E. и др. (2004) в ходе проведения этнофармакологического исследования лекарственных растений Узбекистана [14] обнаружили, что это растение (местное название Chulhulva) имеет гипотензивные свойства.

Трава зизифора Бунге используется в уйгурской медицине в виде отвара, который снимает расстройства дыхания, головокружение и другие симптомы, связанные с сердечнососудистыми заболеваниями, такими как ишемическая болезнь сердца или гипертония [15]. В литературе встречаются патенты [16-24], на применение видов зизифоры или их отдельных компонентов с медицинской целью. Капсулы, содержащие смесь экстрактов надземных частей зизифоры Бунге и полыни рупестровой и экстракта лопуха большого используются для лечения различных вирусных инфекций верхних дыхательных путей. В заявках на патент, также отмечаются данные по жаропонижающей активности экстракта у кроликов, противовоспалительной активности у крыс и противокашлевой активности у мышей. Противовирусная активность препарата была также оценена *in vitro* [16].

Способ получения флавоноидной фракции экстракта З. Бунге путем комбинированной экстракции надземной части органическим растворителем с дисперсией полученного экстракта в водную фазу и последующей фильтрацией через макропористую смолу и промывкой этанолом описан в патенте [17]. Флавоноидная фракция показала позитивный эффект в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Препарат на основе флавоноидной фракции З. Бунге для лечения сердечно-сосудистых заболеваний зарегистрирован в патенте [19]. Ряд других патентов также описывают использование флавоноидной фракции З. Бунге [18].

Зизифора пахучковидная является также компонентом традиционного китайского лекарственного препарата для лечения пароксизмальной наджелудочковой тахикардии [20]. Эфирное масло зизифоры пахучковидной используют в качестве перорального спрея для улучшения гигиены полости рта и подавления роста патогенных бактерий и воспаления [21].

Есть данные о применении эфирного масла зизифоры пахучковидной в сельском хозяйстве в качестве противогрибкового препарата против патогенного гриба *Sclerotinia sclerotiorum*, паразитирующего на растениях [22].

Водные и этанольные экстракты зизифоры пахучковидной не показали значительной антибактериальной активности, но была зафиксирована активность в отношении ЦОГ-1 (циклооксигеназы) [25]. Была отмечена незначительная активность против *Bacillus subtilis* и против *E. coli* различных экстрактов зизифоры пахучковидной подвида *rigida* [26]. Метанольные экстракты зизифоры пахучковидной и зизифоры тонкой показали низкую активность против нескольких грамположительных и грамотрицательных видов микроорганизмов [27].

Эффективность метанольного экстракта, полученного из зизифоры пахучковидной для лечения воспалительного заболевания кишечника, была протестирована на модели декстран сульфатно-индуцированного колита у мышей. Было установлено, что TNF-а и NO уровни снижаются, а уровень антиоксидантной защиты был восстановлен до исходного [28].

Экстракты зизифоры были испытаны на потенциальный цитотоксический эффект в развитии рака желудка клеточной линии и показали перспективную цитотоксическую активность [27]. Метанольный и этанольный экстракты зизифоры тонкой показали способность уменьшать горечь кофеина и проявили некоторую антиоксидантную активность, что делает ее перспективной пищевой добавкой [28]. Некоторые эксперименты также показали снижение активности водного экстракта зизифоры тонкой в процессе формирования наночастиц серебра [29].

#### **1.4 Химический состав как элемент структурно-логического обоснования «вещество- фармакологическая активность» растений рода Зизифора**

Исследования фитохимического состава растений рода Зизифора были в основном направлены на изучение компонентного состава эфирного масла. Помимо эфирного масла, виды зизифоры могут быть источниками флавоноидов, производных кофейной кислоты, жирных кислот, тритерпенов, стеролов и др. [1]. В литературе [30] есть данные о влиянии фазы вегетации на накопление и состав эфирного масла. Так, установлено, что содержание эфирного масла максимально в период цветения растения. Суммарное содержание флавоноидов также варьирует в зависимости от стадии вегетации. Аналогичные результаты были продемонстрированы в работах Razmjoue и Zarei (2015) [31] где указано, что накопление масла зависит от температуры, относительной влажности и высоты над уровнем моря. Среда обитания также

является фактором, влияющим на содержание соединений, присутствующих в эфирном масле зизифоры пахучковидной (исследования Jamzad и соавт. (2013) [32].

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии были идентифицированы диосмин, линарин и пулегон в сырье зизифоры пахучковидной [24].

**Эфирные масла.** Эфирные масла, являются наиболее изученной группой БАВ Зизифоры. Как и свойственно растениям семейства Губоцветных, эфирное масло зизифоры также преимущественно состоит из монотерпеновых соединений. Однако несколько сесквитерпеновых веществ и некоторые другие соединения также были идентифицированы в эфирном масле.

В литературе [33] указывается, что при получении эфирного масла из сырья зизифоры тонкой методом экстракции сверхкритической текучей средой (SFE) существенно увеличивается выход субстанции. Очевидно, что относительные соотношения компонентов варьируются в зависимости от часто встречающихся хемотипов в семействе губоцветных, факторов окружающей среды, географического происхождения, а также метода экстракции [34, 35, 36].

Обзор литературы [37] показал, что эфирные масла видов зизифоры богаты пулегоном и тимолом. Sonboli и др. [38] определили несколько хемоваров *Z. clinopodioides* подвида *rigida*, произрастающего в юго-западном районе Ирана (тип альпийские горы). Содержание эфирного масла в данном виде зизифоры колеблется в диапазоне от 0,12 до 0,98 мл / 100 г сырья. ГХ-МС анализ масла показал наличие пулегона (5,19% - 57,85%), лимонена (0,26% - 12,79%), 1,8-цинеола (до 27,4%), борнилового ацетата (0,47% - 9,37%), пиперитона (0,70% - 9,05%) и производных ментола [39]. Другое исследование показало, что масло *Z. clinopodioides* богато также карвакролом (52,7%), линалоолом (15,9%) и ментолом (14%) [40].

Эфирные масла - это почти всегда сложные смеси многих веществ, и, следовательно, их биологические эффекты это результат синергизма всех молекул, или они отражают основные направления деятельности молекул, которые присутствуют в доминантных концентрациях [41]. Кроме того, синергическое взаимодействие компонентов эфирного масла противодействует адаптационным способностям микроорганизмов, которые выражаются в поддержании мембранной функциональности в присутствии субингибирующих концентраций антибактериальных соединений [42]. Таким образом, обычно оценивается только биологическая активность эфирных масел в комплексе или их основных соединений. Как правило, основные соединения отражают биофизические и биологические характеристики эфирных масел достаточно хорошо [43], а проявление их эффектов зависит от концентрации [44,45]. Сложная смесь соединений, присутствующих в эфирном масле также сильно влияет на запах, толщину, текстуру, цвет и проницаемость [46], липофильное или гидрофильное притяжение и фиксацию на стенках мембран клеток и клеточное распределение [47]. Некоторые литературные



данные свидетельствуют о антагонизме отдельных компонентов эфирного масла [48,49].

В литературе антибактериальная активность различных видов Зизифоры часто обуславливается наличием эфирных масел. Так, эфирные масла, полученные из различных видов казахстанской зизифоры, обычно богаты кислородсодержащими монотерпенами. Их антибактериальное действие может быть связано с наличием этих соединений, однако этот эффект не является следствием содержания только окисленных монотерпенов. Отмечается [37, 49], что эфирные масла зизифоры пахучковидной эффективны как против грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Аналогичные результаты были представлены Salehi и др. (2005) [26], показывающие высокую активность эфирного масла зизифоры пахучковидной подвиды *rigida* против нескольких бактериальных штаммов (за исключением нечувствительной *P.aeruginosa*).

Тимол и пулегон показали частичную ответственность за антибактериальное действие эфирных масел растений рода Зизифора. Кроме того, исследования эфирных масел зизифоры пахучковидной подвиды Бунге, показали активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а пулегон и 1,8-цинеол были определены в качестве соединений, ответственных за данный эффект [50]. Отмечается высокое содержание пулегона, когда анализируется антибактериальная активность эфирных масел: он показал активность особенно в отношении *Candida Albicans* и *Salmonella Typhimurium*. Было установлено, что *C. Albicans* восприимчив к пулегону, который в два раза эффективнее нистатина [51,52].

В другом тесте [53] методом дисковой диффузии сравнивали антибактериальную активность эфирного масла и метанольного экстракта зизифоры пахучковидной по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям. Эфирное масло продемонстрировало более высокую активность по отношению ко всем видам бактерий.

В литературе [54] антибактериальный и антисептический эффекты эфирного масла зизифоры связывают с наличием карвакрола и тимола. Их синергетическое действие описано в литературе [55-56]. Карвакрол ингибирует образование бактериальной биопленки, которая служит одним из механизмов бактериальной устойчивости, а тимол взаимодействует как с внешними, так и с внутренними клеточными цитоплазматическими мембранами, приводит к ее повышенной проницаемости [57,58,59, 60]. Поэтому карвакрол и тимол оказывают синергический эффект, похожий на многие другие комбинации компонентов эфирных масел, активных против различных распространенных человеческих патогенов [61,62,63, 64]. Некоторые из этих комбинаций соединений с синергетической активностью ( н/рцимол и карвакрол), также присутствуют в эфирных маслах зизифоры. Синергетическая активность цимола и карвакрола основана на высокой родственности цимола к цитоплазматической мембране, и его прикрепление к мембране приводит к ее

расширению, изменяя ее потенциал, и способствует повышению ее чувствительности к действию карвакрола [65].

Синергетическую активность некоторых терпеноидов можно наблюдать и в отношении *Meloidogyne incognita* [49]. Синергетическая активность наблюдалась также у пулегон и периллового альдегида при разработке инсектицидов [66].

Следует отметить, что компоненты эфирных масел типа тимола и карвакрола могут выступать в качестве антагонистов, так как некоторые эфирные масла показали более низкую активность, чем их одиночные монотерпеновые компоненты [49]. Обзор Бассоле и Джулиани (2012) [67] показал некоторые примеры синергетической, дополнительной или даже антагонистической активности известных компонентов эфирных масел к различным видам бактерий.

Карвакрол и тимол часто упоминаются как ингибиторы роста пищевых патогенов. Эти патогенные микроорганизмы представлены, например, различными штаммами *Salmonella*, *Shigella*, *E.coli* или *Clostridium*. Активность эфирных масел зизифоры тонкой и зизифоры пахучковидной против пищевых бактерий была доказана Aliakbarlu и Shameli [68].

В литературе [69] сообщается о результатах сравнительного изучения антиоксидантной активности эфирного масла зизифоры пахучковидной и тонкой. Показано, что активность эфирного масла зизифоры пахучковидной выше, что дает возможность рассматривать данный вид зизифоры в качестве перспективных пищевых консервантов.

Гиполипидемическая активность ароматической воды, полученной путем диспергирования эфирного масла зизифоры тонкой в воде была доказана опытами на кроликах, с повышенным уровнем холестерина. Однако, уровни измеряемых параметров гиперхолестеринемии не были восстановлены до базальных данных [69].

Некоторые авторы отмечают, что компоненты эфирных масел, полученных из видов зизифоры, могут влиять на сердечно-сосудистую систему. Сердечно-сосудистая активность тимола, карвакрола, лимонена,  $\alpha$ -терпинеола, линалоола и ментола были отмечены Сантосом и соавт. (2011) [70]. Линалоол и 1,8-цинеол в эксперименте показали гипохолестеролевую активность путем ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы и синтеза холестерина [71,72]. Эндо-борнеол оказывает сосудорасширяющее действие на артериальные кольца грудной аорты крыс [73], а терпинен-4-ол - релаксанта́нный эффект на гладкие мышцы сосудов [74].

Некоторые компоненты эфирных масел зизифоры проявляют антиоксидантную активность, что было доказано как *invitro*, так и в естественных условиях. Например, было установлено, что монотерпеновый  $\alpha$ -терпинен, терпинолен [76,77], тимол [78], борнеол [78]), карвакрол [79], и сесквитерпеновый кариофиллен [80] обладают антиоксидантной активностью.

**Потенциальная токсичность.** Пулегон, с наличием которого обычно связывают токсическое действие масла так называемой болотной

мяты, присутствует во многих растениях семейства Губоцветных. В больших дозах он может привести к печеночной недостаточности, нарушениям в работе центральной нервной системы, гастриту, почечной и легочной патологиям, а в отдельных случаях и к летальному исходу [81,82]. Анализы, проведенные на мышах, показали его гепатотоксичность и легочную токсичность [83]. Токсический потенциал пулегона связан с его экстенсивным метаболизмом в печени, который включает в себя его окисление до ментофурана, п-крезола и других соединений. Эти соединения могут далее метаболизироваться и вызывать истощение глутатиона; затем они могут ковалентно связываться с белками и изменять их функции, вызывая повреждение клеток.

**Тритерпены и стероиды.** Существует не так много информации о тритерпенах, полученных из видов зизифоры, однако их присутствие подтверждено и некоторые результаты показали их относительно высокие концентрации. Основными тритерпеновыми соединениями, идентифицированными до настоящего времени в видах зизифоры, является олеаноловая кислота, урсоловая кислота и масляная кислота, вместе с даукостерином в качестве представителя растительных стероидов.

Олеаноловая и масляная кислоты являются представителями  $\beta$ -амирина. Оба эти соединения являются относительно распространенными в природе и являются активными компонентами многих растений с лекарственными свойствами. Олеаноловая и масляная кислоты и их производные часто используются в качестве компонентов в медицинских препаратах, воздействующих на сердечно-сосудистую систему. Эти соединения помогают бороться с различными, так называемыми, болезнями "цивилизации", например, сердечно-сосудистыми заболеваниями, включая атеросклероз и сахарный диабет, и даже онкозаболевания. Это возможно за счет их противовоспалительных и антиоксидантных свойств, а также цитозащитной и цитотоксической активности в зависимости от условий и типа клеток [83,84].

Урсоловая кислота, аналогично олеаноловой и масляной кислотам, может быть выделена из нескольких видов растений с сильнодействующими лекарственными свойствами. Подобно ранее упомянутым тритерпеновым кислотам, она показывает активность в лечении сердечно-сосудистых заболеваний и хронических воспалений.

В исследовании растений рода зизифора было установлено, что олеаноловая и масляная кислоты влияют на сердечно-сосудистую систему. Оба эти соединения работают против окисления ЛПНП, тем самым показывая антиатерогенные свойства. Олеаноловая кислота также вызывает релаксацию гладких мышц сосудов, действует как сильный антиоксидант и обладает гипогликемическими свойствами.

С наличием урсоловой кислоты в экстрактах зизифоры также связывают антибактериальный эффект, так как для нее была доказана активность против многочисленных грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая устойчивых к ванкомицину энтерококков и различные штаммы микобактерий

туберкулеза. Наблюдалась также некоторая противовирусная, антипаразитарная и противогрибковая активность [84].

Присутствием даукостерина в некоторых видах зизифоры [85,86]. обуславливается антимикробная активность в отношении кишечной палочки, золотистого стафилококка и бактерии хеликобактер пилори.

**Фенолы.** По данным литературы [4] сырье зизифоры пахучковидной было исследовано на предмет содержания фенольных соединений путем фракционной экстракции. Вещества фенольного характера (флавоноиды, фенольные кислоты и др.) были идентифицированы в этилацетатном экстракте. Из флавоноидных соединений в основном были идентифицированы агликоны (апигенин и лютеолин) и выделено только ограниченное количество гликозидов (диосмин и линарин).

В зизифоре тонкой были также идентифицированы специфические липофильные кислото-замещенные флавоны- зизифорин А и В [87].

Из фенолкарбоновых кислот в различных видах зизифоры были идентифицированы кофейная кислота и ее этиловый эфир, розмариновая, салициловая и бензойная кислоты, а также производные бензилового спирта.

В целом флавоноиды из травы зизифоры показали антиоксидантную, противовоспалительную и противоопухолевую активность. Некоторые флавоноиды показали также антибактериальную активность [4].

Антиоксидантная активность флавоноидных веществ зависит от расположения функциональных заместителей. В частности, количество и замена гидроксильных групп влияет на антиоксидантную активность, опосредованную взаимодействием радикалов и комплексообразованием ионов металлов. Флавоноиды способствуют ингибированию генерации активных форм кислорода воздействием на участвующие в их производстве ферменты, таких, как микросомальная монооксигеназа, глутатионная S-трансфераза, митохондриальная сукциноксидаза, NADH-оксидаза, и другие. С учетом высокого содержания полифенолов и флавоноидов наибольшая активность наблюдалась в этилацетатном экстракте [88]. Монотерпеновый глюкозид шизонепетозид А и флавоноиды апигенин, лютеолин и диосметин показали сильное ингибирующее действие на производство NO.

Экстракты зизифоры пахучковидной, которые имели высокую концентрацию полифенольных веществ, продемонстрировали сосудорасширяющую активность [89]. Можно допустить некоторую связь между структурой и активностью: наличие 4'-гидроксигруппы без метильного замещения у флавоноидов, и отсутствие постоянного замещения в положениях 5, 6 и 7 флавоноидной структуры по-видимому отвечает за сосудорасширяющее действие [90].

В целом, флавоноидные агликоны или метоксилированные и прениловые флавоноиды синтезируются растениями как часть защиты от микробной инфекции; поэтому они могут быть использованы для антимикробной терапии. Флавоноиды, выделенные из видов зизифоры, такие как хризин, акацетин или

тимонин, обладают антимикробным действием и являются компонентами прополиса, хорошо известного антимикробного материала. Флавоноиды с антибактериальным действием, скорее всего, обладают несколькими клеточными мишенями, а не одним конкретным полем действия. Одно из их действий на молекулярном уровне заключается в образовании комплекса с белками посредством неспецифического взаимодействия, такого как водородные связи и гидрофобные эффекты, а также за счет образования ковалентной связи. Таким образом, способ их антимикробного действия может быть связан с их способностью инактивировать микробные адгезины, ферменты, транспортные белки клеточной оболочки, и другие. Флавоноиды могут также приводить к разрушению микробных мембран. Таким образом, наличие ряда флавоноидов может внести свой вклад в общий антибактериальный эффект экстрактов зизифоры[4].

Эффективность метанольного экстракта, полученного из зизифоры пахучковидной для лечения воспалительного заболевания кишечника, испытывали на декстран-сульфатно-индуцированной модели колита у мышей. Было установлено, что уровни TNF- $\alpha$  и NO уменьшались, и уровень антиоксидантной защиты был восстановлен до исходного. Зизифора относительно богата флавоноидами, которые можно считать носителем противовоспалительного потенциала этого растения. Сообщается[46, 53,54, 82,79, 88, 89] что такие флавоноиды как хризин, апигенин, лютеолин и линарин обладают противовоспалительным действием.

Кофейная кислота и ее производные проявляют потенциальную противоопухолевую[91] и сердечно-сосудистую активность [92]. Этиловый эфир кофейной кислоты в эксперименте показал гипотензивную, антиоксидантную и противовоспалительную активности, которые могут обосновать использованием зизифоры в лечении сердечно-сосудистых патологий. Розмариновая кислота также эффективна в лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, хронических воспалений и рака[93,94]. .

### **1.5 Перспектива внедрения практики культивирования и заготовки сырья зизифоры Бунге в соответствии с требованиями Надлежащей практики культивирования и сбора лекарственных растений (GACP)**

Надлежащая практика культивирования и сбора лекарственных растений представляет собой первую стадию в обеспечении качества, от которого напрямую зависят безопасность и эффективность лекарственных средств растительного происхождения. Такая надлежащая практика также будет играть большую роль в области защиты природных ресурсов лекарственных растений в целях их рационального использования. Особенно важным это становится в современных экономических условиях интеграции и повышения требований к лекарственным препаратам. Таким образом, при культивировании лекарственных растений важно использовать научно обоснованные методики выращивания, следовать требованиям международных стандартов для получения ЛРС надлежащего качества[95]. Руководящие принципы ВОЗ по

надлежащей практике культивирования и сбора (GACP) лекарственных растений предназначены для обеспечения общего технического руководства в процессе культивирования и заготовки ЛРС[96].

Известно, что ранее проводилась работы по интродукции З. Бунге и разработаны рекомендации по ее выращиванию. В работе Бимурзаева [1] было проведено сравнительное изучение содержания БАВ зизифоры дикорастущей и культивируемой. Результаты данной работы показали, что культивируемая З. бунге по содержанию БАВ не уступает дикорастущей. Обзор литературы позволяет предположить, что З. Бунге перспективное сырье для культивирования и заготовки в соответствии с Надлежащей практикой культивирования.

### **Выводы по первому разделу**

В народной медицине растения рода Зизифора применяют для лечения многих заболеваний. З. Бунге и З. пахучкавидную используют для лечения сердечно-сосудистых и инфекционных патологий. Химический состав зизифоры типичен для представителей семейства Губоцветных и представлен эфирным маслом монотерпенового характера, фенольными веществами (флавоноиды и фенольные кислоты) и тритерпенами. Присутствие этих соединений с подтвержденной фармакологической активностью доказывает, что зизифора Бунге является потенциальным источником для получения лекарственных средств. Сырьевые запасы и способность к культивированию, опыт применения в народной медицине и богатый химический состав зизифоры Бунге дает возможность предположить перспективность воспроизводства отечественного сырья в промышленных масштабах в соответствии с международными стандартами, а также разработку и введение в официальную медицину новых, высокоэффективных, отечественных ЛП.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлась надземная часть растения зизифоры Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz.) (рисунок 1) собранная в июне - августе 2014г, в фенофазу цветения в высокогорных районах Алматинской области (растение идентифицировано в РГП «Институт ботаники и фитониринга» Республики Казахстан (справка №01-04/257 от 03 июля 2014 г., приложение А).

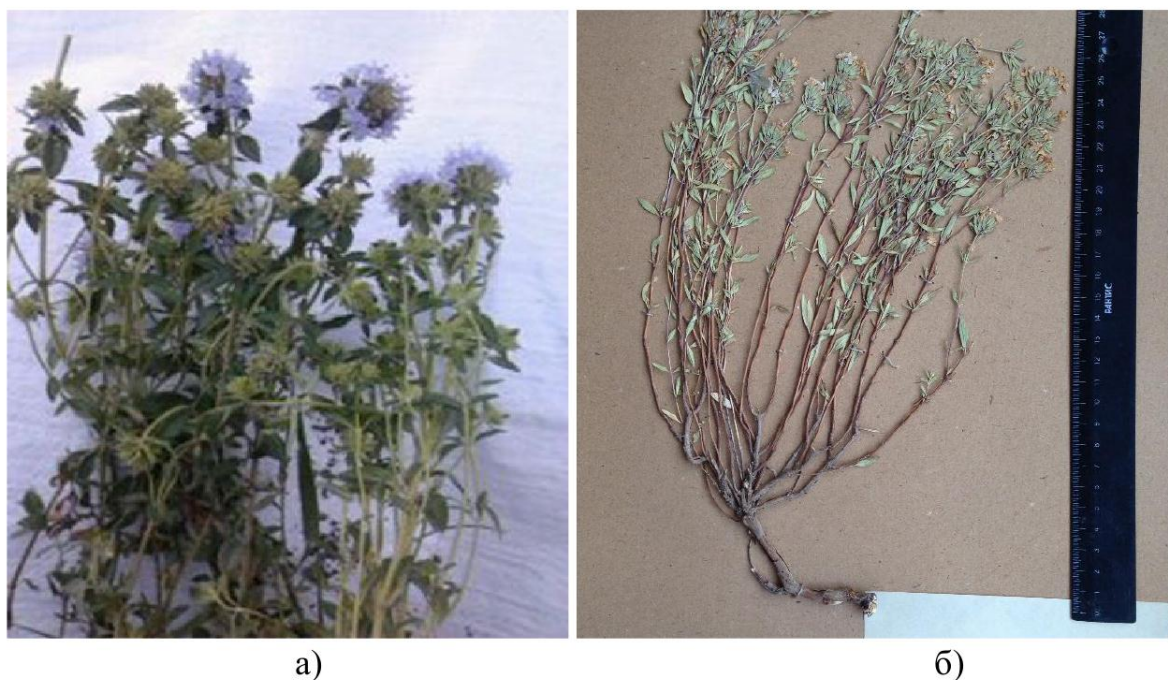


Рисунок 1- Внешний вид цветущих побегов (а), гербарный образец (б) *Ziziphora bungeana* Juz.

### 2.2 Методы исследования растительного сырья зизифоры Бунге

**Способ заготовки растительного сырья зизифоры Бунге.** Сбор и заготовку дикорастущего сырья Зизифоры Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz.) осуществляли в соответствии с Надлежащей практикой сбора лекарственных растений (GACP) в летний период [97] в предгорьях Джунгарского Алатау Алматинской области.

Заготавливали траву (стебли, листья и цветки), срезая ножом надземную часть растения на высоте 5-10 см от земли, применяя ручной способ сбора и очистки в регламенте времени с 7.00 до 10.00 часов. Сушку травы осуществляли на предприятии ТОО «ФитОлеум» в тени на специальных рамках при температуре окружающей среды  $28 \pm 5^\circ\text{C}$ , траву раскладывали слоями 10-15 см и периодически переворачивали. Готовность высушенного сырья определяли по характерному треску при изломе. Собранное сырье контролировали на содержание таких примесей как твердые частицы почвы, грязь, пыль, насекомые. Сырье упаковывали в мешки из крафт-бумаги по 10 кг,

наклеивая этикетку с указанием наименования сырья, места заготовки, времени сбора и массы нетто.

**Методы определения органографических и анатомических признаков травы З. Бунге.** Морфологическую группу растительного сырья З. Бунге определяли согласно Государственной фармакопее. ЛРС, представляющее собой высушенные или свежие надземные части травянистых растений (стебли с листьями, цветки, бутоны, зрелые и незрелые плоды) называются травами согласно ГФ РКІ, т. 1. При определении внешних признаков обращали внимание на строение стеблей, листьев, цветков и плодов, рассматривая их невооруженным глазом или с помощью лупы. В строении стебля отмечали характер и степень ветвления, форму поперечного сечения, характер опушения, размеры, листорасположение. Далее определяли строение листьев, цветков, плодов, тип соцветия. Цвет сухого сырья определяли при дневном освещении; запах — при растирании; вкус — пробуя кусочек сухого сырья или его отвар [98,99,100].

**Методы исследования фармако-технологических и фармакогностических параметров травы З. Бунге**

**Определение степени измельченности ЛРС** проводили согласно монографии ГФ РКІ, т. 1 «Определение степени измельченности лекарственного растительного сырья». Допустимая норма содержания измельчённых частиц для каждого вида сырья должна быть указана в соответствующей частной статье.

**Определение посторонних примесей в ЛРС.** Содержание посторонних примесей определяли согласно монографии ГФ РКІ, т. 1, 2.8.2., ЛРС не должно быть поражено плесенью и амбарными вредителями. Сырье проверяли на посторонние примеси путем визуального осмотра или с помощью лупы (6х). Посторонние примеси отделяли, взвешивали и рассчитывали содержание примесей в процентах.

**Определение тяжелых металлов в ЛРС.** Испытание проводят с использованием фармакопейного метода атомно-абсорбционной спектроскопии (ГФ РКІ, т. 1, 2.2.23 методы I, II).

**Методика определения радионуклидов в растительном сырье** Должно соответствовать требованиям «Гигиенических нормативов «Санитарно - эпидемиологические требования к обеспечению радиационной безопасности» от 27 февраля 2015 года № 155, утвержденные приказом Министра национальной экономики Республики Казахстан.

**Методика определения удельной массы.** Удельная масса представляет отношение массы абсолютно измельченного сырья к объему растительного сырья. 5,0 г сырья (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, заливали водой  $V_{на}$  2/3 объема и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 1,5 – 2 ч., периодически перемешивая с целью удаления воздуха. Далее колбу охлаждали до 20<sup>0</sup>С, доводили объем до метки водой  $V$ . Взвешивали колбу и определяли ее массу с сырьем и водой. Предварительно определяли вес колбы с водой. Удельную массу рассчитывали по формуле:



$$d_y = \frac{Pd}{P+G-F}(1)$$

где P – масса абсолютно сухого сырья, г;

G – масса колбы с водой, г;

F – масса колбы с водой и сырьем, г;

d – плотность воды, г/см<sup>3</sup> (d = 1.5124 г/см<sup>3</sup>).

**Методика определения объемной массы.** Объемную массу определяли как отношение недробленого сырья при определенной влажности до ее полного объема, который включает поры, трещины и капилляры, заполненные воздухом. В мерный цилиндр на 100млналивали 50 млводы P. 10,0 г недробленого сырья помещали в мерный цилиндр с водой Pи определяли объем, который занимает сырье.

Объемную массу рассчитывали по формуле:

$$d_o = \frac{P_o}{V_o}(2)$$

где P<sub>o</sub> – масса недробленого сырья при определенной влажности, г;

V<sub>o</sub> – объем, который занимает сырье (разница объемов), см<sup>3</sup>.

**Методика определения насыпной массы в г/см<sup>3</sup>** Насыпную массу (d<sub>н</sub>) определяли как отношение массы измельченного сырья при естественной влажности до занятого сырьем полного объема, который включает поры частиц и пустоты между ними. В мерный цилиндр помещают измельченное сырье, слегка встряхивают для выравнивания сырья, и определяют полный объем, который оно занимает. После этого сырье взвешивают. Насыпную массу рассчитывают по формуле:

$$d_H = \frac{P_H}{V_H} (3)$$

где P<sub>н</sub> – масса неизмельченного сырья при определенной влажности, г;

V<sub>н</sub> – объем, который занимает сырье, см<sup>3</sup>.

**Методика определения пористости сырья в г/см<sup>3</sup>** Пористость (П<sub>с</sub>) характеризует величину пустот внутри частиц сырья и определяется как отношение разницы между удельной массой (плотностью) и объемной массой к удельной массе. Пористость сырья рассчитывают по формуле:

$$П_c = \frac{d_y - d_o}{d_y} (4)$$

где d<sub>y</sub> – удельная масса сырья, г/см<sup>3</sup>;

d<sub>o</sub> – объемная масса сырья, г/см<sup>3</sup>.

**Методика определения порозности сырья в г/см<sup>3</sup>** Порозность (П<sub>ж</sub>) характеризует величину пустот между частицами растительного материала, определяется как отношение разницы между объемной и насыпной массами к объемной массе. Порозность сырья рассчитывают по формуле:

$$П_ж = \frac{d_o - d_H}{d_o} (5)$$

где  $d_0$  – объемная масса сырья, г/см<sup>3</sup>;  
 $d_H$  - насыпная масса сырья, г/см<sup>3</sup>.

**Методика опеределения свободного объема слоя сырья в г/см<sup>3</sup>.**  
Свободный объем (V) слоя характеризует относительный объем пустот в единице слоя сырья (пустоты внутри частиц и между ними) и определяется какое отношение между удельной массой и насыпной массой к удельной массе.

Свободный объем слоя рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{d_y - d_H}{d_y} \quad (6)$$

где  $d_y$  – удельная масса сырья, г/см<sup>3</sup>;  
 $d_H$  - насыпная масса сырья, г/см<sup>3</sup>.

**Методика определения коэффициента поглощения экстрагента.** По 5,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в мерные цилиндры и заливали экстрагентом (*вода* и *спирт Р* в различных концентрациях 30%, 50%, 70%, 96%) таким образом, чтобы сырье было покрыто полностью, и оставляли на несколько часов. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в другой мерный цилиндр и фиксировали количество полученного экстрагента.

Расчет коэффициента поглощения экстрагента проводили по формуле:

$$X = \frac{V - V_1}{P} \quad (7)$$

где V – объем экстрагента, которым заполняли сырье, см<sup>3</sup>;  
 $V_1$  – объем экстрагента, получили после поглощения сырья, мл;  
P – масса сухого сырья.

**Методика определения потери в массе при высушивании.** Определение потери в массе при высушивании проводили согласно фармакопейной методике ГФ РК I, т.1, 2.2.32

**Методика определения общей золы.** Содержание общей золы определено в соответствии ГФ РК I, т.1, 2.4.16.

**Методика определения золы, нерастворимой в кислоте хлороводородной.** Зола, нерастворимая в кислоте хлороводородной -это остаток, полученный после растворения сульфатной или общей золы в кислоте хлороводородной в пересчете на 100 г сырья. Определение проводили по фармакопейной методикой ГФ РК I, т.1, 2.8.

**Методика определения микробиологической чистоты.** Определение микробиологической чистоты проводили в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и т. 2, 2.6.13. Для категории 4 Вв 1 г допускается не более 10<sup>5</sup> бактерий и не более 10<sup>4</sup> грибов, не более 10<sup>3</sup> энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий; отсутствие бактерий рода *Escherichia coli* и *Salmonella*.

## **Метод определения эфирного масла из растительного сырья Зизифоры Бунге**

Выделение эфирного масла из ЛРС проводили путем перегонки с водяным паром согласно ГФ РК I, т.1, 2.8.12 (Метод 2).

### **2.3 Метод газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС)**

Исследования компонентного состава эфирного масла методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС)

Определение компонентного состава эфирного масла проводили на газовом хроматографе Clarus 580 (PerkinElmer) с масс-спектрометрическим детектором Clarus-SQ 8.

Приготовление пробы эфирного масла: около 25 мг (точная навеска) эфирного масла помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл *гексана P*, перемешивали до полного смешения масла и доводили до метки гексаном.

Хроматографические условия: колонка капиллярная Restek Rxi®-1 ms 0,25 мм x 30 м x 0,25 мкм, объем пробы 1,0 мкл, газ-носитель He (гелий), скорость газа-носителя 1 мл/мин, деление потока 1:25, температура колонки 40 °С, увеличение температуры с 2 °С/мин до 280 °С, температура испарителя – 280 °С, масс-спектрометрический детектор: температура – 240 °С, EI+ = 70 eV, время сканирования с 4 по 120 мин, режим сканирования ионов 39-500 м/з. Процентное содержание компонентов вычисляли автоматически, исходя из площадей пиков на хроматограмме. Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания с использованием библиотеки NIST.

### **2.4 Методики стандартизации фитосубстанции зизифоры Бунге**

**Описание.** Органолептические характеристики эфирного масла устанавливали согласно методике 1. ГФ РК I, т.1, 2.8.8

**Растворимость.** Определение растворимости эфирного масла проводили в соответствии с методикой в ГФ РК I, т.1, 2.8.10.

**Гистохимическая реакция на наличие эфирного масла.** При помещении поперечного среза черешка на 2-3 минуты в раствор *Судана III P*, эфирные масла окрашивались в зелёный цвет [101].

**Идентификация пулегона в эфирном масле методом тонкослойной хроматографии.**

Для ТСХ-анализа использовали хроматографические пластины марки C18 Silica TLC Plates w/UV 254 с сорбентом на основе силикагеля на подложке с закрепленным слоем на фольге из алюминия. После этого на линию старта наносили 20 мкл исследуемых образцов эфирного масла. После высушивания пластинку помещали в хроматографическую камеру с системой растворителей гексан *P*-этилацетат *P* (9:1) (рисунок 2). Когда фронт растворителей проходил 10 см от линии старта, пластину вынимали, высушивали и опрыскивали 1%-ным раствором ванилина в серной кислоте, после чего пластину нагревали при температуре 100-105 °С для проявления компонентов эфирного масла.

