

Казахский Национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова

УДК: 615.012/.014:582.734

На правах рукописи

**КОЗЫКЕЕВА РАУШАН АЙДАРБЕКОВНА**

**«Стандартизация и перспективы разработки технологии получения новых  
фитопрепаратов на основе травы *Agrimonia asiatica*»**

6D110400 - Фармация

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

**Научные консультанты:**

Датхаев У.М., д.фарм.н., профессор

Патсаев А.К., д.х.н., профессор

**Зарубежные научные консультанты:**

Коновалов Д.А. д.фарм.н., профессор

Самир А.Р. д.фарм.н., профессор

Республика Казахстан

Алматы, 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b>	4
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	6
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	
<b>ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ РАСТЕНИЯ РОДА <i>AGRIMONIA L.</i></b>	
1.1 Краткая ботаническая характеристика видов рода <i>Agrimonia L.</i>	9
1.2 Аспекты применения растений рода <i>Agrimonia L.</i> в официальной и этномедицине	11
1.3 Сведения о химическом составе растений рода <i>Agrimonia L.</i>	13
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	
2.1 Материалы исследования	21
2.2 Методы изучения ЛРС <i>A. asiatica</i>	21
2.3 Методы получения экстракта из травы <i>A. asiatica</i> и оценка его качества	23
2.4 Метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС)	24
2.5 Методы токсико-фармакологических исследований экстракта <i>A. Asiatica</i>	25
<b>3 СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТРАВЫ <i>AGRIMONIA ASIATICA</i></b>	
3.1 Заготовка травы <i>A. Asiatica</i>	28
3.2 Морфолого-анатомическое изучение <i>A. asiatica</i>	29
3.3 Определение фармако-технологических параметров и фармакопейных показателей качества ЛРС <i>A. asiatica</i>	33
3.4 Изучения фитохимического состава травы <i>A. asiatica</i>	35
3.5 Разработка спецификации качества травы <i>A. asiatica</i>	42
<b>4 ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТА <i>AGRIMONIA ASIATICA</i></b>	
4.1 Разработка оптимальной технологии получения экстракта <i>A. asiatica</i>	50
4.2 Изучение компонентного состава экстракта <i>A. asiatica</i> и выделения индивидуальных веществ	53
4.3 Изучение антиоксидантной активности экстракта Репешка азиатского	62
4.4 Изучение противовоспалительной активности экстракта <i>A. Asiatica</i>	63
4.5 Разработка спецификации качества экстракта <i>A. asiatica</i>	66
<b>5. ТОКСИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСТРАКТА <i>AGRIMONIA ASIATICA</i></b>	
5.1 Изучение острой и подострой токсичности экстракта <i>A. asiatica</i>	73
5.2 Изучение алергизирующего действия экстракта <i>A. asiatica</i>	82
<b>6. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТАБЛЕТОК С ЭКСТРАКТОМ ТРАВЫ <i>AGRIMONIA ASIATICA</i></b>	

6.1	Анализ рынка таблеток для рассасывания при заболеваниях горла	84
6.2	Разработка состава и технология получения таблеток с экстрактом <i>A. Asiatica</i>	90
6.3	Стандартизация таблеток с экстрактом <i>A. asiatica</i> в соответствии с требованиями ГФ РК	95
6.4	Изучения стабильности таблеток с экстрактом <i>A. asiatica</i>	96
6.5	Технико-экономическое обоснование производства таблеток с экстрактом <i>A. Asiatica</i>	101
	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	103
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	106
	<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b>	113

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:  
Государственная Фармакопея Республики Казахстан I. Т.1. - Алматы:  
Издательский дом «Жибек жолы», 2008. – 592 с.

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

Государственная Фармакопея Республики Казахстан I. Т.3. - Алматы:  
Издательский дом «Жибек жолы», 2014. – 872 с.

Европейская фармакопея, 8-я здания. Нордлинген (Германия):  
Консульства Европы, 2014 г.

Кодекс РК № 193-IV «О здоровье народа и системе здравоохранения» от  
18.09.2009 г. (с изменениями и дополнениями по состоянию на 25.05.2020 г.)

Приказ МЗ РК от 19.11.2009 г. № 754. «Об утверждении правил  
составления, согласования и экспертизы НТД по контролю за качеством и  
безопасностью ЛС».

Постановление Правительства РК от 23.12.2011 г. №1595 «Об  
утверждении правил хранения транспортировки ЛС, ИМН и МТ в условиях,  
обеспечивающих сохранение их безопасности, эффективности и качества».

Постановление Правительства РК от 25.08.2015 г. №680 «Об утверждении  
правил производства и контроля качества, а также проведения испытаний  
стабильности и установления срока хранения и повторного контроля ЛС, ИМН  
и МТ».

Приказ МЗ РК №142 «Об утверждении Правил проведения  
неклинических исследований, клинических исследований, клинико-  
лабораторных испытаний медицинских изделий для диагностики *in vitro*, а  
также требований к неклиническим и клиническим базам» от 02.04.2018 г.  
(с изменениями от 24.06.2019 г.).

Госпрограмма развития здравоохранения РК «Денсаулық» на 2016 - 2019  
годы, принята Указом Президента РК №176 от 15.01.2016 г.

Госпрограмма развития здравоохранения РК на 2020 – 2025 гг., принята  
Правительством РК от 26.12.2019 г. Постановление № 982.

СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования к безопасности и  
пищевой ценности пищевых продуктов.

ГОСТ 24027.1-80 Сырье лекарственное растительное. Методы  
определения подлинности, зараженности амбарными вредителями,  
измельченности и содержания примесей.

ГОСТ 7.1 2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание.  
Общие требования и правила составления.

ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического  
эксперимента.

СТ РК 1617-2006 «Производства лекарственных средств. Надлежащая  
производственная практика. Основные положения».

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудования лабораторные, стеклянные. Типы,  
основные параметры и размеры.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими обозначениями и сокращениями:

БАВ	Биологически активные вещества
БАД	Биологически активные добавки
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГФ РК	Государственная Фармакопея Республики Казахстан
ГЖХ	Газожидкостная хроматография
ГХ	Газовая хроматография
ГХ-МС	Газовая хроматография с масс спектрометром
DMCO- <i>d</i> 6	Дейтерированный диметилсульфоксид
ЕФ	Европейская Фармакопея (European pharmacopoeia)
ED <sub>50</sub>	Полуэффективная доза
ЖОЖ	Желтый оксид железа
ЛРС	Лекарственное растительное сырье
ЛС	Лекарственное средство
ЛФ	Лекарственная форма
ЛЭК	Локальный этический комитет
МБЧ	Микробиологическая чистота
НД	Нормативная документация
НИИ	Научно-исследовательский институт
ОФС	Общая фармакопейная статья
ОЭСР	Организация экономического сотрудничества и развития
СО	Стандартный образец
ТП	Технологический процесс
ТСХ	Тонкослойная хроматография
ТП	Технологический процесс
УМО	Упаковка, маркировка, отпуск
ЭМ	Эфирное масло
ЯМР- спектроскопия	Спектроскопия ядерного магнитного резонанса
<sup>1</sup> H ЯМР	Протонный ядерный магнитный резонанс
<sup>13</sup> C ЯМР	Углеродный ядерный магнитный резонанс
NIST	Национальный институт стандартов и технологий
RH	Относительная влажность
NCNPR	Национальный центр исследований натуральных продуктов
GACP	Надлежащая практика культивирования и сбора
EtOAc	Этилацетат
DCM	Дихлорметан
MeOD	Дейтерированный метанол

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы диссертации.**

Одним из основных направлений для развития фармацевтической промышленности выступает создание растительных лекарственных средств, которые отличаются сравнительной безопасностью и оказывают лечебный эффект на организм, но в то же время доступны по цене для населения.

Актуальность выбранной темы заключается в необходимости использования эффективных мер поддержки отечественных производителей, которые направляют свои инвестиционные программы на распространение безопасных лекарственных средств в терапии социально-значимых заболеваний и соответствуют Государственной программе развития здравоохранения РК на 2020 – 2025 годы. Важную роль представляет вопрос импортозамещения в сфере лекарственного обеспечения. Для рационального решения этих задач требуется тщательное и полномасштабное исследование малоизученных видов лекарственных растений для разработки ЛС на их основе.

Таким образом, в данное время актуально эффективное использование отечественных растительных сырьевых ресурсов с целью систематического снижения импортозависимости Республики Казахстан от зарубежных ЛС. Репешок азиатский (*Agrimonia asiatica* Juz.), произрастающий в предгорьях Каскасу, Толебийского района, представляет достаточную сырьевую базу, является источником БАВ, трава репешка азиатского широко применяется в народной медицине при воспалительных процессах в организме.

**Цель исследования:** Фармакогностическое изучение ЛРС *Agrimonia asiatica* Juz. и фармацевтическая разработка фитосубстанций на его основе.

### **Задачи исследования:**

- провести фармакогностическое изучение надземной части (травы) *Agrimonia asiatica* Juz;
- изучить оптимальную технологию получения экстракта из травы *Agrimonia asiatica* Juz;
- определить показатели и нормы качества, сроки хранения сухого экстракта из сырья *Agrimonia asiatica* Juz;
- провести неклинические исследования острой, подострой токсичности, антиоксидантной и противовоспалительной активности экстракта *Agrimonia asiatica* Juz.
- разработать таблетки и провести технико-экономическое обоснование для производства таблеток из фитосубстанции *Agrimonia Asiatica* Juz.

### **Научная новизна полученных результатов**

Впервые:

- проведено полное фармакогностическое изучение травы Репешка азиатского (*Agrimonia Asiatica* Juz.), произрастающего на юге Казахстана;
- изучены острая, подострая токсичность, антиоксидантная, противовоспалительная активность фитосубстанции *Agrimonia Asiatica* и установлена его безопасность. Новизна подтверждена патентом на изобретение №33804 «Способ получения растительного средства, обладающего

антиоксидантной и хелатирующей активностью», зарегистрированным в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан на момент 09.01.2018 г.;

- проведены исследования по разработке технологии таблеток «Агримол» на основе фитосубстанции *Agrimonia Asiatica Juz.*

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

- результаты технологии заготовки ЛРС, стандартизации и изучения стабильности травы *Agrimonia Asiatica Juz.* соответствуют требованиям ГФ РК;

- основные процессы производства сухого экстракта из травы *Agrimonia asiatica Juz.* оценка качества сухого экстракта из растительного сырья *Agrimonia asiatica Juz.*

- данные неклинического исследования острой, подострой токсичности и антиоксидантной, и противовоспалительной активности экстракта *Agrimonia asiatica Juz.*

- результаты фармацевтической разработки таблеток из экстракта травы *Agrimonia asiatica Juz.*

**Практическая значимость исследования**

- На основе полученных результатов рекомендована фитосубстанция *Agrimonia asiatica Juz.* в качестве лекарственного средства.

- Разработана спецификация качества на сырье *Agrimonia asiatica Juz.* и сухого экстракта *Agrimonia Asiatica Juz.*

- Технология опытно-промышленного производства таблеток была внедрена в производство ТОО «ВИВА ФАРМ», г. Алматы, Республика Казахстан.

**Апробация работы**

Основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, доложены в следующих материалах и трудах научно-практических конференций: Annual International Conference of “Modern Molecular-Biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine”, в сборнике статей в журнале «Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine» (Прага, Чешская Республика 2017 г.); «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству» проведенной в рамках третьей Международной конференции (в городе Пятигорск, Россия 16–17 ноября 2017 г.); VI Всероссийская конференция «Беликовские чтения», (г. Пятигорск, Россия 2018 г.); Международная конференция, посвященная памяти профессора Р.Дильбарханова (г. Алматы, Казахстан 16 июня 2019); «Наука и образование в современном мире: вызовы XXI века» III Международная конференция (г. Нур-Султан, Казахстан 10-12 июля 2019 г.); Международная научно-практическая конференция «Дни университета – 2019: Педиатрия XXI века. Современные вызовы и тенденции», посвященная 130-летию С.Д.Асфендиярова, (г. Алматы, Казахстан 05-06 декабря 2019 г.), в интернет-конференции «Ways of science development in modern crisis conditions», 1st International Scientific and Practical Internet Conference, 28-29 мая, 2020. – Днепр, 2020.

### **Сведения о публикациях**

По результатам проведенной НИР в рамках выполнения диссертационной работы опубликованы 12 научных работ:

- статья в международном журнале – 1, приложение Г;
- статьи в журналах, рекомендованные ККСОН МОН РК – 4;
- материалы (в виде тезисов и статей) в Международных конференциях (Казахстан, Чешская Республика, Россия, Украина) – 6;
- патент (на изобретения) – 1;
- удостоверение автора, приложение Д.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация написана на 151 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы и 5 разделов, посвященных материалам и методам исследования, основной части, состоящей из 4 разделов, с результатами исследований и выводами, заключением и списком использованных источников, включающих 101 литературный источник. Диссертационная работа содержит 53 таблицы, 53 рисунков, 3 диаграммы, 16 формул и приложений от А до Й.



# 1. ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ РАСТЕНИЯ РОДА *AGRIMONIA* L.

## 1.1 Краткая ботаническая характеристика видов рода *Agrimonia* L.

Репешок входит в отдел *Magnoliophyta*, класс *Magnoliopsida*, порядок *Rosales*, семейство розоцветных, род репешок. Семейство розоцветных охватывают 100 родов и более 3000 видов, и их можно встречать во всех местностях там, где произрастают цветковые растения, при этом нужно учитывать тот факт, что большинство из них предпочитают расти в умеренной и субтропической зонах северного полушария. Множество *Rosaceae* несмотря на то, что являются энтомофильными растениями, в генеративной части не имеет хорошо отображаемых приспособлений к разным агентам опыления. Окраска цветков варьирует от белого до розового, ярко-красного и красноватого, реже желтого [1].

Репешок – многолетнее растение. Лиственная основа оканчивается шипами маленьких желтых цветов. Цветок на стебле становится выгнутым в стадии плодоношения, а плод снабжен рядом крючков, которые позволяют ему цепляться за грубые предметы, такие, как шерсть животных, обеспечивая тем самым распространение семян. Из одного растения может продуцироваться приблизительно до 200 семян, распространяемых путем зоохории. Плодоносит растение обычно в августе-сентябре. *Agrimonia* растет в Северной и Центральной Европе, на Балканах, в России и на территории Азии, в Северной Америке. Распространена в большинстве на сухих лугах, поросших кустарниками холмах, лесных опушках и обочинах дорог [2].

Род репешок имеет 15 видов:

1. *Agrimonia bicknellii* (Kearney).
2. *Agrimonia eupatoria* L.,
3. *Agrimonia grandis* Andrzej. Ex C.A. Mey.,
4. *Agrimonia coreana* Nakai.
5. *Agrimonia gorovoi* Rumjantsev.
6. *Agrimonia granulosa* Juz.
7. *Agrimonia japonica* (Miq.) Koidz.
8. *Agrimonia elutina* Juz, nipponica Koidz.
9. *Agrimonia odorata* auct.
10. *Agrimonia pilosa* Lebed.
11. *Agrimonia procera* Wallr.
12. *Agrimonia velutina* Juz.
13. *Agrimonia viscidula* Bunge.
14. *Agrimonia macrocarpa* Rubd.
15. *Agrimonia asiatica* Juz.

В Казахстане распространено 2 вида растения:

1. *A. asiatica* Juz. (Репешок азиатский)
2. *A. pilosa* Ldb. (Репешок волосистый)

Репешок обыкновенный (*Agrimonia Eupatoria* L. – Кәдімгі бұрметікен) в соответствии с рисунком 1, принадлежит к семейству розоцветных. Вид

широко распространен по всей Европе, Азии, Африке и Северной Америке. Обычные места обитания этого вида – пространства вдоль склонов, обочины и скалистые районы. Они также найдены на сухих пастбищах и в засушливых лесах. Репейник - многолетнее травянистое растение, характеризующееся вертикальным, волосистым стеблем с несколькими ветвями. Листья кожистые, перистые, а нижние часто образуют прикорневую розетку. Цветки расположены в виде толстых, колючих гроздьев. Плод растет вниз [3].



Рисунок 1 - Репешок обыкновенный (*Agrimonia eupatoria*)

Репешок азиатский (*Agrimonia asiatica* Juz. – Азиялық бүрметікен) – многолетнее травянистое растение высотой более одного метра, имеет мощное корневище, густой прямостоячий стебель, волоски жесткие и длинные, листья густые. С верхней стороны листья зеленые, снизу - серовато-зеленые, прерывисто-перистые, сверху - слабоопушенные, снизу - бархатисто-опушенные с примесью мелких железок. Цветки желтые, вид соцветий колосовидный. Растет на склонах гор, у арыков, в садах, вдоль дорог, по опушкам березовых лесов, в ореховых лесах. Цветет в июне – июле. Ареал распространения - Кавказ, Средняя Азия, Западная Сибирь, Малая Азия, Балканы, Иран. В Казахстане встречается в Тоболо-Ишимской низменности, Прииртышье и Семипалатинском бору, Актюбинском регионе, Мугоджарах, Западном мелкосопочнике, на Алтае и Тарбагатае, Джунгарском и Заилийском Алатау, в Западном Тянь-Шане [4]. Внешний вид растений вида *Agrimonia asiatica* Juz. соответствует изображению на рисунке 2.