Идентификацию компонентов проводили под воздействием УФ-света по флюоресценции компонентов эфирного масла. Для пятен рассчитывали индекс  $R_f$ .



а)

б)

Рисунок 2- ТСХ-анализ эфирного масла З. Бунге. Раствор эфирного масла (а), хроматографическая камера (б)

**Относительная плотность.** Определение относительной плотности проводили согласно фармакопейной методике по ГФ РК I, т.1,2.2.5

**Показатель преломления.** Определение показателя преломления проводили в соответствии с методикой ГФ РК I, т.1,2.2.6

**Оптическое вращение.** Оптическое вращение эфирного масла определяли по методике согласно ГФ РК I, т.1,2.2.7,

**Кислотное число.** Кислотным числом называют количество калия гидроксида, в миллиграммах, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г испытуемого вещества. Определение проводили согласно методике ГФ РК I, т.1,2.5.1

**Пероксидное число.** Пероксидным числом называют количество миллимольэквивалентов активного кислорода, соответствующее количеству пероксидов, содержащихся в 1 кг испытуемого вещества. При отсутствии указаний в частной статье, используют метод описанный в ГФ РК I, т.1,2.5.5, метод А

**Вода в эфирных маслах.** Вода в эфирном масле определялась в соответствии с методикой ГФ РК I, т.1,2.8.5.

**Остаток после выпаривания эфирных масел.** Согласно ГФ РК I, т. 1, 2.8.9

**Жирные масла и осмолившиеся эфиры в эфирных маслах.** Жирные масла и осмолившиеся эфиры в эфирном масле определяли по методике в ГФ РК I, т.1,2.8.7

**Микробиологическая чистота эфирного масла.** В 1 мл препарата допускается наличие аэробных бактерий не более  $10^4$ , грибов (суммарно) не более  $10^2$ . В 1 мл препарата допускается наличие: энтеробактерий и других

грамотрицательных не более 100. В 1 мл препарата не допускается наличие *E.coli* в 1,0г, *Salmonella* в 10,0г, *Staphylococcus aureus* в 1,0г ГФ РК I, т. 1, 2.6.12.

### **Методики стандартизации густого экстракта 3. Бунге**

**Описание.** Органолептическую характеристику густого углекислого экстракта 3. Бунге устанавливали согласно методике в ГФ РК I, т.1, 2.8.8.

**Растворимость.** Определение растворимости густого углекислого экстракта проводили в соответствии с методикой в ГФ РК I, т.1, 2.8.10.

**Идентификация** линоленовой кислоты, пулегона, пальмитиновой кислоты и  $\beta$  - ситостерола проводилась методом газовой хроматографии-масс-спектрометрией ГФ РК I, т.1, 2.8.28,.

**Относительная плотность.** Определение относительной плотности проводили согласно фармакопейной методике ГФ РК I, т.1, 2.2.5.

**Показатель преломления.** Определение показателя преломления густого углекислого экстракта проводили в соответствии с методикой ГФ РК I, т.1, 2.2.6

**Кислотное число.** Определение проводили согласно методике ГФ РК I, т.1, 2.5.1

**Йодное число.** Йодное число в экстракте определено согласно методике в ГФ РК I, т.1, 2.5.4.

**Число омыления.** Число омыления в экстракте определяли по методике ГФ РК I, т.1, 2.5.6

**Определение тяжелых металлов.** Содержание тяжелых металлов в экстракте устанавливали по методике ГФ РК I, т.1, 2.4.8 *метод А*.

**Микробиологическая чистота.** Микробиологическую чистоту густого углекислого экстракта устанавливали согласно методике ГФ РК I, т.1, 2.6.12.

**Количественное определение.** Количественное определение компонентов густого углекислого экстракта 3. Бунге проводили с использованием метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии ГФ РК I, т.1, 2.8.28.

Определение компонентного состава экстракта проводили на газовом хроматографе Clarus 580 (PerkinElmer) с масс-спектрометрическим детектором Clarus-SQ 8. Для обработки экстракта использовали следующую методику: в образец добавляли 5-10 мл 95%-ного *этилового спирта Р* и замораживали при температуре -20 °С в бытовом холодильнике в течение 1 часа. Замороженный экстракт отфильтровывали от липофильных балластных веществ на бумажном фильтре при обычном давлении. Полученные пробы разводили *этиловым спиртом Р* 1:5 и вводили в газовый хроматограф для качественного и количественного определения компонентов. Условия хроматографирования см. п.2.3.1.

## **2.5 Методы токсико-фармакологических исследований фитосубстанции 3. Бунге**

Изучение антимикробной активности проводили в «Национальном центре исследований природных веществ», школы Фармации, университета Миссисиппи (США), методом *invitro*[102]. Биологический скрининг образцов эфирного масла на антибактериальную и антигрибковую активность проводили по отношению к следующим видам микроорганизмов, представленных в таблице 1. Все микроорганизмы были получены из Американской коллекции типовых культур (Манассас, штат Вирджиния) и протестированы с использованием модифицированных версий методов CLSI (Институт клинических и лабораторных стандартов).

Таблица 1 – Виды микроорганизмов, по отношению к которым изучалась антибактериальная и антигрибковая активность

Бактерии	Грибы
1	2
<i>Staphylococcus aureus</i> 29213 (SA)	<i>Candida albicans</i> 90028 (Ca)
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSa) 33591 (MPC)	<i>Candida glabrata</i> 90030 (Cg)
<i>Escherichia coli</i> 35218 (Ec)	<i>Candida krusei</i> 6258 (Ck)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 (Pa)	<i>Aspergillus fumigatus</i> 204305 (M)
<i>Mycobacterium intracellulare</i> 23068 (Mi)	<i>Cryptococcus neoformans</i> 90113 (Cp)

Антимикробный скрининговый тест заключается в способности образцов ингибировать рост изучаемых видов микроорганизмов. Для всех организмов, за исключением *M. intracellulare* и *A. fumigatus*, оптическая плотность использовалась для контроля роста[103,104]. Питательная среда, дополненная 5 % Alamar Blue™ (Biosource International, Камарильо, штат Калифорния) применялась для обнаружения роста *M. intracellulare*[102] и *A. fumigatus*[105]. Образцы последовательно растворяли в 20% диметилсульфоксида (ДМСО), разводили солевым раствором и переносили по 10 мкл в 96 луночные плоскодонные планшеты в 2-х повторностях. Инокуляты готовились коррекцией OD630 микробных суспензий в инкубирующем бульоне. Для анализа в объеме 200 мкл и окончательном целевом инокуляте из: *Candida spp.*, *C. neoformans* и 1,5 X 10<sup>3</sup>, *M. intracellulare*: 2.0 X 10<sup>6</sup>, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*: 5.0 X 10<sup>5</sup> КОЕ / мл, *A. fumigatus*: 2,7 x 10<sup>4</sup> КОЕ / мл. Конечные концентрации исследуемых образцов составили 1/100 исходной концентрации ДМСО.

В качестве референс-образцов для тестирования антибактериального действия использовали ципрофлоксацин (ICN Biomedicals, штат Огайо), а для

анализа противогрибковой активности - амфотерицин Б (ICN Biomedicals, Огайо). Контроль роста микроорганизмов проводили при  $\lambda=530$  нм с использованием Biotek Power Wave XS ридера (Bio-Tek Instruments, Вермонт) и  $\lambda=544\text{ex}/590\text{em}$ , (для *M. intracellulare*, *A. fumigatus*), используя планшетный ридер Galaxy Polarstar (BMG Lab Technologies, Германия) до и после инкубации. Параметры инкубации следующие: *Candida spp.* при 35°C 46-50 ч; *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, и *P. aeruginosa* при 35°C 16-20 ч; *C. neoformans* при 35°C 70-74 ч; *A. fumigatus* при 35°C 46-50ч; *M. intracellulare* при 37°C и 10% CO<sub>2</sub> в течение 70-74 ч.

ИК<sub>50</sub> (концентрации, ингибирующие 50 % роста колоний микроорганизмов по сравнению с контролем) рассчитаны с использованием программного обеспечения XLfit 4.2 (IDBS, Alameda, CA), модель 201.

При первичном скрининге в двух повторностях тестируют образцы в концентрации 50 мг/мл и затем считают % соотношения положительного и отрицательного ингибирования. В случае, когда образец показывает больше 50% ингибирования, он переходит ко второму этапу скрининга.

При вторичном скрининге образцы (экстракт и некоторые фракции колонки) растворяют в концентрации 20 мг/мл и тестируют 200, 40, 8 мг/мл ИК<sub>50</sub> (концентрация ингибирования) против всех 10 микробных штаммов. Также образцы растворяют (чистые соединения и некоторые фракции колонки) в 2мг/мл и тестируют 20, 4, 8 мг/мл и ИК<sub>50</sub> тестируют против всех 10 микроорганизмов.

Чистые соединения, показавшие ИК<sub>50</sub> более  $\leq 7$  мг/мл тестируются в два раза разбавленных дубликатах: 20, 10, 5 ... мкг/мл.

**Изучение способности связывать каннабионидные и опиоидные рецепторы.** Активность связывания каннабионидных и опиоидных рецепторов была определена *in vitro* методом CORE (TheCenterofResearchExellenceinNaturalProductsNeuroscience) в «Национальном центре исследования природных веществ», школы Фармации, университета Миссисипи (США). Экстракты тестировали на активность блокирования каннабионидны (CB1, CB2) и опиоидных ( $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ) рецепторов.

**Реагенты.** Буферные реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). Все радиолиганды и MicroScint были приобретены у PerkinElmer (Waltham, MA). Немеченый контроль был приобретен у TocrisBioscience (Миннеаполис, Миннесота). Мембранные препараты были приготовлены в буфере Трис - (гидроксиметил) - аминотетан- кислота хлороводородная (50нМ Трис-НCl), рН 7,4. Разведения мембраны, радиолиганда и контроля (тестируемых соединений) были сделаны в буфере Трис для опиоидных рецепторов и Трис - (гидроксиметил) - аминотетан - ЭДТА (50 мМ Трис-НCl, 20 мМ ЭДТА, 154 мм натрия хлорида и 0,2% жирной кислоты БСА (Бычий сывороточный альбумин), рН 7,4, для каннабионидных рецепторов.

**Культура клеток.** Клетки НЕК 293 (HumanEmbryonicKidney) (ATCC, Manassas, VA) стабильно трансфицировали с помощью электропорации,

полноразмерными рекомбинантной ДНК человека (OriGene, Rockville, MD) для подтипа каннабиноидных рецепторов 1 и 2. Эти клетки выдерживали температуру 37°C и 5% содержание углекислого газа в среде Дульбекко (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium) и HAMF-12 питательной смеси (50:50), с добавлением 2 mM L-глутамин, 10% бычьей сыворотки, 1% пенициллина-стрептомицина и раствором антибиотика G418. Клетки HEK293, стабильно трансфицированные к опиоидным рецепторы подтипа  $\delta$ ,  $\mu$ , и  $\kappa$  были использованы для выполнения анализа связывания опиоидных рецепторов. Эти клетки выдерживали температуру 37°C и 5% содержание углекислого газа в питательной смеси DMEM, дополненной 2 mM L-глутамин, 10% бычьей сывороткой, пенициллин-стрептомицина и раствором антибиотика G418.

**Подготовка мембран.** Клетки подвергали лизису и соскабливали в холодном Трис - (гидроксиметил) - аминметан - кислотахлороводородная, pH 7,4, а затем центрифугировали при 5200 об/мин в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатант отбрасывали и осадок ресуспендировали в том же самом буфере и гомогенизировали с помощью Звукового дисмембратора 100 (FisherScientific, Питтсбург, штат Пенсильвания), в течение 30 секунд, а затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатант сливали и осадок проходил процесс диспергирования и гомогенизации еще 2 раза при тех же условиях. Супернатанты объединяли и центрифугировали при 23300 об/мин в течение 40 мин при температуре 4°C. Осадок ресуспендировали в том же холодном буфере, аликвоты разливали по 2 мл во флаконы и хранили при -80 ° C. Общая концентрация белка определялась с использованием набора для анализа белков PierceBCA (ThermoScientific, Rockford, IL), используя инструкцию производителя.

**Анализ связывания рецептора радиолиганда.** Этот тест предназначен для использования ряда элементов управления для определения аффинности связывания испытуемых соединений с использованием 96-луночного формата. 10мм положительного контроля [CP55,940 (CB1, CB2), U-69593 ( $\kappa$ ), DPDPE ( $\delta$ ), или DAMGO (D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkephalin) ( $\mu$ ) используется для установления величины неспецифического связывания (NSB). 1% ДМСО в Трис - ЭДТА буфер используется для установления общего связывания. Для того, чтобы исключить возможность загрязнения в исследуемых соединений, контроля или радиолиганда, были протестированы лунки с 1% ДМСО, не имеющие мембраны. Каждый тест хорошо содержал 50 мкл соответствующего радиолиганда ([<sup>3</sup>H] -CP-55940 (CB1, CB2), [<sup>3</sup>H] -U-69593 ( $\kappa$ ), [<sup>3</sup>H] -DAMGO ( $\mu$ ) или [<sup>3</sup>H] -Enkephalin ( $\delta$ )), 50 мкл соединения, контроля или связывающего вещества и клеточной мембраны 100 мкл.  $K_d$  для лигандов каждого рецептора был создан с помощью оценки мембраны и насыщения связывания эксперимента. Для обработки результатов эксперимента 1-15мм мембраны инкубировали с 1 нМ соответствующего радиолиганда. 10мм немеченого положительного контроля было установлено для неспецифического связывания, 1% ДМСО в буфере используется для установления общего связывания. Итого, специфические и неспецифические были использованы для



расчета связывания немеченого контроля с рецептором. Концентрация мембраны проявляет хорошее связывание (> 50%) и полное связывание с высоким отношением сигнала (тысячи СРМ) использовали в качестве оптимальной концентрации мембраны для анализа. Для анализа насыщения, оптимальная концентрация мембраны и 0.5-10нМ его соответствующего радиолиганда инкубировали с 10мм из немеченого положительного контроля (NSB), или 1% ДМСО в буфере (общее связывание). Данные анализировали с помощью нелинейной аппроксимации кривой модели с использованием программы GraphPadPrizm 5,04 программное обеспечение (GraphPad, LaJolla, CA) была рассчитана и величина Kd.

Для общего скрининга, оптимальной концентрации мембраны и радиолиганда определяли из анализа насыщения, инкубировав с 10мм (очищенный) или 10 мл (экстрактами / фракции) испытуемого соединения. Эти образцы инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре в течение опиоидных рецепторов или 90 минут при температуре 37°C и при мягком помешивании каннабиноидных рецепторов. Реакцию останавливали с помощью быстрой фильтрации с холодным буфером Трис-НСl через UNIFILTERGF / В (опиоиды) или GF / С (каннабиноидов) 96-луночная плашка предварительно пропитанная 0,3% бычей сывороткой альбумина. Когда фильтры просохли, MicroScint (Cat # 6013621, PerkinElmer) был применен к каждому фильтру, и плашки считывали на TopCountNXTHTScинтилляционного счетчика для микроплашек (PerkinElmer, Waltham, MA), где были записаны число импульсов в минуту (СРМ). Неспецифическое связывание вычитают из общего связывания, чтобы найти специфическое связывание. Процент ингибирования определяли с помощью следующего уравнения:

$$\% \text{ ингибирование} = 100 - \left( \frac{\text{соединение.СРМ} - \text{неспецифические.СРМ}}{\text{специфические.СРМ}} * 100 \right) \quad (8)$$

### **Методы токсикологических исследований фитосубстанции 3. Бунге**

Проект исследования с использованием животных был одобрен Локальной Этической Комиссией КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова (выписка из протокола заседаний ЛЭК №1 от 27.01.2016.) в соответствии с законодательством Республики Казахстан. Эксперименты проводились совместно с сотрудниками лаборатории фармакологии и НИИ фундаментальной и прикладной медицины имени А. Атчабарова при КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова.

Исследования сенсibiliзирующего и местно-раздражающего действия эфирного масла 3. Бунге проведены в соответствии с общей методикой, описанной в "Руководстве для доклинических исследований новых фармакологических веществ" под редакцией Миронов [106].

**При исследовании местно-раздражающего действия эфирного масла 3. Бунге** использовали кроликов (6 животных) массой 2,5-3 кг.

Для исследования был использован 10% раствор экстракта в растительном масле. В качестве контрольного субстрата использовали чистое растительное масло.

Исследование было проведено с помощью конъюнктивальных проб, используя подконъюнктивное введение разведенного эфирного масла. 1 каплю исследуемого раствора наносили с помощью шпателя на переходную зону слизистой оболочки конъюнктивы и луковицы правых глаз, с левой стороны подконъюнктивально вводили 1 каплю чистого растительного масла. После введения вещества слезно-носовой канал во внутреннем углу глаза зажимали пальцем в течение 1 мин. Применение вещества было произведено один раз. Визуальное наблюдение состояния конъюнктивы в месте имплантации лекарственных форм проводили сразу же после введения в течение 15 минут, а затем с интервалами 6 часов до 48 часов. Повреждающее действие эфирного масла на слизистую оболочку глаза кролика оценивали по степени гиперемии и отека по балльной системе.

**Исследование сенсibiliзирующего действия эфирного масла** было проведено на 12 светлоокрашенных морских свинок. Животные были разделены на 2 группы - экспериментальную и контрольную по 6 животных в каждой.

Проводили перкутанную сенсibiliзацию исследуемым веществом. За один день до эксперимента, шерсть животных тщательно сбривают по бокам с обеих сторон. Размер исследуемой поверхности кожи составил 5-8% от тела животного. 5% раствор экстракта в растительном масле в количестве 3 капли наносили на кожу в течение 4-х недель (5 раз в неделю).

Животные контрольной группы получали накожно растительное масло в том же объеме.

Определение эффекта сенсibiliзации было сделано на 10-й и 20-й день с помощью конъюнктивальной пробы, используя подконъюнктивное введение 1 капли 1% раствора эфирного масла наносили с помощью шпателя в переходной зоне слизистой оболочки конъюнктивы и луковицы глаз морских свинок. После введения вещества в течение 1 мин. слезно-носовой канал во внутреннем углу глаза был зажат. Применение вещества было произведено один раз. Визуальное наблюдение состояния конъюнктивы в месте имплантации лекарственных субстанций проводили в течение 15 минут, а затем с интервалами в 6 часов до 48 часов. Повреждающее действие эфирного масла на слизистую оболочку глаза кролика оценивали по степени гиперемии и отека по балльной системе:

- 1 балл - незначительное покраснение слезного протока;
- 2 балла – покраснение слезного протока и склеры, направленной на роговицу;
- 3 балла - покраснение всей конъюнктивы и склеры.

**Изучение острой токсичности густого углекислого экстракта З.Бунге при энтеральном введении** проведено на белых мышах (массой 18-25 г) в

количестве 30, которым натошак однократно вводили разведенный в растительном масле экстракт в количестве 1 мл, в пересчете 0,01 г (1% раствор), 0,02 г (2% раствор), 0,04 г (4% раствор) и 0,1 г (10% раствор) экстракта. В каждой группе было по 6 мышей, 1 контрольная группа мышей получала чистое растительное масло без дополнительных компонентов. Перед экспериментальной работой животные прошли двухнедельный карантин и содержались на стандартном рационе вивария. Исследуемое вещество вводили энтерально с помощью зонда. В течение 2-х недель исследовали общее состояние животных, их внешний вид, поведение, динамику веса. На 14 сутки после введения экстракта было проведено вскрытие исследуемых животных с последующим гистологическим исследованием биопсийного материала (ткани печени, почек, желудка). Эвтаназия была проведена методом передозировки эфира для наркоза. Кусочки тканей органов фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили по спиртам восходящей концентрации. Препараты окрашивали по стандартной методике гематоксилин-эозином.

**Для определения острой токсичности густого экстракта 3. Бунге при местном применении** воспроизведен эксперимент на беспородных белых мышах, которые содержались на рационе вивария. Введение вещества проводилось местно путем втирания 2 мл препарата в сбритые участки кожи однократно. Животные были разделены на 3 группы по 6 животных в каждой группе:

1 – контрольная группа

2 – животные, которым втирался препарат в дозе 0,1 г (10% масляный раствор).

3 – животные, которым препарат втирался в кожу в дозе 0,04 г (4% масляный раствор).

В течении 14 дней наблюдали за общим состоянием животных, в конце эксперимента животных вскрывали и проводили морфологическое исследование тканей.

## **2.6 Методы оценки качества адгезивной дентальной пасты с маслом 3. Бунге**

Параметры качества адгезивной дентальной пасты определяли в соответствии ГФ РК I, т. 1, общая статья «*Мягкие лекарственные средства для местного применения*».

**Описание**, проводили визуально, согласно ГФ РК I, т. 1, общая статья «*Мягкие лекарственные средства для местного применения*».

**Идентификацию** проводили в соответствии ГФ РК I, т. 1, 2.2.27. «*Тонкослойная хроматография*»

**рН** определен потенциометрический в соответствии ГФ РК I, т. 1, 2.2.3. **Микробиологическая чистота** проверена согласно ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и т.2, 2.6.13, статья 5.1 .4 категория 2.

**Количественное определение** активного вещества – пулегон проводили согласно ГФ РК I, т. 1, 2.2.28. ГЖХ.

### 3 СТАНДАРТИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ 3.БУНГЕ

#### 3.1 Заготовка травы зизифоры Бунге

Сбор надземной части растений зизифора Бунге осуществлялось в высокогорном районе Алматинской области, в предгорьях Джунгарского Алатау, в фазе цветения (июнь-август) 2014г-2015гг. Заготавливали траву (стебли, листья и цветки), срезая надземную часть растения на высоте 5-10 см от земли, с помощью ножа, в регламенте времени с 7.00 до 10.00 часов. Сушку травы осуществляли на производственной площадке предприятия ТОО «ФитОлеум» в тени на специальных рамках при температуре окружающей среды  $28 \pm 5^\circ\text{C}$ . Траву раскладывали слоями 10-15 см и периодически переворачивали. Окончание сушки сырья определяли по характерному треску при изломе. Собранное сырье просеяли через сито для удаления обесцвеченного, заплесневелого и поврежденного сырья, а также почвы, камней и других посторонних веществ. Идентификацию лекарственного растительного сырья проводили по макроскопическим и микроскопическим признакам в соответствии требованиям ГФ РК. Сырье упаковывали в мешки из крафт-бумаги по 10 кг, наклеивая этикетку с указанием наименования сырья, места заготовки, времени сбора и массы нетто. Технологическая схема заготовки сырья представлена на рисунке 3.



Рисунок 3 - Технологическая схема заготовки сырья зизифоры Бунге

### 3.2 Органографические и анатомические диагностические признаки **З. Бунге**

Органографические (макроскопические) признаки травы зизифоры Бунге. Стебли простые или мало ветвистые жестковатые, тонкие, прямые (иногда изогнутые), густо опушены очень короткими, назад отогнутыми волосками, особенно в верхней частей стеблей. Стебель четырехгранный. В нижней части стебли одревесневают, что характерно для семейства Яснотковых[3].

Листья длиной 0,5-1,5 см, шириной 1,5-6 мм, узколанцетные или яйцевидные, суженные к обоим концам, остроконечные, цельнокрайние, опушенные с обеих сторон, с точечными железками, 2-3 жилками с каждой стороны, снизу обычно сильно выдающимися. Черешки до 4-х мм длиной, густо опушенные очень короткими волосками. Прицветные листья мельче, чем стеблевые, часто линейно-ланцетные, приподнятые кверху или горизонтально отстоящие, без ресничек по краю (Рисунок 4).

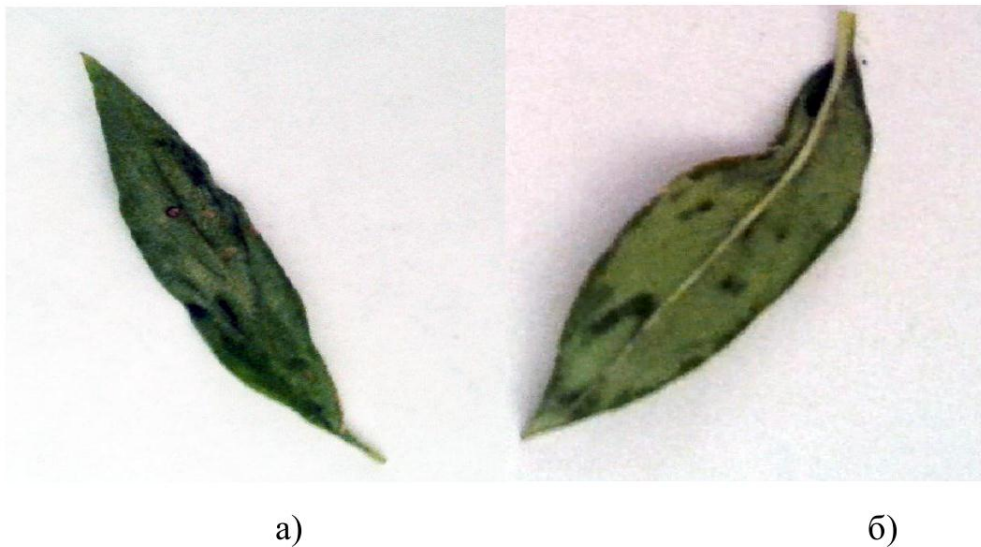


Рисунок 4- Лист зизифоры Бунге: абаксиальная (а) и адаксиальная (б) стороны

Цветки мелкие, собраны на верхушке стеблей и ветвей в немногочисленные ложные мутовки, (головчатые, полушаровидные, рыхловатые соцветия), цветоножки короткие до 1,5 – 3 мм длиной. Цветки сложные, состоят из чашечки и венчика. Чашечка короткая и узкая, длиной до 5 мм, седоватая от густого опушения короткими волосками. Зубцы чашечки острые, во время цветения часто оттопыренные. Венчик небольшой с едва выдающейся расширенной кверху трубкой без опушения, розового или бледно-лилового цвета. Трава имеет приятный, ароматный запах (рисунок 5).



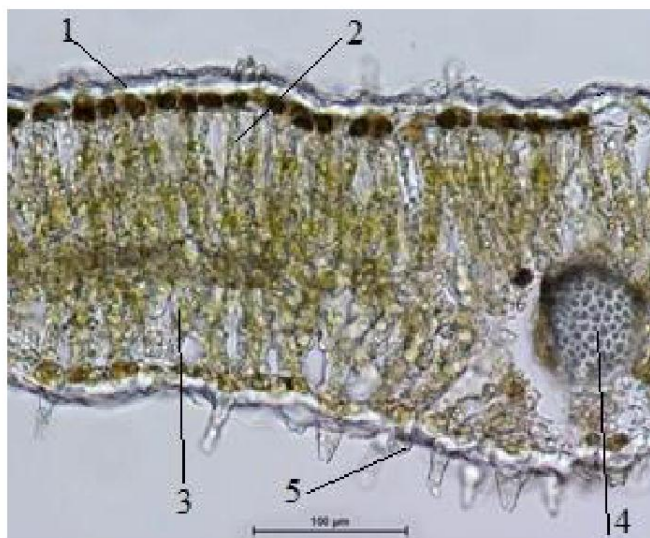
а)

б)

Рисунок 5- Соцветие (а) и отдельные цветки (б) Зизифоры Бунге

Микроскопические признаки травы зизифоры Бунге.

**Лист.** Листовая пластинка дорсовентрального типа. Устьица находятся на обеих сторонах листовой пластинки отражая её амфистоматическое строение. Палисадная ткань состоит из вытянутых в длину клеток, которые располагаются в 3-4 ряда. Столбчатый мезофилл представлен 2 рядами хлорофиллоносных клеток. Губчатый мезофилл имеет клетки изодиаметрической формы с крупными межклетниками. Проводящий пучок коллатерального типа, вокруг которого располагается склеренхимная обкладка (Рисунок 6).



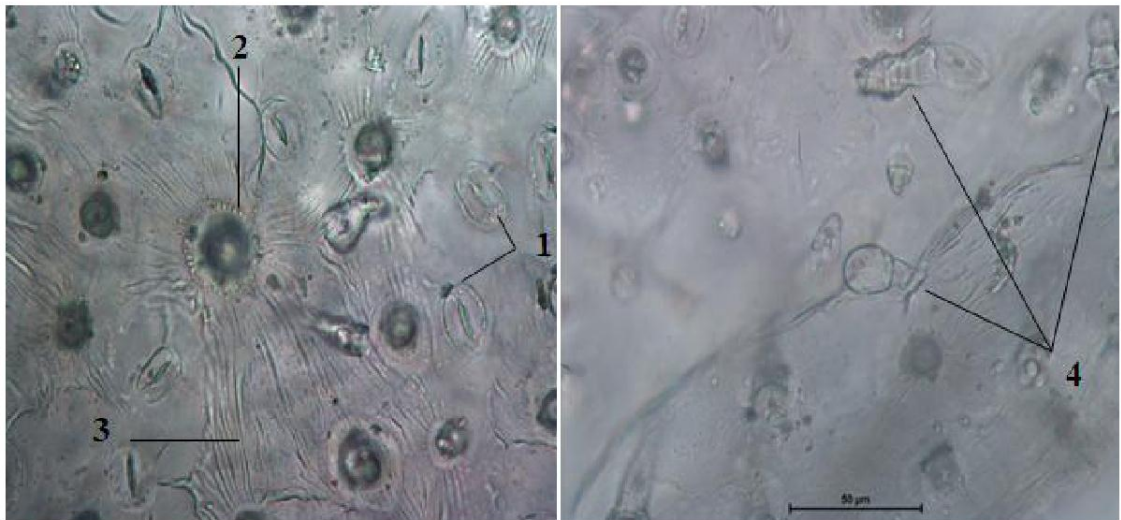
1 – верхний эпидермис, 2 – столбчатый мезофилл, 3 – губчатый мезофилл, 4 – склеренхимная обкладка проводящего пучка, 5 – желёзка на нижнем эпидермисе

Рисунок6- Поперечный срез листа зизифоры Бунге

*Верхний эпидермис.* Клетки верхнего эпидермиса листа многоугольные, иногда с четковидным утолщением стенок, плотно сомкнутые, по форме паренхимные. Устьица диацитного типа - количество околоустьичных клеток 2, которые расположены перпендикулярно устьичной щели (рисунок 7а). На поверхности эпидермиса часто встречаются крупные эфиромасличные железки, которые состоят из восьми радиально расположенных выделительных клеток с общей кутикулой (характерный признак семейства Яснотковых) (рисунок 7б). Клетки эпидермиса вокруг места прикрепления эфиромасличной железки расположены радиально и имеют характерную складчатость (рисунок 8). Присутствуют железистые трихомы с одноклеточной ножкой и одноклеточной овальной головкой (рисунок 7б) и простые трихомы двух типов (рисунок 7):

1. простые 2-3-х клеточные волоски с грубо бородавчатой поверхностью с утолщением в местах соприкосновения клеток. Иногда волоски «коленчатые» (верхняя клетка находится под углом к остальным).

2. Простые одноклеточные волоски треугольной формы (сосочковидные), тонкостенные с грубо бородавчатой поверхностью.



а)

б)

1-устьица; 2-место прикрепления волоска; 3- складчатость кутикулы; 4-трихомы.  
Рисунок 7-Верхний эпидермис листа зизифоры Бунге: внешний вид (а) и трихомы (б) (препарат с поверхности)

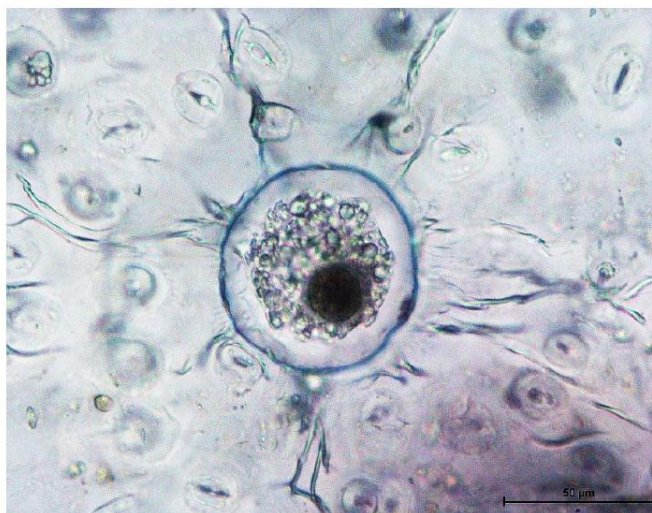
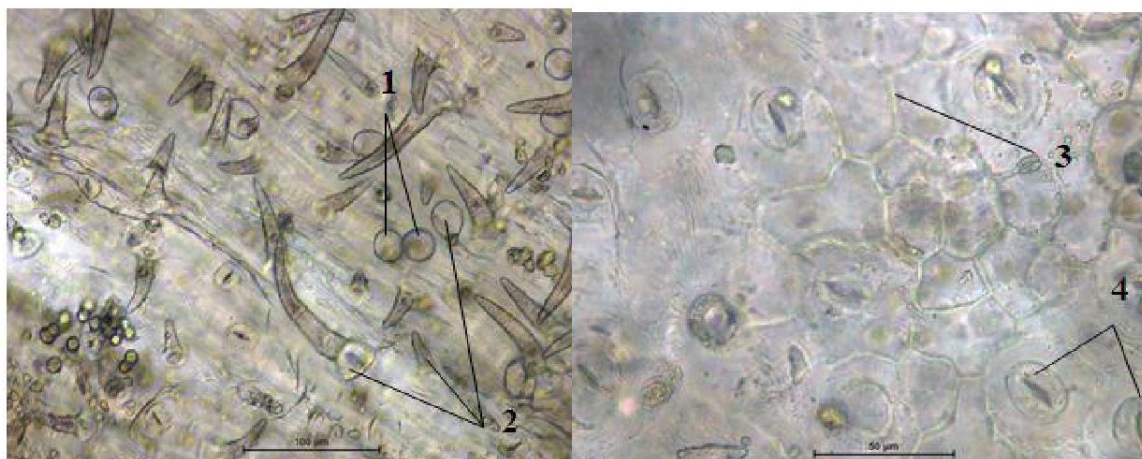


Рисунок 8- Эфиромасленичная железка

*Нижний эпидермис* отличается большей извилистостью оболочек эпидермальных клеток и большим количеством устьиц аналогичных по строению устьицам верхнего эпидермиса - диацитного типа. Строение железок, железистых и простых трихом аналогично верхнему эпидермису. Трихомы многочисленные (рисунок 9).



1-железки; 2-трихомы различных типов; 3-четковидное утолщение клеточных стенок; 4-устьица

Рисунок 9- Нижний эпидермис листа зизифоры Бунге (препарат с поверхности)

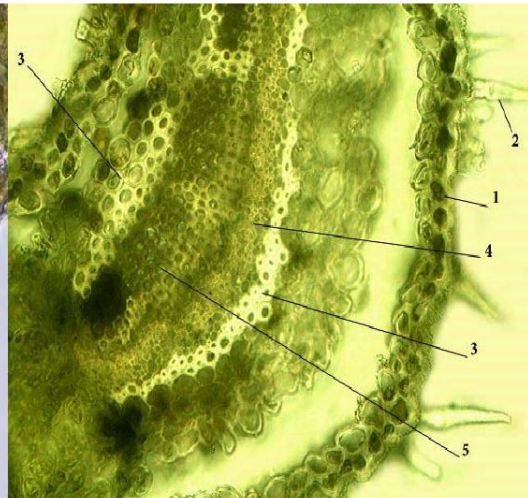
*Центральная жилка.* Эпидермис над жилкой без устьиц с одноклеточными трихомами по форме подобными трихомам верхнего эпидермиса. Центральная жилка однопучковая, с верхней стороны слегка выпуклая, с нижней стороны – удлиненная (рисунок 10). Пучок занимает центральное положение. Пучок закрытый, коллатеральный. Характерно незначительное развитие механических тканей, которые представлены



склеренхимой, окружающей ксилему и флоэму. Паренхимные клетки пучка очень крупные, тонкостенные (рисунок 11). Имеется две боковые жилки по размеру значительно меньше центральной.



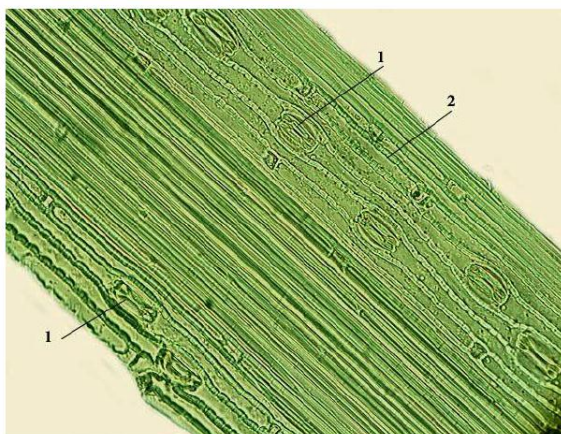
Рисунок 10- Центральная жилка  
листа зизифоры Бунге  
(поперечный срез)



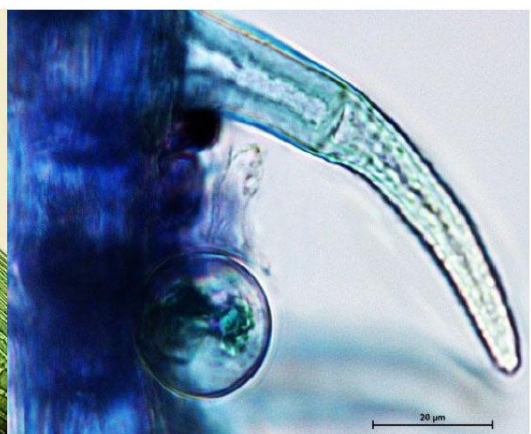
1-эпидермис, 2- трихома, 3-  
склеренхима, 4- флоэма, 5-ксилема

Рисунок 11-Поперечный срез жилки  
листовой пластинки зизифоры Бунге  
(x720)

**Стебель.** Эпидермис стебля состоит из удлинённых клеток, иногда с четковидным утолщением клеточных стенок. Присутствуют устьица диацитного и анизоцитного типа (в отличие от эпидермиса листовой пластинки) (рисунок 12а). Трихомы представлены 1-2-х клеточными волосками с грубо бородавчатой поверхностью, по строению аналогичными трихомам листовой пластинки. Присутствуют эфиромасличные железы (рисунок 12б).



а)

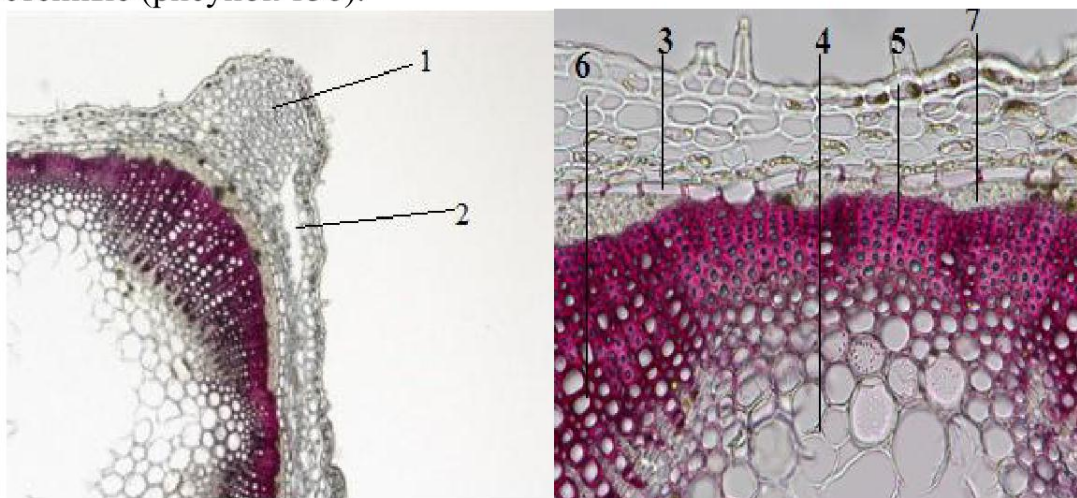


б)

1 – устьица; 2-клетки эпидермиса с четковидным утолщением

Рисунок 12- Эпидермис стебля зизифоры Бунге (препарат с поверхности) (x720) а-внешний вид эпидермиса, б – трихома и железка эпидермы стебля

Под эпидермисом располагается по четырем граням в несколько слоев колленхима, представленная плотно сжатыми, продолговато-изогнутыми клетками, между четырех пучков колленхимы проходят слои клеток хлоренхимы, 2-3 слоя которой расположены субэпидермально. Далее следует однорядный слой клеток эндодермы. В гранях расположено несколько слоев уголкового колленхимы. В первичной коре присутствуют различные по форме воздухоносные полости. Хорошо выражена однослойная эндодерма. Стебель не пучкового строения, флоэма образует сплошное кольцо. Флоэма состоит из тонкостенных клеток. Ксилема занимает внутреннюю часть пучка, представлена крупными сосудами расположенными радиально, которые также образуют сплошное кольцо по диаметру в 2-3 раза больше, чем флоэма. Сердцевина рыхлая, состоит из крупных паренхимных клеток. По центру часть сердцевины разрушена (рисунок 13а). С обеих сторон кольца проводящих элементов окружены фрагментами склеренхимы. Окраска 0,1% спиртовым раствором флюороглуцина говорит о чрезмерной лигнификации элементов проводящей системы. Клетки оставшейся сердцевины по форме паренхимные, тонкостенные (рисунок 13б).



а) б)

1-уголковая колленхима; 2- воздухоносные полости; 3-эндодерма; 4-клетки сердцевины; 5- флоэма; 6-сосуды ксилемы; 7 – фрагменты склеренхимы

Рисунок 13- Поперечный срез стебля зизифоры Бунге: а- фрагмент части стебля (поперечный срез); б– фрагмент проводящих элементов, окрашенный раствором флюороглуцина

**Чашечка.** Эпидермальные клетки чашечки толстостенные, сильно извилистые (рисунок 14). Присутствуют простые волоски с грубо бородавчатой поверхностью, аналогичные по строению волоскам листовой пластинки:

одноклеточные, сосочковидные, 2-х клеточные прямые и коленчатые (рисунок 15). На поверхности чашечки трихомы многочисленны. Присутствуют эфиромасличные 8-ми клеточные железки [107].

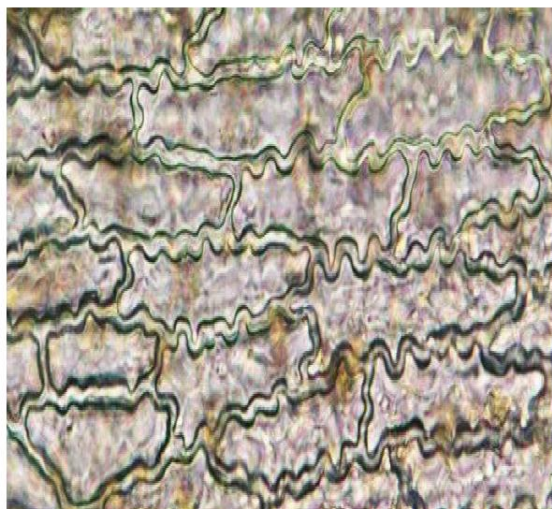
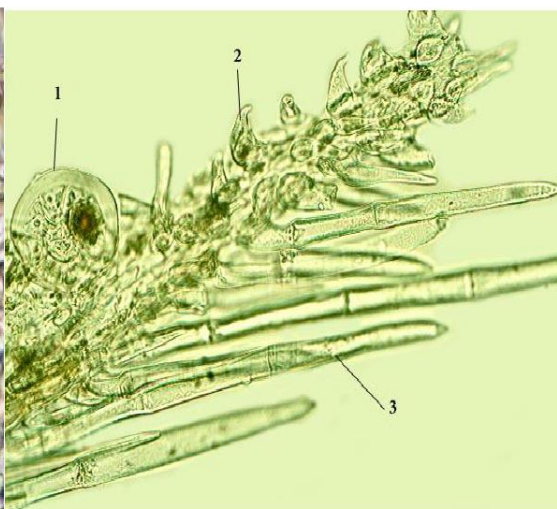


Рисунок 14 -Клетки эпидермиса чашечки зизифоры Бунге(препарат с поверхности)



1-эфиромасличная железка, 2 – простой одноклеточный волосок, 3- простой многоклеточный волосок

Рисунок 15-Трихомы эпидермиса чашечки зизифоры Бунге

### 3.3 Определение фармако-технологических параметров и фармакопейных показателей качества растительного сырья зизифоры Бунге

Фармако-технологические параметры (удельная масса, объемная масса, насыпная масса, пористость, порозность и свободный объем слоя сырья)определяли в соответствии с требованиями ГФ РК I,т. 1[108].

Полученные данные, приведенные в таблицах 2-3 дают возможность обосновать выбор способа экстрагирования, расчёты количества сырья и экстрагента, метод и периодичность динамизации процесса.

Таблица 2 - Определение фармако-технологических параметров травы зизифоры Бунге

№ серии	Удельная масса, г/см <sup>3</sup>	Объемная масса, г/см <sup>3</sup>	Насыпная масса, г/см <sup>3</sup>	Пористость, г/см <sup>3</sup>	Порозность, г/см <sup>3</sup>	Свободный объем слоя сырья, г/см <sup>3</sup>
1	1,5022	0,6656	0,2232	0,5596	0,6996	0,8677
2	1,4998	0,6661	0,2212	0,5578	0,6975	0,8671
3	1,5124	0,6658	0,2231	0,5559	0,6970	0,8598
4	1,5116	0,6650	0,2224	0,5591	0,6990	0,8666
5	1,5021	0,6658	0,2229	0,5575	0,6993	0,8678
$\bar{x}$	1,5056	0,6656	0,2225	0,5579	0,6984	0,8658

Согласно требований ГФ РК показателями качества ЛРС являются зольность (общая и нерастворимая в 10% растворе кислоты хлороводородной), потеря в массе при высушивании, а также содержание тяжелых металлов и радионуклидов, которые определяют безопасность сырья и соблюдение требований к месту его заготовки.

Определение данных параметров проводили в соответствии с методиками ГФ РК, т. 1, 2.8, а так же гигиеническим нормативом «Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению радиационной безопасности» [109].

Таблица 3 – Фармакопейные показатели качества сырья зизифоры Бунге

№ серии	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, %	Зола, нерастворимая в 10% кислоте хлороводородной, %
1	7,7	6,7	0,8
2	7,5	5,8	0,7
3	6,8	6,7	0,88
4	8,7	5,6	0,9
5	8,6	5,7	0,7
$\bar{x}$	7,86	6,1	0,78

Таблица 4 – Определение тяжелых металлов в сырье зизифоры Бунге

Токсичные элементы, не более мг/кг	Нормы по НД	Результаты			НД на методы испытаний
		Проба №1	Проба №2	Проба №3	
Свинец	6,0	0,097	0,169	0,227	ГОСТ Р 51301-99
Кадмий	1,0	Не обн.	0,017	0,098	ГОСТ Р 51301-99
Мышьяк	0,5	Не обн.	Не обн.	Не обн.	ГОСТ 26930-86
Ртуть	0,1	Не обн.	Не обн.	Не обн.	ГОСТ 26927-86

Таблица 5 – Определение радионуклидов в сырье зизифоры Бунге

Наименование показателей, единицы измерений Бк/кг,	Нормы по НД	Результаты			НД на методы испытаний
		Проба №1	Проба №2	Проба №3	

не более: Цезий - 137	200	1,71	1,90	1,92	ГОСТ Р 54016- 2010
Стронций - 90	100	Не обн.	Не обн.	Не обн.	ГОСТ Р 54017- 2010

Полученные экспериментальные данные технологических и фармакопейных характеристик позволяют прогнозировать оптимальный способ экстрагирования биологических активных веществ из З. Бунге и нормирование качество полученной субстанции в виде экстракта[110]. Содержание тяжелых металлов радионуклидов в траве Зизифоры Бунге в пределах нормируемых норм.

### 3.4 Получение эфирного масла из травы З. Бунге

Эфирное масло получали методом гидродистилляции на аппарате Клевенджера. Растительное сырье (рисунок 16) измельчали на мельнице POLYMIX PX-MFC 90D (рисунок 17), взвешивали, помещали в колбу аппарата для отгонки эфирного масла и заливали 1 л воды очищенной. Затем колбу соединяли с аппаратом Клевенджера и устанавливали на электроплитку с водяной баней. Для более четкой идентификации выделившегося объема эфирного масла в градуированный приемник добавляли гексан.



Рисунок 16– Травя З.Бунге

Эфирное масло отгоняли в течение 2-2,5 ч. Начало отгонки устанавливали с момента появления первых капель дистиллята. Интенсивность отгонки не должна превышать 45-50 капель в минуту (рисунок 18).



Рисунок 18 – Получение эфирного масла на аппарате Клевенджера

За 10 мин до конца отгонки прекращали подачу воды в холодильник с целью прогрева его для того, чтобы оставшиеся на его внутренних стенках капли эфирного масла стекли в приемник. После окончания отгона масло из приемника сливали и через аппарат пропускали пар в течение 30 мин. Полученное эфирное масло отделяли от воды на делительной воронке и сушили над безводным сульфатом натрия. Хранили масло в холодильнике при температуре не выше 4°C.

Результаты определения содержания эфирного масла в отдельных сериях сырья приведены в таблице 6.

Таблица 6- Результаты определения содержания эфирного масла в отдельных сериях сырья

№ №	Серия сырья	Навеска, г	Выход, %
1.	серия 080714	39,34	0,150
2.	серия 200714	22,11	0,146
3.	серия 310714	32,15	0,148

#### 3.4.1 Изучение компонентного состава эфирного масла 3. Бунге

Определение компонентного состава эфирного масла проводили на газовом хроматографе Clarus 580 (PerkinElmer) с масс-спектрометрическим детектором Clarus-SQ 8.

Приготовление пробы эфирного масла: около 25 мг (точная навеска) эфирного масла помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15мл *гексана Р*, доводили до метки и перемешивали до полного растворения масла.

Хроматографические условия: колонка капиллярная RestekRxi®-1 ms 0,25мм x 30м x 0,25 мкм, объем пробы: 1,0 мкл, газ-носитель He, скорость газа-носителя: 1 мл/мин, деление потока 1:25, температура колонки: 40 °С, увеличение температуры 2 °С/мин до 280 °С, температура испарителя – 280 °С, масс-спектрометрический детектор: температура – 240 °С, EI+ = 70 eV, время сканирования с 4 по 120 мин, режим сканирования ионов 39-500 м/з. Процентное содержание компонентов вычисляли автоматически, исходя из площадей пиков общей хроматограммы ионов. Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания, с использованием библиотеки NIST.

Результаты изучения компонентного состава приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Компонентный состав эфирного масла зизифоры Бунге

Время удерживания (RT)	Наименование компонента	Содержания в смеси %
1	2	3
5.995	(E)-2-Гексеналь	0.8
10.585	□-Пинен	0.5
11.242	Камфен	0.11
12.753	Сабинен	0.2
12.878	β-Пинен	0.6
12.992	1-Октен-3-ол	0.1
14.158	□-Мирцен	0.7
14.679	Псевдолимонен	0.2
15.688	α-Терпинен	0.4
15.897	o-Цимол	0.3
16.338	1,8-Цинеол	0.2
16.565	Лимонен	0.9
17.424	транс-□-Оцимен	0.1
18.759	γ-Терпинен	0.1
18.968	цис-Сабинен гидрат	0.2
21.041	Терпинолен	0.6
21.951	Линалоол	0.2
23.059	транс-p-Мента-2,8-диен-1-ол	0.7
23.851	Камфора	0.1
25.462	Ментон	15.3
25.641	цис-Оцимен	0.1
26.137	Изоментон	10.2
26.493	Ментофуран	0.1
26.661	Изопулегон	0.8
26.845	Изоментол	2.3
28.709	Левоментол	0.7
29.332	Вербонен	0.1
32.755	Пулегон	60.1
33.199	Пиперитон	0.8
37.877	Тимол	1.0
38.504	Карвокрол	0.0
39.872	Пиперитенон	1.3
45.265	α-Кубебен	0.6
45.713	β-Бурбонен	0.1
52.988	β-Копаен	0.5
64.82	β-Эвдесмен	0.3
96.451	Фитол	0.2



Всего в эфирном масле З. Бунге идентифицировано 37 компонентов. Полученные результаты показывают, что основным компонентом является пулегон, содержание которого составляет 60,1%. Отмечено также значительное содержание изоментона - 10,2% и ментона - 15,3%[111,112].

### 3.4.2 Разработка методик качественного и количественного определения пулегона в эфирном масле З. Бунге

Испытание проводили методом тонкослойной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.27). 0.1 мл эфирного масла, полученного при количественном определении, растворяют в 2 мл *этилацетата Р* (*испытуемый раствор*). На линию старта *ТСХ* пластинки со слоем *силикагеля F<sub>254</sub>Р* наносят 20 мкл испытуемого раствора. Пластинку помещают в камеру с системой растворителей *гексан Р – этилацетат Р* (9:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, сушили на воздухе, и просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме в УФ-свете обнаруживали темно-коричневое пятно с величиной  $R_f$  около 0.61. Затем пластинку опрыскивали свежеприготовленным раствором 10 г/л *ванилина Р* в *кислоте серной Р*. Окраска пятна усиливалась.

**Пулегон.** Испытание проводили методом газовой хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.28). 25 мг эфирного масла, полученного при количественном определении, помещали в мерную колбу вместимостью 50.0 мл, растворяли в 15.0 мл *гексана Р*, доводили тем же растворителем до метки и перемешивали до полного растворения эфирного масла (*испытуемый раствор*). Хроматографировали по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором в следующих условиях (таблица 8):

- колонка капиллярная RestekRxi®-1ms размером 30 м x 0.25 мм x 0,25 мкм заполненная 100% диметилполисилоксаном.
- газ-носитель: *гелий для хроматографии Р*,
- скорость газа-носителя - 1.0 мл/мин,
- деление потока - 1:25,
- температура

Таблица 8- Условия хроматографирования

	Время(мин)	Температура(°С)
Колонка	0	40
	0 – 120	40 – 280
Испаритель		280
детектор - масс-спектрометрический EI+		240

Время хроматографирования должно составлять 120 мин в режиме сканирования ионов 39-500 m/z. Время удерживания пика пулегона составляет около 32.8 мин. Хроматографическая система считается пригодной, если коэффициент симметрии, рассчитанный для пика пулегона на хроматограмме раствора сравнения, составляет не менее 0.6.

Вычисляют содержание пулегона в эфирном масле в процентах по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times 100 \times 50}{S_0 \times m_1 \times 100 \times 25}, \quad (8)$$

где  $S_1$  - среднее значения площадей пиков на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  - среднее значения площадей пиков на хроматограмме раствора сравнения;

$m_0$  - масса навески *СО ГФ РК пулегона*, в миллиграммах;

$m_1$  - масса навески испытуемого образца, в миллиграммах;

$P$  - содержание пулегона в *СО ГФ РК пулегона*, в процентах.

Содержание пулегона в эфирном масле должно быть не менее 40.0 % [113].

**Примечание. Приготовление раствора сравнения.** 10 мг *СО ГФ РК пулегона* помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл, растворяют в 3.0 мл *гексана Р*, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают.

### 3.4.3 Валидация и верификация аналитических методик

Валидация аналитических методик анализа еще на ранних этапах фармацевтической разработки позволяет своевременно выявить и устранить недостатки метода. После проведения валидации появляется уверенность как в самой методике анализа, так и в качестве разрабатываемого лекарственного препарата. Аналитические методы, которые применяются в разработке новых лекарственных средств, должны обладать достаточной правильностью, специфичностью, чувствительностью и прецизионностью. Это обеспечит их соответствие нормативным требованиям, которые заявлены в руководящих указаниях Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для применения у человека (ICH) [114]. Нами была проведена валидация следующих аналитических методик: валидация гистохимической реакции идентификации эфирного масла в траве *З. Бунге* по параметру специфичность. На основании полученных данных можно сделать следующий вывод:

- методика специфична для эфирных масел.

В соответствии с требованиями ГФ РК Специфичность идентификации означает, что идентифицировано именно анализируемое вещество. Критерием будет служить то, что мы определяем этой реакцией любое эфирное масло, не зависимо от происхождения.

Валидация методики идентификации пулегона в траве зизифоры Бунге является экспериментальным доказательством того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач. В соответствии с утвержденной программой валидации были выполнены запланированные работы по валидации аналитической методики идентификации пулегона в траве зизифоры Бунге по параметру «специфичность». Испытание проводили методом тонкослойной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.27).

На хроматограмме должно обнаруживаться темно-коричневое пятно с величиной  $R_f$  около 0.61.

## ОПИСАНИЕ ХОДА ВАЛИДАЦИИ

Таблица 9- Ход валидации

Исследуемый показатель	Критерии приемлемости	Комментарий результатов исследования
Специфичность	Совпадение $R_f$ пятен пулегона в испытуемом растворе и $R_f$ пулегона	$R_f$ пятна пулегона в испытуемом растворе совпадает с $R_f$ пулегона

Полученные данные по валидации аналитической методике сводят в структурированные таблицы. Табличные данные статистически обрабатывают с помощью программ Statistica 6, Excel, Origen.

На основании полученных данных можно сделать следующий вывод:  
- методика специфична, т.к.  $R_f$  пятна в испытуемом образце совпадает с  $R_f$  пятна пулегона [115].

Верификации фармакопейной аналитической методики количественного определения эфирного масла в траве зизифоры Бунге. Используемые реактивы и растворители марки ч.д.а. были приготовлены в соответствии с требованиями ГФ РК, данные были собраны и интегрированы при помощи програм MicrocalOrigin и Statistica 12. В качестве оборудования и материалов были использованы: весы аналитические (Radwag, Польша), аппарат Клевенджера (Россия), электроплита (ЗАО «Электротехника» Россия), химическая посуда (ПАЛ Стеклоприбор, Россия), мельница POLYMIX PX-MFC 90D (Kinematica, Швейцария).

Методика количественное определения. Испытание проводят в соответствии с общей статьей 2.8.12 «Определение эфирных масел в

лекарственном растительном сырье» Государственной Фармакопеи Республики Казахстан.

Верификацию исследуемой методики проводили по следующим характеристикам: специфичность, сходимость, внутрिलाбораторная точность, линейность, диапазон применения.

**Специфичность** методики подтверждена литературными данными. Проведен сравнительный анализ полученных результатов с литературными данными наиболее близкого вида по количественному содержанию эфирного масла *Ziziphora bungeana* Juz. – *Ziziphora clinopodioides* (таблица 10).

Таблица 10– Оценка специфичности аналитической методики

Код пробы	Объект исследования	Масса навески, г	Выход эфирного масла, мл/кг	Комментарий
1.1	Трава зизифоры Бунге	40.0024	1,64 (0,150 %)	Эфирное масло светло-желтого цвета
1.2		40.0009	1,62 (0,148 %)	Эфирное масло светло-желтого цвета
1.3		40.0035	1,63 (0,149 %)	Эфирное масло светло-желтого цвета
2.1	Литературные данные	-	11,0 (1,0 %)	[38]
2.2			10,5 (0,96%)	[39]
2.3			9,9 (0,9 %)	[40]
2.4			14,3 (1,3 %)	[33]
2.5			11,0 (1,0%)	[26]

**Сходимость** характеризует точность методики. Результаты расчетов метрологических характеристик методики при варьировании концентраций приведены в таблице 11.

Таблица 11– Оценка сходимости, линейность, диапазона применения аналитической методики

Сухое сырье «трава зизифоры Бунге»				Извлекаемость, %
№ пробы	Навеска, г	Количественное содержание эфирного масла, мл	%	
1				2
1	48,05	0,07961	121,36	101,1306
2	44,01	0,07195	109,68	99,70898
3	40,00	0,0656	100,00	100
4	36,04	0,06019	91,75	101,9478
5	32,02	0,05188	79,09	98,85671
1				2

Среднее $\bar{X}$ , %	100,3288
Продолжение таблицы 11	
Стандартное отклонение SD	1,22823
Относительное стандартное отклонение $RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100$ , %	1,2242
Относительный доверительный интервал среднего результата $\Delta x = t(95\%,5) \cdot SD = 2.0150 \cdot 1.22823$ , %	2,4749
Систематическая погрешность $\delta =  \bar{X} - 100 $ , %	0,3288
Критерии незначимости систематической погрешности	
$\delta \leq \Delta x / \sqrt{5} = 1.1068$	Выполняется
Общий вывод по методике	Корректна

Из данных, приведенных, в таблице 11 следует, что для количественного определения эфирного масла методика анализа характеризуется достаточной сходимостью, является корректной во всем диапазоне концентраций 80-120 % и не имеет значимой систематической погрешности, относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 2.0 %.

**Линейность** исследовали в пределах диапазона применения аналитической методики по пяти независимым концентрациям в интервале 80-120 % от номинального содержания определенного по методике [9]. Метрологические характеристики линейной зависимости методики представлены в таблице 12

Таблица 12– Метрологические характеристики линейной зависимости аналитической методики

Параметры	Требования	Значения	Комментарий
Уравнение регрессии		$y=1.0247 \cdot x-2.094$	
B	-	1.0247	Соответствует
S <sub>b</sub>	-	0.03884	
A	$\leq 7.41$ $\leq 1.89 \cdot s_a$	-2.094	Соответствует
S <sub>a</sub>	-	3.92264	
SD	2.0	1.22823	Соответствует
P	$\leq 0$	0.00012	Соответствует
R	$\geq 0.97$	0.99785	Соответствует

На основании полученных данных можно утверждать, что линейная зависимость выполняется по всем критериям соответствия в указанном диапазоне применения аналитической методики. Графическое изображение линейной зависимости методики представлено на рисунке 19 в нормализованных координатах.

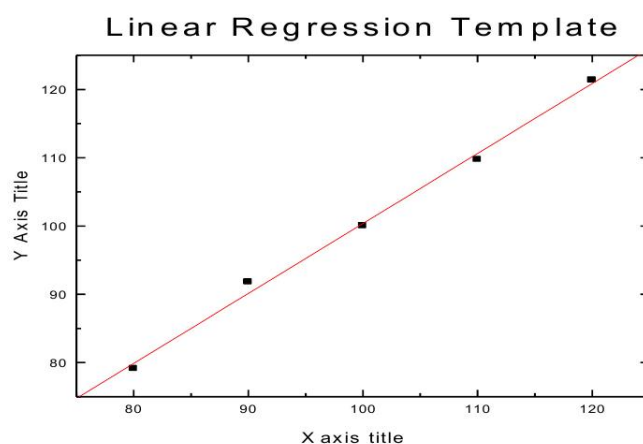


Рисунок 19 – Диаграмма линейной зависимости

Коэффициент регрессии в указанном диапазоне составляет 0.99785. Расчеты параметров линейной зависимости проведены методом наименьших квадратов с помощью компьютерной программы MicrocalOrigin.

**Диапазон применения аналитической методики.** Исследован интервал между минимальной и максимальной концентрацией анализируемой субстанции, для которого аналитическая методика имеет требуемую точность, правильность и линейность. Диапазон применения методики составляет от 80 % до 120 %, относительное стандартное отклонение не превышает 2.0 %.

**Внутрилабораторная точность.** В соответствии с результатами исследования данного теста установлено, что влияние внутрилабораторных вариаций (смена аналитика и дней проведения исследования) не влияют на результаты эксперимента. Рассчитано RSD для каждого аналитика в разные дни, результаты не превышают 2.0 %, как и общее его значение. Методика характеризуется приемлемой точностью.

Таблица 13 – Оценка внутрилабораторной точности методики

№ пробы/ показатели корректност и методики	День 1		День 2		День 3	
	Аналитик 1	Аналитик 2	Аналитик 1	Аналитик 2	Аналитик 1	Аналитик 2
1	1,64	1,61	1,60	1,62	1,64	1,62
2	1,62	1,64	1,62	1,62	1,64	1,64
$\bar{X}$	1,63	1,625	1,61	1,62	1,64	1,63
RSD	0,8676	1,3054	0,8784	0	0	0,8676
$\bar{\bar{X}}$	1,6258					
RSD	0,8482					

Результаты валидации показали, что рассматриваемая аналитическая методика, удовлетворяет условиям специфичности, характеризуется линейной зависимостью в исследуемом диапазоне концентраций, корректной

точностью и сходимостью полученных результатов. Установлена регламентируемая норма показателя количественного содержания эфирного масла в траве Зизифоры Бунге, которого должно быть не менее 0,8 мл/кг.

*Валидация методики количественного определения пулегона в эфирном масле зизифоры Бунге.*

Валидацию исследуемой методики проводили методом газожидкостной хроматографии по следующим характеристикам: специфичность, правильность, сходимость, внутрилабораторная точность, линейность, диапазон применения, прогноз полной неопределенности методики.

**Специфичность.** Хроматограммы, подтверждающие специфичность методики представлены на рисунках 20 и 21.

Специфичность подтверждена следующими критериями:

- время удерживания пика пулегона на хроматограмме испытуемого раствора совпадает с временем удерживания соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения с точностью до 0,1 %;

- число теоретических тарелок по пику пулегона на хроматограмме раствора сравнения составило 3479;

- коэффициент симметрии, рассчитанный для пика пулегона на хроматограмме раствора сравнения составляет 7.4;

- выбранные условия хроматографирования позволяют разделить пики пулегона и пиперитона, коэффициент разделения составил 5,7.

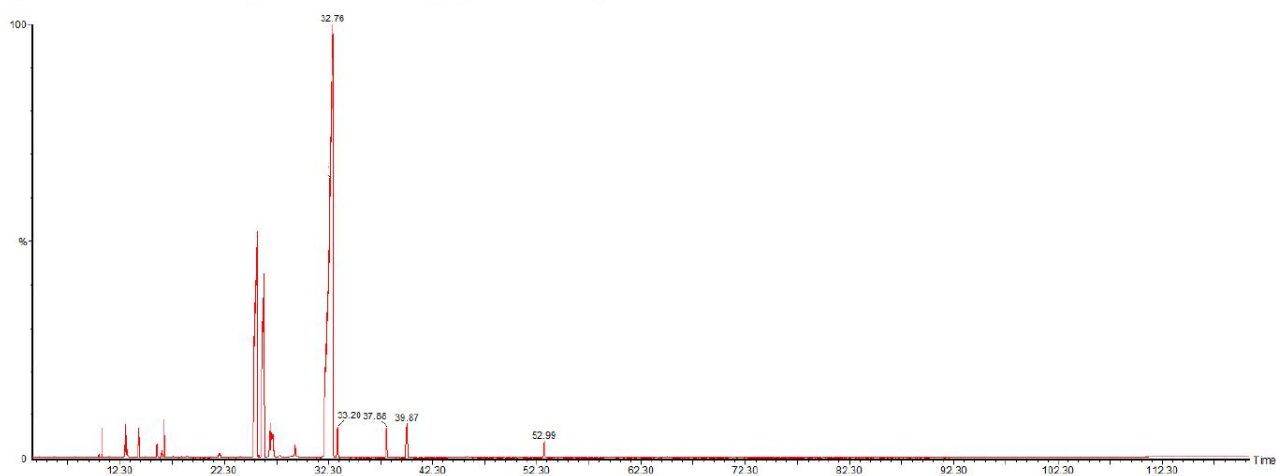


Рисунок 20 – Хроматограмма испытуемого раствора

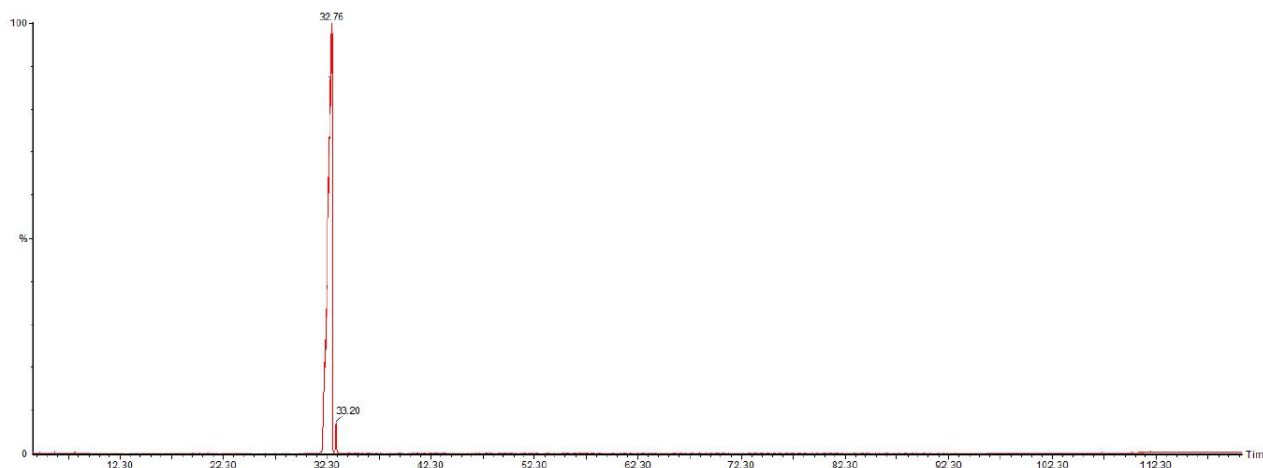


Рисунок 21– Хроматограмма раствора сравнения

**Правильность** характеризует степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по данной методике, при этом **сходимость** характеризует точность методики.

Результаты расчетов метрологических характеристик методики при варьировании концентраций приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Оценка правильности, сходимости, диапазона применения аналитической методики

СО ГФ РК пулегон		Эфирное масло зизифоры Бунге			Извлекаемость, %
№ пробы	% от номинальной концентрации СО ГФ РК	№ пробы	Количественное содержание пулегона в навеске эфирного масла, %	%	
1	2	3	4	5	6
1	80	1	45,19	80,12	100,16
2	85	2	48,01	85,12	100,15
3	90	3	50,54	89,61	99,57
4	95	4	53,85	95,48	100,50
5	100	5	56,43	100,05	100,05
6	105	6	60,22	106,77	101,69
7	110	7	62,16	110,21	100,19
8	115	8	64,96	115,18	100,15
9	120	9	67,58	119,82	99,85
Среднее $\bar{X}$ , %					100,26
Стандартное отклонение SD					0.65473
Относительное стандартное отклонение $RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100$ , %					0.6530
Относительный доверительный интервал среднего результата $\Delta x = t(95\%, 8) \cdot SD = 1.860 \cdot 0.65473$ , %					1.2178
Систематическая погрешность $\delta = \left  \bar{X} - 100 \right $ , %					0.26



Продолжение таблицы 14

Критерии незначимости систематической погрешности		
1.	$\delta \leq \Delta x / 3 = 0.4059$	Выполняется
2.	если не выполняется 1, то $\delta \leq 0.80$	Выполняется
Общий вывод по методике		Корректна

Из данных, приведенных в таблице 14, следует, что для определения пулегона методика анализа характеризуется достаточной правильностью и сходимостью, является корректной во всем диапазоне концентраций 80-120% и не имеет значимой систематической погрешности. Относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 2.0 %.