Рисунок 2 – Репешок азиатский (*Agrimonia asiatica*)

## 1.2 Аспекты применения растений рода *Agrimonia* L. в официальной и этномедицине

Название *Agrimonia* может иметь свое происхождение от греческого *agremone*, который относится к растениям, якобы исцеляющим катаракту хрусталика глаза. Название вида *Eupatoria* относится к Митридату Евпатора, царю Понта, которому приписывают введение многих растительных лекарственных средств. Его древние применения включают лечение катара (воспаление слизистой оболочки), кровотечения, туберкулеза и кожных заболеваний. Другим способом применения является изготовление из него красителей, ароматизаторов, противоопухолевых средств, вяжущих, кардиотонических, коагулянтов, мочегонных, седативных, противоастматических и наружных средств против мозолей или бородавок. В источниках по фитотерапии написано, что в 120 году до н. э. правитель Митридат Евпатор шестой был первым, кто использовал *Agrimonia* с целью излечения болезни печени, а в итоге, убедившись в полезных свойствах растения, присвоил ему свое имя. Вот таким образом и было получено название *Agrimonia eupatoria*. Приятный смолистый запах *Agrimonia* привлек внимание знахарей. В настоящее время установлено, что растение эффективно при терапии новообразований [5]. Заготовку листьев с ветками производят во время цветения, при этом нижние одревесневшие части стебля не подлежат сбору. *Agrimonia eupatoria* оказывает стимулирующее действие на желчный пузырь и печень, поэтому его рекомендуют для лечения холецистита и желчекаменной болезни. Из-за того, что растение обладает кровоостанавливающими свойствами, из него готовят отвар для полоскания полости рта, при воспалении миндалин и ротоглотки. Для этого взвешивают 100 г травы и заливают 1 л воды. Полученную смесь кипятят 20 мин на малом огне, процеживают, добавляют туда 2 ст. ложки меда. При легочных и маточных кровотечениях отвар готовят из 30 г травы, которую заливают 350 мл воды, а затем кипятят, пока объем жидкости не уменьшится в 2 раза, после процеживают. Отвар следует

принимать по 1 ст. ложке через каждые 3 часа. В Европейских странах репешок обыкновенный считается официальным растением. Из репешка готовят настойку или раствор для полоскания горла, также заваривают чай из листьев при заболеваниях ЖКТ. Австрия в своей народной медицине использует *Agrimonia eupatoria* при гепатите, холецистите, как кровоостанавливающее средство. В Болгарии надземную часть репешка используют как вспомогательное лечение при ревматизме, поносе. Наружно для промывания при воспалительных заболеваниях горла, носа и кожных заболеваний также используют траву репешка обыкновенного. Хорошо зарекомендовало себя и выпаривание натруженных усталых ног в горячем настое репешка. Плоды репешка можно употреблять при энурезе у детей и взрослых путем приема водного отвара из них. Не следует путать *Agrimonia eupatoria* с внешне похожими видами – *Agrimonia odorata* и *Agrimonia pilosa*. У *Agrimonia odorata* имеются железистые волоски на стебле и мощное ветвистое корневище, он не обладает лекарственными свойствами. Отсутствие опушения на верхней стороне листа характерно для *Agrimonia pilosa*, а на нижней стороне листа опушение встречается редко. Сходящиеся онусом шипики характерны для плодов *Agrimonia pilosa*. *Agrimonia pilosa* используется так же, как и *Agrimonia eupatoria* [6].

В народной медицине Сибири, Китая и Кореи *Agrimonia eupatoria* широко используется как стимулирующее, диуретическое, желудочное и вяжущее средство [7].

В надземной части *A. eupatoria* содержится эфирное масло, флавоноиды, танины, смолы, аскорбиновая кислота. Подземные органы растения богаты сапонидами, эллаговой кислотой и агримонозидом. В целом, в растении встречаются такие важные микроэлементы, как Cu, Zn, Fe, V, Ni, Cr, Ti, Mn, Sr, Zr, Ag [8].

Эфирные масла репешка обыкновенного содержат сесквитерпеновые углеводороды и кислородсодержащие вещества.  $\alpha$ - и  $\beta$ -пинен, камфен и лимонен являются представителями монотерпеновых углеводородов эфирного масла, которые в большей степени встречаются в растении. Превосходит все компоненты своим высоким содержанием фитол и (3Z)-цембрен А [9].

Трава *Agrimonia pilosa* также была указана в китайской фармакопее в качестве своего рода гемостатического ЛС для лечения заболеваний мочевыводящей, дыхательной, пищеварительной системы, а также различных видов кровотечений, таких, как кровавая дизентерия [10].

В ходе проведения анализа элементного состава *Agrimonia pilosa* в исследуемых частях растения было найдено шестьдесят два элемента. В листьях, по сравнению со стеблями и соцветиями, имеется больше элементов. Если в листьях присутствует 19 элементов (литий, бериллий, алюминий, титан, ванадий, галлий, цирконий, серебро, сурьма, лантан, церий, самарий, кадмий, диспрозий, эрбий, иттербий, золото, ртуть, свинец), то в стеблях содержится 7 элементов (кремний, калий, бром, стронций, кадмий, барий, европий), в соцветии содержится 13 элементов (магний, фосфор, кальций, кобальт, никель, медь, цинк, германий, селен, рублидий, молибден, вольфрам, висмут).

Содержание марганца, железа и кадмия в листьях и соцветиях не отличается, содержание хрома, мышьяка, иттрия, олова, празеодима, неодима, тербия в листьях и стеблях одинакова. Соцветия и стебли близки по содержанию Рb [11].

Все части репешка широко применяют в народной медицине из-за эффекта снятия воспаления, желчегонного, антиаритмического эффекта, способности снижать содержания сахара в крови. Также растения используются против паразитов, для снятия болей, как кровоостанавливающее средство, при артериальной гипертензии, отравлениях и злокачественных новообразованиях [12]. В Европейских странах репешок обыкновенный является фармакопейным ЛР и используется в качестве противовоспалительного и вяжущего средства [13].

### 1.3 Сведения о химическом составе растений рода *Agrimonia* L.

Лечебные свойства рода репешок обусловлены содержанием различных биологически активных веществ. В растениях рода репешок содержатся дубильные вещества, эфирные масла, кумарины, флавоноиды, сапонины, сесквитерпены.

Флавоноиды представляют собой фенольные соединения, и содержат дифенилпропан, который является производным 2- фенилхромона или 2-фенилхромона. Флавоноиды в нативном виде характеризуются как кристаллические соединения, со свойственной им соответствующей температурой плавления. Цвета флавонов и флавонолов бывают светло-желтыми, желтыми или желтовато-зелеными, ауроны имеют оранжевый цвет, антоцианы окрашены в красный или синий цвета, изофлавоны, катехины, флаваноны, флаванонолы бывают бесцветными [14].

Распределение полифенолов травы *A. eupatoria* наглядно представлено на диаграмме 1.

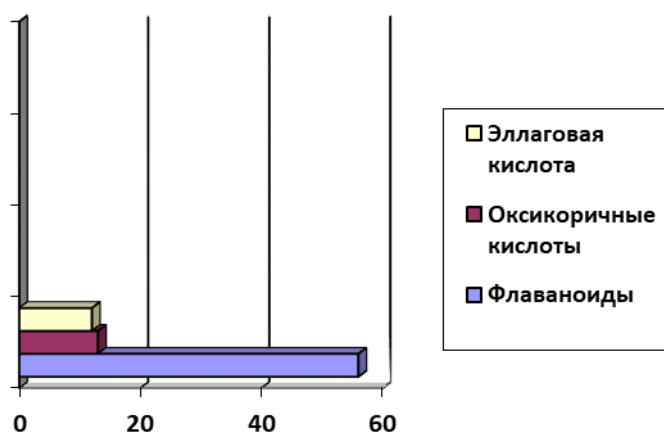


Диаграмма 1 - Полифенольные компоненты травы *A. eupatoria*

Можно увидеть, что основными полифенольными компонентами в надземной части *A. eupatoria* являются флавоноиды (56%), второе место занимает эллаговая кислота (13%) [15].

Распределение гликозидов различных флавоноидов травы *A. eupatoria* наглядно представлено на диаграмме 2.

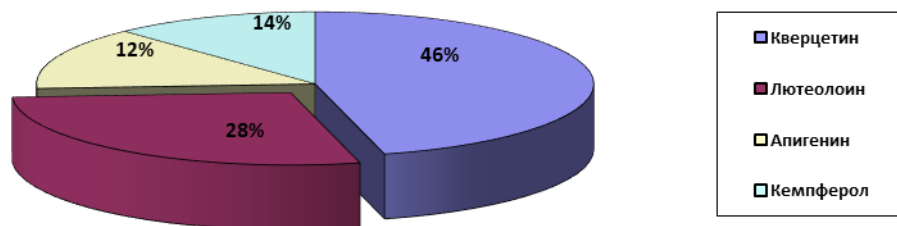


Диаграмма 2 – Гликозиды флавоноидов травы *A. Eupatoria*

В траве *A. pilosa* содержатся полифенольные соединения, полисахариды, кумарины, органические кислоты, каротиноиды. Алкалоиды, антраценпроизводные, сердечные гликозиды в растении отсутствуют. В результате изучения хроматографических данных, водного, хлороформного извлечения, а также извлечений, полученных на 20%, 40% и 70% этаноле, доказано, что в надземной части Репешка реснитчатого имеется не менее двадцати девяти фенольных соединений, из них идентифицировано одиннадцать соединений (четыре флавоноида: рутин, кверцетин, кверцетина рамнозид, апигенин, и четыре кумарина: эскулетин, эскулин, умбеллиферон и скополетин, три гидроксикоричные кислоты: кофейная, хлорогеновая и коричная) [16]. Необходимость использования флавоноидов в качестве гепатопротекторов доказана современными исследованиями [17,18].

Как показано из таблицы 1, многие анализы фитохимического состава *A. eupatoria* были основаны на спиртовых и водно-спиртовых экстрактах. Шабана и соавт. обнаружили, что основными соединениями в водно-спиртовом экстракте являются флавоноиды, большое количество дубильных веществ, а также фенольные кислоты.

Пять из флавоноидов, идентифицированных в этом исследовании, ранее не были описаны для экстракта *A. eupatoria*. Полифенольный профиль экстракта травы характеризуется главным образом методом ВЭЖХ (таблица 1). Основным результатом цитируемых исследований было выявление наиболее сильных соединений, связанных с антиоксидантной активностью *A. eupatoria* (4, 14, 22, 23). [19]

Таблица 1 - Анализ фитохимического состава *A. eupatoria*

Экстракты	Фитохимический состав	Методы	Источники
1	2	3	4
водно-спиртовой	дубильные вещества (10,08%); флавоноиды (0,33%); фенольные кислоты (2,26%); лютеолин 7-О-софорозид; лютеолин 7-О (6 – ацетилгликозид); акацетин 7-О-гликозид; лютеолин 7-О-гликозид; апигенин 7-О –гликозид; протокатеховая кислота; ваниловая кислота; <i>n</i> -гидроксibenзойная кислота	химически е и спектральн ые методы	Шабана и др. (2003 г.)
этилацетатная фракция из водно-спиртового экстракта	флаван-3-олы (катехин и процианидины В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , В <sub>3</sub> , В <sub>6</sub> , В <sub>7</sub> , С <sub>1</sub> , С <sub>2</sub> ); кверцетин-3-О-гликозид; кверцетин-3-О-галактозид; кемпферол-3-О гликозид; кемпферол 3-О- (6-О- <i>n</i> -кумароил) гликозид; апигенин 6-С-гликозид	ВЭЖХ	Коррейа и др. (2006 г.)
метанольный	лютеолин-7-О-гликозид; гиперозид; апигенин	ВЭЖХ	Венскутони с и др. (2008 г.)
водный	апигенин-7-О-3- <i>D</i> -глюкопиранозид; катехин; кверцетин; рутин; кемпферол-3-О-альфа- <i>L</i> рамнозид; кемпферол-3-О-бета- <i>D</i> -глюкопиранозид; лутколин-7-О-бета- <i>D</i> -глюкопиранозид; 19-альфа-24 дигидрокси урсоловая кислота; 3,3-ди- <i>O</i> - метил эллаговая кислота; 4- <i>O</i> - β – <i>D</i> -глюкопиранозид	ВЭЖХ	Жанг и др. (2009 г.)
метанольный	кемпферол 3-О-β- <i>D</i> - (2-О-ацетил-6 – <i>n</i> -кумароил) –глюкопиранозид (2-ацетил тилирозид);	ВЭЖХ	Ли и др. (2010 г.)
	кемпферол 3-О-β- <i>D</i> - (2 – <i>O</i> -ацетил-6- <i>n</i> -кумароил) –глюкопиранозид; тилирозид; астрагалин; апигенин 7-О-β- <i>D</i> глюкуронид; рутин; кверцитрин; изокверцитрин; 7-О-β- <i>D</i> - лютеолина глюкуронид;		

В таблице 2 приведены результаты различных исследований, направленных на оценку отдельных важных фармакологических свойств экстрактов *A. eupatoria*.

Таблица 2 - Анализ активности экстрактов *A. Eupatoria*

Экстракт	Объект	Активности	Методы исследования	Источники
1	2	3	4	5
водно-спиртовой	кролики	Антиоксидантная активность (АОА), противовоспалительное действие (ПВ)	экспрессия генов	Киселева и др. (2011 г.)
водно-спиртовой	мышинные 3Т3-L1 предипоцитные клетки	АОА, ПВ	экспрессия генов	Иванова и др. (2011 г.)
водно-спиртовой	экстракт	АОА	Анализ АВТС	Киселева и др. (2004 г.)
водный	экстракт	АОА	Анализ АВТС	Иванова и др. (2005 г.)
водно-спиртовой	экстракт	АОА	Анализ DPPH и АВТС	Коррейа и др. (2006 г.)
водно-спиртовая фракция, обогащенная полифенолами	экстракт	АОА	Анализ DPPH	Коррейа и др. (2007 г.)
ацетоновый, метанольный, водный, ацетонгексановый, ацетон-n-BuOH, ацетон-водный	экстракт	АОА	DPPH, АВТС анализы	Венскутонис и др. (2007 г.)
суперкритические (SC)-CO <sub>2</sub> экстракты	экстракт	АОА	DPPH, АВТС анализы	Венскутонис и др. (2008 г.)
водный	мышь	АОА	активность ферментов, гепатоглутатионовый уровень	Джиао и др. (2010)
этанольный	мышь HT22 клетки гиппокампа	нейропротекторное	Глутамат-индуцированный окислительный нейротоксичность оцененный анализом МТТ	Ли и др., (2010)
n-гексан, и метанол	<i>B. cereus</i> <i>B. Subtilis</i>	антибактериальное, АОА	на основе 96-микротарелок разведенный анализ, DPPH анализ	Коплэнд и др., (2003)



Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
водно-этанольный	<i>H. pylori</i>	Антибактериальное	анализ микроразведения	Чуикла и др., (2010)
водный	Вирус гепатита В	Противовирусное	микробиологический анализ	Квон и др., (2005)
сухие листья	Мыши	Антидиабетическое	клиническая биохимия	Свантсон-Флатт и др., (1990)
водный	Мыши, BRIN-BD11 линия панкреатической В-клетки	Противодиабетический (антигипогликемический, инсулин-понижающий и инсултноподобное действия)	клиническая биохимия	Грей и др., (1998)
водный	Микрогимальные клетки мышечной BV2	Противовоспалительное	ELISA и вестерн-блот для измерения цитокенических уровней: стимуляцией ЛПС	Бай и др., (2010)
водно-этанольный	Крысы	Против ожирения	Биохимические методы для измерения холестерина и триглицеридов	Братоева и др., (2010)
водный	Здоровые волонтеры	АОА	АВТС анализ, FRAP анализ	Ванкова и др., (2011)

Отмечена антибактериальная активность репешка обыкновенного в отношении золотистого стафилококка и  $\alpha$ -гемолитических стрептококков. Водные экстракты ингибируют микобактерию туберкулеза, в том числе штаммы, устойчивые к стрептомицину и *n*-аминосалицилату. Эфирное масло обладает антибактериальным эффектом, оно активно против *Bacillus subtilis* [20]. Было изучено антибактериальное (против золотистого стафилококка и кишечной палочки) и ранозаживляющее действие экстрактов *Agrimonia eupatoria* (водного и этанольного). Результаты показали, что этанольный экстракт был более эффективным в подавлении тестируемых бактерий, чем водный экстракт. *P. aeruginosa* была наиболее устойчивой бактерией, в то время как самая высокая зона подавления появилась против *E. coli* (20 мм). Выявлена умеренная активность против *S. Aureus* с зоной торможения 15 мм [21]. Препараты *Agrimonia eupatoria* подвергали скринингу на антимикробную активность в отношении выбранных грамположительных и грамотрицательных бактерий, имеющих отношение к ранам, с использованием метода 96-луночного планшета для микродилуции (200, 40 и 8 мкг/мл) [22]. Сообщалось, что этанольный экстракт *Agrimonia eupatoria* активен против вируса *Columbia SK* [23]. Исследована ингибирующая активность водного экстракта наземных

частей (стеблей и листьев) *Agrimonia eupatoria* против вируса гепатита В (HBV). Было обнаружено, что экстракт, приготовленный при температуре 60<sup>0</sup>С, обладает максимальной эффективностью. Ингибирующая активность экстрактов *Agrimonia eupatoria* в отношении секреции HbsAg варьировала в течение вегетационного периода и была самой высокой в середине июля. Эта ингибирующая активность позволяет предположить, что *Agrimonia eupatoria* имеет потенциальную противовирусную направленность против HBV [24]. Приготовленная мазь с этанольным экстрактом показала ранозаживляющую активность у крыс, в отличие от мази с фуцидином и мази на водной основе, следовательно, заживление раны произошло в течение 10 дней за счет применения мази с этанольным экстрактом, в то время как заживление от применения водного экстракта произошло в течение 12-14 дней и мази с фуцидином соответственно, тогда как необработанной ране для завершения заживления требовалось более 16 дней.

Изучались противоопухолевые свойства (рак шейки матки человека; HeLa и рабдомиосаркома; клеточные линии RD и первичная клеточная культура; фибробласт эмбриона мыши; MEF) экстрактов *Agrimonia eupatoria* L. (водного и метанольного). Пять концентраций (6,0; 12,0; 24,0; 48,0; и 96,0 мкг / мл) каждого растительного экстракта оценивали в течение трех периодов времени инкубации (24, 48 и 72 часа) для клеточных линий HeLa и RD или одного периода времени инкубации (48 часов) для клеток MEF. Результаты показали, что пять концентраций растительных экстрактов продемонстрировали противоопухолевые свойства, выраженность которых зависела от концентрации, а метанольный экстракт показал лучшие значения процента ингибирования роста (PGI), чем водный экстракт в клеточных линиях HeLa и RD, в то время как меньшие значения PGI регистрировали в клетках MEF. Среди этих концентраций 96,0 мкг/мл были наиболее эффективными в производстве PGI в клеточных линиях RD и HeLa в течение трех исследованных периодов времени [25].

Периферические анальгетические и противовоспалительные свойства *Agrimonia* были изучены на моделях *in vivo*. У него не было эффектов центральной анальгезии, но в тесте на кортеж процент ингибирования составлял 43,5% (однократная доза) и 49,8% (двойная доза) для этилового экстракта и 29,2% (однократная доза) и 46,8% (двойная доза) для этилацетатной фракций. Формалиновый тест подтвердил эти результаты. Тест на отек лапы показал, что обе дозы (одинарная и двойная) этилового экстракта и его фракции обладают противовоспалительными свойствами, они снижали отек на 43,2% и 52,2% (этиловый экстракт) и 34,6% и 35,4% (этилацетатная фракция) [26].

Водный этанольный экстракт растения испытывали на наличие иммуномодулирующей активности в брюшных полостях мышей. Они вызывали иммуностимулирующую активность, что приводило к активации фагоцитоза и повышению активности лизоцима и пероксидазы [27].

Гипотензивный эффект у анестезированных кошек был задокументирован для экстракта репейника, вводимого внутривенно; артериальное давление было снижено более чем на 40% [28]. Значительная уриколитическая активность

была зарегистрирована для инфузий и отваров *Agrimonia* (15% мас./об.) после их перорального введения самцам крыс в дозе 20 мл/кг массы тела (эквивалентно 3 г сухого растительного порошка) [29]. Описано успешное лечение кожной порфирии в группе из 20 пациентов, получающих инфузии *Agrimonia*. Был отмечен регресс кожных высыпаний вместе со снижением сывороточных концентраций железа в мочевых порфиринах [30].

Анализ литературы показал, что род *Agrimonia* – это многолетние травянистые цветущие растения, классифицированные в отделе *Magnoliophyta*, класс: *Magnoliopsida*, семейство: *Rosaceae*, род: *Agrimonia*. Репейник (*A. eupatoria*) цветет 5 частями желтого цветения. У него прямые опушенные стебли (высотой 50-150 см), покрытые мягкими волосками. Листья перистые, зубчатые с бархатистой нижней стороной. Яркие желтые цветы с пятью маленькими лепестками встречаются на длинных тонких колосках с июня по сентябрь. Маленькие конусовидные плоды заключены в характерную щетинистую чашечку. Щетина с крючками позволяет широко распространять семена на шерсти животных. Растение распространяется вегетативно по толстым древесным глубоким корневищам за счет зоохарии.

*A. asiatica* встречается в изобилии на лугах, пастбищах и в низинах, а также в горах высотой до 1500 м. Репейник любит солнечные лучи и растет на умеренных влажных и сухих почвах. Используется в народной медицине. Репейник хорошо известен своими полезными эффектами при различных симптомах заболеваний, таких, как чувство тяжести в области правого подреберья, болевой синдром, вызванный транслокацией конкрементов в желчном пузыре; диарея, отеки и болезненные ощущения в области поясницы при болезнях почек. Благодаря своим мочегонным свойствам трава широко используется при атонии мочевого пузыря и дизурии. Известно много других способов применения репешка в болгарской народной медицине, таких, как ревматизм, геморрой, кровоточивость десен, трофические язвы при варикозном расширении вен нижних конечностей, ларингит, туберкулез легких и туберкулез кожи. Экстракты могут использоваться в качестве компресса или полоскания, а также настоя [31]. Трава *Agrimonia* является источником многих биологически активных соединений, в первую очередь терпенов, полифенольных соединений, белков, углеводов и витаминов, как представлено в таблице 3.

Таблица 3 - Выбранные биоактивные соединения, присутствующие в сырье *Agrimonia eupatoria*

Группа БАВ	Биоактивные соединения		Источники
1	2	3	4
Аминокислоты	алифатические аминокислоты	аланин, аргинин, кислота аспарагиновая, треонин, серин, изолейцин, глицин, валин	[32]
	ароматические аминокислоты	тирозин и фенилаланин	
	гетероциклические аминокислоты	пролин и гистидин	

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Флаваноиды	флавоны	лютеолин	[33]
Органические кислоты	алифатические	нонановая кислота и каприновая кислота	[34]
Терпены	монотерпены	борнеол, камфен, камфора, линалол, $\alpha$ и $\beta$ пинены, пулегон	[33]
	моноциклические монотерпены	эвкалиптол, лимонен, терпинеол	[34]
	сесквитерпены	$\alpha$ -бисаболен, $\alpha$ и $\beta$ -кедрен, $\tau$ -кадинен, кариофиллен, мууролол, $\alpha$ и $\beta$ -селинен	[33]
Фуранокумарины	пиранокумарины	Тимол	[33]
Фенолы	простые фенолы	карвакрол, миристицин	[35, 36]
	фенолокислоты	кумаровая кислота, галловая кислота, протокатехиновая кислота	
	Сложные эфиры фенолкарбоновых кислот	хлорогеновая кислота	
Витамины		В, В <sub>1</sub> , С, Е, К, РР	[37, 38, 39]

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы исследования

Объекты исследования - надземная часть репешка азиатского (*Agrimonia asiatica* Juz.), сухой экстракт репешка азиатского, таблетки для рассасывания «Агримол». Надземная часть репешка азиатского была собрано в июне 2017 и 2018 гг. во время цветения растения в предгорьях Каскасу, РК. Вид растения определили в «Институте ботаники и фитоинтродукции» КН Министерства образования и науки Республики Казахстан (Приложение Е).

### 2.2 Методы изучения ЛРС *A. asiatica*

Фармакогностические и фармако-технологические, физические и физико-химические, фармакологические и биологические, фармакопейные методы были использованы во время изучения ЛРС репешка азиатского. Описание внешних признаков данного ЛРС должно соответствовать правилам ГФ РК, т.1, «Трава» [40].

Препараты из листьев для микроскопического изучения готовили кипячением в смеси хлоралгидрата и очищенной воды в соотношении один к одному в течение пяти минут. Далее листья промыли три раза очищенной водой и поместили на предметное стекло, накрыв его покровным стеклом. Под микроскопом МС-300 наблюдали листья с обеих сторон при  $\times 720$  увеличении [41].

Стебли кипятили в 5 % растворе едкого натра 5 мин, затем промыли очищенной водой, отделили эпидермис и провели макроскопическое изучение. Срезы стеблей для изучения под микроскопом подготовили ручным способом [42, с.10].

Подготовка образцов (плоды и семена) к сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Сушеные плоды *A. asiatica* кипятили в воде, фиксировали в FAA (формалин-уксусная кислота-спирт) в течение 48 ч, промывали водой и обезвоживали путем пропускания повышающихся концентраций спирта в воде в соответствии со стандартным способом [43]. Затем образцы высушивали в Leica EM CPD300 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), снабженной жидким CO<sub>2</sub>. Далее образцы монтировали на алюминиевые заглушки, используя двустороннюю углеродную клейкую ленту, покрывая платиной и используя устройство для нанесения покрытия напылением Desk V (Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA), поставляемое с газообразным аргонном. Микрофотографии всех образцов, полученных в продольном разрезе, были получены с использованием сканирующего электронного микроскопа с полевой эмиссией JSM-7200F (JEOL Ltd., Токио, Япония).

Чтобы определить потерю в массе при высушивании ЛРС, из измельченного сырья взвешивали 1,000 г на каждую из 5 навесок. Взвешенные навески положили в бюксы (предварительно высушенные и взвешенные бюксы) и поместили в сушильный шкаф, уже нагретый до 105<sup>0</sup>С. Навески сушились до получения постоянной массы. Через 2 часа провели первое взвешивание [44].

Чтобы рассчитать степень измельченности ситовым анализом, определили средний размер частиц. Далее по полученным данным рассчитали средневзвешенный диаметр ( $d$ ), используя формулу 1;

$$d = \frac{a_1 - d_1}{100} \quad (1)$$

где  $a_1$  – число фракции, %;

$d_1$  – средний размер частиц, мм [45].

Для определения удельной массы взвесили 5,0 г сырья и поместили в пикнометр. В пикнометр залили очищенную воду и держали на кипящей водяной бане в течение двух часов. После охлаждения пикнометра до 20°C, объем раствора довели очищенной водой до метки. Взвешивали пикнометр с сырьем и водой и рассчитывали удельную массу, применяя формулу 2:

$$d_n = \frac{P \times d_{ж}}{P + G - F} \quad (2)$$

где  $P$  –  $m$  измельченного сухого сырья, г;

$G$  –  $m$  пикнометра с водой, г;

$F$  –  $m$  пикнометра+вода+сырье, г;

$d_{ж}$  – 0,9982 г/см<sup>3</sup> [46].

Чтобы определить объемную массу, 10,0 г сырья поместили в мерный цилиндр с очищенной водой. Объем, который занимает сырье, находили по разнице объемов в мерном цилиндре. Расчет проводили по формуле 3:

$$d_0 = \frac{P_0}{V_0} \quad (3)$$

где  $P_0$  –  $m$  сырья, г;

$V_0$  – объем, который занимает сырье, см<sup>3</sup> [46].

Для того, чтобы определить насыпную массу, в мерный цилиндр поместили измельченное сырье и определили полный объем, занимаемый сырьем. Сырье из мерного цилиндра взвесили и рассчитали насыпную массу ( $d_n$ ) по формуле 4:

$$d_n = \frac{P_n}{V_n} \quad (4)$$

где  $P_n$  –  $m$  измельченного сырья, г;

$V_n$  – объем, который занимает сырье, см<sup>3</sup> [46].

Чтобы рассчитать пористость ЛРС, использовали формулу 5.

$$P_c = \frac{d_y - d_0}{d_y} \quad (5)$$

где  $d_y$  – удельный вес сырья;

$d_0$  – объемная  $m$  сырья [46].

Чтобы рассчитать порозность ЛРС, использовали формулу 6.

$$П = \frac{d_o - d_n}{d_o} \quad (6)$$

где  $d_0$  – объемная  $m$  сырья;  
 $d_n$  – насыпная  $m$  сырья [46].

Чтобы рассчитать свободный объем слоя ЛРС, использовали формулу 7.

$$V = \frac{d_y - d_n}{d_y} \quad (7)$$

где  $d_y$  – удельный вес сырья;  
 $d_n$  – насыпная  $m$  сырья [46].

Разница объема сырья, использованного для экстрагирования и объем полученного шрота после экстрагирования, дает возможность определить коэффициент поглощения экстрагента ( $K$ ) с использованием формулы 8.

$$K = \frac{V_n - V_3}{P} \quad (8)$$

где  $V_n$  – объем экстрагента;  
 $V_3$  – объем экстракта после отжима;  
 $P$  –  $m$  сухого сырья [46].

### 2.3 Методы получения экстракта из травы *A. asiatica* и оценка его качества

Выделения БАВ из растительного сырья в экстрагент является главной стадией получения экстрактов.

Известные методы извлечения БАВ из растений классифицируются на экстракционные и дистилляционные. Чтобы выбрать тот или иной метод, в первую очередь нужно определить свойства выделяемого соединения. Широко используемые экстракционные методы детально описаны в источниках с приведенными примерами [46-47]. Эти методы включают в себе мацерацию, ремацерацию, перколяцию, метод Сокслета. Самый простой и старый метод – это мацерация, суть которой заключается в следующем: измельченный материал кладется в мацерационный бак и заливается экстрагентом. Этот метод прост в исполнении [48]. Но при мацерации БАВ извлекаются частично; процесс длительный; в полученных извлечениях содержится высокий процент промежуточных веществ. Недостатки метода: трудоемкий; большие потери; сложности в перемешивании.

Метод Сокслета можно считать приемлемым и хорошо разработанным, он считается мощным по производительности, в сравнении с обычными историческими способами экстрагирования, но при этом важно учитывать, что метод не подходит для извлечения термолабильных соединений [49]. Современное применение метода Сокслета приведено в методике [50].

Современными интенсивными методами экстрагирования считаются следующие методы: ЖЭМ, сверхкритическая ФЭ, субкритическая экстракция водой, УЗ экстракция. Модифицированная жидкостная протекает при температуре от 50 до 200<sup>0</sup>С и  $P$  от 10 до 15 Мпа. Повышение температуры усиливает кинетику экстрагирования. Высокое давление дает возможность извлекать БАВ из клеток растений [51-52].

УЗ экстракция предоставляет возможность непрерывной работы и сокращает время экстрагирования, так как данный процесс позволяет экстрагировать термолабильные соединения при низкой температуре. Звуковые волны могут перемещаться в любой среде [53-54]. С помощью УЗ экстракции можно извлекать такие соединения, как эфирные масла и липиды [55-58]. Было изучено применение метода УЗ экстракции и его влияние на структуру материала [59-61]. Основным недостатком УЗ метода считается неустойчивость извлекаемых веществ, при этом точно не ясна связь процента разрушения биологически активных веществ и частоты УЗ, а также интенсивности УЗ и Мг обрабатываемых веществ.

При использовании дробной мацерации рассчитанное количество измельченного ЛРС укладывают в перколятор на фильтр из ваты, и утрамбовывают каждую порцию ЛРС палочкой. Далее его прикрывают тонким слоем марли, а сверху кладут груз для того, чтобы ЛРС не всплывало. После этого перколятор с ЛРС укрепляют на штативе, под перколятор ставят сухой приемник и подают экстрагент в перколятор. Наполняют экстрагент в перколятор поверх материала до образования «зеркала». Далее перколятор закрывают пергаментом и оставляют на 24–48 ч. По истечении указанного времени кран открывается, и первую порцию извлечения сливают в объеме 1/4 готового продукта. Оставшийся экстрагент подают на сырье до образования «зеркала», и спустя 1,5 ч снова повторяют вышеописанный процесс. Таким образом, производят всего четыре слива. Полученные порции извлечения объединяют.

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

ГХ-МС – способ количественного и высококачественного анализа множества соединений, раскрывающий гигантские возможности в токсикологии, медицине и промышленности. ГХ-МС - сочетание 2-ух аналитических инструментов: газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Они были введены в конце 50-х годов XX века как система распределения и ввода эталона в масс-спектрометр.

Уже давно известно некоторое количество видов интерфейсов ГХ-МС, но в итоге становления вакуумной технологии высочайшей пропускной возможности и совершенного вытеснения ГХ с насадочными колонками, основная масса изготовителей в данный момент предпочитают использовать прямую пробу. Гелий широко применяется в качестве транспортирующего газа, так как он не тяжелый. Широко распространенной версией ГХ-МС является анализ с использованием электронной ионизации (EI). Спектры, полученные при нормальных условиях ионизации во время скрининга, сравниваются со спектрами массы библиотеки. Нередко химическая ионизация с обнаружением позитивных (PCI) или же негативных ионов (NCI) часто применяется для повышения селективности, несмотря на это, химическая ионизация редко применяется в качестве способа скрининга. Ее используют для обнаружения аналитов. Стадия деривации необходима для ГХ анализа соединений с полярными гидроксильными и аминогруппами. Метаболиты



многих лекарств содержат несколько полярных групп различной природы, и для их анализа часто используется ацетилирование с уксусным ангидридом в присутствии пиридина или триэтиламина. Преимущество ацетилирования: невысокая цена реагентов, получение стабильных производных и недоступность колоночного «зависимого» эффекта. Полифторированные реагенты относительно легко гидролизуются, соответственно, это ограничивает их использование. В библиотеках недостаточно справочной информации о производных этих реагентов. Ацетилирование ангидрида уксусной кислоты с безводным пиридином нередко применяется для целей скрининга, потому что он является одним из самых несложных и современных способов деривации [62].

## **2.5 Методы токсико-фармакологических исследований экстракта *Agrimonia asiatica***

Определения острой, подострой токсичности и алергизирующего действия экстракта *Agrimonia asiatica* проводили соответственно «Руководству по проведению неклинических исследований лекарственных средств» [63]. Оценочными мерами токсичности экстракта *Agrimonia asiatica* являлись интоксикация и выживаемость подопытных животных в течение 48 ч. В течение первых 6 часов после введения экстракта животных непрерывно контролировали, а затем 2 недели наблюдали за их состоянием и поведением. Для определения токсичности экстракта изучение проводили на белых мышах (беспородные, m тела 18-25 г., разделенные на четыре группы по пять особей в каждой), условия содержания животных в виварии НИИ имени Атчабарова:

- комнатная температура –  $(25 \pm 2)$  °C;
- влажность воздуха комнаты – 60%.

Экстракт, растворенный в воде, очищенный в трех дозах (500 мг/кг; 1000 мг/кг; 2000 мг/кг) однократно вводили животным натошак. Продолжительность наблюдения за животными составила не менее 14, 21 и 30 дней. В это время оценивали состояние животных.

### **Морфологическое исследования органов подопытных животных**

Изучение проводили на беспородных белых мышах, после двухнедельного карантина. Контроль над животными проводили в течение двух недель. В указанное время животные вели себя активно. Забой животных проводился на пятнадцатый день методом цервикальной дислокации. В ходе вскрытия отметили, что органы анатомически локализованы правильно и серозные оболочки были гладкими. Фиксирование органов проводили с использованием десятипроцентного раствора формалина [64].

### **Исследования по проведению неклинических исследований эффективности фитосубстанции**

Противовоспалительную активность экстракта исследовали способом «формалинового отека» лапы крыс. Объектами изучения стали нелинейные

половозрелые крысы самцы (m= 210–240 г.). Условия содержания животных в виварии НИИ имени Атчабарова:

- комнатная температура – (20±5)°С;
- влажность воздуха комнаты – 60%±5.

Опыт был проведен в соответствии с правилами GLP и МРЕК [65]. Животные прошли обязательный карантинный период, равный 14 суткам до начала опыта. Кормление осуществлялось стандартным рационом вивария. Отек вызвали субплантарно, для этого вводили 0,1 мл двухпроцентного формалинового раствора, и по изменению объема лапы оценивали воспалительную реакцию через три часа после возбуждения воспаления. Оценку прироста объема конечности и торможение воспаления определяли в качестве показателя оценки противовоспалительной активности исследуемого экстракта. Прирост объема конечности рассчитали, используя формулу 9:

$$П = \frac{О - И}{И \times 100\%} \quad (9)$$

где П – прирост;

О – объём лапы после введения формалина;

И – объём лапы до введения формалина.