**Линейность** исследовали в пределах диапазона применения аналитической методики по девяти независимым концентрациям в интервале 80-120 % от номинального содержания пулегона в эфирном масле. Метрологические характеристики линейной зависимости методики представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Метрологические характеристики линейной зависимости аналитической методики

Параметры	Требования	Значения	Комментарий
Уравнение регрессии		$y=1.0049 \cdot x-0.22778$	
1	2	3	4
B	-	1.0049	Соответствует
$S_b$	-	0.01691	
A	$\leq 3.22$ $\leq 1.89 \cdot s_a$	-0.22778	Соответствует
$S_a$	-	1.70455	
SD	2.0	0.65473	Соответствует
P	$\leq 0$	$1.0009 \cdot 10^{-10}$	Соответствует
R	$\geq 0.97$	0.99901	Соответствует

На основании полученных данных можно утверждать, что линейная зависимость выполняется по всем критериям соответствия в указанном диапазоне применения аналитической методики. Графическое изображение линейной зависимости методики представлено на рисунке 22 в нормализованных координатах.

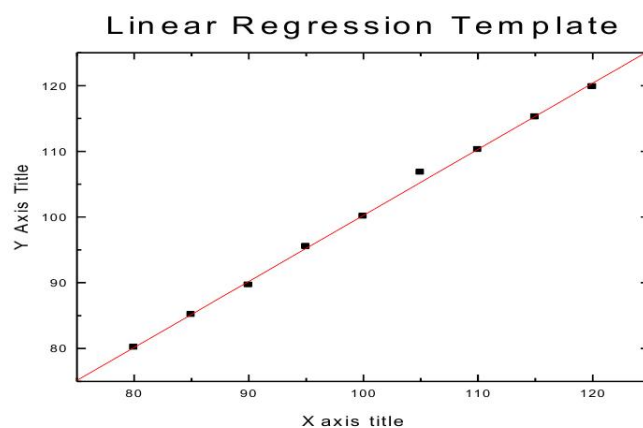


Рисунок 22 – Диаграмма линейной зависимости

Коэффициент регрессии в указанном диапазоне составляет 0.99901. Расчеты параметров линейной зависимости проведены методом наименьших квадратов с помощью компьютерной программы MicrocalOrigin.

**Диапазон применения аналитической методики.** Исследован интервал между минимальной и максимальной концентрацией анализируемого вещества в субстанции, для которого аналитическая методика имеет требуемую точность, правильность и линейность. Диапазон применения методики составляет от 80 % до 120 %, относительное стандартное отклонение не превышает 2.0 %.

**Внутрилабораторная точность.** В соответствии с результатами исследования данного теста установлено, что влияние внутрилабораторных вариаций (смена аналитика и дней проведения исследования) не влияют на результаты эксперимента. Рассчитано RSD для каждого аналитика в разные дни, результаты не превышают 2.0 %, как и общее его значение. Методика характеризуется приемлемой точностью. Оценка внутрилабораторной точности методики показана в таблице 16.

Таблица 16 – Оценка внутрилабораторной точности методики

№ пробы/ показатели корректности методики	Количественное содержание пулегона в эфирном масле зизифоры Бунге					
	День 1		День 2		День 3	
	Аналитик 1	Аналитик 2	Аналитик 1	Аналитик 2	Аналитик 1	Аналитик 2
1	56,7	58,4	56,5	55,9	56,8	56,6
2	56,9	58,4	56,2	56,2	57,5	57,1
3	56,2	58,1	56,4	56,5	57,3	56,9
4	57,4	57,8	56,2	56,7	56,4	56,8
5	57,6	58,3	56,6	55,9	57,1	56,4
6	56,5	57,7	56,1	56,4	57,5	56,7
$\bar{X}$	56,88	58,12	56,33	56,27	57,10	56,75
RSD	0,9396	0,5531	0,4697	0,7183	0,9751	0,3668
$\bar{\bar{X}}$	56,91					
RSD	1.2407					

### Прогноз полной неопределенности методик.

Валидация аналитических методик предполагает определение не только реальной полной погрешности анализа, но и их неопределенности. В соответствии с Европейской фармакопеей методика считается корректной в случае когда  $\Delta_{As} \leq V_{upper}$ . При этом необходимо отметить, что верхний предел определяемого вещества в исследуемом лекарственном растительном сырье не регламентирован, поэтому величина  $V_{upper}$  условно приравнена к норме относительного стандартного отклонения (RSD), которая должна не превышать 2.0 %.

Расчет прогноза полной неопределенности методики приведен в таблице 17.

Таблица 17 – Расчет прогноза полной неопределенности аналитической методики

Наименование характеристики	Результаты, %
Неопределенность взвешивания на аналитических весах навески эфирного масла	$\frac{100 \cdot 0.0002}{0.025} = 0.8$
Неопределенность взвешивания на аналитических весах навески стандартного вещества пулегона	$\frac{100 \cdot 0.0002}{0.10} = 0.2$
Неопределенность колбы объемом 50 мл	0.17
Неопределенность колбы объемом 25 мл	0.23
$\Delta_{V,r}$	0,87
$\Delta_{FAO} = \frac{1}{\sqrt{3}} \times t(95\%; n-1) \times RSD$	0.87
$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{FAO}^2 + \Delta_{V,r}^2}$	1.23
Корректность полной неопределенности $\Delta_{As} \leq V_{upper}$	1.23 < 2 % Корректно

Примечание - где  $\Delta_{V,r}$  - относительная неопределенность погрешности пробоподготовки;

$\Delta_{FAO}$  - относительная неопределенность конечной аналитической операции;

$V_{upper}$  – верхний допуск определяемого вещества в сырье.

На основании полученных данных наибольший вклад в полную неопределенность методики вносят относительная неопределенность погрешности пробоподготовки ( $\Delta_{V,r}$ , 0.87 %) и относительная неопределенность конечной аналитической операции ( $\Delta_{FAO}$ , 0.1.23 %). При этом полная неопределенность методики не превышает 2.0 %, что говорит о ее корректности при воспроизведении в других лабораториях.

Таким образом, изучены валидационные характеристики аналитической методики количественного определения пулегона в эфирном масле травы зизифоры бунге[114,115]. Результаты валидации показали, что рассматриваемая аналитическая методика удовлетворяет условиям тестов на

специфичность, правильность, характеризуется линейной зависимостью в исследуемом диапазоне применения аналитической методики, корректной точностью и сходимостью полученных результатов. На основании расчета полной неопределенности методики можно судить о корректном её воспроизведении в других аналитических лабораториях. Установлена регламентируемая норма содержания пулегона в эфирном масле - не менее 40 %.

### 3.5 Разработка спецификации качества травы З.Бунге

На основании полученных данных была разработана спецификация качества травы з. Бунге и проект АНДв соответствии приказом МЗ РК от 19.11.2009 года №754 « Об утверждении Правил составления, согласования и экспертизы нормативно-технического документа по контролю за качеством и безопасностью лекарственных средств» [116,117].

Таблица 18-Спецификация качества «зизифора Бунге трава»

Показатели Качества	Нормы отклонений	Методы Испытаний
1	2	3
Определение	Высушенные цельные или частично измельченные надземные части стеблей с листьями и цветками многолетнего травянистого растения Зизифоры Бунге ( <i>Ziziphora bungeana</i> Juz.), семейства Яснотковых ( <i>Lamiaceae</i> ). Запах ароматный, вкус горьковато пряный, слегка холодящий.	По внешнему виду должны соответствовать требованиям ГФ РК II, т. 1, общей статьи "Травы".
Идентификация: -Макроскопия	Цельное сырье. Стебли четырехгранные многочисленные, высотой 15-30 см жестковатые. Листья размером 0.5-1.5 см длиной, 1.5-6 мм шириной, узколанцетные. Черешки до 4 мм длиной, густо опушенные. Чашечки короткие и узкие, 5 мм длиной. Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев и цветков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 8 мм. Цвет стеблей и листьев зеленоватый, цветков фиолетовый.	В соответствии с АНД РК  ГФ РК II, т. 1, 2.9.12

Продолжение таблицы 18

Микроскопия	Микроскопия листа с поверхности. Фрагменты клеток верхнего эпидермиса многоугольные, плотно сомкнутые, иногда с четковидными утолщениями, нижний эпидермис с извилистыми стенками; устьица диацитного типа менее многочисленные на верхней стороне листа и более многочисленны с нижней стороны; эфиромасличные железки, состоящие из 8 выделительных клеток расположенных радиально с заметной складчатостью кутикулы вокруг; губчатый мезофилл с крупными межклетниками.	В соответствии с АНД РК ГФ РК II, т. 1, 2.8.3
- пулегон	На хроматограмме должно обнаруживаться темно-коричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61.	Тонкослойная хроматография ГФ РК II, т. 1, 2.2.27
Посторонние примеси:	Цельное сырье. Почерневших и побуревших частей сырья, не более 10 %, - кусков стеблей толщиной 2 мм не более 1 %, - органической примеси не более 1 %, - минеральной примеси не более 1 %. Измельченное сырье. Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0.2 мм, не более 1 %, - частиц стеблей, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 19 %, - органической примеси не более 1 %, - минеральной примеси не более 1 %.	ГФ РК II, т. 1, 2.8.2.
Потеря в массе при высушивании	Не более 13.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.2.32
Общая зола	Не более 7.0 %	ГФ РК I, т. 1, 2.4.16
Зола, нерастворимая в 10 % кислоте хлороводородной	Не более 1.0 %	ГФ РК II, т. 1, 2.8.1.
Микробиологическая чистота	Лекарственное растительное сырье должно соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А. - Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов: не более $10^7$ бактерий и не более $10^5$ грибов в грамме; - Не более $10^2$ <i>Escherichia coli</i> в 1 г.	ГФ РК II, т. 1, 2.6.12, т. 2.6.13
Количественное определение: - эфирное масло	Не менее 0.8 мл/кг	Определение эфирных масел в лекарственном растительном

- пулегон	Не менее 40.0%	сырье, ГФ РК II, т.1, 2.8.12
Радионуклиды	Должно соответствовать требованиям «Гигиенические нормативы «Санитарно - эпидемиологические требования к обеспечению радиационной безопасности»»	Газовая хроматография, ГФ РК II, т.1, 2.2.28 Санитарные правила от 27.02.2015г. №155 Утверждены приказом Министра национальной экономики Республики Казахстан
Тяжелые металлы	В соответствии с требованиями государственного органа	В соответствии с требованиями государственного органа
Упаковка	Сырье по 10 кг и 15 кг упаковывают в мешки из крафт-бумаги, трехслойные	В соответствии с АНД РК, ГОСТ 2228-81.
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с АНД РК
Транспортировка	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е.	ГОСТ 17768-90Е
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 18 °С	В соответствии с АНД РК
Срок хранения	2 года	В соответствии с АНД
Основное фармакологическое действие	Антимикробное и анальгезирующее средство	В соответствии с АНД

### 5.3 Изучение стабильности травы методом долгосрочных испытаний

Долгосрочные исследования стабильности проводили на опытно-промышленных сериях (таблица 19), полученных в ТОО «ФитОлеум» [118].

При исследовании стабильности трех опытно-промышленных серий травы Зизифоры Бунге, изучали следующие показатели качества: описание, макро- и микроскопию, гистохимическую реакцию, качественную реакцию на пулегон, посторонние примеси, потеря в массе при высушивании, микробиологическая чистота, количественное определение эфирного масла и пулегона в эфирном масле. Периодичность контроля образцов составляла по основным показателям качества: 0, 3, 6, 9, 12, 18 месяцев, для показателя микробиологическая чистота - 0, 24 месяца, данное условие позволяет подтвердить устойчивость активных компонентов во времени.

Таблица 19-

Общая характеристика опытно-промышленных серий растительного сырья зизифоры Бунге

№ серии	Размерсерии, кг	Датапроизводства	Регламентисследования, мес.
080714	5.0	09.2014 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
200714	5.20	09.2014 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24
310714	5.12	09.2014 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24

Испытания ЛРС проводили в упаковке, применяемой для хранения и реализации: трехслойная крафт-бумага по ГОСТ 2228-81, размером 100×50 см, поставщиком упаковки является ТОО «ТиН», Республика Казахстан. Температура хранения препарата – (18±2) °С и относительная влажность – (60±5) %. Для стандартизации препарата во времени использованы фармакопейные методы [Государственная Фармакопея Республики Казахстан I., 2008., Государственная фармакопея СССР., 1990], а используемые методики прошли валидацию. Оценка полученных результатов осуществлялась при помощи программ Excel и Statistica 12.

В связи с природой объекта исследования (термолабильные природные вещества) был выбран режим долгосрочных испытаний стабильности. Температурный режим хранения (18±2)°С и влажность (60±5) % выбраны с целью сохранения эфирного масла в объекте. На основании проекта АНД разработана спецификация качества на стабильность (таблица 3.18)

Таблица 20 - Спецификация качества стабильности растительного сырья З. Бунге

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
1	2	3
Описание	Высушенные цельные или частично измельченные надземные части стеблей с листьями и цветкамимноголетнего травянистого растения зизифоры Бунге ( <i>Ziziphora bungeana</i> Juz.), семейства Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> ). Запах ароматный, вкус горьковато пряный, слегка холодящий	По внешнему виду соответствует требованиям ГФ РК I, т. 1, общая статья "Трава".
Идентификация:		
Макроскопия	Цельное сырье. Стебли четырёхгранные многочисленные, высотой 15-30 см жестковатые. Листья размером 0.5-1.5 см длиной, 1.5-6 мм шириной, узколанцетные.	В соответствии с АНД РК

		Черешки до 4 мм длиной, густо опушенные. Чашечки короткие и узкие, 5 мм длиной	
		Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев и цветков различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет стеблей и листьев зеленоватый, цветков фиолетовый.	ГФ РК I. т. 1, 2.9.12
	Микроскопия	Срез листа: листовая пластинка дорсовентрального типа строения амфистоматическая. Эпидермис: клетки многоугольные, иногда с четковидным утолщением, плотно сомкнутые. Устьица диацидного типа. На поверхности эпидермиса встречаются крупные эфиромасличные железки, которые состоят из восьми радиально расположенных выделительных клеток с общей кутикулой. Нижний эпидермис отличается большей извилистостью оболочек эпидермиальных клеток и большим количеством устьиц.	ГФ РК I. т. 1, 2.8.3
	Гистохимическая реакция на наличие эфирного масла	При помещении поперечного среза черешка на 2-3 мин в раствор Судана III, эфирные масла окрашиваются в зелёный цвет.	В соответствии с АНД РК
	Пулегон	На хроматограмме должно обнаруживаться темно-коричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61.	Тонкослойная хроматография ГФ РК, т. 1, 2.2.27



Продолжение таблицы 20

1	2	3
Посторонние примеси:	<p>Цельное сырье.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- почерневших и побуревшие части сырья</li> <li>– не более 10 %,</li> <li>- кусочков стеблей толщиной 2 мм</li> <li>– не более 1 %,</li> <li>- органические примеси – не более 1 %,</li> <li>- минеральные примеси – не более 1 %.</li> </ul> <p>Измельченное сырье.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- почерневших и побуревшие части сырья</li> <li>– не более 10 %,</li> <li>- частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0.2 мм – не более 1 %,</li> <li>- частиц стеблей, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм – не более 19 %,</li> <li>- органической примеси – не более 1 %,</li> <li>- минеральные примеси – не более 1 %.</li> </ul>	ГФ РК, т.1, 2.8.2
Потеря в массе при высушивании	Не более 13 %	ГФ РК I, т. 1,2.2.32
Микробиологическая чистота	<p>Лекарственное растительное сырье должно соответствовать требованиям ГФ РК I, т.1, 5.1.4, категория 4B-Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов: В 1.0 г допускается не более <math>10^5</math> бактерий и не более <math>10^4</math> грибов; не более <math>10^3</math>, энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий; отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г.</p>	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12, т. 2.6.13

Продолжение таблицы 20

1		2	3
	<p>Количественное определение:</p> <p>- эфирное масло в сухом сырье</p> <p>- содержание пулегона в эфирном масле</p>	<p>Не менее 0.8 мл/кг</p> <p>Не менее 40 % в</p>	<p>Определение эфирных масел в лекарственном растительном сырье, ГФ РК т.1,2.8.12</p> <p>Газовая хроматография, ГФ РК т.1, 2.2.28</p>

На протяжении указанного срока и условий хранения лекарственное растительное сырье, помещенное в первичную упаковку, характеризуется постоянством состава во времени, его качественные и количественные характеристики находятся в пределах регламентируемых норм. Описание и идентификация (макро- и микроскопия, гистохимическая реакция, качественная реакция на пулегон), микробиологическая чистота соответствуют требованиям спецификации, дополнительных посторонних примесей в продукте не обнаружено, потеря в массе при высушивании варьирует от 7.0 % до 8.79 % (рисунок 23), количественное определение эфирного масла в сырье находится в интервале от 1.42 мг/кг до 1.64 мг/кг (рисунок 24), количественное определение пулегона в эфирном масле – от 54.8 % до 60.1 % (рисунок 25).

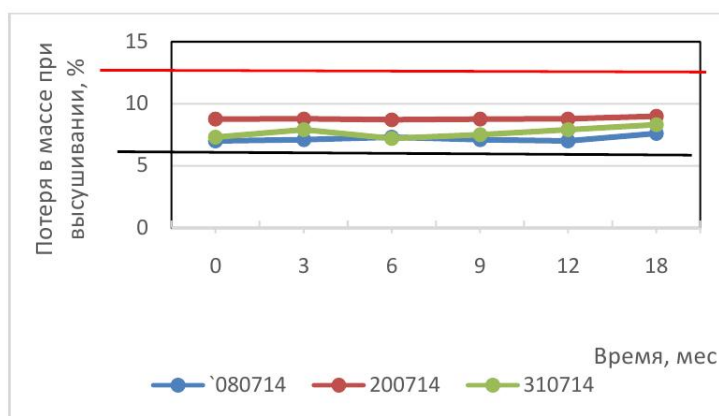


Рисунок 23- Потеря в массе при высушивании

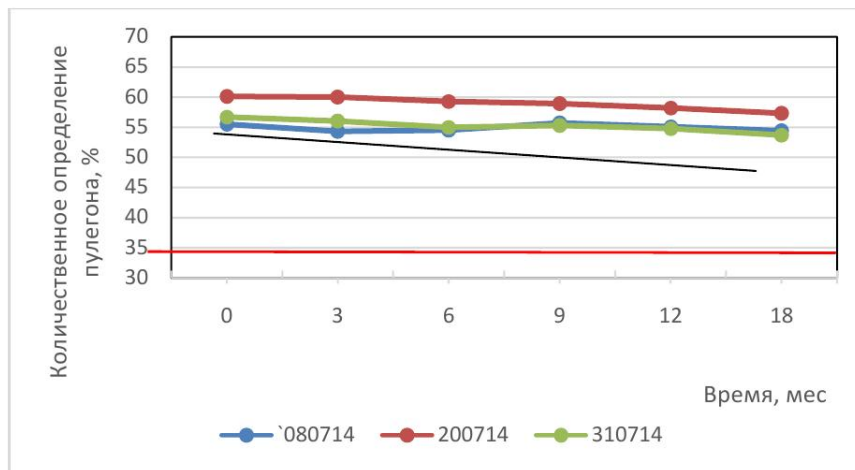


Рисунок 24-Количественное определение пулегона в эфирном масле

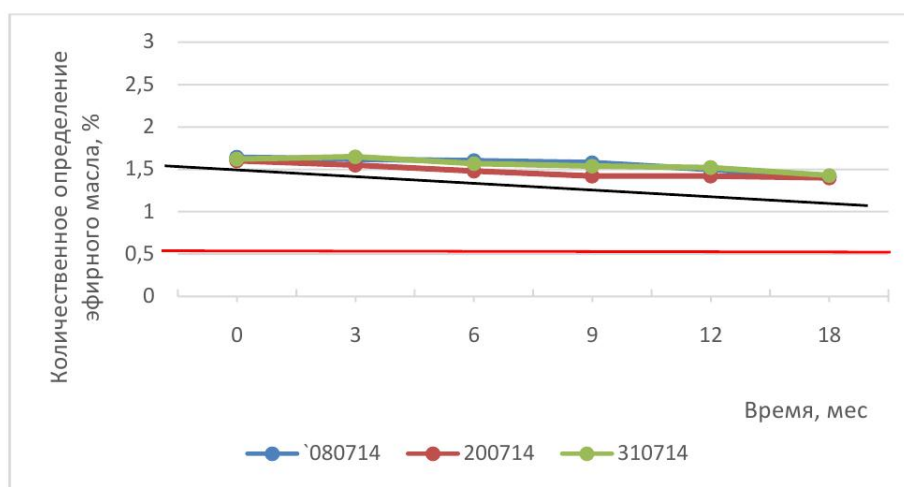


Рисунок 25-Количественное определение эфирного масла в траве зизифоры Бунге

Таблица 21-Результаты испытаний стабильности лекарственного растительного сырья «зизифоры Бунге трава», серия 080714

Упаковка: мешки из крафт-бумаги, трехслойные										
Температура: (18 ± 2)°С. Относительная влажность: (60±5) %			Партия: 080714 Дата начала испытания: 09.2014 г. Дата окончания испытания: 03.2016 г.							
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.								
		0	3	6	9	12	18	24		
1	2	3								
Описание	Высушенные цельные или частично измельченные надземные части стеблей с листьями и цветками многолетнего травянистого растения зизифоры Бунге ( <i>Ziziphora bungeana</i> Juz.), семейства Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> ). Запах ароматный, вкус горьковато пряный, слегка холодящий.	+	+	+	+	+	+	+		
Идентификация:		+	+	+	+	+	+	+		
A	Макроскопия	В соответствии со спецификацией		+	+	+	+	+		
B	Микроскопия	В соответствии со спецификацией		+	+			+		
C	Гистохимическая Реакция	При помещении поперечного среза черешка на 2-3 мин в раствор Судана IIIР, эфирные масла окрашиваются в зелёный цвет.		+	+	+	+	+		
D	Качественная реакция на пулегон	Тонкослойная хроматография		+	+	+	+	+		
Посторонние примеси		Цельное сырье: - почерневших и побуревших части сырья – не более 10 %		8.2	8.5	8.0	8.6	8.4	8.8	8.9

Продолжение таблицы 21

1	2	3						
	- кусочков стеблей толщиной 2 мм – не более 1 %	0.33	0.35	0.35	0.32	0.30	0.47	0.49
	- органические примеси – не более 1 %	0.86	0.82	0.84	0.87	0.85	0.99	0.98
	- минеральные примеси – не более 1 %	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.93	0.94
	Измельченное сырье:							
	- почерневших и побуревших части сырья – не более 10 %	8.5	8.5	8.4	8.6	8.2	8.6	8.8
	- частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0.2 мм – не более 1 %	0.3	0.55	0.51	0.53	0.55	0.68	0.70
	- частиц стеблей, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм – не более 19 %	15.0	15.3	15.1	15.4	15.2	15.5	15.5
	- органической примеси – не более 1 %	0.96	0.91	0.95	0.94	0.95	0.99	0.99
	- минеральные примеси – не более 1 %	0.86	0.85	0.84	0.86	0.86	0.93	0.95
Потеря в массе при высушивании	Не более 13 %	7.0	7.1	7.3	7.1	7.0	7.6	7.8
Количественное определение:								
- эфирное масло	Не менее 0.8 мл/кг	1.64	1.62	1.60	1.58	1.50	1.41	1.55
- пулегон	Не менее 40 % в эфирном масле	55.5	54.3	54.5	55.7	55.1	54.4	54.0

Примечание: + обозначение соответствия

Таблица 22-Результаты испытаний стабильности лекарственного растительного сырья «зизифоры Бунге трава», серия 200714

Упаковка: мешки из крафт-бумаги, трехслойные									
Температура: (18 ± 2) °С. Относительная влажность: (60±5) %			Партия: 310714 Дата начала испытания: 09.2014 г. Дата окончания испытания: 03.2016 г.						
Показатели		Нормы	Периоды контроля, мес.						
1		2	3						
			0	3	6	9	12	18	24
Описание		Высушенные цельные или частично измельченные надземные части стеблей с листьями и цветками многолетнего травянистого растения зизифоры Бунге ( <i>Ziziphora bungeana</i> Juz.), семейства Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> ). Запах ароматный, вкус горьковато пряный, слегка холодящий.	+	+	+	+	+	+	+
Идентификация:			+	+	+	+	+	+	+
A	Макроскопия	В соответствии со спецификацией	+		+	+	+	+	+
B	Микроскопия	В соответствии со спецификацией	+	+	+	+	+	+	+
C	Гистохимическая Реакция	При помещении поперечного среза черешка на 2-3 мин в раствор Судана IIIР, эфирные масла окрашиваются в зелёный цвет.	+	+	+	+	+	+	+
D	Качественная реакция на пулегон	Тонкослойная хроматография	+	+	+	+	+	+	+
Посторонние примеси		Цельное сырье: - почерневших и побуревших части сырья – не более 10 %	8.0	8.3	8.4	8.1	8.4	8.9	8.9

Продолжение таблицы 22

1	2	3						
		- кусочков стеблей толщиной 2 мм – не более 1 %	0.28	0.31	0.27	0.27	0.28	0.30
	- органические примеси – не более 1 %	0.86	0.86	0.88	0.85	0.86	0.89	0.90
	- минеральные примеси – не более 1 %	0.89	0.90	0.89	0.90	0.90	0.94	0.94
	Измельченное сырье:							
	- почерневших и побуревшие части сырья – не более 10 %	8.61	8.60	8.65	8.64	8.62	8.68	8.69
	- частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0.2 мм – не более 1 %	0.56	0.56	0.53	0.55	0.55	0.59	0.60
	- частиц стеблей, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм – не более 19 %	14.6	15.0	15.1	14.9	14.7	15.2	15.2
	- органической примеси – не более 1 %	0.90	0.91	0.88	0.93	0.87	0.90	0.91
	- минеральные примеси – не более 1 %	0.84	0.85	0.85	0.84	0.83	0.87	0.88
Потеря в массе при высушивании	Не более 13 %	8.75	8.79	8.72	8.75	8.79	8.98	8.98
Количественное определение:								
- эфирное масло	Не менее 0.8 мл/кг	1.60	1.55	1.48	1.42	1.42	1.40	1.41
- пулегон	Не менее 40 % в эфирном масле	60.1	60.0	59.3	58.9	58.2	57.3	58.0

Примечание: + обозначение соответствия

Таблица 23-Результаты испытаний стабильности лекарственногорастительного сырья «зизифоры Бунге трава», серия 310714

Упаковка: мешки из крафт-бумаги, трехслойные								
Температура: (18 ± 2) °С. Относительная влажность: (60±5) %			Партия: 310714 Дата начала испытания: 09.2014 г. Дата окончания испытания: 03.2016 г					
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
1	2	3						
Описание	Высушенные цельные или частично измельченные надземные части стеблей с листьями и цветками многолетнего травянистого растения зизифоры Бунге ( <i>Ziziphora bungeana</i> Juz.), семейства Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> ). Запах ароматный, вкус горьковато пряный, слегка охлаждающий.	+	+	+	+	+	+	+
Идентификация:		+	+	+	+	+	+	+
A	Макроскопия	В соответствии со спецификацией		+	+	+	+	+
B	Микроскопия	В соответствии со спецификацией		+	+	+	+	+
C	Гистохимическая Реакция	При помещении поперечного среза черешка на 2-3 мин в раствор Судана IIIР, эфирные масла окрашиваются в зелёный цвет.		+	+	+	+	+
D	Качественная реакция на пулегон	Тонкослойная хроматография		+	+	+	+	+
Посторонние примеси	Цельное сырье:							
	- почерневших и побуревшие части сырья – не более 10 %		7.8	8.2	8.2	7.5	7.7	7.9



Продолжение таблицы 23

1	2	3						
	- кусочков стеблей толщиной 2 мм – не более 1 %	0.30	0.34	0.30	0.32	0.34	0.40	0.41
	- органические примеси – не более 1 %	0.50	0.56	0.53	0.58	0.59	0.63	0.64
	- минеральные примеси – не более 1 %	0.30	0.34	0.30	0.32	0.27	0.40	0.42
	Измельченное сырье:							
	- почерневших и побуревшие части сырья – не более 10 %	8.46	8.51	8.46	8.45	8.47	8.61	8.62
	- частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0.2 мм – не более 1 %	0.36	0.36	0.37	0.37	0.35	0.38	0.38
	- частиц стеблей, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм – не более 19 %	14.98	15.0	14.9	15.1	15.2	15.4	15.5
	- органической примеси – не более 1 %	0.97	0.94	0.97	0.97	0.98	0.98	0.98
	- минеральные примеси – не более 1 %	0.85	0.87	0.86	0.89	0.90	0.95	0.97
Потеря в массе при высушивании	Не более 13 %	7.3	7.9	7.2	7.5	7.9	8.3	8.4
Количественное определение:								
- эфирное масло	Не менее 0.8 мл/кг	1.62	1.65	1.57	1.54	1.52	1.43	1.45
- пулегон	Не менее 40 % в эфирном масле	56.7	56.0	55.0	55.3	54.8	53.7	54.1

Примечание: + обозначение соответствия

Таким образом, в результате проведенных исследований изучена стабильность травы зизифоры Бунге. В процессе хранения в условиях долгосрочных испытаний не выявлено значительных изменений контролируемых параметров качества, что соответствует требованиям фармацевтической разработки ICHQ8 [119]. Соответствие значений показателей качества требованиям спецификации стабильности позволяет установить срок хранения 24 мес. На данном этапе долгосрочные исследования стабильности продолжаются.

### **Выводы по третьему разделу**

На основании результатов изучения динамики накопления эфирного масла в различные фазы вегетации был установлен оптимальный период заготовки надземной части зизифоры Бунге (июль-август месяцы). На основании полученных результатов разработана инструкция по заготовке и сушке ЛРС З.Бунге (Приложение Б): рекомендовано производить сушку сырья на открытом воздухе, без воздействия прямых солнечных лучей, при температуре окружающей среды  $30 \pm 5$  °С. Хранить сырье зизифоры Бунге рекомендовано в соответствии СанПиН № 232 от 19.03.15 и приказа МЗ СР РК по хранению и транспортировке ЛС, ИМН и МТ № 262 от 24.04.15 при температуре не выше 18° С. Разработана технологическая схема заготовки сырья зизифоры Бунге для опытно-промышленных серий на производстве ТОО ФитОлеум. Проведена оценка качества сырья по требованиям ГФ РК. Проведено изучение органографического и анатомического строения травы зизифоры Бунге. Установлены следующие диагностические признаки: ароматное растение, со специфическим приятным запахом, многочисленными, жестковато-ребристыми стеблями и узколанцетными листьями. Растение густо опушено, очень короткими волосками. К анатомическим диагностическим элементам можно отнести эфирномасличные железки с 8-ю выделительными клетками, расположенными радиально. Полученные данные будут использованы для составления раздела «Идентификация» нормативной документации на ЛРС зизифора Бунге трава.

Изучены технологические параметры сырья зизифоры Бунге: удельная масса, объемная масса, насыпная масса, пористость, порозность, свободный объем слоя сырья и коэффициент поглощения экстрагента для более эффективного процесса экстрагирования, прогнозирования и нормирования качества субстанции - экстракта. Также были определены некоторые фармакопейные показатели качества сырья: сумма экстрактивных веществ, потеря в массе при высушивании, общая зола, зола, нерастворимая в 10% кислоте хлороводородной, содержание тяжелых металлов и радионуклидов. Полученные данные позволяют выбрать оптимальный способ экстрагирования БАВ. Результаты исследования будут использованы при разработке оптимальной технологии производства экстракта из сырья З. Бунге и при составлении нормативных документов (технологических регламентов, спецификации качества). Разработана оптимальная технология

получения эфирного масла из травы зизифоры Бунге методом перегонки с наибольшим выходом основного компонента пулегона – 60,1%. Установлены критерии технологического процесса: температура, время, скорость перегонки. Исследован компонентный состав эфирного масла. Разработаны критерии качества масла в соответствии с требованиями ГФ РК. На основе полученных данных разработаны нормативные документы: спецификация качества и аналитический нормативный документ на эфирное масло зизифоры Бунге. Изучены валидационные характеристики аналитической методики количественного определения пулегона в эфирном масле травы зизифоры Бунге. Результаты валидации показали, что предложенная аналитическая методика, удовлетворяет условиям тестов на специфичность, правильность, характеризуется линейной зависимостью в исследуемом диапазоне применения аналитической методики, корректной точностью и сходимостью полученных результатов. Установлена регламентируемая норма основного компонента пулегона в эфирном масле зизифоры Бунге, содержание которого должно быть не менее 40 %.

## **4 ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФИТОСУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ З. БУНГЕ**

### **4.1 Разработка оптимальной технологии получения эфирного масла З. Бунге**

Процесс получения эфирного масла З. Бунге в опытно-промышленных условиях состоял из нескольких технологических этапов, которые включают: вспомогательные работы, перегонку сырья З. Бунге с водяным паром, отделение масла, его сушку, фасовку, маркировку и упаковку.

Изложение технологического процесса.

**Стадия 1. Подготовка сырья.** Высушенное растительное сырье, собранное в фазе цветения разделяют на составные части: стебли, цветки и цельные листья. Стебли измельчают до размеров 0,5- 3,0 мм на мельнице (POLYMIX PX-MFC 90D) и полученное сырье взвешивают на весах.

**Стадия 2. Перегонка с водяным паром.** Взвешенное сырье в объеме 200 г. помещают в круглодонную в 2 –х л. колбу и заливают отмеренным количеством воды очищенной 1000 мл.. После колбу соединяют с аппаратом Клевенджера и нагревают на водяной бане. Эфирное масло отгоняют в течение 2-2,5 ч. Начало отгонки устанавливают с момента появления первых капель дистиллята. Интенсивность отгонки не должна превышать 45-50 капель в минуту. За 10 мин до конца отгонки прекращают подачу воды в холодильник с целью прогревания его для того, чтобы оставшиеся на его внутренних стенках капли эфирного масла стекли в приемник. После окончания отгонки объем масла из приемника сливают и пропускают пар через аппарат в течение 30 мин. Для охлаждения воды в рубашке холодильника на аппарате Клевенджера используют миничиллер.

**Стадия 3. Отделение масла.** Полученное масло отделяют от воды с помощью делительной воронки.

**Стадия 4. Сушка.** Полученное масло сушат над безводным сульфатом натрия.

#### **Упаковка**

**Стадия 5. Первичная упаковка.** Масло разливают в стеклянные флаконы для фармацевтического применения из оранжевого стекла *I* класса (ГФ РК I, т.1, 3.2.1) с винтовой горловиной вместимостью 5 мл, 10 мл. Флаконы вместимостью 5 мл, 10 мл укупоривают навинчивающимися полипропиленовыми крышками с контрольным кольцом и полиэтиленовыми капельницами (ГФ РК I, т.1, 3.2.2). После укупорки флаконов их маркируют индивидуальными этикетками.