Подавление отека рассчитывали, используя следующую формулу 10:

$$100\% = \frac{\frac{О - И}{И_{\delta}}}{\frac{О - И}{И_{\phi}}} \times 100\% \quad (10)$$

где, δ– контрольная группа;

φ – формалиновая группа.

Оценку противовоспалительного эффекта проводили по уменьшению отека, и по итогам действия трех доз исследуемого вещества рассчитали ED<sub>50</sub>.

#### Определение аллергизирующего действия сухого экстракта из травы *Agrimonia asiatica* Juz.

Морским свинкам в ротовую полость через зонд вводили 1 мл сухого экстракта (500 мг/мл) в течение трех недель. Тестирование сенсibilизирующих свойств проводили каждую неделю. Сенсibilизирующие свойства проверяли путем конъюнктивальной пробы, 1 каплю раствора экстракта капали в правый глаз морской свинки и наблюдали изменения спустя 5, 15, 45, 60 мин [63].

Таким образом, во время проведения исследования мы использовали стандартные методы. Микроскопическое изучение проводили с использованием бинокулярного микроскопа и воспользовались стандартной техникой микроскопического и микрохимического исследования ЛРС [41]. Проводили изучение фармако-технологических параметров травы Репешка азиатского (определение степени измельченности ЛРС, определение удельной массы, определение объемной массы, определение пористости сырья, определение порозности сырья, определение свободного объема слоя сырья, определение коэффициента поглощения экстрагента). Экстракцию сырья

проводили методом перколяции. При выделении индивидуальных соединений использовали колоночную хроматографию. Полученный экстракт изучали, используя методы ГХ-МС, ВЭЖХ. Во время установления структуры выделенных индивидуальных соединений нами были использованы методы  $C^{13}$  и  $H^1$  ЯМР спектроскопии. При проведении токсико-фармакологических исследований экстракта *Agrimonia asiatica* изучали острую, подострую токсичности и аллергизирующее действие фитосубстанции Репешка азиатского *in vivo*. Тест на «формалиновый» отек лапы крыс использовали в изучении противовоспалительного эффекта экстракта. Определение аллергизирующего действия сухого экстракта (спиртового экстракта) из травы *Agrimonia asiatica* Juz. проводили на морских свинках и сенсibiliзирующие свойства проводили путем конъюнктивальной пробы.

### 3. СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТРАВЫ *AGRIMONIA ASIATICA*

#### 3.1 Заготовка травы *A. asiatica*

Заготовка дикорастущего растения проводится, если имеется достаточный запас лекарственных растений, также все потребности предприятий, которые занимаются переработкой, должны находиться под строгим мониторингом локальных отделений охраны природы. Сырьевая база запаса Репешка азиатского, согласно данным (Аталыкова, 1988), была выявлена на хребте западного Тарбагатая (1,78 т. надземной фитомассы). Как видно, на рисунке 3 репешок азиатский в диком виде встречается в Казахстане, Узбекистане, на территории Украины и России.

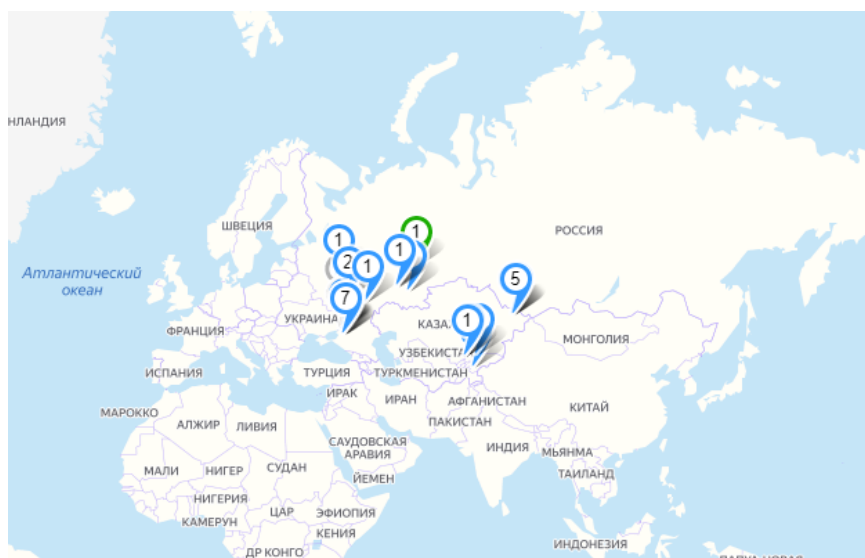




Рисунок 3 – Распространение Репешка азиатского (источник: <https://www.plantarium.ru/> Яндекс карты)

-  снимки дикорастущих особей
-  снимки дикорастущих особей в географических точках

На территории Казахстана встречается в Тоболо-Ишимской низменности, Прииртышье и Семипалатинском бору, Актюбинском регионе, Мугоджарах, Западном мелкосопочнике, на Алтае и Тарбагатае, Джунгарском и Заилийском Алатау, в Западном Тянь-Шане. Репешок азиатский произрастает на равнинах, горных склонах, лугах и берегах ручьев, среди кустарников, вдоль дорог и в садах.

При заготовке растительного сырья, растения не выдергивали с корнем, а только срезали верхнюю часть ножницами, при этом оставляя 2—3 растения на 1 м<sup>2</sup> для образования и созревания семян.

Экспедиция для сбора сырья *Agrimonia asiatica* была проведена в фазе цветения растения. После сбора сырья их высушили и подготовили гербарии растения. Заготовку ЛРС *Agrimonia asiatica* проводили согласно правилам GACP.

Траву растения срезали с помощью ножниц на высоте 15 см от земли, сбор сырья осуществляли с 8.00 до 10.00 часов. Далее сушили траву в лаборатории ЛР при ЮКМА естественной воздушно-теневого сушкой, раскладывая траву слоями и постепенно переворачивая. Температура воздуха комнаты, где сушили траву, была не выше 25°C. Готовность высушенного сырья оценивали по звуку треска при ломке растений.

Процесс заготовки ЛРС Репешка азиатского схематически изображен на рисунке 4.



Рисунок 4 - Процесс заготовки ЛРС репешка азиатского

### 3.2 Морфолого-анатомическое изучение *A. asiatica*

Стебель Репешка азиатского прямостоячий, густо опушенный с ярко выраженной бороздой высотой до 80 см, согласно рисункам 5-6. Листья непарноперистосложные, листочки эллиптические с крупнозубчатым краем. Сверху листья зеленые, снизу - серовато-зеленые, прерывисто-перистые, сверху – слабоопушенные, снизу - бархатисто-опушенные с примесью мелких железок. Длина листьев до 5 см, ширина до 3 см. Жилкование перисто-краевое, изображенное на рисунке 7. Запах слегка ароматный. Вкус горьковатый.



Рисунок 5 - Гербарий репешка азиатского (А)      Рисунок 6 - Гербарий репешка азиатского (Б)      Рисунок 7 - Лист репешка азиатского

Соцветие колосовидное. Прицветники 3-раздельные, с острыми долями, имеют 5 лепестков. Цветки на коротких цветоножках 10 мм в диаметре. Лепестки темно-желтые, эллиптические.

Характерной особенностью при изучении строения листьев оказалась сильная извилистостенность верхнего эпидермиса, в то время как нижний эпидермис имеет прямостенные клетки, устьица встречаются с обеих сторон листа, как это видно на рисунках 8 и 12. Обнаруженный устьичный аппарат крупный, имеет овальную форму, устьичная щель резко очерченная, устьица окружены 3 клетками эпидермиса, из которых одна заметно меньше других (аномоцитный тип) в соответствии с рисунками 9, 13. Волоски простые в виде одноклеточных выростов. Поверхность волосков бородавчатая, согласно рисункам 10-11. Эфирномасличные железки с пигментированным содержимым, расположены с обеих сторон листа в углублениях эпидермиса. Железки бесцветные, округлые, одинаковые по размерам, состоят из 3-5 слабодифференцированных выделительных клеток в соответствии с рисунком 14.

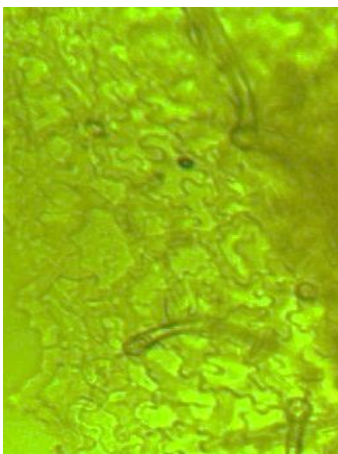


Рисунок 8 – Верхний эпидермис

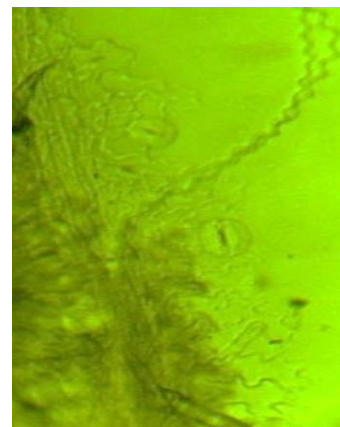


Рисунок 9 – Локализация устьиц

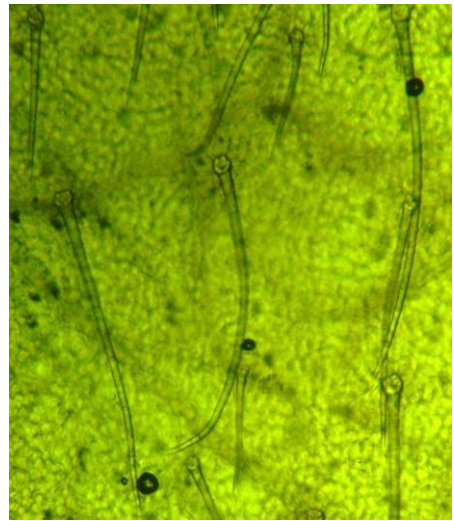
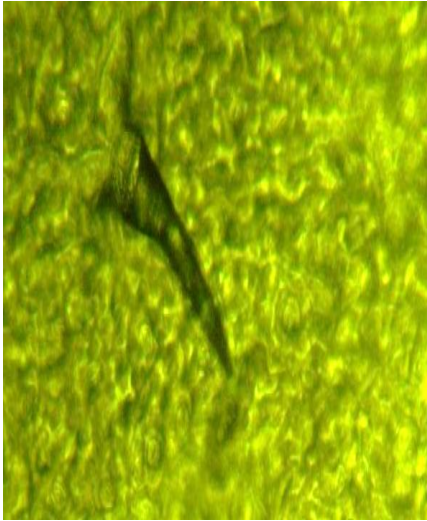


Рисунок 10, 11 – Простые волоски

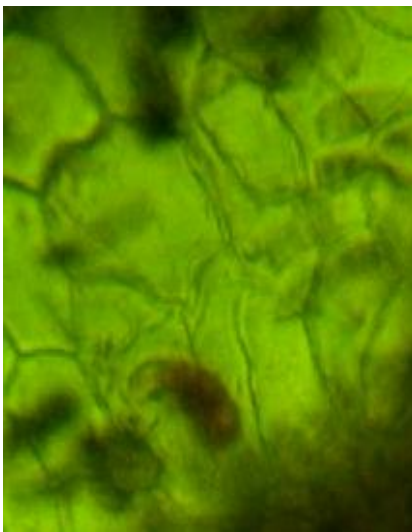


Рисунок 12 - Нижний эпидермис

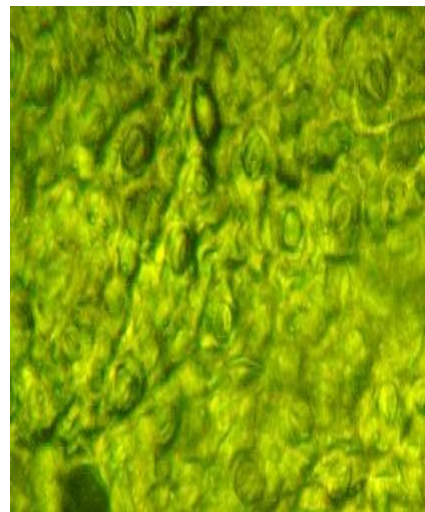


Рисунок 13 – Устьица, расположенные в нижнем эпидермисе

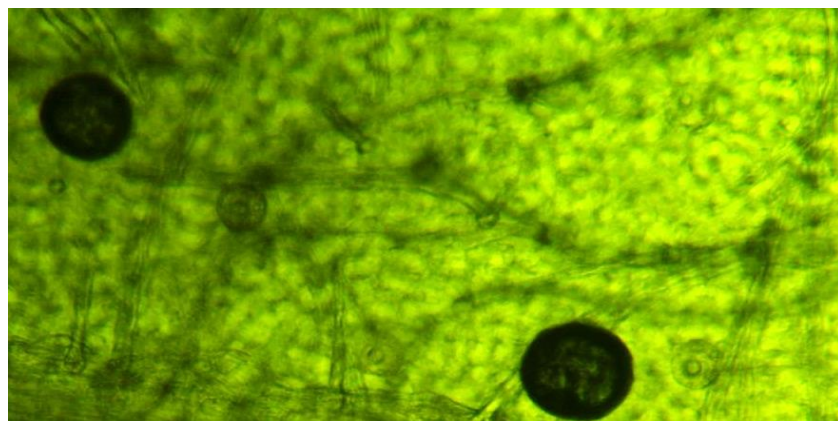


Рисунок 14 – Железки, содержащие эфирные масла

Однорядный эпидермис, который состоит из мелких клеток и проводящих пучков, характерен для поперечного среза стебля. Рыхло-расположенные круглые клетки паренхимы составляют сердцевину, согласно рисункам 15,16 [66].

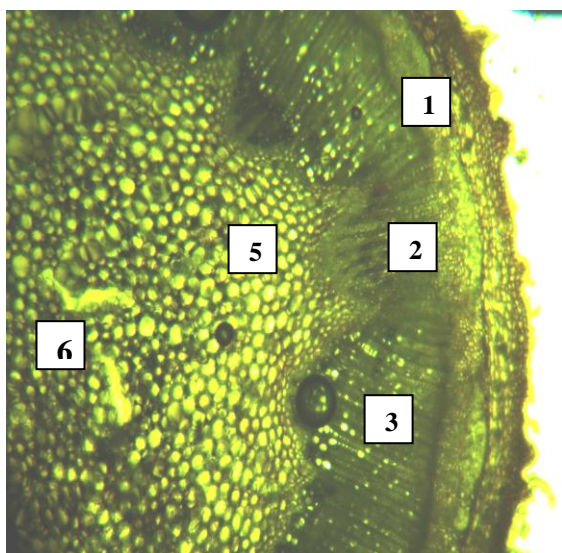


Рисунок 15 - №1 - эпидермис; №2 - колленхима; №3 - флоэма; №5 - ксилема; №6 - сердцевина;

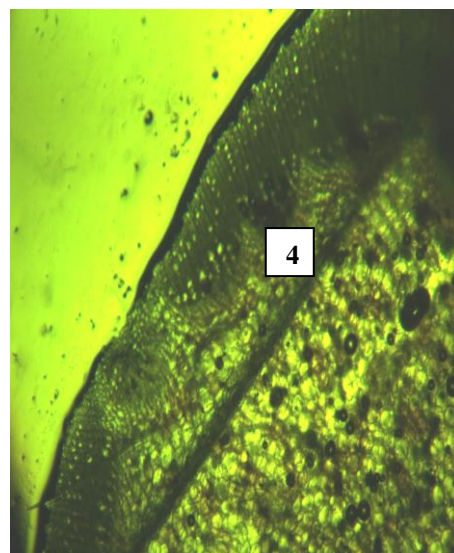


Рисунок 16 - №4 - камбий;

Морфолого-анатомическое строение плодов соответствует с рисунку 17. Плод *A. asiatica* представляет собой гипантиум (цветочную чашку), который содержит от 1 до 2 семян. Гипантий имеет чашеобразную форму, со стенками снизу, в дистальной части расположены крючковатые щетинки, длиной около 1 см и диаметром 0,5 см, включая щетинки; наружные щетинки изогнуты, внутренние - растягиваются. В нижней части гипантиума видны многочисленные не железистые покровные трихомы. Плодоносящая чашечка устойчива, видна на вершине гипантиума. В продольном разрезе зрелый плод представляет собой мясистый чашеобразный гипантий с крючковатыми щетинками вдоль края, согласно рисунку 18. Семена до 3 мм длиной и 1,5 мм в диаметре. Оболочка семени тонкая, трехслойная; одеревеневшая и толстостенная склеренхима образует средний слой. Семя с семядолями занимает большую часть объема семян [67].

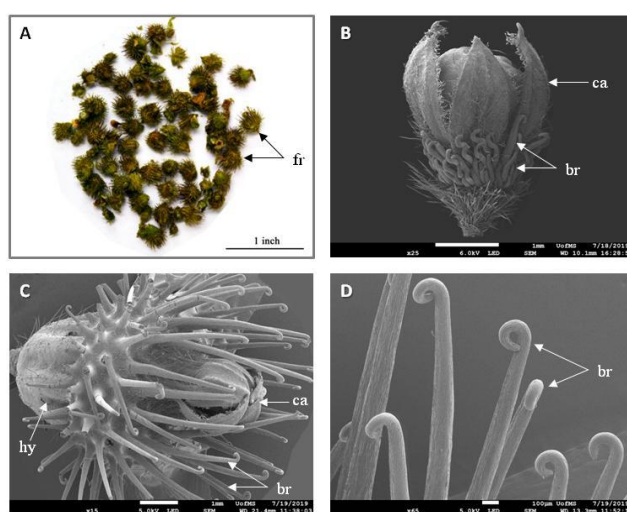


Рисунок 17 – Морфологическое строение плодов *Agrimonia asiatica*



А - фотография плода; В-SEM изображение цветущего бутона, на котором видны развивающиеся щетинки; С, D-SEM изображения зрелых плодов и крупный план крючководных щетинок гипантиума; br - щетина с крючком; са- чашечка; fr –плоды; hy- гипантиум.

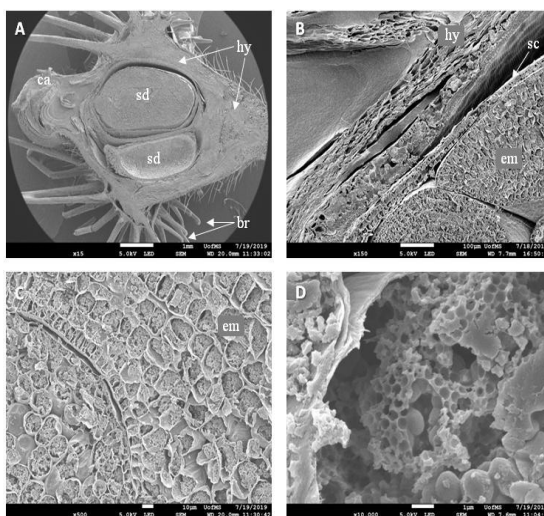


Рисунок 18 – Анатомическое строение плодов и семян *Agrimonia asiatica*

A-D-SEM изображение продольных срезов плода, на которых показан внешний гипантий с крючковатыми щетинками, охватывающими семена (А), и крупным планом вид частей плода (В) и семян (С, D). Щетина с крючководным кольцом, чашечка, гипантиум, семена.

### 3.3 Определение фармако-технологических параметров и фармакопейных показателей качества ЛРС *A. asiatica*

Определение фармако-технологических параметров проводили согласно с требованиями ГФ РК I, т. 1. Представленные данные в таблице 4 указывают на целесообразность выбора метода экстрагирования, точного расчета количества сырья и растворителя.

Таблица 4 - Фармако-технологические показатели травы репешка азиатского

№	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	1.7400	0.1171	0.3462	0.9300	1.9500	0.8001
2	1.7423	0.1178	0.3465	0.9307	1.9502	0.8006
3	1.7456	0.1176	0.3461	0.9308	1.9509	0.7997
4	1.7493	0.1179	0.3469	0.9301	1.9523	0.8002
5	1.7500	0.1177	0.3472	0.9305	1.9507	0.7999
$\bar{x}$	1.7454	0.1176	0.3465	0.9304	1.9508	0.8001

В соответствии с требованиями, описанными в ГФ РК, числовыми

показателям качества ЛРС являются зола общая, зола нерастворимая в 10% растворе хлороводородной кислоте, потеря в массе при высушивании и содержание тяжелых металлов и радионуклидов.

Определение вышеуказанных показателей проводили в соответствии с фармакопейными методами и согласно правилам «Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению радиационной безопасности» [68].

В таблице 5 представлены результаты числовых показателей качества сырья репешка азиатского.

Таблица 5 - Определение числовых показателей травы репешка азиатского

№	Потеря в массе при высушивании, %	Общая зола, %	Зола нерастворимая в 10% растворе HCl, %
1	5,90	6,30	1,37
2	5,86	6,62	1,30
3	5,77	6,18	1,37
4	5,80	6,25	1,41
5	5,81	6,23	1,33
$\bar{x}$	5,83	6,3	1,35

Результаты определения тяжелых металлов в сырье репешка азиатского представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Определение тяжелых металлов в сырье репешка азиатского

Тяжелые металлы, не более мг/кг	Нормы по НД	Результаты		НД на методы испытаний
		Проба 1	Проба 2	
Pb	6.0	1,47	1,50	ГОСТ Р51301-99
Cd	1.0	0,37	0,45	ГОСТ Р51301-99
As	0.5	Не обн.	Не обн.	ГОСТ 26930-86
Hg	0.1	Не обн.	Не обн.	ГОСТ 269227-86

Таблица 7 – Определение радионуклидов сырья репешка азиатского

Радионуклиды, Бк/кг	Нормы по НД	Результаты		НД на методы испытаний
		Проба 1	Проба 2	
Cs <sup>137</sup>	200	Не обн.	Не обн.	ГОСТ Р54016-2010
Sr <sup>90</sup>	100	21,18	25,30	ГОСТ Р 54017-2010

Данные результаты технологических и фармакопейных показателей, полученные экспериментальным путем, дают возможность выбора

оптимального способа экстрагирования БАВ из травы Репешка азиатского. Содержание радионуклидов и тяжелых металлов в траве Репешка азиатского находится в пределах нормируемых показателей.

Микробиологическую чистоту растительного сырья исследовали в соответствии с требованиями ГФ РК. Полученные результаты подтвердили, что лекарственное растительное сырье отвечает требованиям ГФ РК I, т.1, 5.1.4, категория 4 В [69]. Результаты изучения микробиологической чистоты сырья представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Определение микробиологической чистоты сырья репешка азиатского

Наименования показателей	Обозначение НД на методы испытания	Требования НД	Полученные результаты
Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов, КОЕ/г	ГФ РК, т 1, стр.176	Не более $10^7$	$5.4 \times 10^2$
Грибы, КОЕ/г	ГФ РК, т 1, стр.176	Не более $10^5$	$2 \times 10^2$
<i>E.coli</i> в 1.0 г	ГФ РК, т 1, стр.181	Не более $10^2$	Менее 10

### 3.4 Изучение фитохимического состава травы *A. asiatica*

Траву репешка азиатского измельчили в мельнице ИКА-20. Измельченное сырье содержит 5,83% влаги. Далее провели качественные реакции на группы биологически активных веществ по методике, разработанной Р.А.Музыкакиной и соавторами [70-71].

В результате проведенных качественных реакций на извлечения травы репешка азиатского, установлено наличие полисахаридов, фенольных соединений, сапонинов, дубильных веществ, флавоноидов, карбоновых кислот. Наличие полисахаридов в полученных водных экстрактах травы репешка азиатского установили качественными реакциями, приведенными в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты качественных реакций на содержание полисахаридов

№	Название реакции или реактив	БАВ	Результаты
1	2	3	4
1	95% - раствор этилового спирта	слизи	коагуляция раствора, затем выпал осадок
2	кислота хлороводородная концентрированная	слизи	желто-зеленое окрашивание
3	20% раствор резорцина и концентрированной серной кислоты	инулин	красное окрашивание
4	раствор аммония гидроксида	слизи	лимонно-желтое окрашивание

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4
5	20% раствор тимола и концентрированной серной кислоты	инулин	розовато-малиновое окрашивание
6	1% раствор йода	крахмал	сине-фиолетовое окрашивание

Таким образом, в результате проведенных качественных реакций были обнаружены и подтверждены слизи, инулин и крахмал.

Наличие фенольных соединений в полученных водных экстрактах из травы репешка азиатского установили качественными реакциями, приведенными в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты качественных реакции на содержания фенольных соединений

№	Название реакции или реактив	БАВ	Результаты
1	кристаллики сульфата закисного железа	флороглюцины	темно-фиолетовый осадок
2	раствор натрия фосфорномолибденовокислого в хлористоводородной кислоте	арбутин	синее окрашивание
3	раствор бромтимола	фенолокислоты	желтое окрашивание на голубом фоне
4	2% раствор свинца ацетата основного	фенолы, дубильные вещества	желтый осадок

Таким образом, в результате проведенных качественных реакций были обнаружены и подтверждены флороглюцины, арбутин, фенолокислоты, фенолы, полифенолы, двух- и трехатомные фенолы, производные салициловой кислоты.

Наличие дубильных веществ в полученных водных извлечениях из надземной части репешка азиатского установили качественными реакциями, приведенными в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты качественных реакции на содержание дубильных веществ

№	Название реакции или реактив	БАВ	Результаты
1	1% раствор желатина	дубильные вещества	помутнение раствора
2	раствор свинца основного уксуснокислого	гидролизуемые дубильные вещества	появляется белый осадок
3	1% раствор железоаммонийных квасцов	конденсированные дубильные вещества	черно-зеленое окрашивание
4	раствор ванилина в кислой среде	конденсированные дубильные вещества	Красное окрашивание

Наличие флавоноидов в полученных спиртовых (70% этиловый спирт) извлечениях из надземной части репешка азиатского установили качественными реакциями, приведенными в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты качественных реакций на содержание флавоноидов

№	Название реакции или реактив	Группы анализируемых веществ	Результаты
1	реакция Запрометова	флавоны, флавонолы	ярко-желтое окрашивание
2	реакция Гейдж	изофлавоны	коричнево-желтое окрашивание
3	проба Chinoda	все флавоны, флавонолы, флаваноны	окрашивание от оранжевого до красного
4	2% раствора свинца ацетата	флавоноиды с орто-диоксигруппировкой	появляется оранжево-красного цвета
5	раствор аммиака	Флавоны, флаваноны, флавонолы	желтое окрашивание
6	борно-лимонная реакция	5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы	ярко-желтое окрашивание с желто-зеленой флуоресценцией

Результаты качественных реакций свидетельствуют о наличии флавонов, флавонолов, 5-оксифлавонолов и 5-оксифлавонов, всех флавоноидов и других полифенольных соединений с диоксигруппировкой.

Наличие сапонинов, полученных в спиртовых и хлороформных извлечениях из надземной части репешка азиатского, установили качественными реакциями, приведенными в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты качественных реакций на содержание сапонинов

№	Название реакции или реактив	Группы анализируемых веществ	Результаты
1	2	3	4
1	реакция пенообразования пробирка А: 0.1 н раствора натра едкого пробирка Б: 0.1 н раствора кислоты хлороводородной	сапонины (тритерпеновые)	в обеих пробирках появляется пена
2	реакция Либермана-Бурхарда	все стерины, имеющие двойную связь в положении 5	появляется устойчивое темно-зеленое окрашивание
3	1% раствора свинца ацетата	сапонины	появляется осадок
4	реакция Лафона	сапонины	появляется сине-зеленое окрашивание

Наличие карбоновых кислот, полученных в спиртовых извлечениях из надземной части репешка азиатского, установили качественными реакциями, приведенными в таблице 14.

Таблица 14 - Результаты качественных реакций на содержание карбоновых кислот

№	Название реакции или реактив	Группы анализируемых веществ	Результаты
1	раствор аммиака и 10% раствора натрия фосфорномолибденовокислого в 10% кислоте хлороводородной	аскорбиновая кислота	появляется синее окрашивание
2	1% раствор ферроцианида калия и раствор железоаммониевых квасцов	окси-, ди- и трикарбоновые кислоты	появляется темное окрашивание

Результаты качественных реакций свидетельствуют о наличии аскорбиновой кислоты, окси-, ди- и трикарбоновых кислот.

Для определения полисахаридов траву репешка азиатского в количестве около 5 г измельченного сырья поместили в колбу объемом 100 мл, прибавили 50 мл очищенной воды, колбу присоединили к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на водяной бане в течение часа. После охлаждения еще раз в аналогичных условиях в течение 30 мин повторяли дважды экстракцию водой. Полученные извлечения объединяли и провели фильтрацию с трехслойной марлей в мерную колбу объемом 250 мл. После промывания фильтра, объем раствора довели очищенной водой до метки.

В центрифужную пробирку положили 25 мл готового раствора и добавили 75 мл 95% этилового спирта. Затем раствор подогрели на водяной бане при температуре 60<sup>0</sup>С в течение 5 мин. Через 30 мин содержимое подвергли центрифугированию в течение 30 мин (5000 об/мин). Жидкость в пробирке слили в высушенный до постоянной массы стеклянный фильтр ПОР 16. Далее полученный осадок положили на этот же фильтр и промыли 15 мл 95%-ного этилового спирта. Высушивали фильтр с осадком при температуре 100-105<sup>0</sup>С до постоянной массы [72].

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле 11:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - w)} \quad (11)$$

где  $m_1$  – масса фильтра (г);

$m_2$  – масса фильтра с осадком (г);

$m$  – масса ЛРС (г);

$w$  – влажность ЛРС.

В таблице 15 представлены полученные результаты анализа количественного содержания полисахаридов в траве Репешка азиатского.

Таблица 15 - Результаты количественного содержания полисахаридов

№	m (г)	w (%)	m <sub>1</sub> (г)	m <sub>2</sub> (г)	X (%)
1.	5	5,83	0,8247	0,7206	22,1
2.	5	5,83	0,8247	0,7208	22,1

Таким образом, количественное содержание полисахаридов составило 22%.

Для определения количественного содержания флавоноидов, 2 г измельченного сырья поместили в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавили 30 мл спирта этилового 90%, содержащего 1% кислоты хлороводородной концентрированной, колбу присоединили к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение часа, затем охладили и фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем фильтрата довели 90% этиловым спиртом до метки (обозначили р-р А).

Раствор А (2 мл) поместили в мерную колбу объемом 25 мл, добавили 1 мл 1% раствора AlCl<sub>3</sub> в 95% этиловом спирте затем объем раствора довели 95% этиловым спиртом до метки. Через 20 минут измерили оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенного спиртом этиловым 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл [73].

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле 12:

$$X = \frac{D \times 100 \times 100 \times 25 \times 100}{764,6 \times m \times 2 \times (100 - w)} \quad (12)$$

где, D – оптическая плотность испытуемого раствора при  $\lambda_{\max}$  430 нм;  
764,6 – удельный показатель поглощения (комплекс кверцетина с 1% AlCl<sub>3</sub>)

W – потеря в массе сырья;

m – масса взвешенного сырья.

В таблице 16 представлены полученные результаты анализа количественного содержания флавоноидов в траве репешка азиатского.

Таблица 16 - Результаты количественного содержания флавоноидов

Проба	m	D	W	%
1	2,00	0.105	5,83	9,11
2	2,00	0.107	5,83	9,29
3	2,00	0.110	5,83	9,54
4	2,00	0.107	5,83	9,29
5	2,00	0.108	5,83	9,38
Среднее значение				9,32±0,43

Изучение химического состава эфирного масла *Agrimonia asiatica*

Высушенный на воздухе растительный материал (535,36 г) измельчали и подвергали перегонке водяным паром, с использованием 1 л деионизированной

воды на истинном паровом дистилляторе емкостью 1 л в течение 2,5 часа, в соответствии с рисунком 19.



Рисунок 19 - Перегонка с водяным паром сырья репешка азиатского

Извлеченные эфирные масла из образцов анализировали методом GC-MS-FID на инертном XL MSD системы GC Agilent 7890A с трехостным детектором и автосамплером Agilent 7693. ГХ был оборудован капиллярной колонкой из плавленого кварца DB-5 (30 м × 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мм). Условия хроматографирования:

- температура инжектора +240°C;
- начальная температура колонки +60°C.

Температуру колонки повышали со скоростью +3°C/мин. Газом-носителем был He, а объем впрыска составлял 5 мкл (без разделения). Условиями МС были диапазон масс 50–550 m/z, задержка филамента 3.50 мин (Приложение Ё - параметры контроля инструмента ГХ МС). Компоненты масла были идентифицированы путем сравнения их масс-спектров с библиотекой NIST, а также с аутентичными соединениями. Хроматограмма представлена на рисунке 20 и в Приложении Ж.



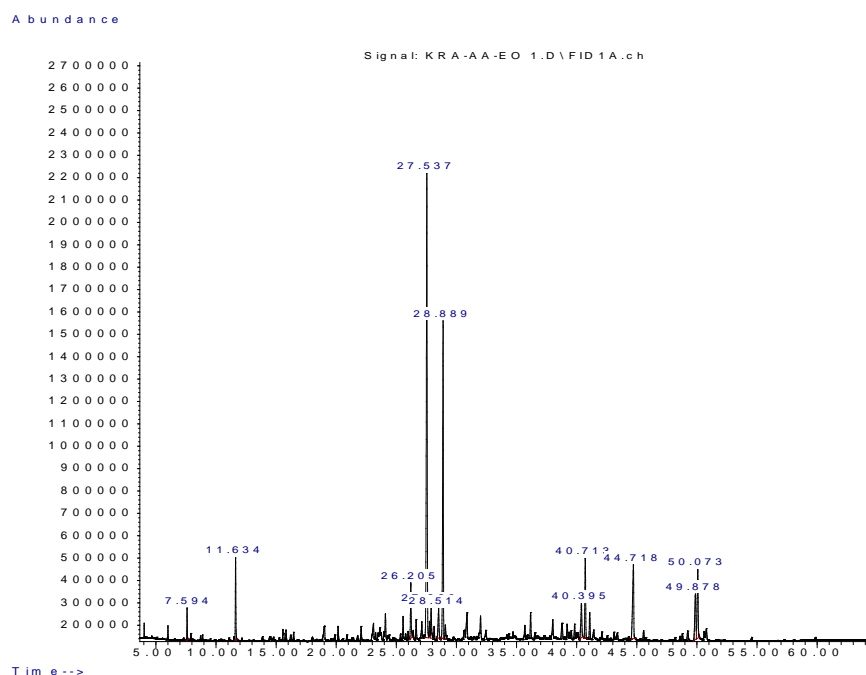


Рисунок 20 - Хроматограмма эфирного масла *A. Asiatica*

Компонентный состав эфирного масла был определен путем сравнения их масс-спектров с библиотекой NIST, а также с аутентичными соединениями. Это было подтверждено сравнением их удерживающих признаков с этими другими соединениями, а также с данными, опубликованными в литературе [74]. Идентифицированные соединения, их индексы удерживания и их процентные составы суммированы в таблице 17. Компоненты расположены в порядке, соответствующем их элюции на колонке DB-5. Массовая доля образцов на основе веса составляет 0,003-0,004%. Основными компонентами масла были  $\beta$ -селинен (36,4%),  $\alpha$ -панасинсен (21,7%), пальмитиновая кислота (7,8%), 1,2-нонадиен (6,2%), нонанал (4,2%), гермацерен А (2,5%) и  $\beta$ -гвайен (2,4%).