Флаконы проверяют на герметичность в приборе контроля флаконов.

**Стадия 6. Вторичная упаковка.** Каждый флакон вместе с инструкцией по медицинскому применению упаковывают в коробку из картона коробочного марки хром-эрзац по ГОСТ 7933-89 или из картона хром-эрзац для складных коробок по ТУ 63.151.-01-03 для потребительской

тары по ГОСТ 7933-89. На коробку наклеивается голограмма с фирменным логотипом.

**Стадия 7. Транспортная упаковка.** Коробки упаковывают в групповую тару по 50 штук для флаконов, на которую наклеивают этикетку в соответствии с ГОСТ 17768-90Е.

На рисунке 26 представлена технологическая схема производства эфирного масла З. Бунге.

#### 4.1.1 Изучение фармакопейных характеристик эфирного масла

Фармакопейные характеристики эфирного масла З. Бунге были изучены в соответствии с ГФ РК I, т.1, раздел 2.8 Методы Фармакогнозии.

**Описание.** Прозрачная жидкость светло-желтого или светлого зеленовато-желтого цвета с характерным запахом и охлаждающая на вкус  
**Растворимость эфирных масел в спирте.** Масло смешивается с 96% этанолом и метилхлоридом в соотношении 1 мл:20мл.

**Идентификация пулегона.** На хроматограмме в УФ-свете обнаруживали темно-коричневое пятно с величиной  $R_f$  около 0.61. Затем пластинку опрыскивали свежеприготовленным раствором 10 г/л ванилина *P* в кислоте серной *P*. Окраска пятна усиливалась.

**Относительная плотность.** 0.900 - 0.912 г/см<sup>3</sup> (ГФ РК I, т. 1, 2.2.5, метод 1)

**Показатель преломления.** 1.467 (ГФ РК I, т. 1, 2.2.6)

**Оптическое вращение.** От - 10° до - 30° (ГФ РК I, т. 1, 2.2.7).

**Кислотное число.** Не более 1.4 (ГФ РК I, т. 1, 2.5.1).

**Пероксидное число.** Не более 20 (ГФ РК I, т. 1, 2.5.5).

**Вода в эфирных маслах.** 10 капель эфирного масла смешивают с 1 мл сероуглерода *P*. Раствор остается прозрачным при стоянии.

**Жирные масла и осмолившиеся эфиры в эфирных маслах.** 1 каплю эфирного масла наносили на фильтровальную бумагу. Капля полностью испаряется в течение 24ч, не оставляя полупрозрачного или жирного пятна.

**Остаток после выпаривания эфирных масел.** 92.92% (ГФ РК I, т. 1, 2.8.9).

**Микробиологическая чистота.** В 1 мл препарата допускается наличие: аэробных бактерий не более 10<sup>4</sup>, грибов (суммарно) не более 10<sup>2</sup>. В 1 мл препарата допускается наличие: энтеробактерий и других граммотрицательных не более 100. В 1 мл препарата не допускается наличие *E.coli* в 1.0г, *Salmonella* в 10.0г, *Staphylococcus aureus* в 1.0г.

**Количественное определение.** Содержание пулегона, определенное методом ГЖХ, должно быть не менее 40% (ГФ РК т.1, 2.2.28).

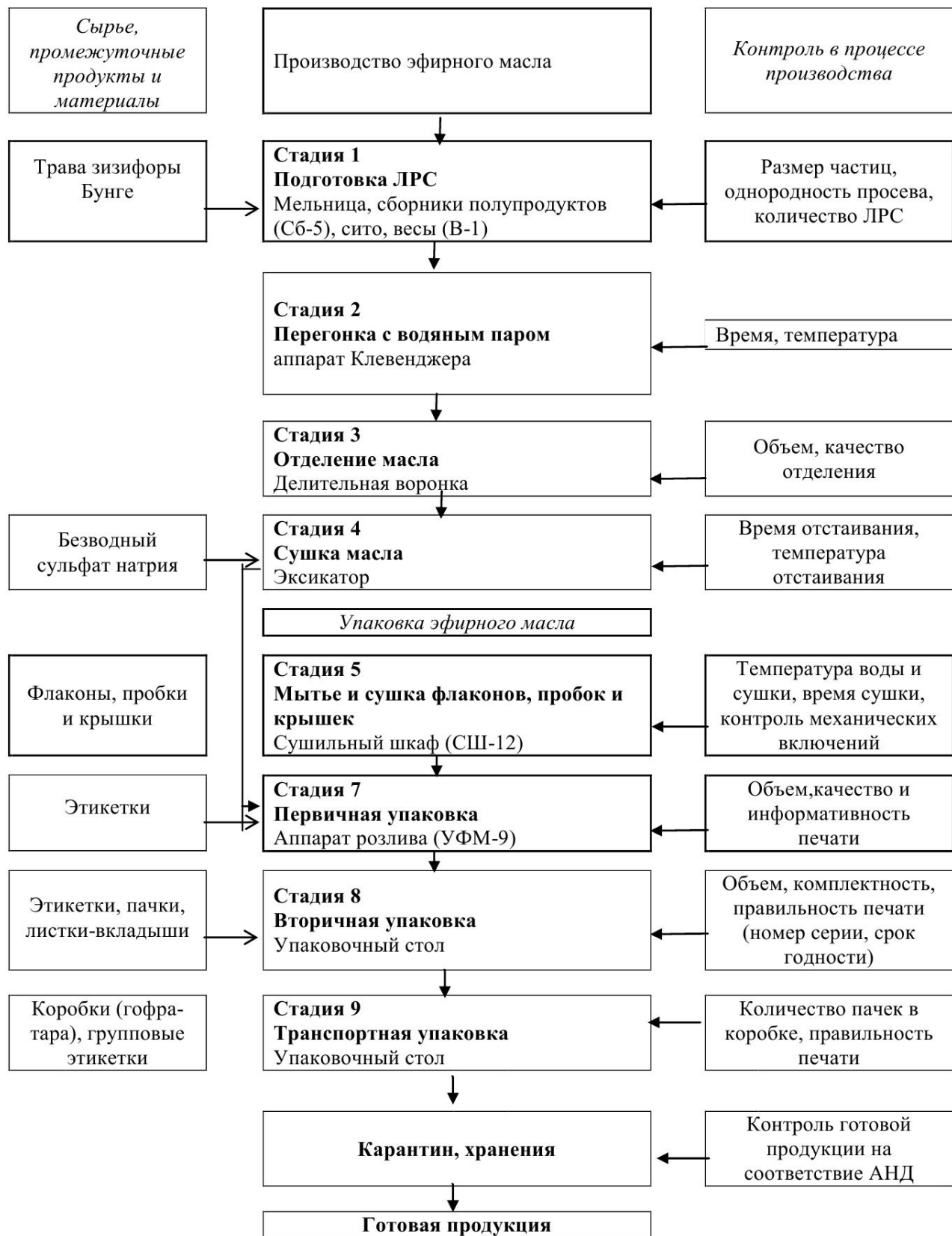


Рисунок 26- Технологическая схема производства эфирного масла З. Бунге.

#### 4.1.2 Разработка спецификации качества эфирного масла З. Бунге

На основании полученных данных была разработана спецификация качества на эфирное масло З. Бунге и проект АНД в соответствии с приказом МЗ РК от 19 ноября 2009 г. №754 « Правила составления, согласования и экспертизы нормативно-технического документа по контролю за качеством и безопасностью лекарственных средств» [116,120]. Спецификация качества эфирного масла представлена в таблице 23.

Таблица 24-Спецификация качества «зизифора Бунге эфирное масло»

Показатели качества	Нормы Отклонений	Методы испытаний
1	2	3
Описание	Прозрачная жидкость светло-желтого или светлого зеленовато-желтого цвета с характерным запахом и охлаждающая на вкус	Визуально. ГФ РК I, т. 1, 2.8.8
Растворимость эфирных масел	Смешивается с 96% этанолом и метиленхлоридом 1:20	ГФ РК I, т. 1, 2.8.10
Идентификация - пулегон	На хроматограмме в УФ-свете обнаруживается темно-коричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61, окраска которого усиливается после обработки раствором 10 г/л ванилина Р в кислоте серной Р.	ТСХ, ГФ РК I, т. 1, 2.2.27
Относительная плотность	От 0.900 до 0.912 г/см <sup>3</sup>	ГФ РК I, т. 1, 2.2.5
Показатель преломления	1.467	ГФ РК I, т. 1, 2.2.6
Оптическое вращение	От - 30 ° до - 10 °	ГФ РК I, т. 1, 2.2.7
Кислотное число	Не более 1.4	ГФ РК I, т. 1, 2.5.1
Пероксидное число	Не более 20	ГФ РК I, т. 1, 2.5.5
Вода в эфирных маслах	Раствор должен быть прозрачным при стоянии после смешивания с сероуглеродом Р	ГФ РК I, т. 1, 2.8.5

Продолжение таблицы 24

1	2	3
Остаток после выпаривания эфирных масел	92.92%	ГФ РК I, т. 1, 2.8.9
Жирные масла и осмолившиеся эфиры в эфирных маслах	Субстанция должна выдерживать испытание	ГФ РК I, т. 1, 2.8.7
Микробиологическая чистота	<p>В 1 мл препарата допускается наличие: аэробных бактерий не более 10<sup>4</sup>, грибов (суммарно) не более 10<sup>2</sup>.</p> <p>В 1 мл препарата допускается наличие: энтеробактерий и других грамотрицательных не более 10<sup>0</sup>.</p> <p>В 1 мл препарата не допускается наличие E.coli в 1.0г, Salmonella в 10.0г, Staphylococcus aureus в 1.0г.</p>	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12
Количественное определение - пулегон	Не менее 40.0%	Газовая хроматография, ГФ РК т.1, 2.2.28
Упаковка	<p>По 5 мл, 10 мл препарата в стеклянные флаконы для фармацевтического применения из оранжевого стекла I класса (ГФ РК I, т.1, 3.2.1) с винтовой горловиной. Флаконы вместимостью 5 мл, 10 мл укупорены навинчивающимися полипропиленовыми крышками с контрольным кольцом и полиэтиленовыми капельницами (ГФ РК I, т.1, 3.2.2).</p> <p>На стеклянные флаконы наклеивается этикетка из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86Е. Каждый флакон вместе с инструкцией упаковывают в коробку из картона коробочного марки хром-эрзац по ГОСТ 7933-89 или из картона хром-эрзац для складных коробок по ТУ 63.151.-01-03. Коробки упаковывают в групповую тару по 10 штук, на которую наклеивают этикетку в соответствии с ГОСТ 17768-90Е.</p>	В соответствии с АНД



Продолжение таблицы 24

1	2	3
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с АНД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768–90Е	ГОСТ 17768–90Е
Хранение	При температуре не выше 25 °С,	В соответствии с АНД
Срок хранения	2 года	В соответствии с АНД
Основное фармакологическое действие	Антибактериальное, анальгезирующее действия	

4.1.3 Изучение стабильности эфирного масла З. Бунге

Изучение стабильности эфирного масла зизифоры Бунге (*Ziziphora bungeana* Juz., включает 24 мес долгосрочных испытаний в условиях температурного режима  $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $(60 \pm 5)\%$ .

Изучение стабильности было проведено на трех опытно-промышленных сериях (таблица 25). В таблицах 27-29 представлены результаты изучения стабильности, охватывающие комплекс характеристик, полученных при физико-химических и микробиологических испытаниях, согласно спецификации (таблица 26). Периодичность контроля образцов составляла по основным показателям качества: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяцев, а для показателя микробиологическая чистота - 0, 24 месяца. Данное условие позволяет подтвердить устойчивость активных компонентов во времени.

Таблица 25– Сведения об исследуемых опытно-промышленных сериях эфирного масла зизифоры Бунге

Период заготовки	Номер серии	Объем, г
Июль 2015	Z010715	3
Июль 2015	Z020715	3,1
Июль 2015	Z030715	3,3

На данный момент испытания стабильности (точки контроля 18 и 24 месяца) продолжаются.

Таблица 26- Результаты испытаний стабильности лекарственной субстанции «Масло зизифоры Бунге»

Упаковка: стеклянные флаконы для фармацевтического применения изоранжевого стекла I класса (ГФ РК I, т.1, 3.2.1) с винтовой горловиной.		Партия: Z010715					
Температура: $(18 \pm 2)$ °C. Относительная влажность: $(60 \pm 5)$ %		Дата начала испытания: 07.2015г					
		Дата окончания испытания: 07.2017 г					
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.					
		0	3	6	9	12	18
1	2	3					
Описание	Прозрачная жидкость светло-желтого или светло-зеленовато-желтого цвета с характерным запахом и холодящая на вкус	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Испытания продолжаются

Продолжение таблицы 26

1	2	3					
Идентификация: А. Тонкослойная хроматография - пулегон	На хроматограмме в УФ-свете обнаруживается темнокоричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61, окраска которого усиливается после обработки раствором 10 г/л ванилина Р в кислоте серной Р	0.61	0.61	0.60	0.62	0.59	Испытания продолжаются
Кислотное число	Не более 1.4	0.98	1.00	1.05	1.23	1.31	Испытания продолжаются
Пероксидное число	не более 20	16	17	18.5	18.7	19	Испытания продолжаются
Вода в эфирных маслах	Раствор должен быть прозрачным при стоянии	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Испытания продолжаются
Остаток после выпаривания эфирных масел	Не более 92.92%	92,90	92,20	92,00	92,00	91,94	Испытания продолжаются
Количеств.определени е: - пулегон	Не менее 40 % в эфирном масле	55,5	54,3	54,2	54,1	53,7	Испытания продолжаются
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 2	Соотв	Соотв	Соотв	Соотв	Соотв	Испытания продолжаются

Таблица 27- Результаты испытаний стабильности лекарственной субстанции «Масло зизифоры Бунге»

Упаковка: стеклянные флаконы для фармацевтического применения изоранжевого стекла <i>I класса</i> (ГФ РК I, т.1, 3.2.1) с винтовой горловиной.		Партия: Z020715					
Температура: $(18 \pm 2)$ °С. Относительная влажность: $(60 \pm 5)$ %		Дата начала испытания: 07.2015 г					
		Дата окончания испытания: 07.2017 г					
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.					
		0	3	6	9	12	18
1	2	3					
<b>Описание</b>	Прозрачная жидкость светло-желтого или светло-зеленовато-желтого цвета с характерным запахом и охлаждающая на вкус	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соот в.	Испытание продолжаются

Продолжение таблицы 27

1	2	3					
Идентификация: А. Тонкослойная хроматография - пулегон	На хроматограмме в УФ-свете обнаруживается темно-коричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61, окраска которого усиливается после обработки раствором 10 г/л ванилина Р в кислоте серной Р	0.61	0.60	0.60	0.59	0.59	Испытания продолжают ся
Кислотное число	Не более 1.4	0.98	1.07	1.13	1.19	1.27	Испытания продолжают ся
Пероксидное число	не более 20	17	17.2	18.6	18.9	19	Испытания продолжают ся
Вода в эфирных маслах	Раствор должен быть прозрачным при стоянии	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Испытания продолжают ся
Остаток после выпаривания эфирных масел	Не более 92.92%	92,85%	92,20%	92,7%	92,0%	91.88%	Испытания продолжают ся
Количеств.определ ение: - пулегон	Не менее 40 % в эфирном масле	56.2	55.5	55.0	54.9	54.2	Испытания продолжают ся
Микробиологическ ая чистота	ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 2	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Испытания продолжают ся

Таблица 28- Результаты испытаний стабильности лекарственной субстанции «Масло зизифоры Бунге»

Упаковка: стеклянные флаконы для фармацевтического применения из оранжевого стекла I класса (ГФ РК I, т.1, 3.2.1) с винтовой горловиной.		Партия: Z030715					
Температура: $(18 \pm 2)$ °С. Относительная влажность: $(60 \pm 5)$ %		Дата начала испытания: 07.2015 г					
		Дата окончания испытания: 07.2017 г					
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.					
		0	3	6	9	12	18
1	2	3					
Описание	Прозрачная жидкость светло-желтого или светло-зеленовато-желтого цвета с характерным запахом и охлаждающая на вкус	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Испытания продолжаются

Продолжение таблицы 28

Идентификация: А. Тонкослойная хроматография - пулегон	На хроматограмме в УФ-свете обнаруживается темнокоричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61, окраска которого усиливается после обработки раствором 10 г/л ванилина Р в кислоте серной Р	0.61	0.60	0.60	0.59	0.59	Испытания продолжаются
Кислотное число	Не более 1.4	0.99	0.99	1.02	1.12	1.25	Испытания продолжаются
Пероксидное число	не более 20	17	18.1	18	18.8	18.8	Испытания продолжаются

Продолжение таблицы 28

Вода в эфирных маслах	Раствор должен быть прозрачным при стоянии	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Испытания продолжаются
Остаток после выпаривания эфирных масел	Не более 92.92%	92,90%	92,74%	92,60%	92,10%	91,96%	Испытания продолжаются
Количеств.определение: - пулегон	Не менее 40 % в эфирном масле	56,7	55,0	54.5	54.0	53,8	Испытания продолжаются
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 2	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Испытания продолжаются



Оценка стабильности лекарственной субстанции «Масло зизифоры Бунге» по показателю количественного содержания основного компонента пулегона представлена на рисунке 27.

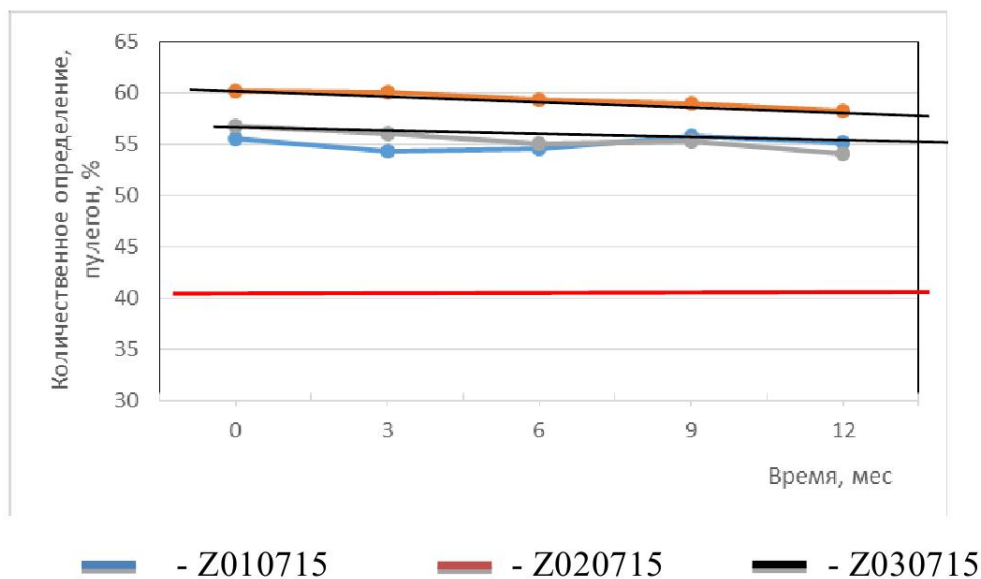


Рисунок 27–Оценка стабильности лекарственной субстанции «Масло зизифоры Бунге» по показателю количественного содержания основного компонента пулегона

На основании проведенных 12–месячных долгосрочных исследований стабильности трех опытно-промышленных партий лекарственной субстанции масло З. Бунге в условиях температурного режима  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $60 \pm 5\%$ , было установлено, что никаких существенных изменений в количественном содержании основного компонента масла – пулегона -не наблюдалось.

## 4.2 Разработка оптимальной технологии густого экстракта З. Бунге в докритических условиях

### 4.2.1 Получение густого экстракта из травы З. Бунге

Для получения  $\text{CO}_2$  экстракта было использовано свежее- высушенное сырье, собранное в период цветения. Экстракция из травы зизифоры произведена в ТОО «Фито-Аромат» на углекислотной установке (УУПЭ) 5л, в соответствии со стандартом предприятия СТ 27658-1910-ТОО-02-2011 на условиях докритики, экстрагент – жидкая углекислота ГОСТ 8050-85. Масса использованного сырья составила 2300г [121,122].

Был проведен ряд экспериментальных экстракций при различных физических параметрах экстрагента. Для увеличения площади контакта

экстрагируемого сырья с жидким CO<sub>2</sub>, траваизмельчалось на дробилке КДУ-2. В таблице 29 указаны результаты получения экстракта.

Таблица 29- Результаты получения экстракта

Порядок экстракции	Параметры экстракции				Выход экстракта, г (%)
	Экстракционная масса, Г	Рабочее давление, атм.	Температура экстракции, °С	Время экстракции, ч.	
1-я экстракция	2300	73 атм	28	16	5 (0,2)
2-я экстракция	2295	70 атм.	26	10	3 (0,13)
3 –я экстракция	2200	65 атм.	23	18	27.7 (1,26)
4-я экстракция	2300	62 атм	22	10	50 (2,17)

На рисунке 28 приведена технологическая схема получение густого углекислого экстракта З.Бунге в докритических условиях



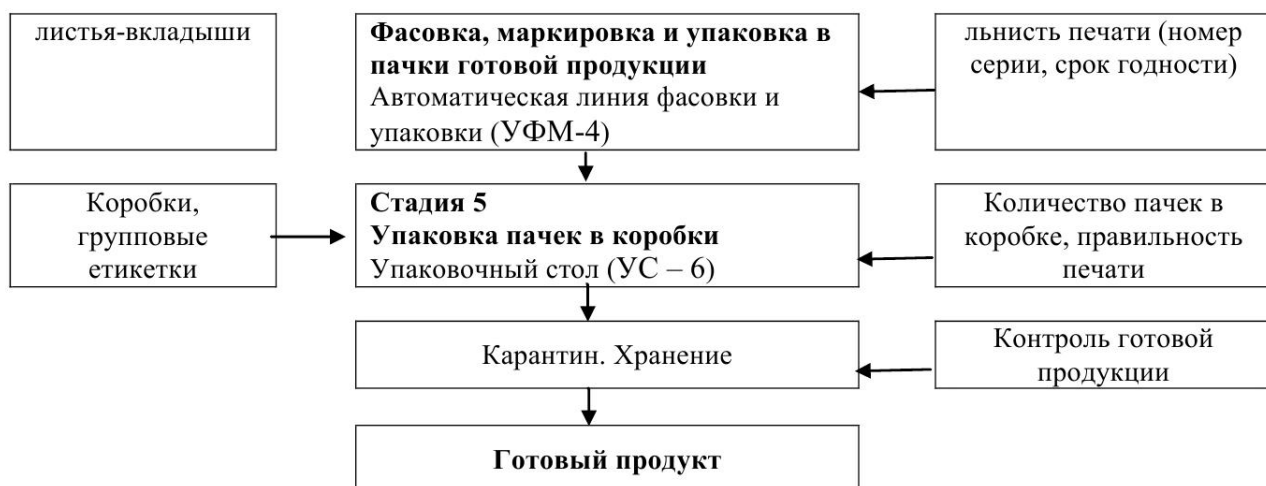


Рисунок 28 - Технологическая схема получение густого углекислого экстракта *З.Бунге* в докритических условиях

Для исследования компонентного состава густого экстракта *З. Бунге* его фракционировали на колонке с силикагелем (силикагель 60 F254). На хроматографической колонке с использованием системы гексан-этилацетат (в соотношении 20:80) получили 25 фракции экстракта. Дальнейшее фракционирование с использованием колоночной хроматографии привело к выделению шести соединений (рисунок 29). Структуру выделенных соединений определяли по 1D, 2D ЯМР и масс-спектральными данными. Для идентификации этих соединений  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры были получены на Bruker модели 400 ЯМР-спектрометра (Германия) с помощью стандартных импульсных последовательностей, работающих на частоте 400 МГц,  $^1\text{H}$  и 100 МГц в  $^{13}\text{C}$ , соответственно. Хлороформ использовали в качестве растворителя, и тетраметилсилан использовали в качестве внутреннего стандарта.

Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на масс-спектрометре Micromass Q-ToF Micro с источником блокировки распыления. Фракции, полученные колоночной хроматографией анализировали с помощью ТСХ (силикагель 60 F254). ТСХ-анализ в системе растворителей этилацетат-гексан (10:90) дал возможность идентифицировать следующие соединения: 3 $\beta$ -ацетоксиолеан-11-ен-28,13 $\beta$ -олид (**9**), 3 $\beta$ -ацетокси-11 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -эпокси-олеанан-28,13 $\beta$ -олид (**10**), бетулин (**11**),  $\beta$ -с-итостерол (**12**), олеиновую кислоту (**13**) и глицерил 1,3-дилинолеат (**14**). 9 и 10 соединения впервые выделены из растения *З. Бунге* [123].

## Рисунок29- Химическая структура компонентов густого экстракта З. Бунге

### 4.2.2 Изучение количественного содержания компонентов густого экстракта з. Бунге

Определение количественного содержания компонентов густого экстракта З. Бунге проводили на газовом хроматографе Clarus 580 (PerkinElmer) с масс-спектрометрическим детектором Clarus-SQ 8 (рис.4). Приготовление пробы густого экстракта: около 25 мг (точная навеска) густого экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл гексана, доводили до метки и перемешивали до полного смешения масла. Хроматографические условия: колонка капиллярная RestekRxi®-1 ms 0,25 мм x 30м x 0,25 мкм; объем пробы: 1,0 мкл; газ-носитель He; скорость газа-носителя: 1 мл/мин; деление потока 1:25; t колонки: 45 °С (2 мин), подъем 1,5 °С/мин до 200 °С, далее 15 °С/мин до 280 °С, изотермический режим при 280 °С в течение 10 мин; t испарителя – 280 °С, массспектрометрический детектор: t – 240 °С, EI+ = 70 eV; время сканирования с 4 по 120 мин; режим сканирования ионов 39-500 m/z.

Процентное содержание компонентов вычисляли автоматически, исходя из площадей пиков общей хроматограммы ионов. Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания, с использованием библиотеки NIST. Время удерживания пересчитывали относительно n-алканов.

Таблица 30 – Компонентный состав густого экстракта зизифора Бунге

RT	Наименование компонента	Содержания в смеси %
1	2	3
10.108	Циклогексанона, 3-метил-	0.8
16.532	1,8-Цинеол	0.5

Продолжение таблицы 30

25.285	транс-Ментон	2.5
25.986	цис-Ментонглицерилкеталь	1.3
26.713	Изопулегон	0.3
26.9	Изоментол	0.7
28.745	$\alpha$ -Терпиниол	0.2
28.833	1R-Ментол	0.4
30.242	Оксид цис-пулегона	1.2
32.175	Пулегон	12.3
32.751	<i>Неидент. 1</i>	0.4
35.782	<i>Неидент. 2</i>	0.4
37.902	Тимол	1.1
38.504	Карвокрол	0.5
39.912	Пиперитон	1.4
50.838	Минтлактон	0.7
50.996	<i>трет</i> -Бутил- <i>n</i> -бензохинон	0.4
52.335	<i>Неидент. 3</i>	0.7
53.263	Изоминтлактон	0.3
55.908	<i>Unkown 4</i>	0.9
59.775	Оксид кариофиллена	0.3
74.468	Тетрадекановая кислота	0.2
79.795	2-Пентадеканон, 6,10,14-триметил	0.3
85.844	Пальмитиновая кислота	0.5
87.844	<i>n</i> -Гексадекановая кислота	7.6
89.495	Гексадекановой кислоты этиловый эфир	0.3
96.414	Фитол	0.4
97.804	( <i>Z,Z,Z</i> )-9,12,15-Октадекатриеновая кислота	20.7
98.09	( <i>E</i> )-9-Октадеценовая кислота	6.1
98.787	9,12- Октадекадиеновая кислота, этиловый эфир	0.3
98.971	Этиловый эфир 9,12,15-октадекатриеновой кислоты	0.3
99.503	Октадекановая кислота	1.2
104.052	<i>Неидент. 5</i>	0.9
107.075	<i>Неидент. 6</i>	0.4
107.985	Эйкозановая кислота	0.3
109.793	<i>Неидент. 7</i>	0.5
109.995	Диизооктилфталат	0.2
111.213	$\alpha$ -Глицероловый линоленат	0.6
112.754	Сквален	1.4
112.923	$\alpha$ -Токоспиро В	0.2
113.165	$\alpha$ -Токоспиро А	0.2

Продолжение таблицы 30

115.678	<i>Unknown 8</i>	0.2
116.349	Витамин Е	1.9
117.952	Кампестерол	0.7
118.554	Стигмастерол	1.1
119.82	$\beta$ -Ситостерол	<b>7.6</b>
120.054	Изофукостерол	1.0
120.337	$\alpha$ -Амирин	1.1
<b>Итого</b>		<b>83.4</b>

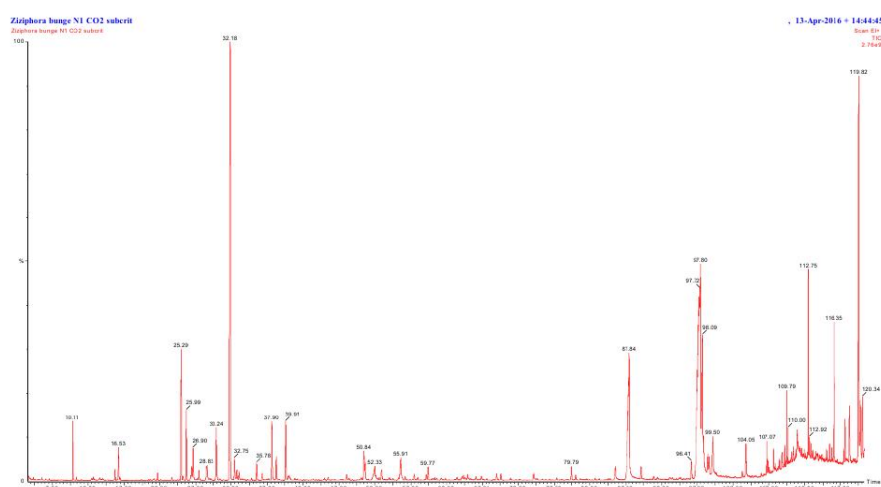


Рисунок 30- Хроматограмма компонентов густого экстракта З. Бунге

Проведенный анализ компонентного состава густого экстракта З. Бунге показал что, по содержанию преобладают следующие компоненты: линеленовая кислота (20.7%), пулегон (12.3%), пальмитиновая кислота (7,6%) а также,  $\beta$ -Ситостерол (7.6%). На рисунке 29 указаны хроматографические спектры З.Бунге. На основании полученных данных было установлено идентификация и количественное содержание основных компонентов густого экстракта.

#### 4.2.3 Изучение фармакопейных критериев густого углекислого экстракта З.Бунге

Критерии качества густого углекислого экстракта З. Бунге были изучены в соответствии ГФ РК раздела 2.8 «Методы Фармакогнозии» и раздела «Экстракты».

**Описание.** Густая, вязкая масса темно-коричневого цвета с зеленоватым оттенком, с характерным запахом и вкусом (ГФ РК I, т.1, 2.8.8).

**Растворимость.** Растворяется в 95% спирте (1:10) с образованием незначительной взвеси и в жирных маслах (ГФ РК I, т.1, 2.8.10).

**Идентификация** На хроматограмме испытуемого раствора времена удерживания пиков линоленовой кислоты, пулегона, пальмитиновой кислоты и  $\beta$  – ситостерола ( $R_f$ : 97.804; 32.175; 87.844; 119.82 соответственно) должны соответствовать с временами удерживания соответствующих веществ в растворах сравнения (ГФ РК I, т.12.8.28).

**Плотность.** От 0.900 до 0.912 г/см<sup>3</sup> (ГФ РК I, т.1, 2.2.5.)

**Показатель преломления.** От 1.457 до 1.467 (ГФ РК I, т.1, 2.2.6).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 25% (ГФ РК I, т. 1, 2.8.17).

**Кислотное число.** Не более 1.4 (ГФ РК I, т.1, 2.5.1).

**Йодное число.** 130,0 – 155 (ГФ РК I, т.1, 2.5.4).

**Число омыления.** До 1 (ГФ РК I, т.1, 2.5.6).

**Содержание тяжелых металлов.** Не более 0,01% (ГФ РК I, т.1, 2.4.8 метод А).

**Микробиологическая чистота.** В 1 г препарата допускается наличие: аэробных бактерий не более 1000, грибов (суммарно) не более 100. В 1 г препарата допускается наличие: энтеробактерий и других грамотрицательных не более 100. В 1 г препарата не допускается наличие *Pseudomonas aeruginos* и *Staphylococcus aureus*. (ГФ РК I, т.1, 2.6.12).

**Количественное определение.** Линоленовой кислоты не менее 20.0%, пулегона не менее 10.0%, пальмитиновой кислоты не менее 4% и  $\beta$ -ситостерола не менее 4 % в экстракте (ГФ РК I, т.1, 2.8.28).

#### 4.2.4 Разработка спецификации качества густого экстракта З.Бунге

На основании полученных данных была разработана спецификация качества (таблица 31) на густой экстракт З. Бунге и проект АНД в соответствии с приказом МЗ РК от 19 ноября 2009 года №754 « Правила составления, согласования и экспертизы нормативно-технического документа по контролю за качеством и безопасностью лекарственных средств» [116].

Таблица 31-Спецификация качества «густой экстракт зизифора Бунге »

Показатели Качества	Нормы Отклонений	Методы испытаний
1	2	3
Описание	Густая, вязкая масса темно-коричневого цвета с зеленоватым оттенком, с характерным запахом и вкусом.	Визуально. ГФ РК I, т. 1, 2.8.8
Растворимость	Растворяется в 95% спирте (1:10) с образованием незначительной взвеси и в жирных маслах	ГФРКИ, т. 1, 2.8.10, ГФРКИ, т. 1. 1.4
Идентификация -линоленовая кислота -пулегон -пальмитиновая кислота - β- Ситостерол	На хроматограммеиспытуемого раствора времена удерживания пиков линоленовой кислоты, пулегона, пальмитиновой кислоты и β – ситостерола (R <sub>t</sub> :97.804; 32.175; 87.844; 119.82 соответственно) должны соответствовать с временами удерживания соответствующих веществ в растворах сравнения	ГХ/МС, ГФ РК I, т. 1, 2.2.28
Показатель преломления	От 1.457 до1.467	ГФ РК I, т. 1, 2.2.6
Тяжелые металлы	Не более 0,01%	ГФ РК I, т. 1, 2.4.8 метод А
Потеря в массе при высушивании	Не более 25 %	ГФ РК I, т. 1, 2.8.17
Кислотное число	Не более 1.4	ГФ РК I, т. 1, 2.5.1
Относительная плотность	От 0.900 до 0.912 г/см <sup>3</sup>	ГФ РК I, т. 1, 2.2.5
Число омыления	До 1	ГФ РК РК I, т. 1, 2.5.6
Йодное число	130,0 – 155	ГФ РК I, т. 1, 2.5.4.