Таблица 17 - Компонентный состав эфирного масла *A. Asiatica*

№	Соединения	RT	KI	%
1	2-пентилфуран	7.594	970.28	1.3
2	нонанал	11.634	1107.20	4.2
3	6,10-диметил-5, 9 – ундекадиен-2-он	26.205	1450.26	3.8
4	$\beta$ - селинен	27.537	1485.46	36.4
5	$\beta$ - гвайен	27.893	1494.58	2.4
6	гермацерен А	28.514	1510.21	2.5
7	$\alpha$ - панасинсен	28.889	1519.49	21.7
8	Z-нуцеферол ацетат	40.395	1829.33	3.2
9	7-гидрокси-кумарин	40.713	1839.58	5.7
10	гексадекановая кислота	44.718	1961.84	7.8
11	4-метил-2-4-бис (4-триметилсилилфенилпентен-1)	49.878	2130.60	4.8
12	1,2 –нонаиен	50.073	2136.97	6.2
Общий				100

### 3.5 Разработка спецификации качества травы *A. asiatica*

Руководствуясь ГФ РК и №754 Приказа МЗ РК, была разработана спецификация качества ЛРС *Agrimonia asiatica Juz.* и результаты представлены в таблице 18.

Таблица 18 - Критерии качества ЛРС репешка азиатского (*Agrimonia asiatica Juz.*)

№ п/п	Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
1	2	3	4
1.	Определение	Частично измельченная высушенная трава репешка азиатского ( <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> ). Запах - слегка ароматный, вкус горьковатый.	ГФ РК I, т. 1, общая статья «Травы».
2.	Идентификация: А. Макроскопия;	<i>Цельное сырье.</i> Стебель репешка азиатского прямостоячий, густо опушенный с ярко выраженной бороздой высотой до 90см. Листья непарноперистосложные, листочки эллиптические с крупнозубчатым краем. Сверху листья зеленые, снизу - серовато-зеленые, прерывисто-перистые, сверху - слабоопушенные, снизу - бархатисто-опушенные с примесью мелких железок. Длина листьев до 5см, ширина до 3см. Жилкование перисто-краевое. Соцветие колосовидное. Прицветники 3-раздельные, с острыми долями, имеют 5 лепестков. Цветки на коротких цветоножках 10мм в диаметре. Лепестки темно-желтые, эллиптические	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> »
	В. Микроскопия;	<i>Верхние клетки</i> сильно извилистостенные, нижние прямостенные, устьица обнаружены с обеих сторон листа. Форма устьица овальная с резко очерченной устьичной щелью, тип устьиц аномоцитный. Простые волоски встречаются в виде одноклеточных выростов. Поверхность волосков бородавчатая. Эфирномасличные железки с пигментированным содержимым, расположены с обеих сторон листа в углублениях эпидермиса. Железки бесцветные, округлые, одинаковые по размерам состоят из 3-5 слабодифференцированных выделительных клеток.	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> »
	С. Качественные реакции;	катехины, слизи, дисахара, крахмал, таннины, флаванолы	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> »

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4
3.	Посторонние примеси	<p><i>Цельное сырье.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- почерневшие и побуревшие кусочки сырья - не более 10%;</li> <li>- частички стеблей с диаметром два мм – не более 1%;</li> <li>- органические примеси – не более 1%;</li> <li>- минеральные примеси – не превышают 1%.</li> </ul> <p><i>Измельченное сырье.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- почерневшие РС не превышают 10%;</li> <li>- примеси органического и минерального происхождения не превышают 1%;</li> </ul>	ГФ РК, т.1, 2.8.2
4.	Потеря в массе при высушивании)	Не более 9%	ГФ РК I, т. 1, 2.2.32
5.	Общая зола	Не более 10%	ГФ РК, т. 1, 2.4.16
6.	Зола нерастворимая в HCl	Не более 2%	ГФ РК, т. 1, 2.8.1
7.	Экстрактивные вещества	Большой выход экстрактивных веществ достигается при экстракции растительного сырья 96% этиловым спиртом	ГФ РК I, т.1, 2.8.16
8.	Микробиологическая чистота	<p>ЛРС должен соответствовать требованиям ГФ РК I, т.1, 5.1.4, категория 4 В.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Число всех жизнеспособных микроорганизмов, нуждающихся в воздухе, не превышает <math>10^7</math> бактерии и не превышает <math>10^5</math> грибов в грамме;</li> <li>- Не более <math>10^2</math> <i>Escherichia coli</i> в 1 г.</li> </ul>	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12, т. 2.6.13
9.	Количественное определение действующих веществ - полисахариды - сумма флавоноидов на пересчете кверцетин	<p>Не менее 20%;</p> <p>Не менее 9,0%;</p>	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica</i> Juz.»
10.	Упаковка	Упаковывают сырье по 10 кг в мешки, подготовленные из крафт-бумаги.	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica</i> Juz.»
11.	Маркировка	ГОСТ 5717-91	Согласно спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica</i> Juz.»

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4
12.	Хранение	Вдали от места прямого попадания лучей солнца и света при температуре не выше +25С <sup>0</sup>	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> »
13.	Срок хранения	2 года	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> »
14.	Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е.	ГОСТ 17768-90Е.
15.	Основное фармакологическое действие	Противовоспалительное	В соответствии со спецификацией качества «Трава <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> »

Проведенные исследования показали соответствие ЛРС репешка азиатского установленным требованиям.

Изучение стабильности и определение срока хранения травы репешка азиатского тестировали в течение длительного периода, согласно с установленным нормам Приказа МЗСР РК №680 от 25.08.2015 г. Полученные результаты тестирования стабильности ЛРС репешка азиатского даны в таблицах 19 – 21. В испытательном периоде (24 мес.) качественные и количественные показатели, МБЧ находились в пределах установленных норм. Контроль проводили каждые 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяцев. В ходе изучения значимых изменений показателей качества не выявлено. В связи с этим, результаты долгосрочных испытаний стабильности ЛРС репешка азиатского дают возможность установить срок хранения в течение 2 лет при температуре не выше 25±2°С и относительной влажности 60±5%.

Таблица 19 - Результаты испытаний стабильности ЛРС «Травы репешка азиатского (*Agrimonia asiatica Juz.*)», семейства Розацветных (Rosaceae)

Упаковка: трехслойные мешки из крафт-бумаги								
Т: 25±2°C. RH: 60±5%		Партия: KRA-AA-10-17-01 Дата начала испытания: 10.2017 г Дата окончания испытания: 10.2019 г						
Показатели	Нормы отклонений	Контрольные периоды, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
Описание	В соответствии со специф.качества	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Идентификация:	A B C D	соответ соответ соответ соответ	соответ соответ соответ соответ	соответ соответ соответ соответ	соответ соответ соответ соответ	соответ соответ соответ соответ	соответ соответ соответ соответ	соответ соответ соответ соответ
Посторонние примеси	почерневшие и побуревшие кусочки сырья - не более 10%; - частички стеблей с диаметром два мм – не более 1%; - органические примеси – не более 1%; - минеральные примеси – не превышают 1%.	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
		соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
		соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Потеря в массе при высушивании	Не более 13 %	5,70%	5,83%	5,90%	5,99%	5,63%	5,93%	5,83%
Общая зола	Не более 10 %	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13, категория 4 В	+	+	+	+	+	+	+
Количественное определение*	Не менее 20% Не менее 9,0%	22,1	22,1	22,1	21,8	21,8	21,5	20,9
		9,32	9,30	9,31	9,31	9,31	9,31	9,31

Таблица 20 - Результаты испытаний стабильности ЛРС «Травы репешка азиатского (*Agrimonia asiatica* Juz.)», семейства Розацветных (Rosaceae)

Упаковка: трехслойные мешки из крафт-бумаги								
Т: 25±2°C. RH: 60±5%		Партия: KRA-AA-10-17-02 Дата начала испытания: 10.2017 г Дата окончания испытания: 10.2019 г						
Показатели	Нормы отклонений	Контрольные периоды, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
Описание	В соответствии со специф.качества	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Идентификация:	A	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	B	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	C	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	D	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Посторонние примеси	почерневшие и побуревшие кусочки сырья - не более 10%;	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	- частички стеблей с диаметром два мм – не более 1%;	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	- органические примеси – не более 1%; - минеральные примеси – не превышают 1%.	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Потеря в массе при высушивании	Не более 13 %	5,70%	5,83%	5,90%	5,99%	5,63%	5,93%	5,83%
Общая зола	Не более 10 %	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13, категория 4 В	+	+	+	+	+	+	+
Количественное определение*								
	- полисахариды	Не менее 20%	22,0	22,1	22,1	22,1	22,0	22,1
- флаваноиды	Не менее 9,0%	9,31	9,30	9,30	9,31	9,31	9,31	9,31
кверцетина								

Таблица 21 - Результаты испытаний стабильности ЛРС «Травы репешка азиатского (*Agrimonia asiatica* Juz.)», семейства Розацветных (Rosaceae)

Упаковка: трехслойные мешки из крафт-бумаги								
Т: 25±2°C. RH: 60±5%		Партия: KRA-AA-10-17-03 Дата начала испытания: 10.2017 г Дата окончания испытания: 10.2019 г						
Показатели	Нормы отклонений	Контрольные периоды, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
Описание	В соответствии со специф.качества	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Идентификация:	A	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	B	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	C	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	D	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Посторонние примеси	почерневшие и побуревшие кусочки сырья - не более 10%;	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	- частички стеблей с диаметром два мм – не более 1%;	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
	- органические примеси – не более 1%; - минеральные примеси – не превышают 1%.	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Потеря в массе при высушивании	Не более 13 %	5,70%	5,83%	5,90%	5,99%	5,63%	5,93%	5,83%
Общая зола	Не более 10 %	6,34%	6,33%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%	6,34%
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13, категория 4 В	+	+	+	+	+	+	+
Количественное определение*								
	- полисахариды	Не менее 20%	22,1	22,0	22,1	21,2	21,0	21,5
- флаваноиды	Не менее 9,0%	9,32	9,30	9,31	9,31	9,31	9,31	9,31
кверцетина								

Таким образом, сырье было собрано в фазе массового цветения растения и после осыпания плодов. Отдельно были собраны плоды Репешка азиатского во время плодоношения для макроскопического и микроскопического изучения.

При макроскопическом изучении определили, что листья непарноперистосложные, листочки эллиптические с крупнозубчатым краем. Сверху листья зеленые, снизу - серовато-зеленые, прерывисто-перистые, сверху - слабоопушенные, снизу - бархатисто-опушенные с примесью мелких железок. Жилкование перисто-краевое. Соцветие колосовидное. Прицветники 3-раздельные, с острыми долями, имеют 5 лепестков. Цветки на коротких цветоножках 10мм в диаметре. Лепестки темно-желтые, эллиптические. Запах слегка ароматный, вкус горьковатый. Морфолого-анатомическое строение плодов. Внешние признаки плода: *A. asiatica* представляет собой гипантиум (цветочную чашку), который содержит от 1 до 2 семян. Гипантий имеет чашеобразную форму, с ребрами снизу, дистально с крючковатыми щетинками, длиной около 1 см и диаметром 0,5 см, включая щетинки; наружные щетинки изогнуты, внутренние растягиваются.

Микроскопический анализ листьев показал, что верхний эпидермис листа извилистостенный, а нижний эпидермис прямостенный, устьица встречаются с обеих сторон листа. Имеет аномоцитный тип устьичного аппарата. Волоски простые в виде одноклеточных выростов. Поверхность волосков бородавчатая. Имеет бесцветные, округлые, одинаковые по размерам эфирномасличные железки, состоящие из 3-5 слабодифференцированных выделительных клеток с пигментированным содержимым, которые расположены с обеих сторон листа в углублениях эпидермиса. В результате микроскопического изучения на поперечном срезе стебля выявлен однорядный эпидермис. Результаты изучения микроскопического анализа плодов репешка азиатского показали, что в нижней части гипантиума имеются гребни и многочисленные нежелезистые покровные трихомы. Плодоносящая чашечка устойчива, видна на вершине гипантиума. В продольном разрезе зрелый плод представляет собой мясистый чашеобразный гипантий с крючковатыми щетинками вдоль края. Семена до 3 мм длиной и 1,5 мм в диаметре. Оболочка семени тонкая, трехслойная; средний слой состоит из клеток склеренхимы, которые толстостенные и одревеневшие. Семя с семядолями занимает большую часть объема семян.

В результате изучения фармако-технологических параметров ЛРС определили  $d_n$ , который составляет 1,7454 г/см<sup>3</sup>;  $d_0$  составляет 0,1176 г/см<sup>3</sup>;  $d_H$  составляет 0,3465 г/см<sup>3</sup>; пористость составляет 0,9304 г/см<sup>3</sup>; порозность равна 1.9508 г/см<sup>3</sup>; свободный объем слоя сырья равен 0,8001 г/см<sup>3</sup>. Фармакопейными индикаторами ЛРС определили потерю в массе при высушивании, которая составляет 5,83% , зола общая равна 6,3% и нерастворимая зола в 10% растворе HCl составила 1,35%.

Количество тяжелых металлов в растительном сырье. Обнаружено наличие свинца 1,485 мг/кг в допустимой норме по ГОСТ Р51301-99 и кадмия 0,41 мг/кг в допустимой норме по ГОСТ Р51301-99. В сырье не присутствуют мышьяк и ртуть.



В траве репешка азиатского не обнаружен радионуклид  $Cs^{137}$ , но был обнаружен  $Sr^{90}$  23,24 Бк/кг, который не превышает норму, указанную в ГОСТ Р 54017-2010.

При изучении микробиологической чистоты травы репешка азиатского установили:

- Общее число жизнеспособных микроорганизмов, живущих в воздушной среде, КОЕ/г -  $5.4 \times 10^2$
- Грибы, КОЕ/г -  $2 \times 10^2$
- *E.coli* в 1.0 г - Менее 10

Результаты испытания микробиологической чистоты показали, что лекарственное растительное сырье относится к категории 4 В.

В результате проведенных качественных реакций на извлечения травы репешка азиатского установлено наличие полисахаридов, фенольных соединений, сапонинов, дубильных веществ, флавоноидов, карбоновых кислот. Изучался состав эфирного масла репешка азиатского полученное на истинном паровом дистилляторе, методом ГХ-МС. Выход эфирного масла составляет 0,003-0,004%. Основными компонентами масла были  $\beta$ -селинен (36,4%),  $\alpha$ -панасинсен (21,7%), пальмитиновая кислота (7,8%), 1,2-нонадиен (6,2%), нонанал (4,2%), гермацерен А (2,5%) и  $\beta$ -гуайен (2,4%).

## IV. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТА *AGRIMONIA ASIATICA*

### 4.1 Разработка оптимальной технологии получения экстракта *A. asiatica*

Первостепенным этапом в технологии получения экстракта считается оптимальное извлечение БАВ из ЛРС с использованием передовых и эффективных методов, позволяющих не изменять структуру и свойства каждого составляющего компонента. Эксперименты проводили в лабораториях ЦПН КазНМУ имени С.Д.Асфендиярова; в лаборатории изучения лекарственных растений в ЮКМА, Шымкент; в лаборатории физико-химических методов исследования КазГУ, Алматы; в НЦИПС (NCNPR) Университет Миссисипи, город Оксфорд. Проведена сравнительная оценка эффективности экстракции сырья по составу функциональных групп БАВ, который определяли ИК спектроскопией [75] и методом ГХ-МС. По итогам изучения был выбран оптимальный способ экстрагирования - метод перколяции [76]. Для того, чтобы получить сухой экстракт Репешка азиатского перколяционным методом, в качестве растворителя использовали 96% этиловый спирт. Первым этапом является подготовка ЛРС, затем ЛРС замачиваем, настаиваем, проводим процесс перколяции, отстаиваем осадок, фильтруем полученную вытяжку. Для получения экстракта с большим выходом БАВ используются в качестве экстрагирующего агента 96% этиловый спирт, измельченный ЛРС 3-4 мм, настаивание в течение - 24 ч, температура – 25<sup>0</sup>С. Далее осуществили очистку с последующим сгущением экстракта, контролируя, чтобы количество влаги не превысило 5%.

Надземные части с семенами *Agrimonia asiatica* были собраны в селе Каскасу в Туркестанском регионе Казахстана в июне 2018 года на склонах гор и идентифицированы доктором Гемеджиевой Н.Г. Образец гербария был депонирован в Гербарии НИИ Ботанического сада Алматы, Казахстан. Заготовка производилась в соответствии с принципами стандарта GACP. Растительный материал высушивали в комнате при температуре 25<sup>0</sup>С, снабженной вентиляцией. После сушки сырье измельчали до 3-4 мм с помощью лабораторной мельницы ИКА М20. Измельченный растительный материал (0,850 кг) сначала обезжиривали с использованием гексана, а затем экстрагировали перколяцией в 96% этаноле (4 л) в течение 24 ч с получением этанольного экстракта. Затем полученный экстракт сушили в лиофильной сушке FreeZone 12 л. Проводили ТСХ на этанольный экстракт из Репешка азиатского в системе 10:6:4:1 (EtAc:DCM:MeOH:H<sub>2</sub>O) в соответствии с рисунком 21.



Рисунок 21 - ТСХ на этанольный экстракт

Таким образом, готовый сухой экстракт представляет собой порошок коричневого цвета с характерным запахом. Готовый продукт положили в широкогорлые банки и маркировали в соответствии с нормативными требованиями. В таблице 22 представлен выход сухого экстракта.

Таблица 22 – Выход сухого экстракта

Метод получения экстракта	Сырье, (г)	сухой экстракт, (г)	Выход, %
Перколяция	850	36.926	4.4%

Процесс получения сухого экстракта представлен в виде схемы на рисунке 22.

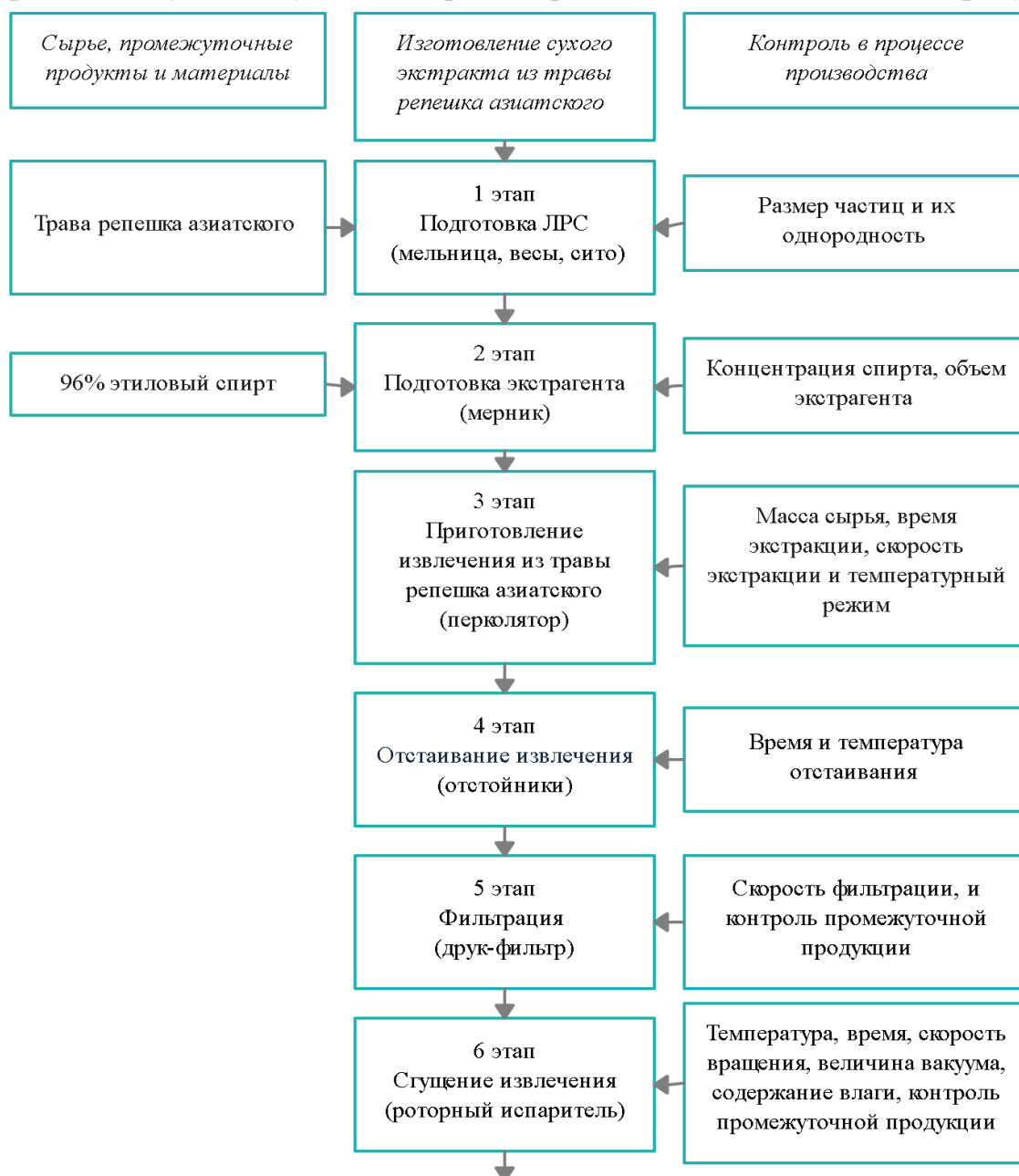
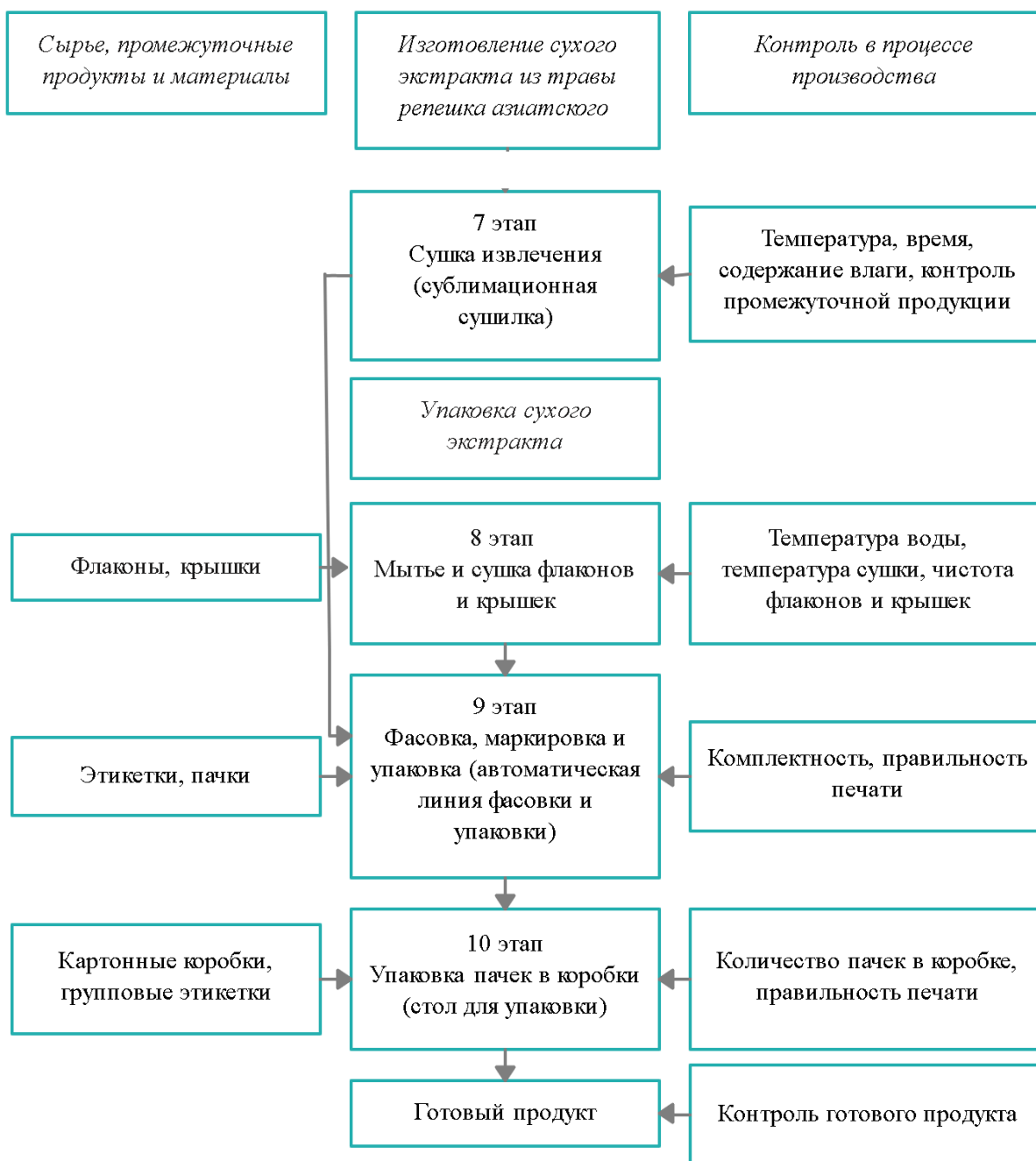


Рисунок 22– Технологическая схема получения сухого экстракта Репешка азиатского

Продолжение рисунка 22.



## 4.2 Изучение компонентного состава экстракта *A. asiatica* и выделение индивидуальных веществ

Выделение индивидуальных соединений проводили в лаборатории NCNPR, Университет Миссисипи, Оксфорд. Полученный этанольный экстракт адсорбировали в цеолите на колонке с силикагелем и элюировали системой растворителей EtOAc:DCM:MeOH:H<sub>2</sub>O (10:6:4:1), и 10% MeOH:H<sub>2</sub>O. Фракции собирали с помощью коллектора фракции Spectra Chrom SF-1, представленного на рисунке 23. Все фракции контролировали с использованием ТСХ и объединили в 10 основных фракций.



Рисунок 23 - Колоночная хроматография и сбор фракций

Схема выделения индивидуальных соединений из экстракта репешка азиатского приведена на рисунке 24.

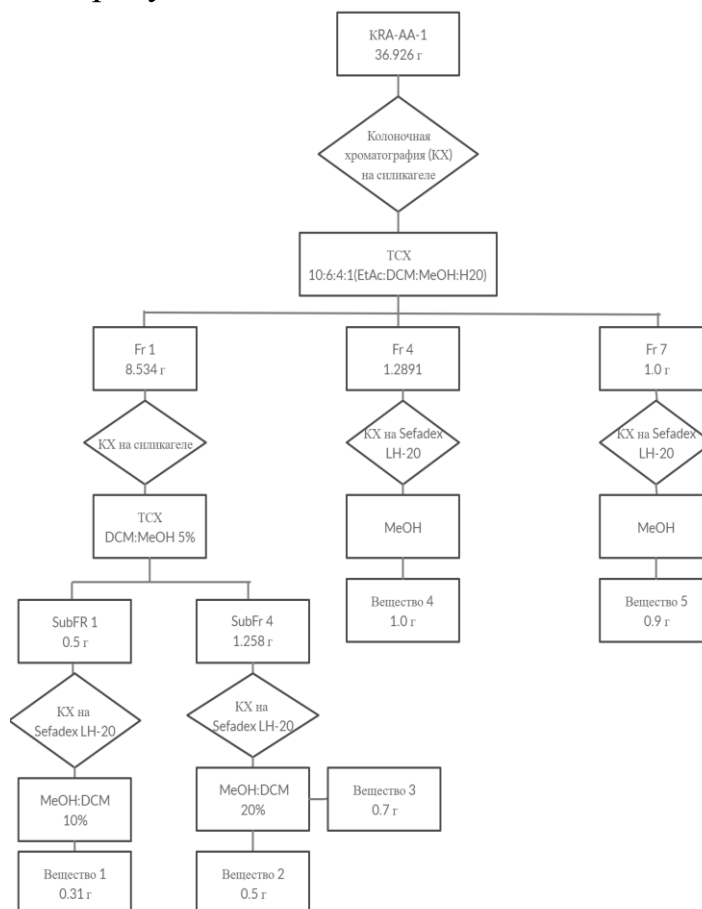


Рисунок 24 - Схема выделения индивидуальных соединений из экстракта Репешка азиатского

Основная фракция 1 (8,534 г) была адсорбирована на силикагеле (8,00 г) и помещена в колонку с силикагелем, элюирована смесью DCM:MeOH с возрастающей полярностью с получением 4 субфракций. Подфракция 1 (0,5 г) загружалась в колонку с сефадексом LH-20 и элюировалась 10% MeOH:DCM. Собирали 15 фракций, из которых фракция 14 была идентифицирована как 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) -β-D- глюкозопиранозид). ТСХ соответствует рисунку 25.

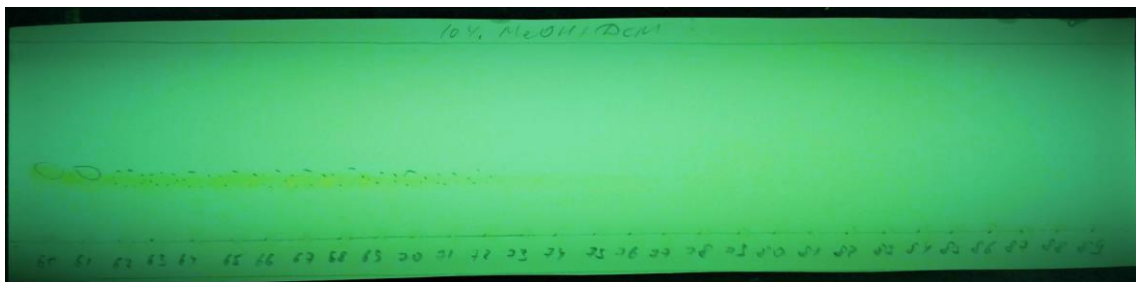


Рисунок 25 – ТСХ фракции, полученной из подфракции 1

Подфракцию 4 (1,258 г) загружали в колонку с сефадексом LH-20 и элюировали MeOH, затем собирали 16 субфракций. Подфракцией 9 является кемпферол-3-гликозид. ТСХ соответствует рисунку 26.

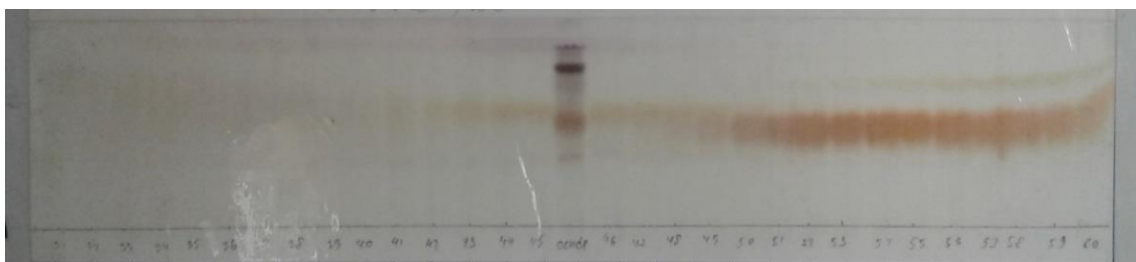


Рисунок 26 – ТСХ фракции, полученной из подфракции 4

Подфракция 11 была идентифицирована как катехин (+-). Основную фракцию 4 (1,2891 г) загружали в колонку с сефадексом LH-20 и элюировали MeOH, получая девять субфракций. Подфракция 5 была идентифицирована как кверцетин-3-О-α-арабинофуранозил-β-D-галактозопиранозид. ТСХ в соответствии с рисунком 27.

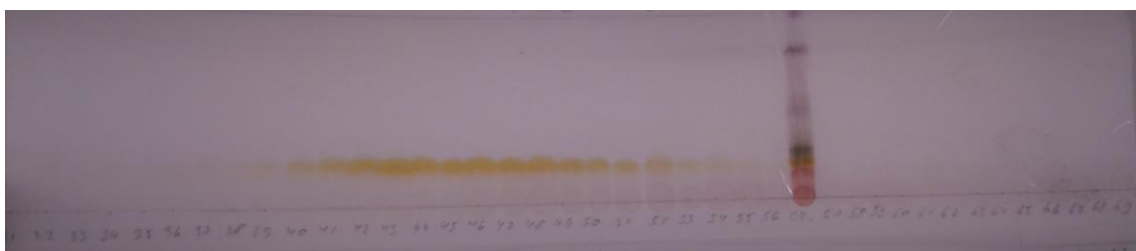


Рисунок 27 – ТСХ фракции, полученной из подфракции 5

Основную фракцию 7 (1,00 г) загружали на колонку с сефадексом LH-20 и элюировали MeOH, получали семь субфракций и субфракции 2 и 4 идентифицировали как фруктозу и глюкозу. Соответственно, в спектрометре AMX 500 ЯМР и 400 ЯМР в режиме Брукера и стандартной импульсной системы собраны спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  в соответствии с рисунком 33. Прибор работает на частотах 500 и 400 МГц в  $^1\text{H}$  и от 125 до 100 МГц в  $^{13}\text{C}$  и в качестве растворителей использовали DMSO- $d_6$  и MeOD.

Фитохимическое исследование этанольного экстракта *Agrimonia asiatica* привело к выделению четырех производных флавоноидов. Все выделенные соединения были идентифицированы путем анализа их спектральных данных: 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид (1), кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид (2), кемпферол-3-гликозид (3), катехин (4) и сахароза (5) в таблице 23-27 и их ЯМР-спектры, приведенные на рисунках 28-32 и в приложениях 3 1- 3 15 и ЖХ МС спектры в приложениях И 1 - И 5 [77].

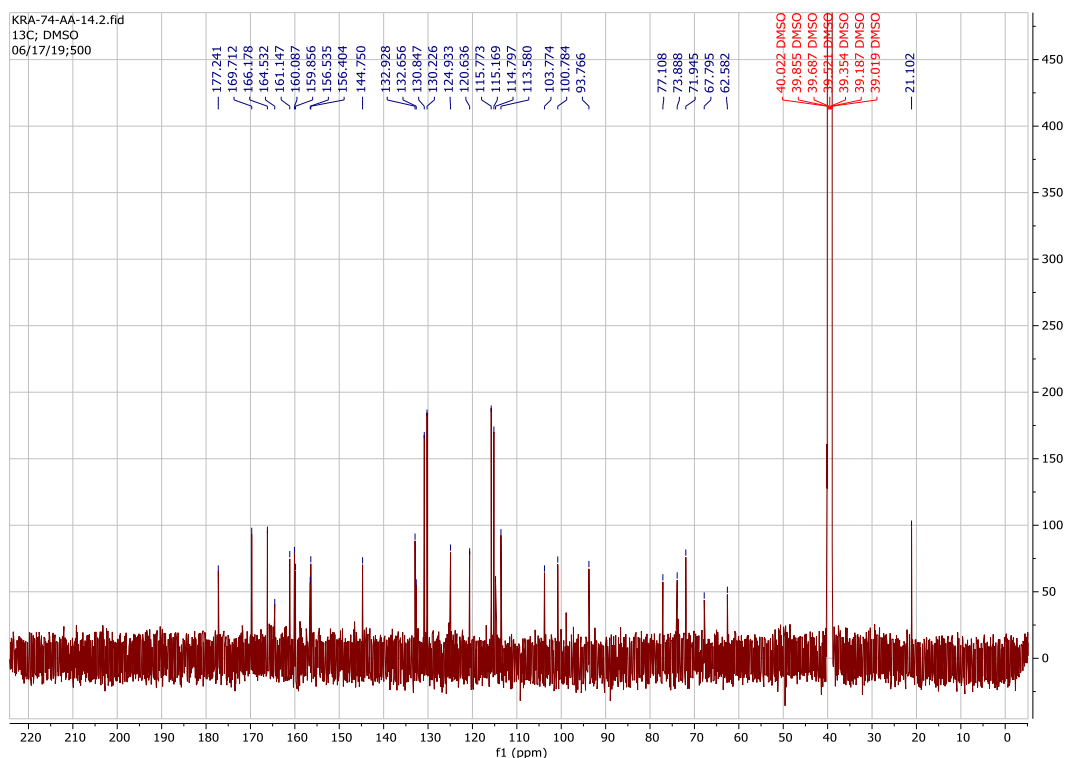


Рисунок 28 -  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид

Таблица 23 - Данные ЯМР для соединения 1 в DMSO- $d_6$

№	$^{13}\text{C}$ ЯМР (126 МГц) $\delta$	[79]	№	$^{13}\text{C}$ ЯМ (126 МГц) $\delta$	[79]
1	2	3	4	5	6
2	156,53	156,3	2"	71,94	74,2
3	132,93	132,7	3"	77,11	73,7
4	177,24	177,1	4"	67,79	70,0
5	161,15	161,2	5"	73,89	74,1
6	98,89	98,7	6"	62,58	62,8