Продолжение таблицы 31

Микробиологическая чистота	В 1 г препарата допускается наличие: аэробных бактерий не более 1000, грибов (суммарно) не более 100. В 1 г препарата допускается наличие: энтеробактерий и других грамотрицательных не более 100. В 1 г препарата не допускается наличие <i>Pseudomonas aeruginos</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12
Количественное определение - линоленовая кислота - пулегон - пальмитиновая кислота - β-ситостерол	Не менее 20.0%  Не менее 10.0 % Не менее 4.0 %  Не менее 4.0 %	Газовая хроматография, ГФ РК т.1, 2.2.28
Упаковка	50 мл препарата помещают во флакон из оранжевого стекла с завинчивающейся пластиковой крышкой с контролем первого вскрытия. На флакон наклеивают самоклеящуюся этикетку. 1 флакон вместе инструкцией по медицинскому применению на государственном и русском языках помещают в коробку из картона с голограммой фирмы-производителя.	В соответствии с АНД
Маркировка	В соответствии	
Транспоровка	В соответствии с ГОСТ 17768–90	ГОСТ 17768–90
Хранение	В сухом месте при температуре не выше 18 °С	В соответствии с АНД
Срок хранения	2 года	В соответствии с АНД
Основное фармакологическое действие	Антибактериальное и анальгезирующее действие	

### **Выводы по четвертому разделу**

По результатам исследований составлена технологическая схема производства эфирного масла *З. Бунге* в опытно-промышленных условиях. На основании полученных данных разработан лабораторный регламент производства эфирного масла (Приложение Г). Изучены фармакопейные характеристики эфирного масла в соответствии с ГФ РК и ЕФ. Разработаны спецификация качества и аналитический нормативный документ (Приложение Д). В режиме долгосрочных исследований проводится изучения стабильности эфирного масла *З. Бунге*. За 6 месяцев хранения эфирное масла в упаковке стеклянные флаконы для фармацевтического применения из оранжевого стекла *I класса* (ГФ РК I, т.1, 3.2.1) с винтовой горловиной, в условиях: температура:  $(18 \pm 2)$  °С., относительная влажность:  $(60 \pm 5)$  % показало что, значительных изменений в показателях качества эфирного масла не наблюдается.

Определены оптимальные параметры экстрагирования густого экстракта *з. Бунге*. В докритических условиях с наибольшим выходом экстракта (2.17%), оптимальные условия экстракции густого экстракта определяются с температурой экстрагента – жидкая углекислота 22<sup>0</sup> С и давлением 60 – 65 атм. На основании полученных результатов разработаны технологическая схема опытно-промышленный регламент (приложение Ё) производства густого экстракта (СО<sub>2</sub>)травы *з. Бунге*.

Технология получения густого экстракта *з. Бунге* внедрено в фармацевтическое предприятие (Приложение Е)

Определен химический состав густого экстракта и установлены основные компоненты. Из фракции густого экстракта выделенные на колоночной хроматограмме были выделены два новых соединения. Новые соединения, относящиеся к классу тритерпенов впервые выделены из *з. Бунге*. На основании исследований химического состава разработана спецификация качества и аналитический нормативный документ (приложение Ж) густого экстракта *З. Бунге*.

## 5 ТОКСИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИТОСУБСТАНЦИИ З. БУНГЕ

5.1 Изучение антимикробной активности эфирного масла и густого экстракта З. Бунге

Антибактериальная активность эфирного масла и густого экстракта З. Бунге изучались в научной лаборатории Национального центра по исследованию природных веществ школы Фармации, университета Миссиссиппи методом InVitro. Для определения антимикробной активности использовались 5 видов бактериальных штаммов и 5 видов штаммов грибов патогенных для человека. Образцы сначала тестируют в первичном скрининге 50мг/мл в двойном экземпляре и высчитывают процент ингибирования соотношения негативных и позитивных контролей. Если образец показал больше 50% ингибирования то анализ переходит ко вторичному анализу.

Значение IC<sub>50</sub>, это минимальная концентрация ингибирования микроорганизмов 50%. Если значение IC<sub>50</sub> ниже 10 мкг/мл, показывает высокую активность. Полученные данные показывают, что эфирное масло из З.Бунге демонстрируют различные уровни антимикробной активности.

Таблица 32-Результаты антимикробного скрининга эфирного масла и густого экстракта З. Бунге

Названия штаммов	Результаты испытаний ингибирования при концентрации эфирного масла 50 мг / мл(% ингибирования.)	Результаты испытаний ингибирования при концентрации густого экстракта 50 мг / мл (% ингибирования.)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	0
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	2	1
<i>Escherichia coli</i>	1	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	5
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	0	0
<i>Candida albicans</i>	38	17
<i>Candida glabrata</i>	4	3
<i>Candida krusei</i>	14	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	0

Результаты, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о том, что эфирное масло 3. Бунге значительной мере ингибирует рост грибов *Candida albicans* 38 мкг/мл и *Candida krusei* 14 мкг/мл, меньшей мере *Candida glabrata* 4 мкг/мл, а также *Pseudomonas aeruginosa* 7 мкг/мл, и *Staphylococcus aureus* 4 мкг/мл. На *Escherichiacoli*, *Mycobacteriumintracellulare* и *Aspergillusfumigatus* практически не проявляет активность.

В свою очередь углекислый экстракт значительно ингибирует рост *Candida albicans* 17 мкг/мл и незначительно *Pseudomonas aeruginosa* 5 мкг/мл. Слабую задержку роста проявляет *Candida glabrata*, *Escherichiacoli*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Mycobacteriumintracellulare*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* не показал активность.

При этом отдельные фракции густого экстракта показали во вторичном скрининге антимикробного скрининга более высокое ингибирование роста испытуемых микроорганизмов.

Таблица 33- Результаты антимикробного скрининга фракции углекислого экстракта 3. Бунге

Наименование образцов	C. albicans IC50	C. glabrata IC50	C. krusei IC50	A. fumigatus IC50	C. neoformans IC50	S. aureus IC50	MR S IC50	E. coli IC50	P. aeruginosa IC50	M. intracellulare IC50	Test Conc
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CO <sub>2</sub> -FR-1	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-2	>200	>200	>200	>200	<b>198,76</b>	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-3	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-4	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	20-0.8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-5	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	20-0.8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-6	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-7	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-8	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-9	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL

											L
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

Продолжение таблицы 33

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CO <sub>2</sub> -FR-10	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-11	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-12	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-13	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-14	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-15	>200	>200	>200	>200	>200	<b>45,57</b>	<b>55,29</b>	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-16	>200	>200	>200	>200	<b>132,58</b>	<b>83,84</b>	<b>45,94</b>	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-17	>200	>200	>200	>200	<b>175,81</b>	<b>69,31</b>	<b>195,62</b>	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-18	>200	<b>73,25</b>	>200	>200	<b>47,07</b>	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-19	>200	<b>48,02</b>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-20	>200	>200	>200	>200	>200	>200	<b>159,75</b>	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-21	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-22	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-23	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-24	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL
CO <sub>2</sub> -FR-25	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200-8ug/mL

Несколько фракции густого экстракта (№2, 16, 17,18) показали высокую активность против *S. Neoformans*, фракции № 18, 19 умеренную активность против *S. Glabrata*, фракции №15, 16, 17 против *S. Aureus*, высокую активность против *Methicillin*-

resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) фракции №17, 20, умеренную фракции № 15, 16 показали.

Полученные результаты дают предположить более значительную противогрибковую активность эфирного масла и антибактериальную активность отдельных фракции углекислого экстракта З.Бунге[124].

## **5.2 Изучения влияния эфирного масла и густого экстракта З. Бунге на каннабиноидные и опиоидные рецепторы**

Каннабиноидов и опиоидные рецепторы классифицируются как рецепторы G-белка, которые распознают и трансдукции сообщений через ячейки мембраны. Основными подтипа каннабиноидных рецепторов являются CB1 и CB2 рецепторы, а также наиболее известные опиоидные рецепторы мю ( $\mu$ ), каппа ( $\kappa$ ) и дельта ( $\delta$ ). В организме человека, рецептор CB1 встречается по всей центральной нервной системы в головном мозге и спинном мозге, тогда как рецептор CB2, более распространены в периферической нервной системе по всему организму. Эти рецепторы контролируют широкий спектр процессов в организме, включая память, аппетит, и боли зондирования. Опиоидные рецепторы играют важную роль в центральной нервной системе, сердечно-сосудистой, иммунной, репродуктивной, эндокринной и пищеварительной систем. Они регулируют различные физиологические функции, и прежде всего нейрогормональная секреции надпочечников и гипофиза.

С целью влияния на связывания каннабиноидных и опиоидных рецепторов эфирное масло, густой экстракт и его фракции были сданы для биологического скрининга в центре CORE-NPN (Center of Research Excellence in Natural Products Neuroscience)методом in-vitroCOREв Национальном центре исследовании природных соединений, университета МИссиссипи, финансируемый Национальным институтом здоровья США.

В Таблице 34 приведены результаты ингибирования каннабиноидных рецепторов эфирного масла из з. Бунге. Эти данные указывают на то, что эфирное масло демонстрируют умеренные уровни связывания с каннабиноидными рецепторами и более активное ингибирование рецепторов CB<sub>1</sub>.

К опиоидным рецепторам карра (26,3% Инг.) и  $\mu$  (31,9% Инг.) эфирное масло показал более высокие проценты ингибирования.

Отдельные фракции густого экстракта показали более высокие активности ингибирования связывания каннабиноидных и опиоидных рецепторов. В частности к CB<sub>1</sub> и CB<sub>2</sub> фракции 19, 20, 21, 24 показали значительную активность, а, фракции 6, 7, 8, 20, 21, 22, 23, 24 к Delta рецепторам проявили достаточно высокую активность, также фракции 17, 18, 19к Карра рецепторам оказали значительную чувствительность.

Таблица 34 – Результаты связывания каннабиоидных и опиоидных рецепторов экстрактов 3. Бунге

Sample Code	Concentration Tested	CB1 %Inhibition	CB2 %Inhibition	Delta %Inhibition	Kappa %Inhibition	Mu %Inhibition
CO <sub>2</sub> -Fr1	10ug/mL	-	-	-	-	3,0
CO <sub>2</sub> -Fr2	10ug/mL	9,8	18,2	3,7	24,6	9,4
CO <sub>2</sub> -Fr3	10ug/mL	-	13,4	4,5	7,8	2,3
CO <sub>2</sub> -Fr4	10ug/mL	-	14,3	0,5	7,7	-
CO <sub>2</sub> -Fr5	10ug/mL	8,0	13,6	0,9	1,7	-
CO <sub>2</sub> -Fr6	10ug/mL	-	2,1	<b>47,2</b>	-	2,5
CO <sub>2</sub> -Fr7	10ug/mL	-	10,0	<b>47,1</b>	0,6	10,5
CO <sub>2</sub> -Fr8	10ug/mL	12,3	16,1	<b>56,6</b>	-	4,4
CO <sub>2</sub> -Fr9	10ug/mL	24,3	-	-	34,8	16,0
CO <sub>2</sub> -Fr10	10ug/mL	14,8	-	7,6	8,7	-
CO <sub>2</sub> -Fr11	10ug/mL	3,9	-	3,4	7,2	7,1
CO <sub>2</sub> -Fr12	10ug/mL	2,5	-	-	7,3	-
CO <sub>2</sub> -Fr13	10ug/mL	14,1	-	35,2	12,2	0,6
CO <sub>2</sub> -Fr14	10ug/mL	3,0	10,1	50,2	13,4	0,1
CO <sub>2</sub> -Fr15	10ug/mL	12,8	20,4	52,4	13,8	8,5
CO <sub>2</sub> -Fr16	10ug/mL	29,5	13,4	<b>63,2</b>	22,8	7,2
CO <sub>2</sub> -Fr17	10ug/mL	15,4	19,1	27,40	<b>33,60</b>	11,40
CO <sub>2</sub> -Fr18	10ug/mL	9,0	11,7	20,1	<b>32,4</b>	-
CO <sub>2</sub> -Fr19	10ug/mL	<b>35,9</b>	<b>29,8</b>	52,0	<b>53,5</b>	18,1
CO <sub>2</sub> -Fr20	10ug/mL	<b>55,8</b>	<b>46,2</b>	<b>61,8</b>	21,4	25,2
CO <sub>2</sub> -Fr21	10ug/mL	<b>33,2</b>	9,1	<b>65,4</b>	10,3	4,0
CO <sub>2</sub> -Fr22	10ug/mL	9,1	-	<b>64,6</b>	3,1	-
CO <sub>2</sub> -Fr23	10ug/mL	29,3	12,6	<b>60,2</b>	-	-
CO <sub>2</sub> -Fr24	10ug/mL	<b>43,0</b>	27,8	<b>84,4</b>	28,1	32,0
CO <sub>2</sub> -Fr25	10ug/mL	17,8	8,4	<b>57,9</b>	11,9	1,2
Essential oil	10ug/mL	<b>32,1</b>	<b>20,6</b>	<b>12,0</b>	<b>26,3</b>	<b>31,9</b>

CO2 extract (crude extract)	10ug/mL	16,8	16,1	18,9	25,4	3,5
-----------------------------------	---------	------	------	------	------	-----

### **5.3 Изучение острой токсичности и местнораздражающего действия фитосубстанций З.Бунге**

#### **Результаты исследования местно-раздражающего действия эфирного масла З.Бунге**

Оценка раздражающих эффектов при введении субконъюнктивного эфирного масла визуально выполнена.

Реакции были приняты во внимание сразу же после нанесения вещества в 15 минут (быстрая реакция) и в 24-48 часов (гиперчувствительность) замедленного типа.

Сразу после введения раствора отмечались незначительное покраснение слезного протока и слизистой оболочки конъюнктивы, которое исчезло в течение 30 минут, что указывает на отсутствие раздражающего действия. Других симптомов раздражения за период наблюдения не отмечалось. Общее состояние животных было без изменений в течение всего времени наблюдения.

#### **Результаты исследования сенсibiliзирующего действия эфирного масла З. Бунге.**

Визуально признаки сенсibiliзирующего эффекта на 10-й и 20-й день эксперимента в течение 15 мин и 24 ч после однократного введения эфирного масла на слизистую оболочку конъюнктивы морских свинок не наблюдались. Отмечалось преходящая гиперемия в области слезного протока, которая проходила через 15 мин. Отека слизистой оболочки глаза не наблюдалось. Кровотечений не было.

#### **Результаты исследования острой токсичности густого экстракта З. Бунге при энтеральном введении.**

Морфологические изменения 2 группы животных (введение препарата в дозе 0,01мг) характеризовались следующими изменениями. Структура печени не нарушена, в гепатоцитах отмечалась картина гидропической дистрофии. В цитоплазме клеток содержались вакуоли заполненные цитоплазматической жидкостью (рисунок 31).

Структура почек сохранена. В корковом слое отмечался отек клубочков. В эпителии канальцев I-II порядка картина паренхиматозной гиалиновокапельной дистрофии. В цитоплазме содержались белковые гранулы, ядро сохранено (рисунок 32).



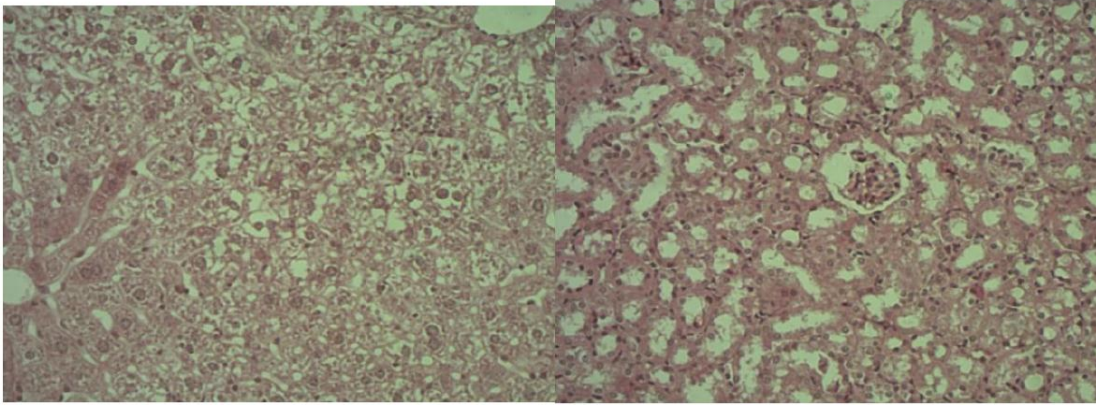


Рисунок 31-Печень-гидропическая дистрофия гепатоцитов  $\times 400$ He. Дозировка 0,01 мл

Рисунок 32 -Почки – паренхиматозная дистрофия эпителии канальцев  $\times 400$  He

В желудке гистологическое строение органа сохранено. Стенка желудка утолщена за счет отека. В эпителии желудка наблюдалась картина паренхиматозной белковой гиалиновокапельной дистрофии, ядро клеток сохранено (рисунок 33).

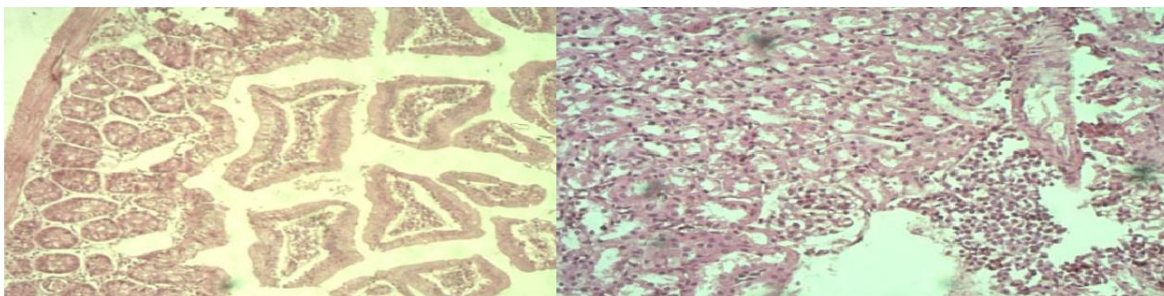


Рисунок 33-Желудок-дистрофия покровного эпителии  $\times 400$  He

Рисунок 34- Почки –инфильтрация строения,отек  $\times 400$ He

При морфологическом исследовании 3 группы животных (введение препарата в дозе 0,02 мг) изменение в органах носили следующий характер. В почках выраженный отек коркового и мозгового слоев. Вокруг почечных сосудов выявлялась круглоклеточная инфильтрация. В эпителии канальцев наблюдалась картина паренхиматозной белковой дистрофии (рисунок 34). Структура печени сохранена, отмечалась выраженная паренхиматозная белковая дистрофия гепатоцитов. Встречались отдельные гепатоциты, лишенные ядер с эфинофильной цитоплазмой (рисунок 35).

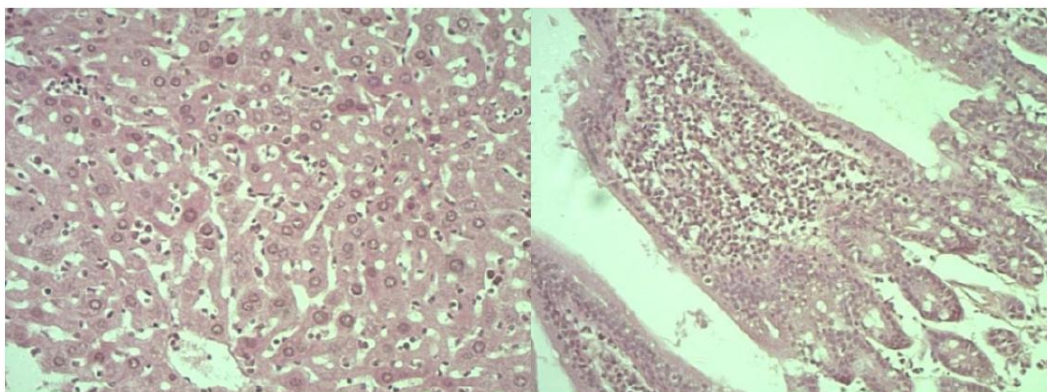


Рисунок 35 - Печень – межблочный отек, паренхиматозная дистрофия гепатоцитов ×400 Не

Рисунок 36- Желудок – дистрофия с воспалительным инфильтратом эпителия желез ворсин ×400 Не

Строение желудка сохраняется, наблюдается отек слизистой оболочки желудка с воспалительной инфильтрацией ворсин (рисунок 36). В эпителии желез и покровного эпителия ворсин наблюдалась картина паренхиматозной белковой дистрофии.

Гистологические изменения внутренних органов 4 группы животных (введение 0,04 мл препарата) характеризовались следующими изменениями. В желудке в одном из отделов структура нарушена за счет формирования микроабцесса. В эпителии желез и покровном эпителии наблюдалась картина паренхиматозной белковой дистрофии (рисунок 37).

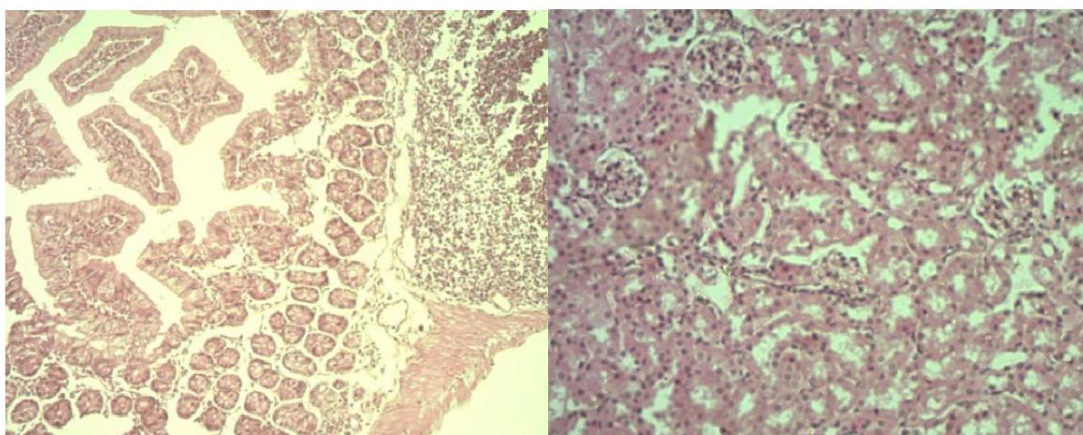


Рисунок 37-Желудок – воспаление стенки с формированием абцесса, дистрофия эпителия желез

Рисунок 38- Почки – отек , дистрофия и некроз отдельных гепатацитов ×400 Не

(Дозировка 0,04 мл)

В почках в эпителии канальцев коркового слоя картина дистрофии и очагового некроза. Последний характеризовался отсутствием ядра в клетке, который представлял собой гомогенную розовую массу (рисунок 38).

В печени на больших участках строение органа сохранялось, однако наряду с дистрофией гепатоцитов встречались очаги микронекроза гепатоцитов (рисунок 39).

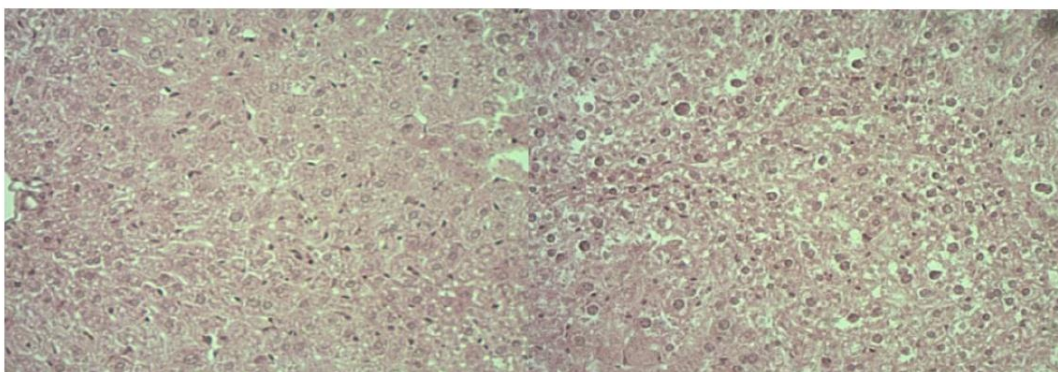


Рисунок 39 - Печень – дистрофия гепатоцитов с некрозом отдельных гепатоцитов  $\times 400$  Не.

Рисунок 40 - Печень- очаговый некроз гепатоцитов  $\times 400$  Не

(Дозировка 0,09 мл)

При морфологическом исследовании 5 серии животных (введение 0,09 мл препарата) изменение в органах носило следующий характер: в печени наблюдались очаги некроза гепатоцитов, участки ткани лишённые ядер (рисунок 40).

В почках наблюдалась дистрофия и некроз эпителия канальцев (рисунок 41). В желудке выявлялась дистрофия эпителия желез и покровного эпителия, с единичными очагами круглоклеточной инфильтрации СОЖ и отеком стенки (рисунок 42).

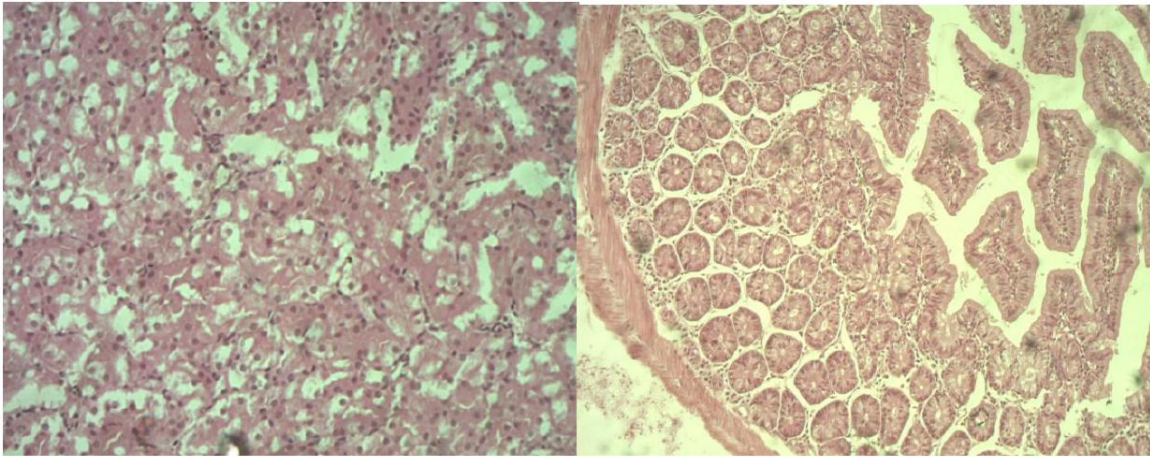


Рисунок 41 -Почки-дистрофия и некроз эпителия канальцев ×400  
He

Рисунок 42 - Желудок – дистрофия эпителия желудка, единичные очаги круглоклеточной инфильтрации ×400 He

**Для определения острой токсичности густого экстракта З. Бунге при местном применении воспроизведен эксперимент на беспородных белых мышах, которые содержались на рационе вивария. Введение вещества проводилось местно путем втирания препарата в сбритые участки кожи однократно. Животные были разделены на 3 группы:**

- 1 - контрольная
- 2 – животные, которым втирался препарат в дозе 0,04
- 3 – животные, которым препарат втирался в кожу в дозе 0,02.

Эксперимент длился 14 дней. Поведение животных во время опыта было активным: хорошо ели, пили воду, двигались по клетке. Носики холодные на ощупь влажные, шерстка опавшая. Кожа в месте втирания без изменений. На 14 день от начала эксперимента были взяты ткани органов (печень, легкие, почки) для гистологического исследования. Кусочки тканей органов фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили по спиртам восходящей концентрации. Препараты окрашивали по стандартной методике гематоксилин -эозином. При морфологическом исследовании были получены следующие данные. Первая группа контрольная. Ткань печени сохранила свое гистологическое строение, гепатоциты с эозинофильной цитоплазмой и базофильным ядром (рисунок 43). Структура легкого не нарушена, межальвеолярные перегородки тонкие, просвет альвеол пустой (рисунок 44). Гистологическое строение почек не изменено (рисунок 45).

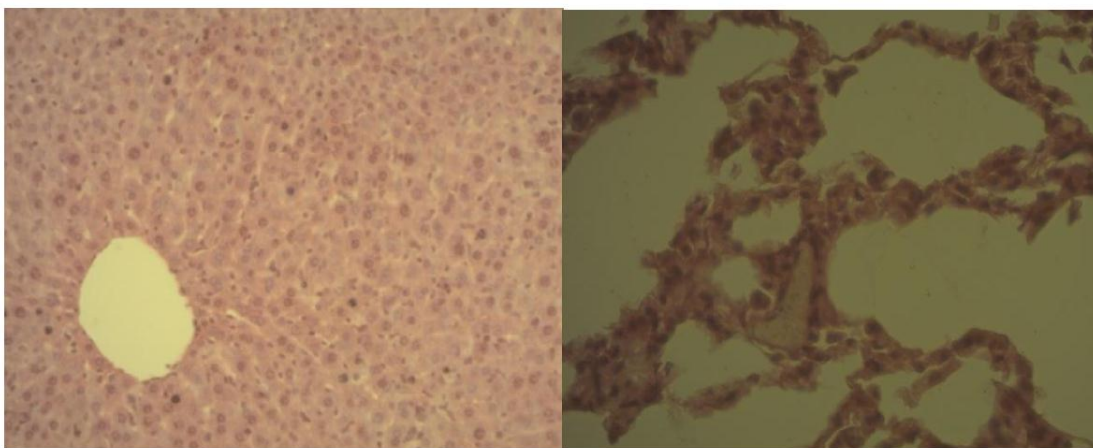


Рисунок 43-Печень  
контрольная группа  $\times 200$  He

Рисунок 44- Ткань легкого,  
контроль  $\times 200$  He

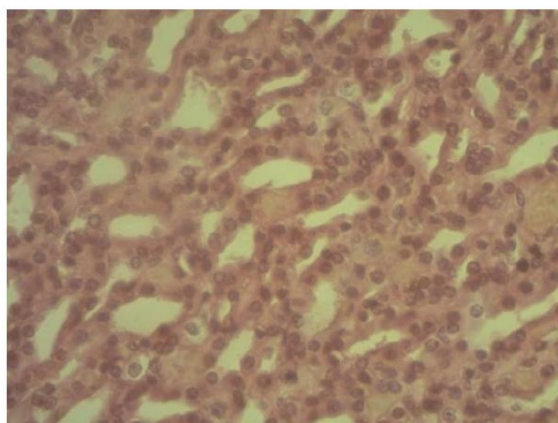


Рисунок 45- Ткань почек, контроль  $\times 200$  He

Морфологические изменения органов мышей третьей группы (втирание 0,02 препарата) были следующими. Легкое сохранило свое гистологическое строение, просветы альвеол свободные межальвеолярные перегородки не утолщены (рисунок 46). Структура печени не изменена, в отдельных местах выявлялся межбалочный отек (рисунок 47). Ткань почки обычного гистологического строения, местами отмечался очаговый отек (рисунок 48).

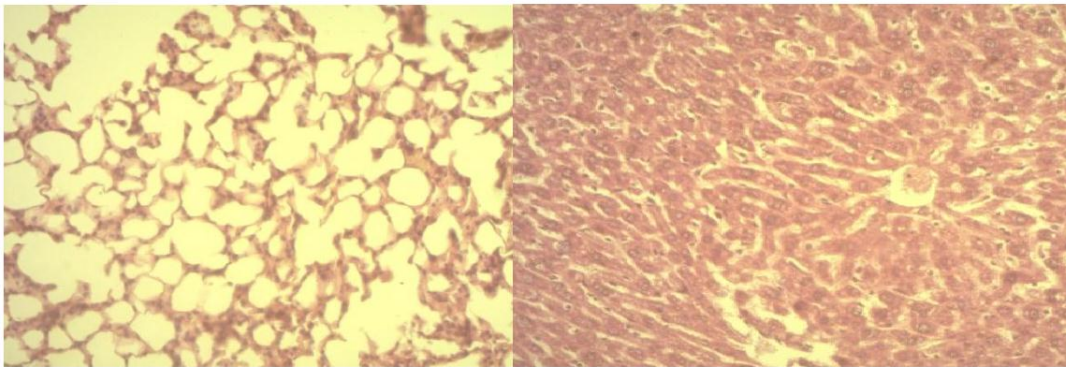


Рисунок 46- Ткань легкого Рисунок 47 - межбалочный отек  
(опыт 0,02 мл) ×100 Непечени (опыт 0,02 мл) ×200 Не

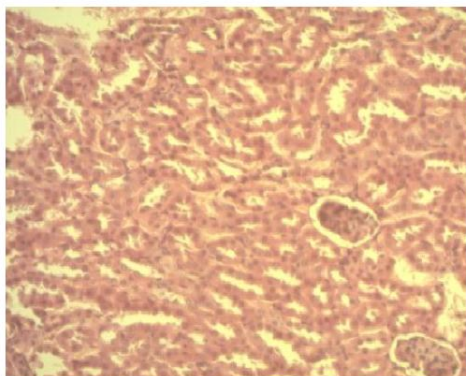


Рисунок 48- Отек ткани почек  
(опыт 0,02 мл) ×200 Не

При гистологическом исследовании органов животных, которым втирали препарат в дозе 0,04 мл были выявлены следующие данные. Ткань легкого сохранила свое гистологическое строение, межальвеолярные перегородки тонкие, просвет альвеол свободный (рисунок 49) .В ткани печени структура органа не нарушена. Местами отмечался очаговый межбалочный отек (рисунок 50). Почки сохраняли свою гистологическую структуру, местами определялся очаговый отек ткани (рисунок 51).

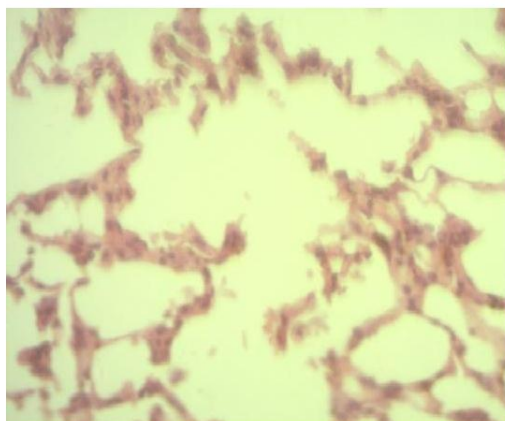


Рисунок 49- Легкое (опытная доза 0,04 мл препарата)

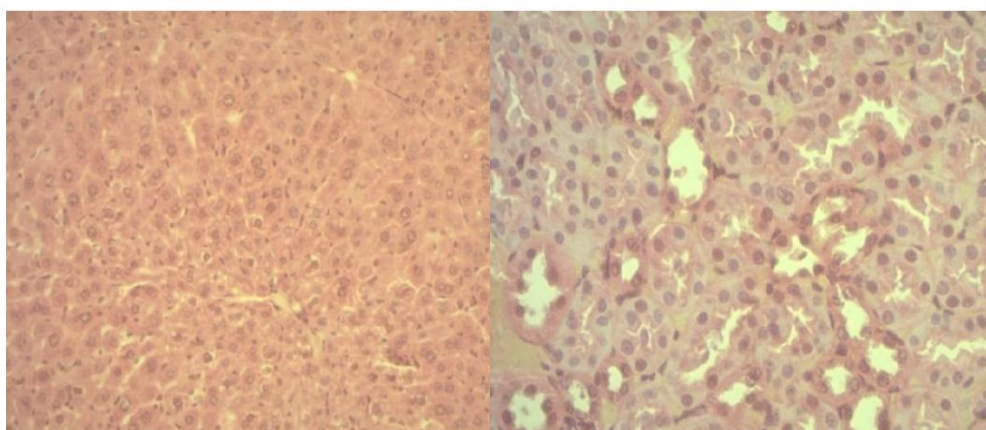


Рисунок 50-межбалочный  
отек печени ( опытная дозировка  
0,04мл) ×200He

Рисунок 51- Почки- очаговый  
отек (опытная дозировка 0,04 мл)  
×200He

## **Выводы по пятому разделу**

Таким образом проведенные исследования позволили сделать следующие заключения.

Биологический скрининг эфирного масла и густого экстракта з. Бунге показал что, у эфирного масла умеренная активность против грибов рода *Candida*, особенно штамму *Candidaalbicans*. Высокую чувствительность также к микроорганизмам рода *Candida* и значительно замедляет рост бактерии *Staphylococcus aureus* и Methicillin-resistant *Staphylococcus* фракции густого экстракта з. Бунге.

Результаты исследования местно-раздражающего действия эфирного масла з. Бунге показало отсутствие раздражающего действия эфирного масла на конъюнктивы подопытных животных. Общее состояние животных было без изменений в течение всего времени наблюдения.

Результаты исследования сенсibiliзирующего действия эфирного масла з. Бунге визуальных признаков сенсibiliзирующего эффекта у испытуемых животных не наблюдались. Отмечалось преходящая гиперемия в области слезного протока, которая проходила через 15 мин. Отека слизистой оболочки глаза не наблюдалось. Кровотечений не было.

При пероральном введении различных доз густого экстракта во внутренних органах экспериментальных животных наблюдалась картина повреждения тканей. в виде дистрофии и некроза. Повреждающий эффект нарастал по мере увелечения дозы препарата. Морфологические изменение в желудке помимо повреждающего фактора характеризовались развитием воспаления.

Морфологическое исследование внутренних органов животных при определении острой токсичности растительного препарата при местном применении (наружно) структурных изменений во внутренних органах не выявлены.

В связи с этим, углекислый экстракт зизифоры рекомендуется лишь для наружного применения и может быть рекомендован для создания новых лекарственных форм для местного применения.



## 6 ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА АДГЕЗИВНОЙ ДЕНТАЛЬНОЙ ПАСТЫ С МАСЛОМ З. БУНГЕ

### 6.1 Разработка оптимального состава адгезивной дентальной пасты

Первым этапом разработки было создание основы для пасты, которая явилась матрицей для создаваемой лекарственной формы. Изучив опыт создания адгезивных основ в качестве эксципиентов для разрабатываемой пасты были исследованы субстанции:

- липофильные - полиэтилен низкой плотности, парафин жидкий, белый вазелин;
- гидрофильные - ПЭГ 4000, ПЭГ 300;
- липофильно-гидрофильная композиция: ланолин безводный, вазелин белый, вода очищенная.

Созданы композиции основ в оптимальных соотношениях из вышеперечисленных субстанций, таблица 35.

Таблица 35 – Основы для изготовления паст

Основы	Вид основы	Состав	Количественные данные, об/об
А	Липофильная	Полиэтилен низкой плотности	5
		Парафин жидкий	95
В	Гидрофильная	ПЭГ 1500	20
		ПЭГ 400	80
С	Липофильная	Вазелин белый	100
D	Липофильно-гидрофильная	Ланолин безводный	35
		Вазелин белый	50
		Вода очищенная	15

Вторым этапом фармацевтической разработки явилось создание адгезивной комбинации с матрицей. В эксперименте исследовали следующие адгезивные субстанции: натрий КМЦ микронизированную, желатин микронизированный, пектин микронизированный, каолин микронизированный, а также их комбинации.

Подбор адгезивных компонентов производился по способности прилипания композиции к пластинке и удерживанию не менее 6 ч (методика валидирована).

Таким образом, были исследованы 28 составов композиций, представленных в таблице 36.

Состав адгезивной композиции состоит из основы-матрицы и адгезивного агента в соотношении 1:1 [125]. Критериями оценки адгезивной композиции были определены: описание, адгезивная способность, реологические свойства.

Таблица 36 – Составы адгезивных композиций

Адгезивный агент	Основы			
	А	В	С	Д
Желатин микронизированный	1	2	3	4
Пектин микронизированный	5	6	7	8
Натрий КМЦ микронизированная	9	10	11	12
Каолин микронизированный	13	14	15	16
Бентонит	17	18	19	20
Желатин, пектин и натрий КМЦ в виде микронизированной субстанции	21	22	23	24
Желатин, пектин, натрий КМЦ и каолин микронизированные	25	26	27	28

При введении натрия КМЦ в основы В, С и Д отсутствовала однородность получаемых композиций (составы 10, 11, 12), образовывались агломераты, наблюдалось неоднородное распределение частиц. Адгезивные агенты, введенные в липофильно-гидрофильную основу способствовали набуханию получаемой массы и препятствовали прилипанию (составы 4, 8, 20, 24, 28). Вышеуказанные составы не удовлетворяли требуемым критериям отбора, были исключены из дальнейшего исследования. Оставшиеся 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27 составы исследовали на способность к адгезии, в результате чего были отобраны составы 21, 22, 25, 26, которые подвергли реологическим исследованиям.

В результате исследований реологических и адгезивных свойств отобраны модели №25 и №26, консистентные свойства которых находятся в диапазоне реологического оптимума. Установленные значения «механическая стабильность» характеризуют их как тиксотропную систему, что облегчает технологический процесс их изготовления и позволяет прогнозировать стабильность при длительном хранении. Известны свойства ПЭГ осушать слизистые покровы тканей организма за счет поглощения влаги [126]. Для места поражения данное свойство является положительным, однако для неповрежденных участков в полости рта - будет вызывать значительный дискомфорт. В связи с этим выбран состав 25 (таблица 37).

Таблица 37 – Выбранный состав адгезивной композиции

Наименование ингредиента	НД	Количественный состав, мг	Функциональное назначение
Полиэтилен низкой плотности	ГФ РК	25	Основа
Парафин жидкий	ГФ РК	475	Основа
Натрий карбоксиметилцеллюлоза микронизированная	ГФ РК	165	Адгезивный компонент
Желатин микронизированный	ГФ РК	165	Адгезивный компонент
Пектин микроонизированный	ГФ РК	165	Адгезивный компонент
Каолин микронизированный	ЕФ	5	Основа
Итого		1000	

В адгезивную композицию были введены АФИ – масло зизифоры Бунге и компонент, увеличивающий трансдермальный перенос активных веществ, проникая через кожу и другие биологические мембраны - диметилсульфоксид, способствующий повышению проницаемости лекарственных веществ. При этом диметилсульфоксид оказывает местное противовоспалительное, местноанестезирующее, фибринолитическое и противомикробное (антисептическое) действие [127]. Содержание масла зизифоры обосновано на основании антимикробной активности[124]. Состав лекарственной формы представлен в таблице 38.

Таблица 38 – Состав готового продукта

Наименование ингредиента	НД	Состав на единицу продукции, мг	Назначение ингредиента
1	2	3	4
Эфирное масло Зизифоры Бунге	СП фирмы	20	Активное вещество
Диметилсульфоксид	ЕФ	10	Трансдермальный агент
Натрий КМЦ микронизированный	ЕФ	820	Адгезивный компонент

Продолжение таблицы 38

1	2	3	4
Желатин микролизированный	ГФ РК I, т. 2	820	Адгезивный компонент
Пектин микролизированный	ЕФ	820	Адгезивный компонент
Каолин микролизированный	ЕФ	25	Основа пасты
Полиэтилен	ЕФ	124	Основа пасты
Парафин жидкий	ГФ РК I, т. 3	2361	Основа пасты
Всего:		5000	

### **6.2 Технология получения адгезивной дентальной пасты с маслом З.Бунге**

Технологический процесс состоит из следующих операций: подготовка сырья и материалов, приготовление основы-матрицы, введение диметилсульфоксида в основу-матрицу, введение адгезивного агента в основу, введение активного компонента, первичная, вторичная, групповая упаковка (рисунок 52).

Описание технологического процесса. Расплавляют регламентируемое количество полиэтилена низкого давления при температуре  $170 \pm 10$  °С и сплавляют его с парафином жидким в течение 4,3 ч, скорость вращения лопастей  $20 \pm 5$  об/мин. Остужают основу-матрицу до  $60 \pm 10$  °С и вводят регламентируемое количество натрий КМЦ микролизированный перемешивая в течение 1 ч, скорость вращения лопастей  $20 \pm 5$  об/мин. Затем вводят диметилсульфоксид при тех же условиях.

Полученную массу охлаждают до температуры 20-25 °С и вводят регламентируемое количество желатина микролизированного, пектина микролизированного, каолина микролизированного, перемешивая в течение 2 ч, скорость вращения лопастей  $20 \pm 5$  об/мин. Затем вводят масло зизифоры и перемешивают в течение 1 ч в тех же условиях до получения однородной массы.

Полученную пасту дозируют в тубы по 5 г. Заполненную тубу и инструкцию по медицинскому применению вкладывают в пачку. Регламентируемое количество пачек укладывают в гофра короб и маркируют [128].

### **6.3 Изучение критериев оценки качества адгезивной дентальной с маслом З.Бунге**

Определены критерии качества и установлены к ним регламентируемые нормы. На основании проведенного анализа

определены показатели качества готового продукта: описание, идентификация пулегона, масса содержимого контейнера и однородность массы, однородность консистенции, рН, микробиологическая чистота и количественное определение активного вещества, упаковка, маркировка, транспортирование, хранение, срок хранения. Спецификация качества пасты представлена в таблице 39.





Рисунок 52 – Технологическая схема производства адгезивной дентальной пасты с маслом зизифоры

Таблица 39 - Спецификация качества адгезивной дентальной пасты с маслом З. Бунге

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
1	2	3
Описание	Светло-желтая, однородная пастообразная масса со специфическим запахом эфирного масла Зизифоры Бунге.	Визуально, ГФ РК I, т. 1, общая статья «Мягкие лекарственные средства для местного применения»
Идентификация -пулегон	На хроматограмме должно обнаруживаться темно-коричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61	Тонкослойная хроматография ГФ РК I, т. 1, 2.2.27
Масса содержимого упаковки	Не менее 5 г	В соответствии с АНД
Однородность консистенции	Препарат должен быть однородным	ГФ РК I, т. 1, общая статья «Мягкие лекарственные средства для местного применения», Национальная часть, Приложение 1.
pH	От 6.0 до 8.0	Потенциометрический, ГФ РК I, т. 1, 2.2.3
Микробиологическая чистота	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 2 В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий. В 1 г препарата не допускается наличие бактерий <i>Pseudomonasaeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и т.2, 2.6.13
	2	3
Количественное определение	Не менее 5 мг/г	ГЖХ ГФ РК I, т. 1, 2.2.28

- пулегон		
1	2	3
Упаковка	По 5 г препарата помещают в тубы алюминиевые. По 1 тубе вместе с инструкцией по медицинскому применению на государственном и русском языках помещают в пачку из картона. Групповая и транспортная тара соответствует ГОСТ 17768-90	В соответствии с АНД
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с АНД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90	ГОСТ 17768-90
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25°C	В соответствии с АНД
Срок хранения	Теоритический 2 года	В соответствии с АНД

#### **6.4 Разработка плана валидации технологического процесса адгезивной дентальной пасты с маслом З.Бунге**

Проведено планирование валидации технологического процесса производства адгезивной дентальной пасты с маслом З.Бунге в соответствии с национальными требованиями GMP на 3 опытно-промышленных сериях [129], которые в последствии поставлены на изучение стабильности. Изначально проведена оценка пригодности технических средств (оборудование производственное и лабораторное) и используемых методик дл проведения валидации процесса. Результаты оценки показали, что все используемые технические средства успешно прошли квалификацию и используемые методики валидированы. На втором этапе определены критические точки в процессе производства препарата и технологические параметры качества для каждой стадии тхнологического процесса. Для определения области проведения и объема валидации использовали подход, основанный на оценке рисков. Таким образом был разработан валидационный мастер план технологического производства адгезивной дентальной пасты с масло З. Бунге

Таблица 40– План валидации технологического процесса производства адгезивной дентальной пасты с маслом 3. Бунге

Стадия	Исследуемый показатель	Критерии приемлемости	Количество отбираемых проб	Способ измерения	Периодичность
1	2	3	4	5	6
Приготовление дез. и моющих растворов	Количество ингредиентов	Рег-мое количество	1	Мерная посуда	Каждая серия
Подготовка помещений	Микробиол. чистота стен в помещениях	Не более 50 КОЕ	5	Смыв	1 раз в неделю
	Микробиол. чистота воздуха в помещениях	Не более 200 КОЕ	5	Чашки Петри ставят в помещение на 20 мин	1 раз в неделю
	Температура воздуха	Не более 25°C	3	Гигрометр	1 раз в день
	Относительная влажность воздуха	65±15 %	3	Гигрометр	1 раз в день
Подготовка оборудования	Микробиол. чистота оборудования	Не более 50 КОЕ	3	Смыв	Каждую серию
Подготовка персонала	Микробиол. чистота рук персонала	Не более 20 КОЕ	3	Смыв	1 раз в неделю
Подготовка ингредиентов	Качество ингредиентов	В соответствии с НД	1	В соответствии с НД	Каждая серия
Приготовление основы	Порядок введения компонентов основы в реактор для её сплавления	-	1	В соответствии с НД	Каждая серия
	Количество ингредиентов для приготовления основы	Рег-мое количество	1	Визуально	Каждая серия



Продолжение таблицы 40

1	2	3	4	5	6
	Температура	170±10°C	12	При помощи датчиков	5 мин
	Скорость смесителя	20±5 об/мин	12	При помощи датчиков	5 мин
	Давление	15 Мпа	12	При помощи датчиков	5 мин
	Время	240±20 мин	1	При помощи датчиков	Каждая серия
	Оценка качества основы пасты	Основа пасты должны быть однородна (прозрачная без видимых вкраплений)	1	Визуально	Каждая серия
Введение масло полифитовое Кызыл май и димексид в основу	Температура	50±10°C	24	При помощи датчиков	5 мин
	Скорость смесителя	20±5 об/мин	24	При помощи датчиков	5 мин
	Давление	15 Мпа	24	При помощи датчиков	5 мин
	Время	60±10 мин	1	При помощи датчиков	Каждая серия
	Оценка качества массы пасты	В соответствии с СП-фирмы	1	Визуально	Каждая серия
Приготовление пасты	Порядок приготовления пасты	-	1	В соответствии с СП	Каждая серия
	Количество ингредиентов для приготовления пасты	Рег-мое количество	1	Визуально	Каждая серия
	Температура	20±5°C	12	При помощи датчиков	5 мин
	Скорость смесителя	20±5 об/мин	12	При помощи датчиков	5 мин

Продолжение таблицы 40

1	2	3	4	5	6
	Время	240±20 мин	1	При помощи датчиков	Каждая серия
	Оценка качества пасты	Однородная, вязкая пастообразная масса желтого цвета, без видимых вкраплений	1	Визуально	Каждая серия
Фасовка, упаковка, маркировка	Производительность	600 туб/ч	2	При помощи датчиков	2 раза в серию
	Качество упаковки	В соответствии с СП	100	Визуально	10 мин
	Масса упакованной пасты	В соответствии с СП	100	Весовой	10 мин
	Время	3 ч	1	При помощи датчиков	Каждая серия
	Качество готового продукта	В соответствии с ВАНД	1	В соответствии с ВАНД	Каждая серия

**6.5 Исследование стабильности адгезивной дентальной пасты с маслом Зизифоры Бунге**

Долгосрочные исследования стабильности лекарственного средства адгезивной дентальной пасты с маслом З. Бунге проводили на опытно-промышленных сериях (таблица 41), полученных в ТОО «ФитОлеум».

Таблица 41 – Общая характеристика опытно-промышленных серий препарата

№ серии	Объем серии, уп.	Дата производства	Регламент исследования, мес.
АДП010416	150	04.2016 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18,24
АДП020416	150	04.2016 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18,24
АДП030416	150	04.2016 г.	0, 3, 6, 9, 12, 18,24

Испытания лекарственного средства проводили в упаковке, применяемой для хранения и реализации (тубы алюминиевые с мембраной и пластмассовым колпачком), в режиме долгосрочных испытаний

стабильности при температуре хранения ( $25 \pm 2$ )°С и влажности ( $60 \pm 5$ ) %. На основании проекта АНД разработана спецификация качества на стабильность препарата (таблица 42).

Таблица 42 – Спецификация стабильности адгезивной дентальной пасты с маслом З. Бунге

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Светло-желтая, однородная пастообразная масса со специфическим запахом эфирного масла зизифоры Бунге.	Визуально, ГФ РК I, т. 1, общая статья « <i>Мягкие лекарственные средства для местного применения</i> »
Идентификация -пулегон	На хроматограмме должно обнаруживаться темно-коричневое пятно с величиной $R_f$ около 0.61	Тонкослойная хроматография ГФ РК I, т. 1, 2.2.27
Масса содержимого упаковки	Не менее 5 г	В соответствии с АНД
Однородность консистенции	Препарат должен быть однородным	ГФ РК I, т. 1, общая статья « <i>Мягкие лекарственные средства для местного применения</i> », Национальная часть, Приложение 1.
pH	От 6.0 до 8.0	Потенциометрический, ГФ РК I, т. 1, 2.2.3
Микробиологическая чистота	Препарат должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 2 В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10 энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий. В 1 г препарата не допускается наличие бактерий <i>Pseudomonasaeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и т.2, 2.6.13, т. 1, 5.1.4, категория 2
Количественное определение - пулегон	Не менее 5 мг /г	ГЖХ ГФ РК I, т. 1, 2.2.28

В таблицах 3, 4, 5 представлены результаты стабильности за 6 месяцев, охватывающие комплекс характеристик, полученных при физико-химических и микробиологических испытаниях, согласно спецификации стабильности (таблица 42). При исследовании стабильности трех опытно-промышленных серий адгезивной дентальной пасты, изучаем следующие показатели качества: описание, однородность консистенции, pH,

качественную реакцию на пулегон, микробиологическая чистота, количественное определение пулегона в лекарственной форме. Периодичность контроля образцов составляет по основным показателям качества: 0, 3, 6, 12, 18, 24 месяцев, для показателя микробиологическая чистота - 0, 6 месяца, данное условие позволяет подтвердить устойчивость биологически активных веществ во времени.

На протяжении 6 месяцев исследования готовая лекарственная форма в первичной упаковке характеризуется постоянством состава, его качественные и количественные характеристики находятся в пределах регламентируемых норм. Описание и идентификация, микробиологическая чистота соответствуют требованиям спецификации, консистенция лекарственной формы однородна, показатель рН варьирует от 6,5 до 6,9, количественное определение пулегона в лекарственной форме находится в интервале от 8,5 до 8,9 мг (рисунок 53).

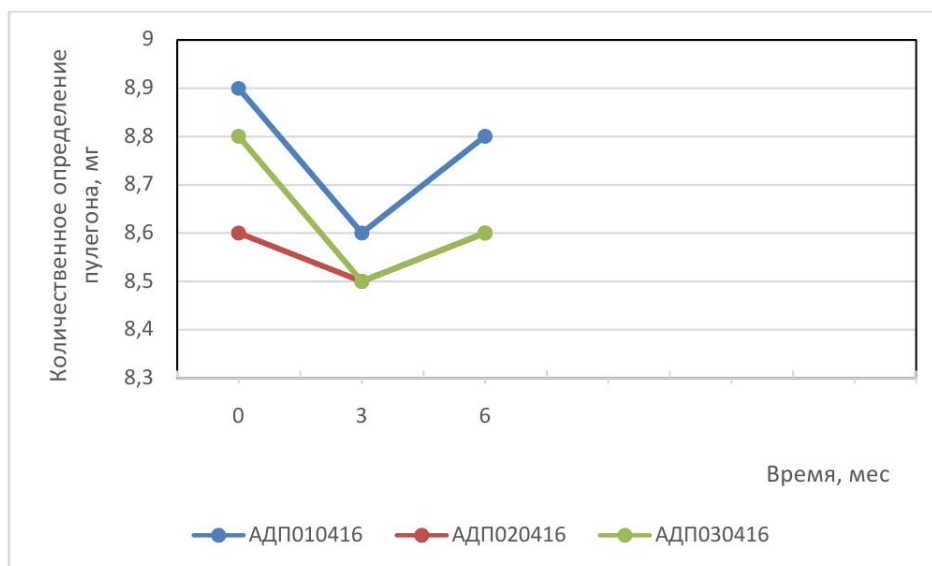


Рисунок 53 -Количественное определение пулегона в адгезивной дентальной пасте

Таким образом, долгосрочные исследования стабильности продолжаются, проведенные исследования указывают о стабильности препарата в течение 6 месяцев.

Таблица 43 - Результаты испытаний стабильности адгезивной дентальной пасты серия АДП010416

Упаковка: Тубы алюминиевые с мембраной и пластмассовым колпачком (полипропилен высокой плотности)		Серия: АДП010416 Дата начала испытания: 04.2016 г. Дата окончания испытания: 04.2018 г					
Температура: (25 ± 2) °С. Относительная влажность: (60±5) %							
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.					
		0	3	6	9	12	18
Описание	Светло-желтая, однородная пастообразная масса со специфическими запахом эфирного масла зизифоры Бунге.	соответст	соответст	соответст	Исследование продолжается		
Идентификация: Качественная реакция на пулегон	Тонкослойная хроматография	соответст	соответст	соответст	Исследование продолжается		
Масса содержимого упаковки	Не менее 5,0 г	соответст	соответст	соответст	Исследование продолжается		
Однородность консистенции	Препарат должен быть однородным	соответст	соответст	соответст	Исследование продолжается		
рН	От 6.0 до 8.0	6,8	6,9	6,8	Исследование продолжается		
Количество определе ние: - пулегон	Не менее 5 мг	8,9	8,6	8,8	Исследование продолжается		

Таблица 44 - Результаты испытаний стабильности адгезивной дентальной пасты серия АДП020416

Упаковка:		Партия: АДП020416 Дата начала испытания: 04.2016 г. Дата окончания испытания: 04.2018 г					
Температура: (25 ± 2) °С. Относительная влажность: (60±5) %							
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.					
		0	3	6	9	12	18
Описание	Светло-желтая, однородная пастообразная масса со специфическими запахом эфирного масла зизифоры Бунге.	соответст	соответст	соответст	Исследование продолжается		
Идентификация: D. Качественная реакция на пулегон	Тонкослойная хроматография	соответст	соответст	Соответст	Исследование продолжается		
Масса содержимого упаковки	Не менее 5,0 г	соответст	соответст	Соответст	Исследование продолжается		
Однородность консистенции	Препарат должен быть однородным	соответст	соответст	Соответст	Исследование продолжается		
pH	От 6.0 до 8.0	6,5	6,7	6,6	Исследование продолжается		
Количество: - пулегон	Не менее 5 мг	8,6	8,5	8,6	Исследование продолжается		

Таблица 45 - Результаты испытаний стабильности адгезивной дентальной пасты, серия АДП030416

Упаковка:								Партия: АДП030416 Дата рначала испытания: 04.2016 г. Дата окончания испытания: 04.2018 г			
Температура: (25 ± 2) °С. Относительная влажность: (60±5) %											
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.									
		0	3	6	9	12	18	24			
Описание	Светло-желтая, однородная пастообразная масса со специфическими запахом эфирного масла Зизифоры Бунге.	соответст	Соответст	соответст	Исследование продолжается						
Идентификация Качественная реакция на пулегон	Тонкослойная хроматография	соответст	Соответст	соответст	Исследование продолжается						
Масса содержимого упаковки	Не менее 5,0 г	соответст	соответст	соответст	Исследование продолжается						
Однородность консистенции	Препарат должен быть однородным	соответст	соответст	соответст	Исследование продолжается						
рН	От 6.0 до 8.0	6,7	6,7	6,5	Исследование продолжается						
Количеств.определе ние: - пулегон	Не менее 5 мг	8,8	8,5	8,6	Исследование продолжается						

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено фармакогностическое и фармако-технологические изучение растительного сырья «Зизифора Бунге трава».

Установлен оптимальный период заготовки надземной части зизифоры Бунге (июль-август месяцы).

Разработана технологическая схема заготовки сырья зизифоры Бунге для опытно промышленных серий на производстве ТОО «ФитОлеум». Проведена оценка качества сырья по требованиям ГФ РК. На основании полученных результатов разработана инструкция по заготовке и сушки ЛРС З.Бунге.

Изучено органографическое и анатомическое строение травы зизифоры Бунге. Полученные данные применены в разделе «Идентификация» нормативной документации на ЛРС «зифора Бунге трава».

Для более эффективного процесса экстрагирования, прогнозирования и нормирования качества субстанции - экстракта.изучены технологические параметры сырья зизифоры Бунге: удельная масса, объемная масса, насыпная масса, пористость, порозность, свободный объем слоя сырья. Определены некоторые фармакопейные показатели качества сырья: сумма экстрактивных веществ, потеря в массе при высушивании, общая зола, зола, нерастворимая в 10% кислоте хлороводородной, содержание тяжелых металлов и радионуклидов.

Разработана оптимальная технология получения эфирного масла из травы Зизифоры Бунге методом перегонки с наибольшим выходом основного компонента пулегона – 60,1%. Исследован компонентный состав эфирного масла.

Разработаны критерии качества масла в соответствии с требованиями ГФ РК. На основе полученных данных разработаны нормативные документы: спецификация качества и аналитический нормативный документ на эфирное масло зизифоры Бунге.

Изучены валидационные характеристики аналитической методики количественного определения пулегона в эфирном масле травы зизифоры Бунге. Установлена регламентируемая норма основного компонента пулегона в эфирном масле зизифоры Бунге, содержание которого должно быть не менее 40 %.

По результатам исследований составлена технологическая схема производства эфирного масла З. Бунге в опытно-промышленных условиях. На основании полученных данных разработан лабораторный регламент. Изучены фармакопейные характеристики эфирного масла в соответствии с ГФ РК и ЕФ. В режиме долгосрочных исследований проводится изучения стабильности эфирного масла З. Бунге. Исследование стабильности эфирного масла за 6 месяцев, показало что, значительных изменений в показателях качества эфирного масла за этот период не наблюдаются.



Разработана оптимальная технология производства густого экстракта З. Бунге в докритических условиях.

На основании полученных результатов разработана технологическая схема получения густого экстракта з. Бунге.

Определен химический состав густого экстракта и установлены основные компоненты. На основании исследования химического состава разработана спецификация качества густого экстракта З. Бунге.

Результаты исследования антимикробной активности показали, значительную активность эфирного масла некоторых фракции густого экстракта зизифора Бунге против штаммов *Candida*.

По результатам биологического скрининга было установлена высокая активность ингибирования опиоидных и каннабиноидных рецепторов эфирного масла и густого экстракта З. Бунге.

Токсикологические исследования эфирного масла и густого экстракта позволили сделать следующее заключение: эфирное масло и густого экстракт зизифоры Бунге рекомендуются для наружного применения и может быть рекомендованы для создания новых лекарственных форм для местного применения.

Проведена фармацевтическая разработка адгезивной дентальной пасты с маслом зизифоры Бунге. Разработан рациональный состав, оптимальная технология адгезивной дентальной пасты с маслом зизифоры Бунге, проведена стандартизация в соответствии требованиям ГФ РК.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Бимурзаев А.А. Фитохимическое изучение Зизифоры: диссертационный тезис.- Алматы, 1985.
- 2 Xi-wen L, Hedge I.C. Lamiaceae. In: Xi-wen Zheng-yi W, Raven PH (eds) Flora of China. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press. - St. Louis. - P.1994.-vol. 17.-P.342.
- 3 Павлов Н.В. Флора Казахстана. Академия наук КазАССР.- Алматы: Изд-во «Наука», 1964.-Т.7.- С. 434-437.
- 4 Karel Šmejkal, Milan Malaník, Karlygash Zhaparkulova, Zurriyda Sakipova, Galya Ibadullaeva, Lilya Ibragimova Marya Kamanova, Milan Žemlička. Kazakhstan Ziziphora species as sources of bioactive substances// Molecules. - 2016.-21 (7). -P.826.
- 5 Furukawa M, Oikawa N, Imohata T et al. Monoterpene Glucosides from Ziziphora clinopodioides (Labiatae)// Chem Pharm Bull. -2012.-№ 60(3).- P. 397-401.
- 6 Tian S, Shi Y, Zhou X et al. Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different Ziziphora clinopodioides Lam. Extracts. //Pharmacog Mag. - 2011.- №7(25).- P. 65-68.
- 7 Baytop T, Turkiyede B, Tedavi IU. Yayinlari//Eczacilik Fak. - 1996.- №40.- P. 444.
- 8 Masrournia M, Shams A . Elemental Determination and Essential Oil Composition of Ziziphora clinopodioides and Consideration of its Antibacterial Effects// Asian J Chem. - 2013.- №25(12). - P. 6553-6556.
- 9 Beikmohammadi M. The Evaluation of Medicinal Properties of Ziziphora clinopodioides// World Appl Sci J. - 2011. - №12 (9).- P. 1635-1638.
- 10 Ozturk Y, Aydin S, Tecik B et al . Effects of essential oils from certain Ziziphora species on swimming performance in mice// Phytother Res. - 1995.-№9- P. 225-227.
- 11 Tarakci Z, Coskun H & Tuncturk Y. Some properties of fresh and ripened herby cheese, a traditional variety produced in Turkey// Food Technol Biotech. -2004.- №42- P. 47–50.
- 12 Ozturk S, Ercisli S . Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides// Food Control. - 2007.- №18- P. 535–540.
- 13 Ghassemi N, Ghanadian M, Ghaemmaghami L et al. Development of a Validated HPLC/Photodiode Array Method for the Determination of Isomenthone in the Aerial Parts of Ziziphora tenuior L. //Jundishapur J Nat Pharm Prod. - 2013. - № 8(4) - P. 180-186.
- 14 Sezik E, Tümen G, Başer KHC. Ziziphora tenuior L. a new source of pulegone//Flav Fragr J. - 1991.-№ 6- P. 101-104.
- 15 Pirbalouti AG, Amirhosravi A, Bordbar F. Diversity in the chemical composition of essential oils of Ziziphora tenuior as a potential source of pulegone // Chemija. - 2013. - №24(3) - P. 234-239.

- 16 CN 101513448(B).Preparation and use of Ziziphora general lavone.Seoul Guri, History Hao, Abdulla I et al,1 August 2012.
- 17 CN 102895304 (A).Compound Ziziphora bungeana capsule, and preparation method and application thereof.Yang Weijun et al, 30 January 2013.
- 18 CN 101513448(B).Preparation and use of Ziziphora general lavone.Seoul Guri, History Hao, Abdulla I et al,1 August 2012.
- 19 CN 101623324 (B).. Ziziphora extraction and production methods and application thereof cardiovascular drugs.He Jiang, Yang Weijun, Buy Er Haba et al,1 February 2012.
- 20 CN 102048813(A).Ziziphora bungeana dripping pills, production method thereof and application of dripping pills as cardiovascular medicament.He Jiang, Liu Chong, Yang Weijun, 11May 2011.
- 21 CN 102861169 (A).Traditional Chinese medicine compound for treating paroxysmal supraventricular tachycardia.Zheng Shihua, Mengxian Lan, Zhu Hongmei, Xu Meiling, 9 January 2013.
- 22 CN 101485621(A).Kazak medicine Ziziphora clinopodioides Lam. oral cavity spray.Paul River, Bahaerguli Xu, Zhu West, 22 July 2009.
- 23 CN 102093932(B).Preparation method of Ziziphora clinopodioides volatile oil and function thereof of preventing and treating sclerotinia rot of rape.He Jingfeng, Koizumi, Tian Jun, Chen Yuxin, Huang Bo, 14 November 2012.
- 24 CN 102662019 (A).Ziziphora clinopodioides Lam fingerprint and establishment method thereof.Yu Qian, Liu Hong, 12 September 2012.
- 25 Jeppesen AS, Soelberg J, Jäger AK. Antibacterial and COX-1 Inhibitory Effect of Medicinal Plants from the Pamir Mountains //Plants.- Afghanistan , 2012.- №1- P. 74-81.
- 26 Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F et al. Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of Ziziphora clinopodioides subsp. rigida (BOISS.) RECH.f. from Iran // Biol Pharm Bull. - 2005. -№ 10- P. 1892-1896.
- 27 Ghazanfari T, Yaraee R, Shams J et al. Cytotoxic effect of four herbal medicines on gastric cancer (AGS) cell line// Food Agric Immunol. - 2013.- №24- P. 1-7.
- 28 Entezary A, Neamatshahi MM, Khodaparast MHH et al. The effects of adding extracts of Ziziphora (Ziziphora tenuir) as flavoring to chewing gums and the study of the release of caffeine from these extracts// Eur J Exp Biol. - 2013. - № 3(5) - P. 307-312.
- 29 Sadeghi B, Gholamhoseinpoor F. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using Ziziphora tenuior (Zt) extract at room temperature// Spectrosc Acta Pt A- Mol Biomol Spectr. -2015.- №134- P. 310-315.
- 30 Ding W, Yang T, Liu F et al. Effect of different growth stages of Ziziphora clinopodioides Lam. on its chemical composition//Pharmacog Mag. - 2014. -№10- P. 1-5.

- 31 Razmjoue D, Zarei Z. Study on the ecological specifications effects (climate and height) on chemical compounds of Ziziphora medicinal plant essential oil (*Ziziphora Clinopodioides* Lam.) in Fars province, Iran// J Chem Biol Phys Sci . - 2015. -№ 5(3) - P. 3049-3066.
- 32 Jamzad M, Jamzad Z, Mokhber F et al. Variation in essential oil composition of *Mentha longifolia* var. *chlorodichya* Rech.f.and *Ziziphora clinopodioides* Lam. growing in different habitats// J Med Plant Res. -2013.- № 7(22) - P. 1618-1623.
- 33 Darbandi T, Honarvar B, Nobandegani SM et al. Extraction of *Ziziphora tenuior* essential oil using supercritical CO<sub>2</sub>// Eur J Exp Biol. - 2013. - №3(3) - P. 687-695.
- 34 Barra A. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments// Nat Prod Commun. - 2009. - №4(8) - P. 1147-1154.
- 35 Figueiredo CA, Barroso JG, Pedro LG et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils.// Flavour Frag J. - 2008. - № 23(4) - P. 213-226.
- 36 Amiri H. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Ziziphora clinopodioides* Lam// Nat Prod Res. - 2009. - № 23(7) - P. 601-606.
- 37 Aghajani Z, Assadian F, Masoudi Sh et al. Chemical composition and In Vitro Antibacterial Activities of The Oil *Ziziphora clinopodioides* and *Z. capitata* SUBSP. *capitata* from Iran// Chem Nat Comp. - 2008. - № 44(3) - P. 387-389.
- 38 Sonboli A, Mirjalili MH, Hadian J et al. Antibacterial Activity and Composition of the Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz.) Rech.f. from Iran// Z Naturforsch. -2006. -№ 61- P. 677-680.
- 39 Soltani Nejad Shahla. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against some pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research.-2012.- Vol. 6(7).-P. 1504-1508.
- 40 Verdian – Rizi Mohammadreza. Essential oil Composition and Biological activity *Ziziphora clinopodioides* Lam. from Iran. Research Journal of Pharmacology 2 (2).-2008.-P. 17-19.
- 41 Aghajani Z, Assadian F, Masoudi Sh et al. Chemical composition and In Vitro Antibacterial Activities of The Oil *Ziziphora clinopodioides* and *Z. capitata* SUBSP. *capitata* from Iran// Chem. Nat. Comp. -2008 . -№ 44(3) - P.387-389.
- 42 Касымов Ф.У, Кязимов И.М, Дембицкий А.Д и др. Компонентный состав эфирных масел видов Зизифора // Химия природных соединений. -1988.-№ 23 (5) - P. 636-637.
- 43 Дембицкий А.Д., Бегалиев Е.С., Кязимов И.М. Химический состав эфирных масел Зизифора, произрастающих в различных

экологических условиях // Химия природных соединений. -1994. - № 30 (6) - P. 673-675.

44 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et al. Biological effects of essential oils – A review//Food Chem. Toxicol. - 2008. - № 46- P. 446–475.

45 Di Pasqua R, Mamone G, Ferranti P et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol// Proteomics. -2010. -№ 10(5) - P. 1040-1049.

46 Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test// Food Chem. - 2005. - №93- P. 551–556.

47 Franzios G, Mirosou M, Hatzia Apostolou E et al. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils //J Agric Food Chem. - 1997. - №45- P. 2690–2694.

48 Santana-Rios G, Orner GA, Amantana A et al. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. //Mutat. Res. - 2001. - № 495- P. 61–74.

49 Cal K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles//Planta Med. - 2006. -№ 72- P. 311–316.

50 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et al. Biological effects of essential oils – A review// Food Chem. Toxicol. -2008. - № 46- P. 446–475.

51 Savelev S, Okello E, Perry NSL et al. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil//Pharmacol Biochem Behavior. - 2003. - №75(3) - P. 661-668.

52 Ntalli NG, Ferrari F, Giannakou I et al. Phytochemistry and Nematicidal Activity of the Essential Oils from 8 Greek Lamiaceae Aromatic Plants and 13 Terpene Components// J Agric Food Chem. -2010. - №58(13) - P. 7856-7863.

53 Duru ME, Oztürk M, Ugur A et al. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicia* from Turkey//J. Ethnopharmacol. -2004. - № 94- P. 43–48.

54 Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T et al. Antimicrobial activity of mint essential oils// J. Agric Food Chem. - 1995. - № 43- P. 2384–2388.

55 Ozturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*//Food Control. - 2007. -№ 18- P. 535–540.

56 Radulović NS, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ et al. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action// Curr. Med. Chem. - 2013. - №20- P. 932-952.

57 Friedman M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices// J. Agric. Food Chem. - 2014. -№ 62(31) - P. 7652-70.

58 Nowotarska S, Nowotarski K, Friedman M. Effect of structure on the interactions between five natural antimicrobial compounds and

phospholipids of bacterial cell membrane on model monolayers// *Molecules*.- 2014. - P. 19.- 7497–7515.

59 Helander IM, Alakomi H, Latva-Kala K et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria// *J. Agric. Food Chem.* -1998. -№ 46(9) - P. 3590-3595.

60 Lambert RJW, Skandamis, PN, Coote PJ et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol// *J Appl Microbiol.*-2011. - № 91(3) - P. 453-462.

61 Walsh SE, Maillard JY, Russell AD et al. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria.//*J Appl Microbiol.*- 2003. - № 94(2) - P. 240-247.

62 Horváth G, Kovács K, Kocsis B et al. Effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and its main constituents on the outer membrane protein composition of *Erwinia* strains studied with microfluid chip technology// *Chromatographia*. – 2009.- №70 (11-12) - P. 1645-1650.

63 Lachowicz KJ, Jones GP, Briggs DR et al. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora// *Lett. Appl. Microbiol.* – 1998. -№ 26(3) - P. 209-214.

64 Moleyar V, Narasimham P. Antibacterial activity of essential oil components// *Int J Food Microbiol.* – 1992. -№ 16(4) - P. 337-342.

65 Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens // *Phytomedicine*. – 2010. -№ 17(13) - P. 1061-1066.

66 Ultee A, Slump RA, Steging G et al. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice// *J. Food Prot.* - 2000. - № 63(5) - P. 620-624.

67 Bassolé, I.H.N.; Juliani, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties//*Molecules*.- 2012.-17- P. 3989–4006.

68 Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review//*Crit Rev. Microbiol.* - 2014. - № 40(1) - P. 76-94.

69 Thodgdon-A J, Inprakhon P. Composition and biological activities of essential oils from *Limnophila geoffrayi* Bonati//*World J. Microbiol Biotechnol.* – 2009. - № 25(8) - P. 1313-1320

70 SantosMRV, Moreira FV, Fraga BP et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review // *Revista Brasileira de Farmacognosia*.– 2011. - № 21(4) - P. 764-771.

71 Aliakbarlu J, Shameli F. In vitro antioxidant and antibacterial properties and total phenolic contents of essential oil from *Thymus vulgaris*, *T. kotschyanus*, *Z. tenuior* and *Z. clinopodioides* // *Turk J. Biochem.* – 2013. - №38(4) - P. 425-431.

- 72 Karimi I, Hayatgheybi H, Motamedi S et al. Chemical Composition and Hypolipidemic Effects of an Aromatic Water of *Ziziphora tenuior* L. in Cholesterol-fed Rabbits// *J. Appl. Biol. Sci.* – 2013. - № 7(3) - P. 61-67.
- 73 Cho SY, Jun H, Lee JH et al. Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2- and ubiquitin-dependent mechanisms// *FEBS Lett* . – 2011.- № 585(20) - P. 3289-3296.
- 74 Kladniew BR, Polo M, Villegas SM et al. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines//*Chem. Biol. Interactions.* – 2014.– №214.- P. 57- 68.
- 75 Silva-Filho JC, Oliveira NNPM, Arcanjo DDR et al. Investigation of Mechanisms Involved in (-) Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta //*Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.*-2012.- № 110(2).- P. 171-177.
- 76 Maia-Joca RPM, Joca HC, Ribeiro FJP et al. Investigation Of Terpinen-4-ol Effects On Vascular Smooth Muscle Relaxation// *Life Sci.*-2014.- № 115(1-2) - P. 52-58.
- 77 Kim H-J, Chen F, Wu C et al. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. //*J Agric Food Chem.* – 2004. - № 52(10).- P. 2849-2854.
- 78 Alavinezhad A, Boskabady M.H. Antiinflammatory, Antioxidant, and Immunological Effects of *Carum copticum* L. and Some of Its Constituents //*Phytother Res.* – 2014.- № 28(12).- P. 1739-1748.
- 79 Horvathova E, Slaménova D, Marsalkova L et al. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide//*Food Chem Toxicol.*- 2009. -№47(6). - P. 1318-1323.
- 80 Horvathova E, Navarova J, Galova E. Assessment of Antioxidative, Chelating, and DNA-Protective Effects of Selected Essential Oil Components (Eugenol, Carvacrol, Thymol, Borneol, Eucalyptol) of Plants and Intact *Rosmarinus officinalis* Oil.// *J Agric Food Chem.*- 2014.- №62(28)- P. 6632-6639.
- 81 Calleja MA, Vieites JM, Montero-Melendez TT et al. The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. //*British Journal of Nutrition.* - 2013.-№109(3).- P. 394-401.
- 82 Anderson IB, Mullen WH, Meeker JE et al. Pennyroyal toxicity: measurement of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature//*Ann Intern Med.* – 1996. - № 124(8).- P. 726–734.
- 83 Gordon WP, Forte AJ, McMurtry RJ et al. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse// *Toxicol Appl Pharmacol.* – 1982.-№ 65(3).- P. 413–424.

- 84 Woolf A. Essential oil poisoning // J Toxicol Clin Toxicol. – 1999. - №37(6). - P. 721-727.
- 85 Paszel-Jaworska A., Romaniuk A, Rybczynska M. Molecular Mechanisms of Biological Activity of Oleanolic Acid - A Source of Inspiration for A New Drugs Design // Mini-Rev Org Chem.- 2014. -№ 11(3).- P. 330-342.
- 86 Kashyap D, Tuli HS, Sharma AK. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential // Life Sci. – 2016. -№ 146.- P. 201-213.
- 87 Mehmood R, Imran M, Malik A et al. Ziziphorins A and B. New flavonoids from *Ziziphora tenuior* //Z Naturfors Sect B: J Chem Sci. – 2010. - №65(11).- P. 1397-1400.
- 88 Jeong JS, Lee J-H, Lee SH et al. Suppressive actions of *Astragali Radix* (AR) ethanol extract and isolated astragaloside I on HCl/ethanol-induced gastric lesions// Biomol Therapeutics. – 2009.-№ 17(1).- P. 62-69.
- 89 Huang L.J., Gao W.Y., Li X et al. Evaluation of the In Vivo Anti-inflammatory Effects of Extracts from *Pyrus bretschneideri* Reh// J Agric Food Chem. – 2010. -№ 58(16).- P. 8983-8987.
- 90 Tian S, Shi Y, Zhou X et al. Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different *Ziziphora clinopodioides* Lam. Extracts. //Pharmacog Mag. -2011.- №7(25). - P. 65-68.
- 91 Magnani C, Isaac VLB, Correa MA et al. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics// Anal Meth. -2014.-№6(10).- P. 3203-3210.
- 92 Amini-Shirazi N, Hoseini A, Rajnbar A et al. Inhibition of Tumor Necrosis Factor and Nitrosative/Oxidative Stresses by *Ziziphora Clinopoides* (Kahlioti); A Molecular Mechanism of Protection Against Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice// Toxicol Mech Methods . -2009.-№19.- P. 183-189.
- 93 Su P, Shi Y, Wang J et al. Anticancer Agents Derived from Natural Cinnamic Acids// Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry .- 2015.- №15(8).- P. 980-987.
- 94 Senejoux F, Demougeot C, Kerram P et al. Bioassay-guided isolation of vasorelaxant compounds from *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae)//Fitoterapia. - 2012.- №83.- P. 377-382.
- 95 Егеубаева Р. А., Айдарбаева Д.К. Проблемы, тенденции и перспективы ботанического ресурсосведения Казахстана. Известия НАН РК, серия биологическая, 2007. - №4. - С. 25-27.
- 96 Руководящие принципы ВОЗ по надлежащей практике культивирования и сбора (GACP) лекарственных растений // Всемирная организация здравоохранения. – Женева,2003. – С. 55-59.
- 97 ЖапаркуловаК.А. Сакипова З.Б., Ибрагимова Л.Н., Ибадуллаева Г.С., Бимурзаев А.А.Правила сбора, заготовки и хранения лекарственного растения Зизифоры Бунге (*Ziziphora bungeana*Juz.)// Вестник КазНМУ. - №5. – 2015. - С 239-241.



- 98 Барыкина Р.П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина – М.: Изд-во МГУ, 2004. – С. 312.
- 99 Основы микротехнических исследований в ботанике: справочное руководство / Р. П. Барыкина [и др.] – М. :Изд-во МГУ, 2000. – С. 127.
- 100 Dashek W.V. Methods in Plant Electron Microscopy and Cytochemistry / W.V. Dashek – N.Y. Humana Press, 2000. – P.301.
- 101 ГФ СССР XI, т.1, выпуск 1. Общие методы анализа
- 102 NCCLS, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A2. National Committee on Clinical Laboratory Standards. – 2002. -№22. – P. 15.
- 103 NCCLS, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Seventh Edition M7-A7. National Committee on Clinical Laboratory Standards. - 2006. № 26. - P. 2-5.
- 104 NCCLS, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Tentative Standard—Approved Standard, M24-A. National Committee on Clinical Laboratory Standards. - 2003. №23. - P. 18-22.
- 105 Franzblau, S.G., et al., Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay // J. Clin. Microbiol. - 1998. Vol. 36, № 2. -P. 362-366.
- 106 Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований. -г. Москва.- 2012. -т.1.- С. 944.
- 107 Zhaparkulova K.A., Sakipova Z.B., Samir A. Ross, Inna I. Ternynko. Macroscopic and morpho-anatomical diagnostic features of *Ziziphora bungeana* Juz. from Kazakhstan // International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research . - 2016.-№ 8(5).– P. 812-819.
- 108 Жапаркулова К.А Сакипова З.Б., Тернинко И.И., Бопанова Г.С., Бимурзаев А.А . Определение фармако-технологических параметров и фармакопейных показателей качества лекарственного растительного сырья Зизифоры Бунге // Вестник АТУ, №1. - 2016г . -С . 82-87. ISSN 2304-5681.
- 109 Приказ Министра национальной экономики от 27 февраля 2015 года № 155, об утверждении гигиенических нормативов «Санитарно-эпидемиологических требований к обеспечению радиационной безопасности».
- 110 Жапаркулова К.А., Караубаева А.А., Сакипова З. Б., Ибрагимова Л. Н. Определение критериев эффективности процесса экстракции травы *Ziziphora bunugeana* Juz. ВАК РФ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.
- 111 Жапаркулова К.А., Сакипова З. Б., Ермахан А.М., Бимурзаев А.А. Разработка технологии получения эфирного масла из травы Зизифоры

Бунге и оценка его качества. Вестник АМУ, «Астана медициналық журналы». -2016.-№ 3.

112 Zhaparkulova K.A., R. Srivedavyasari, Z. B. Sakipova, I. Ternynko S. A. Ross. Chemical composition of the volatile oil of *Ziziphora bungeana* Juz // International Conference: Pharmacy today and tomorrow – Theory and Practice. Medical University of Lublin, Poland, 11-12 June 2015. - P. 29.

113 Zhaparkulova K. A. R. Srivedavyasari, Vijayasankar R., Z. B. Sakipova, L. Ibragimova, Ikhlal A. Khan, Samir A. Ross. Standardization of medicinal herb *Ziziphora bungeana* Juz. (Lamiaceae) and quantitative determination of pulegone in the essential oil. Abstracts of the Joint Meeting of 16th Annual International Conference on the Science of Botanicals (ICSB) with 5th Interim American Society of Pharmacognosy (ASP) // *Planta Medica*, Issue 05.- March 2016. - Vol. 82.

114 Жапаркулова К.А., Сакипова З.Б., Ибрагимова Л.Н. Верификация методики количественного определения эфирного масла в траве Зизифоры Бунге // *Здравоохранение Таджикистана*. - ВАК РФ. - 2016.-№ 1(328). - С.32-38.

115 Zhaparkulova K. A., Sakipova Z. B., Ibragimova L.N. Development and validation evaluation of methods of quantitative determination of pulegone in the *Ziziphora bunge* essential oil // *Вестник КарГУ: серия «Химия»*. – 2016. -№2. – С. 61-67.

116 Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 19 ноября 2009 года №754 « Об утверждении Правил составления, согласования и экспертизы нормативно-технического документа по контролю за качеством и безопасностью лекарственных средств»

117 Жапаркулова К.А. Разработка показателей качества растительного сырья *Ziziphora bungeana* // *Український медичний альманах*. № 2.-Т. 17. – 2014г. -С. 98.

118 Жапаркулова К.А., Сакипова З.Б., Ибрагимова Л.Н., Ибадуллаева Г.С., Ермахан А.М. Исследование стабильности травы Зизифоры Бунге. *Научные ведомости Белгородского Государственного университета*, серия «Медицина-Фармация». -2016. - №12(233). - С. 174-180.

119 ICH Q8 (R2): *Pharmaceutical Development*, August. - 2009. – P.28

120 Жапаркулова К.А., Ермахан А.М., Наурызгалиева М.Ж., Сакипова З.Б. Оценка качества эфирного масла травы Зизифоры Бунге. Международная научно-практическая конференция «Инновационные достижения в современной фармации и медицине». Южно-Казахстанская государственная фармацевтическая академия, 21-22 апреля 2016 г. г. Шымкент.

121 Жапаркулова К.А., Сакипова З.Б. Технология получения CO<sub>2</sub> экстракта из растительного сырья *Ziziphora bungeana* Juz. // Сборник материалов I Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 17 ноября 2014 г. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2014. - С. 355.

122 Жапаркулова К.А., Сакипова З.Б., Молдакаримова М.А. Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе растительного сырья *Ziziphora bungeana* Juz // Материалы II международной научно-практической конференции «Интеграция фармацевтической науки, образования и практики на современном этапе», Алматы, 4 декабря 2013. – Вестник КазНМУ. - №5. – 2013. - с. 104-105.

123 Zhaparkulova K.A., Sakipova Z., Ross Samir, R. Srivedavyasasr. Phytochemical and biological studies on *Ziziphora bungeana* Juz: Abstracts of the 15<sup>th</sup> International Conference on the Science of Botanicals // Planta Medica Issue 05.- March 2015.- Vol. 81 . - March 2015

124 Zhaparkulova K., Karaybayeva A., Seitaliyeva A., Sakipova Z., Satbayeva E. Biological activity and preclinical study of toxicological action of the essential oil of *Ziziphora bungeana* Juz. from Kazakhstan // International Journal of Toxicological and Pharmacological Research .-2016.- 8(4).- P. 275-280 .

125 Swarbrick J. Encyclopedia of pharmaceutical technology // Third Edition.- Informa healthcare: New York, -2007.– P. 3263.

126 Чуешов В.И. Промышленная технология лекарств, т.2. – Изд НФА., -2002. – С. 716.

127 Орлова О.В., Егорова С.Н., Ослопов В.Н. Исследование влияния диметилсульфоксида на проницаемость клеточных мембран // Казанский медицинский журнал.- 2011 г. - т. 92.- № 6. – С. 901-904.

128 Жапаркулова К.А., Ибрагимова Л.Н., Орынбекова С.О., Сейталиева А.М. Фармацевтическая разработка адгезивной дентальной пасты с маслом Зизифоры Бунге // Фармация Казахстана. - 2016. - №9. - С. 36-40.

129 Государственный стандарт Республики Казахстан. Производство Лекарственных Средств. Надлежащая Производственная Практика GMP. Основные Положения. СТ РК 1617-2006. – Астана.: Госстандарт РК: утв. и введ. приказом Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан 1 января 2008.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым  
Министрлігі ғылым Комитетінің шаруашылық  
жүргізу құқығындағы Республикалық  
мемлекеттік қасіпорныны «Ботаника және  
фитоинтродукция институты»



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ

Республиканское государственное предприятие  
на праве хозяйственного ведения «Институт  
ботаники и фитоинтродукции» КН  
Министерства образования и науки Республики  
Казахстан

050040, Алматы қ., Тимирязев к., 36 «Д»,  
тел. 8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

050040, г. Алматы, ул. Тимирязева 36 «Д», тел.  
8(727) 394-80-40, факс 8(727) 394-80-40

№ 01-04/257

«03» шам 2015 г.

Декану фармацевтического факультета  
КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова,  
доктору фармацевтических наук,  
профессору Датхаеву У.М.

Уважаемый Убайдула Махамбетович!

В ответ на Ваше письмо об оказании помощи в идентификации лекарственного сырья и определении сырьевых запасов дикорастущих лекарственных растений *Ziziphora bungeana* Juz., *Artemisia cina* Berg., *Artemisia gmelinii* Web. ex Stechm., *Artemisia aschurbajewii* C. Winkl. сообщаем, что научно-исследовательские работы по определению сырьевых запасов конкретных видов дикорастущих растений проводятся на платной основе после заключения договора с РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК на выполнении вышеуказанных услуг.

В настоящее время мы располагаем данными по запасам сырья применяемого в народной медицине вида *Ziziphora clinopodioides* Lam. (син. *Ziziphora bungeana* Juz.), полученными нами при выполнении бюджетных программ в 2000, 2004, 2006, 2014 годы (См. «Аннотированный список лекарственных растений Казахстана. – Алматы, 2014. – С. 96). В соответствии с современной ботанической номенклатурой по С.К. Черепанову (1995) *Ziziphora bungeana* Juz. является синонимом вида *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Спб.: Мир и семья. 1995). *Ziziphora clinopodioides* Lam. (син. *Ziziphora bungeana* Juz.) обеспечена сырьевой базой при объеме ежегодных возможных заготовок не более 1,0–2,0 т воздушно-сухой надземной фитомассы.

Для эндемичного и редкого вида *Artemisia cina* Berg., применяемого в официальной медицине, имеются устаревшие (1972, 1976 годы) сведения по запасам сырья на территории Сарыагашского и Алгабасского районов Южно-Казахстанской области (см. «Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений Казахстана». – Алматы, 1994. – С. 71). Для оценки современного состояния природных популяций и запасов сырья *Artemisia cina* необходимы ресурсные исследования.

Для лекарственных видов *Artemisia gmelinii* Web. ex Stechm. и *Artemisia aschurbajewii* C. Winkl., применяемых в народной медицине, сведения о сырьевой базе отсутствуют, так как в природных условиях нами не были выявлены заросли промышленного значения и запасы сырья этих видов, соответственно, не определялись.

Генеральный директор РГП «Институт ботаники  
и фитоинтродукции» КН МОН РК, академик КазНАН,  
доктор биологических наук



Ситпаева Г.Т.




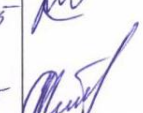
Отв. исп.: зав. лаб. растительных ресурсов, член-корр.  
доктор биологических наук Н.Г. Гемеджиева, тел.: 872

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ТОО «ФитОлеум» ОТ – СТ –ТЗБ– 15	<b>ИНСТРУКЦИЯ ПО СБОРУ И СУШКЕ ТРАВЫ ЗИЗИФОРЫ БУНГЕ</b>	
	Версия 01	Страница 1 из 7

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
 Директор ТОО «ФитОлеум»  
 А.Ш. Курдоглы  
 «14» сентября 2015г.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО СБОРУ И СУШКЕ ТРАВЫ ЗИЗИФОРЫ БУНГЕ

	Ф.И.О., должность	Дата	Подпись
Согласовано	Сакипова З.Б., руководитель модуля «Фармацевт-технолог»	14.09.15	
	Сермухамедова О.В., зам. директор ТОО «ФитОлеум»	14.09.15	
Разработано	Ермахан А.М., студент 4 курса специальности 5B074800 - «Технология фармацевтического производства»	10.09.15	
	Жапаркулова К.А. - Ph.D докторант специальности 6D074800 - «Технология фармацевтического производства»	10.09.15	

Алматы 2015 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

<b>УТВЕРЖДЕН</b> ТОО «ФитОлеум» Директор А.Ш. Курдоглы 201__ г.	
	
<b>ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА</b> РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗСР РК «__» _____ 201__ г.	<b>ПРИКАЗ</b> Комитета контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗСР РК от " __ " _____ 201__ г. № _____
<b>АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ</b>	
<b>Наименование лекарственного растительного сырья</b> Ziziphora bungeana herba Райхангул шебі Зизифоры Бунге трава	
<b>Лекарственное растительное сырье</b>	
<b>Наименование и страна организации производителя</b> ТОО «ФитОлеум», Казахстан	
<b>Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения</b> ТОО «ФитОлеум», Казахстан	
<b>Наименование и страна организации-упаковщика</b> ТОО «ФитОлеум», Казахстан	
<b>АНД РК 42 – Вводится впервые</b>	Срок введения установлен с " __ " _____ 201__ г. Срок действия до " __ " _____ 201__ г.
<b>ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА</b>	

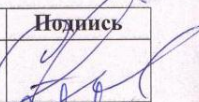
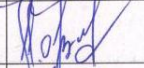
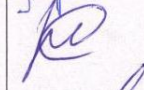

# ПРИЛОЖЕНИЕ Г

<b>ТОО «ФитОлеум»</b>	<b>ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ</b>		
	<b>МАСЛО ЗИЗИФОРЫ БУНГЕ</b>		
ОТ – СТ – ТЗБ – 14	Версия 01	Страница 1 из 15	

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
 Директор ТОО «ФитОлеум»  
 А.Ш. Курдоглы   
 «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.



## ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ НА ПРОИЗВОДСТВО МАСЛА ЗИЗИФОРЫ БУНГЕ

	Ф.И.О., должность	Дата	Подпись
<b>Согласовано</b>	Сакипова З.Б., руководитель модуля «Фармацевт-технолог»	04.04.16	
	Сермухамедова О.В., зам. директор ТОО «ФитОлеум»	04.04.16	
<b>Разработано</b>	Ермахан А.М., студент 4 курса специальности 5B074800 - «Технология фармацевтического производства»	04.04.16	
	Жапаркулова К.А. - Ph.D докторант специальности 6D074800 - «Технология фармацевтического производства»	04.04.16	

Алматы 2016 г.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

**УТВЕРЖДЕН**  
ТОО «ФитОлеум»  
Директор  
А.Ш. Курдоглы  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

### ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА

РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ СР РК

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

### ПРИКАЗ

Комитета контроля медицинской и фармацевтической деятельности МЗ СР РК

от « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

№ \_\_\_\_\_

## АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

### Наименование лекарственной субстанции

Ziziphora bungeana oil

Зизифоры Бунге майы

Масло Зизифоры Бунге

### Наименование и страна организации производителя

ТОО «ФитОлеум», Республика Казахстан

### Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

ТОО «ФитОлеум», Республика Казахстан

### Наименование и страна организации-упаковщика

ТОО «ФитОлеум», Республика Казахстан

**ВАНД РК 42 –**

Срок введения установлен с

**Вводится впервые**

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

Срок действия до

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

**ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ**

**ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**



## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Товарищество с ограниченной ответственностью  
«ФИТО-АРАМАТ»

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Инновационных технологий в практическую фармацию  
Фармацевтическое предприятие ТОО «Фито-Аромат»

- 1. Наименования предложения:** Разработка оптимальной технологии получения  $\text{CO}_2$  - экстракта травы Зизифоры Бунге (лат. наз. *Ziziphora bungeana* Juz.)
- 2. Цель:** Расширение производства фито препаратов с использованием метода экстракции жидкой двуокисью углерода ( $\text{CO}_2$ ), позволяющий выделить комплекс биологически активных веществ, состоящих из липофильной фракции содержания растительной клетки, и осуществлением глубокой экстракции с максимальным выделением компонентов БАВ.
- 3. Где и когда внедрено:** ТОО «Фито-Аромат», 2016 г.
- 4. Форма внедрения:** производство густого углекислого экстракта травы З. Бунге.
- 5. Эффективность внедрения:** Получены опытно-промышленные партии густого углекислого экстракта травы З. Бунге
- 6. Учреждение и/или автор разработки:** КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, Институт Фармации, докторант специальности «Докторант КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, специальности 6D074800 «Технология фармацевтического производства» Жапаркулова К.А.

Научный консультант, руководитель модуля  
Д.фарм.н.

Сакипова З.Б.

Ph.D докторант

Жанаркулова К.А.

Директор ТОО «Фито-Аромат»

Проскурин Б.М.



# ПРИЛОЖЕНИЕ Ё

Товарищество с ограниченной ответственностью  
**ФИТО-АРОМАТ**



## ОПЫТНО - ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ НА ПРОИЗВОДСТВО ГУСТОГО УГЛЕКИСЛОГО ЭКСТРАКТА (CO<sub>2</sub>) ВИЗИФОРЫ БУНГЕ

	ФИО, должность	Дата	Подпись
Согласовано	Проскурян Б.М. - директор ТОО «Фито-Аромат»		
	Саяннова З.Б. - руководитель модуля «Фармацевт-технолог» КазНМУ		
Разработано	Жапсаркулова К.А. - Ph.D докторант специальности 6D074800 - «Технология фармацевтического производства» КазНМУ		
	Студент 4 курса Ермахан А.М., специальности 5B074800 - «Технология фармацевтического производства» КазНМУ		

Алматы 2016 г.

1

# ПРИЛОЖЕНИЕ Ж



**УТВЕРЖДЕН**  
ТОО «Фито-Аромат»  
Директор  
*Б.М. Прокурин*  
201\_\_ г.

**ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА**  
РГП на ПХВ «Национальный центр  
экспертизы лекарственных средств, из-  
делий медицинского назначения и меди-  
цинской техники» МЗ СР РК  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

**ПРИКАЗ**  
Комитета контроля медицинской и  
фармацевтической деятельности  
МЗ СР РК  
от " \_\_ " \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.  
№ \_\_\_\_\_

## АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

**Наименование лекарственного растительного сырья**  
Carbon dioxide extract (CO<sub>2</sub>) of *Ziziphora bungeana* Juz.  
Углекислотный экстракт Зизифоры Бунге  
Зизифоры Бунге көміркышқыл экстракты

**Наименование и страна организации производителя**  
ТОО «Фито-Аромат», Республика Казахстан

**Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения**  
ТОО «Фито-Аромат», Республика Казахстан

**Наименование и страна организации-упаковщика**  
ТОО «Фито-Аромат», Республика Казахстан

---

<b>ВАНД РК 42 –</b>	Срок введения установлен с
<b>Вводится впервые</b>	" __ " _____ 201__ г.
	Срок действия до
	" __ " _____ 201__ г.

---

**ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ      ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**

# ПРИЛОЖЕНИЕ 3

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТЕРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ  
«ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ-ТЕХНИКАЛЫҚ  
АКПАРАТ ОРТАЛЫҒЫ»  
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ  
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ»

050026, Қазақстан Республикасы  
Алматы қ., Бөгенбай батыр көш., 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09, Факс: +7 (727) 378-05-47  
Email: dir@inti.kz http://www.inti.kz

050026, Республика Казахстан  
г. Алматы, ул. Бөгенбай батыра, 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09, Факс: +7 (727) 378-05-47  
Email: dir@inti.kz http://www.inti.kz

Исх №: 78-02-05/1415  
«17» 10 2016

Казахский национальный  
медицинский университет  
им. С.Д. Асфендиярова

Бланк сериальді нөмірлер жеріне қолы қойылды. Жауап қайтарарда міндетті түрде бланк № және күні мерзімі туралы мәлімет берілуі тиіс. Бланк без сериального номера не действителен. При ответе обязательно сослаться на наш № и дату.

Согласно Вашего запроса № 2068-04-01-01-09 от 12.07.2016 г. предоставляем информацию о наличии публикации докторанта PhD, преподавателя модуля «Фармацевт-технолог» **Жапаркуловой Карлыгаш Алтынбековны**, д.фарм.н., доцента, руководителя модуля «Фармацевт-технолог» **Сакиповой Зурияды Бектемировны** и преподавателя модуля «Фармацевт-технолог» **Ибрагимовой Лилии Николаевны** в журнале «Molecules» (Switzerland), ISSN 1420-3049, входящем в международные информационные ресурсы Web of Science (Thomson Reuters) с 1997 года по настоящее время. Предметная область – химия.

Статья докторанта PhD **Жапаркуловой К.А.**, доцента **Сакиповой З.Б.**, преподавателя **Ибрагимовой Л.Н.:**

Smejkal K., Malanik M., Zhaparkulova K., Sakipova Z., Ibragimova L., Ibadullaeva G., Zemlicka M. Kazakh Ziziphora Species as Sources of Bioactive Substances // Molecules. – 2016. - V. 21. – Iss. 7. – Article number UNSP 826.

Данная статья выявлена в базе Web of Science Core Collection. В момент ее опубликования во второй половине 2016 года журнал «Molecules» имеет Impact Factor 2015:2,465 (Journal Citation Reports, Thomson Reuters), действительный до июня 2017 г.

Вице-президент АО «НЦТИ»

М. Бапиева

Горбатов В.  
8 (727) 378-05-13

005986

# ПРИЛОЖЕНИЕ И

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТЕРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ  
«ҒЫЛЫМ-ТЕХНИКАЛЫҚ  
АКПАРАТ ОРТАЛЫҒЫ»  
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ  
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ»

050026, Қазақстан Республикасы  
Алматы қ., Бөкейбай бағыр кван. 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09, Факс: +7 (727) 378-05-47  
Email: dir@nti.kz http://www.nti.kz

050026, Республика Казахстан  
г. Алматы, 30 Козыбай бағыр. 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09, Факс: +7 (727) 378-05-47  
Email: dir@nti.kz http://www.nti.kz

Исх № 04-04-03/1165  
06.09.2016г.

Казахский национальный  
медицинский университет  
им. С.Д. Асфендиярова

Согласно запроса № 2747-04-01-01-09 от 31.08.2016 г. предоставляем информацию о наличии публикации докторанта PhD Жапаркуловой Карлыгаш Алтынбековны в журнале «International Journal of Toxicological and Pharmacological Research» (Australia) ISSN 0975-5160, входящем в базу данных Scopus (Elsevier) с 2011 года по настоящее время. Предметная область – фармакология, токсикология и фармацевтика.

Статья докторанта PhD Жапаркуловой К.А.:

Karlygash Z., Aigerim K., Ainur N., Galymzhan K., Aida S., Lilya I., Zuriyadda S., Elmira S., Samir R. Biological activity and preclinical study of toxicological action of the essential oil of ziziphora bungeana juz. From kazakhstan // International Journal of Toxicological and Pharmacological Research. – 2016. - V. 8. – Iss. 4. - P. 275-280.

Статья выявлена в базе Scopus. В момент ее опубликования во второй половине 2016 года журнал «International Journal of Toxicological and Pharmacological Research» имеет SJR за 2015 год, равный 0,135 и действительный до июня 2017 г.

И.о. президента АО «НЦТИ»

Л. Абубакирова

Буркитбаев Ж.  
8 (727) 378-05-13

005386

# ПРИЛОЖЕНИЕ К

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТЕРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ  
«ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ-ТЕХНИКАЛЫҚ  
АҚПАРАТ ОРТАЛЫҒЫ»  
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
КОМИТЕТ НАУКИ  
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ»

050026, Қазақстан Республикасы  
Алматы қ., Бөгенбай батыр көш., 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09, Факс: +7 (727) 378-05-47  
Email: dir@inti.kz http://www.inti.kz

050026, Республика Казахстан  
г. Алматы, ул. Бөгенбай батыра, 221  
Тел.: +7 (727) 378-05-09, Факс: +7 (727) 378-05-47  
Email: dir@inti.kz http://www.inti.kz

Исх №: 08-02-051641  
«18» 05 2016

Казахский национальный  
медицинский университет  
им. С.Д. Асфендиярова

Согласно Вашего запроса № 1459-04-01-01-09 от 16.05.2016 г. предоставляем информацию о наличии публикации докторанта PhD, преподавателя модуля «Фармацевт-технолог» **Жапаркуловой Карлыгаш Алтынбековны** в журнале «International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research» (India) ISSN 0975-4873, входящем в базу данных Scopus (Elsevier, Нидерланды) с 2011 года по настоящее время. Предметная область – фармакология, токсикология и фармацевтика.

Статья докторанта PhD **Жапаркуловой К.А.**

**Karlygash Z.A., Zuriyda S.B., Inna T.I., Vijayasankar R., Natalya K.V., Samir R.A., Ikhlas K.** Macroscopic and morpho-anatomical diagnostic features of Ziziphora bungeana Juz. From Kazakhstan // International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. – 2016. • V. 8. – Iss. 5. - P. 812-818.

Данная статья выявлена в базе Scopus. В момент ее опубликования в первой половине 2016 года журнал «International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research» имел SJR за 2014 год, равный 0,220, действительный до июля 2016 г.

Вице-президент АО «НЦНТИ»

М. Бапиева

Буркитбаев Ж.  
8 (727) 378-05-13

Бланк серийный, номера хранения – больше пятизначны. Журнал регистрацией индекса в базе Scopus № не является авторитетным источником.  
Бланк без серийного номера не действителен. При оплате обязательно ссылаться на наш № и дату.

001963