Продолжение таблицы 23

1	2	3	4	5	6
7	164,53	164,2	8'''	166,18	166,1
8	93,77	93,7	7'''	113,58	113,6
9	156,40	156,6	6'''	144,75	144,7
10	103,77	103,9	1'''	124,93	124,9
1'	120,64	120,6	2''', 6'''	130,23	130,2
2', 6'	130,85	130,8	3''', 5'''	115,77	115,8
3', 5'	115,17	115,1	4'''	159,86	159,8
4'	160,09	160,1	Ацетил карбонил	169,71	169,6
1''	100,78	98,5	Ацетил метил	21,10	21,0

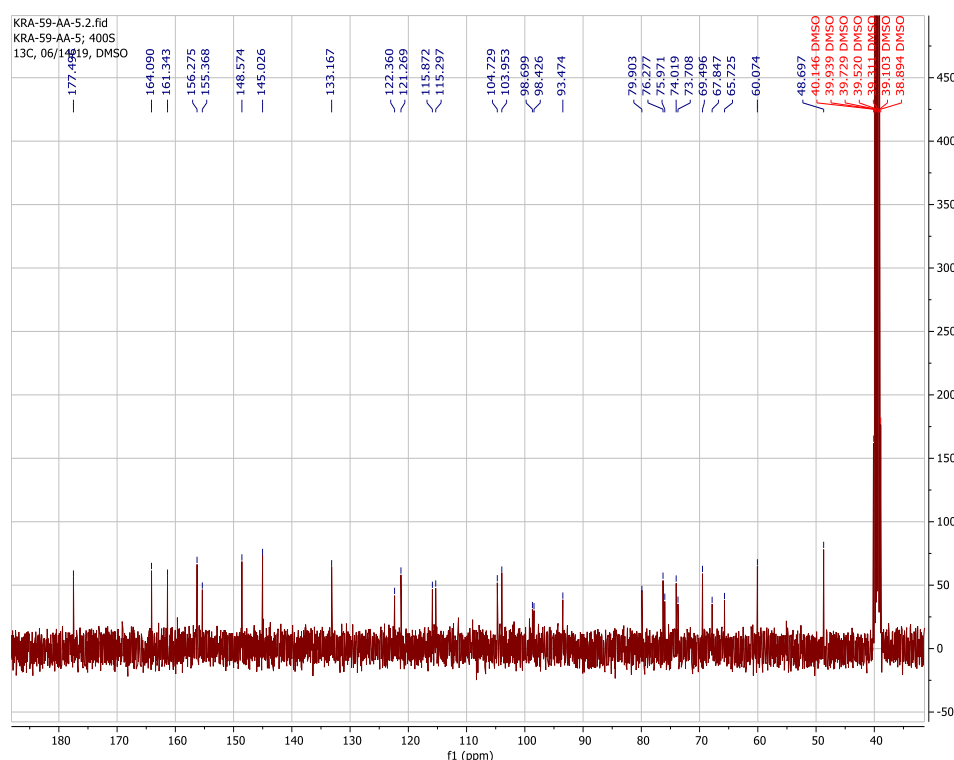


Рисунок 29 -  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид

Таблица 24 - Данные ЯМР для соединения 2 в  $\text{DMSO-}d_6$

№	$^{13}\text{C}$ ЯМР (101 МГц) $\delta$	$^1\text{H}$ ЯМР (400 МГц) $\delta$
1	2	3
2	155,37 (S)	-
3	133,17 (S)	-
4	177,50 (S)	-
5	156,28 (S)	-
6	93,47 (D)	6,40 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H)
7	164,09 (S)	-
8	98,70 (D)	6,19 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)
9	161,34 (S)	-
10	103,95 (S)	-



Продолжение таблицы 24

1	2	3
1'	121,27 (S)	-
2'	122,36 (D)	7,76 (dd, $J = 8,5, 2,2$ Hz, 1H)
3'	115,30 (D)	6,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H)
4'	148,57 (S)	-
5'	145,03 (S)	-
6'	115,87 (D)	7,53 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H)
1''	104,73 (D)	4,56 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H)
2''	73,71 (D)	-
3''	69,50 (D)	-
4''	75,97 (D)	-
5''	76,28 (D)	-
6''	65,73 (T)	-
1'''	98,43 (D)	5,70 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H)
2'''	79,90 (D)	-
3'''	67,85 (D)	-
4'''	74,02 (D)	-
5'''	60,07 (T)	-

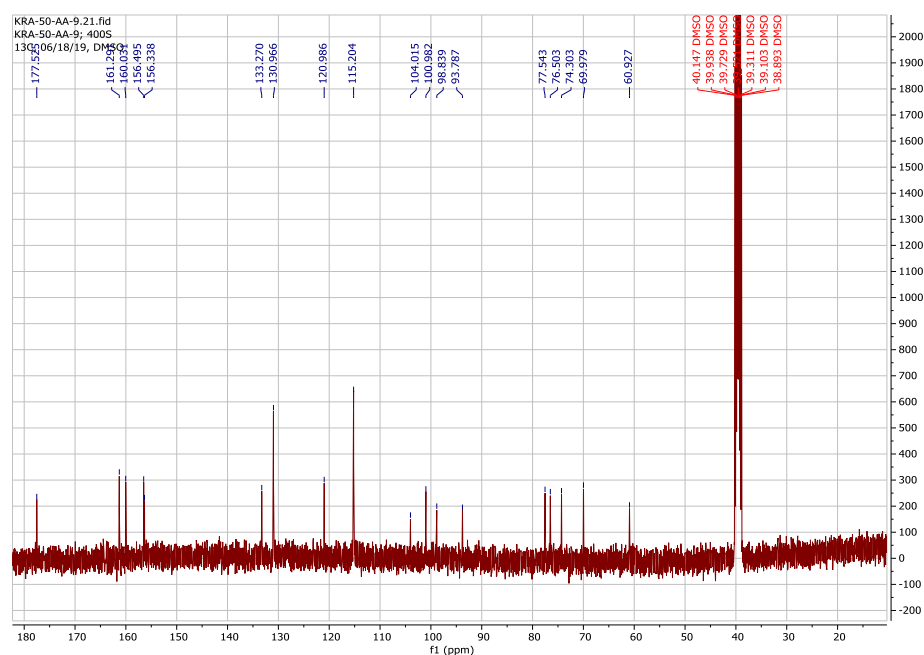


Рисунок 30 -  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр кемпферол-3-гликозид

Таблица 25 - Данные ЯМР для соединения 3 в  $\text{DMSO-}d_6$

№	$^{13}\text{C}$ ЯМР (101 MHz) $\delta$	$^1\text{H}$ ЯМР (400 MHz) $\delta$
1	2	3
2	156,34	-
3	133,27	-
4	177,53	-
5	156,49	-
6	98,84	6,20 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H),
7	164,59	-
8	93,79	6,43 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)

Продолжение таблицы 25

1	2	3
9	161,29	-
10	104,01	-
1'	120,99	-
2'	130,97	8,05 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H)
3'	115,20	6,87 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H)
4'	160,03	-
5'	115,20	6,87 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H)
6'	130,97	8,05 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H)
1''	100,98	5,45 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H)
2''	74,30	3,18
3''	77,54	3,09 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H)
4''	69,98	3,09 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H)
5''	76,50	3,21
6''	60,93	3,56; 3,32

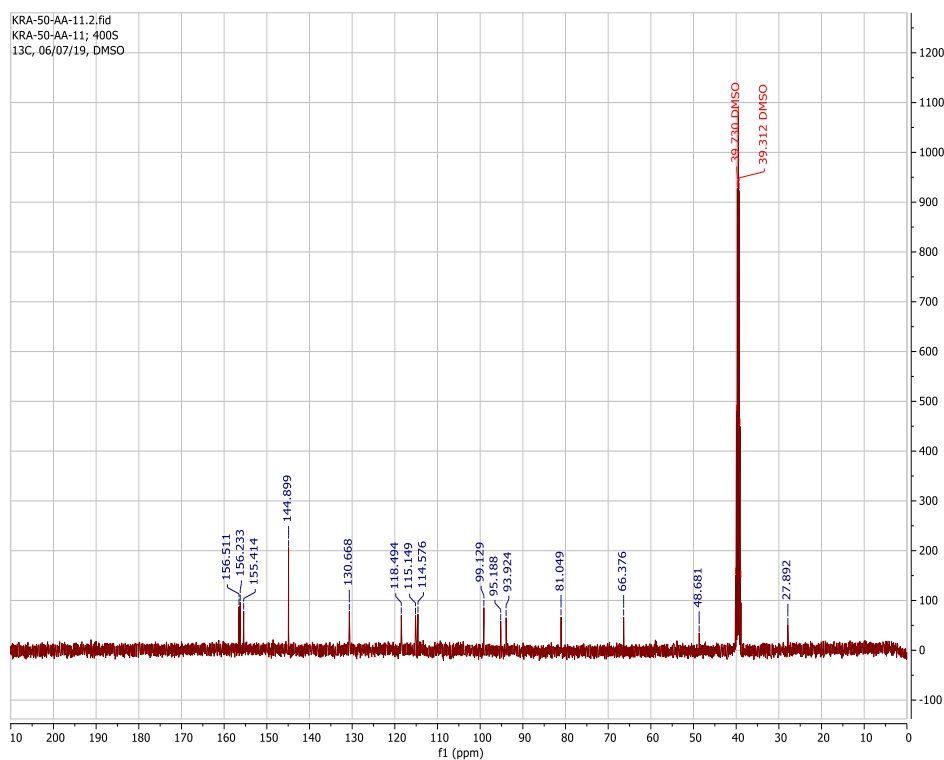


Рисунок 31 -  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр катехина

Таблица 26 - Данные ЯМР для соединения 4 в  $\text{DMSO-}d_6$

№	$^{13}\text{C}$ ЯМР (101 МГц) $\delta$	$^1\text{H}$ ЯМР (400 МГц) $\delta$
1	2	3
2	81,05 (D)	4,49 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H)
3	66,38 (D)	3,83 (td, $J = 7,7; 5,4$ Hz, 1H)
4	27,89 (T)	2,66 (dd, $J = 16,0; 5,4$ Hz, 1H) 2,36 (dd, $J = 16,0; 8,0$ Hz, 1H)
5	99,13 (S)	-
6	156,23 (S)	-
7	95,19 (D)	5,89 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)
8	156,51 (S)	-
9	93,92 (D)	5,70 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)

Продолжение таблицы 26

1	2	3
10	155,41 (S)	-
1'	130,67 (S)	-
2'	114,58 (D)	6,73 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)
3'	144,90 (S)	-
4'	144,90 (S)	-
5'	115,15 (D)	6,69 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)
6'	118,49 (D)	6,60 (dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, 1H)

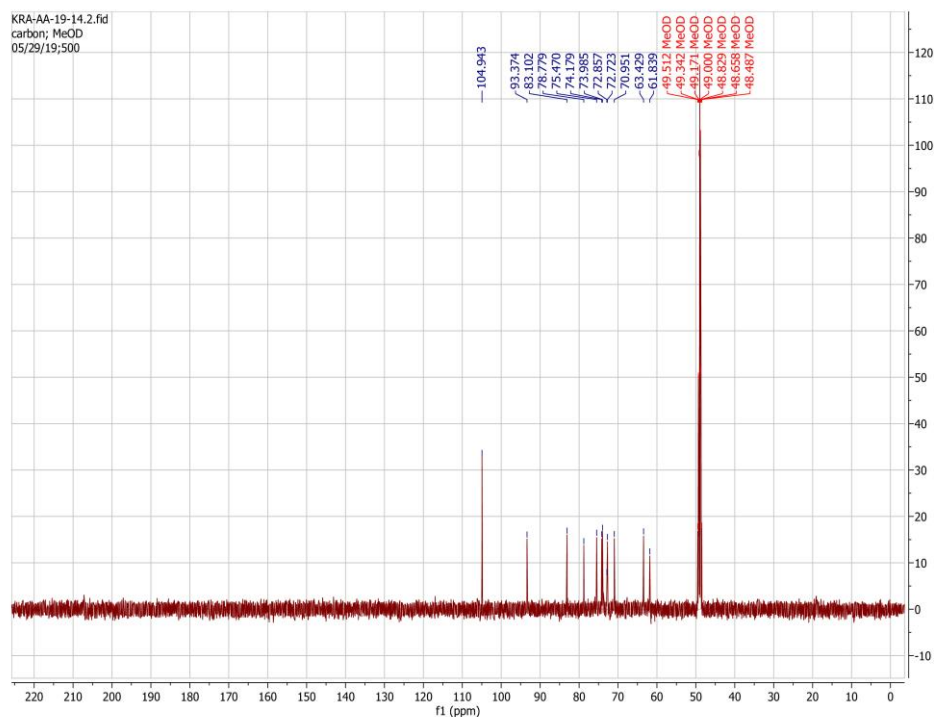


Рисунок 32 -  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр сахарозы

Таблица 27 - Данные ЯМР спектра сахарозы

№	$^{13}\text{C}$ NMR (126 MHz, MeOD) $\delta$	$^{13}\text{C}$ NMR (400 MHz, H <sub>2</sub> O) $\delta$	Источник
1	2	3	4
2'	104,94	106,36	<a href="https://www.drugbank.ca/spectra/nmr_one_d/1220">https://www.drugbank.ca/spectra/nmr_one_d/1220</a>
1	93,37	94,84	
5'	83,10	84,05	
3'	78,78	79,23	
4'	75,47	76,77	
3	74,18	75,33	
5	73,99	75,10	
2	72,72	73,80	
4	70,95	71,98	
6'	63,47	65,08	

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4
1'	63,43	64,13	
6	61,84	62,88	

Разделение и определение флавоноидов проводили на ВЭЖХ Agilent 1200 series (Agilent, Германия), оснащенном четырехканальным градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и диодно-матричным детектором. Разделение проводили на колонке Agilent Zorbax SB-C18 4,6x150 мм, d=3,5 мкм при скорости подачи растворителя 1 мл/мин анализ проводили в течение 60 мин. Смесь, состоящую из ацетонитрила и 0,5 % водного р-р ортофосфорной кислоты, использовали в качестве элюента.

Варьируя концентрацию ацетонитрила от 15 до 85%, процесс элюирования проводили в градиентном режиме, как указано в таблице 28. Температуру колонки поддерживали постоянной на уровне 30°C. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл. Для обнаружения всех флавоноидов использовали 4 длины волн: 280±8 нм, 330±10 нм, 350±8 нм, 370±8 нм.

Таблица 28 - Параметры градиентного элюирования ВЭЖХ

Время, мин	Буфер, %	Ацетонитрил, %
0	85	15
5	80	20
40	70	30
50	15	85
52	85	15
60	85	15

Для управления хроматографической системой, при регистрации и обработке хроматографических данных использовали программное обеспечение Agilent LC ChemStation. Обработка хроматограмм включала в себя определение времени удерживания и площадей пиков, обработку спектральных данных.

Идентификацию флавоноидов проводили, сравнивая время удерживания выделенных флавоноидов с временами удерживания пиков, обнаруженных на хроматограмме в соответствии с рисунками 33-35. Для более точного подтверждения использовали данные о максимумах поглощения.

Время удерживания индивидуальных флавоноидов, представленное в таблице 29, определяли, анализируя выделенные образцы. В ходе выполнения анализов было установлено, что время удерживания флавоноидов может существенно изменяться. Основной причиной является постепенное увеличение температуры колонки за счет трения между подвижной и неподвижной фазами. Однако после термостатирования колонки все еще наблюдались небольшие изменения времен удерживания всех флавоноидов, что, по-видимому, вызвано особенностями градиентного элюирования. Для

решения данной проблемы и более надежной идентификации пика использовали максимумы поглощения, известные из литературных данных и зарегистрированные при анализе стандартных образцов.

Таблица 29 - Время удерживания, максимумы поглощения и длины волн количественного определения флавоноидов

	Флавоноиды	
	Катехин	Астрагалин
tR, мин	7,03-7,06	9,36-9,69
max поглощения, нм	350	350

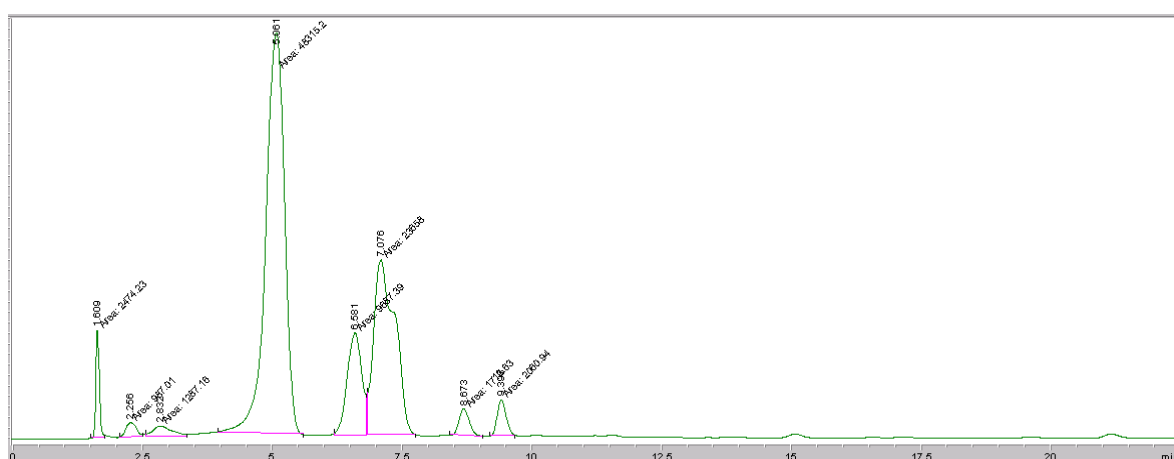


Рисунок 33 - Хроматограмма экстракта при 350 нм

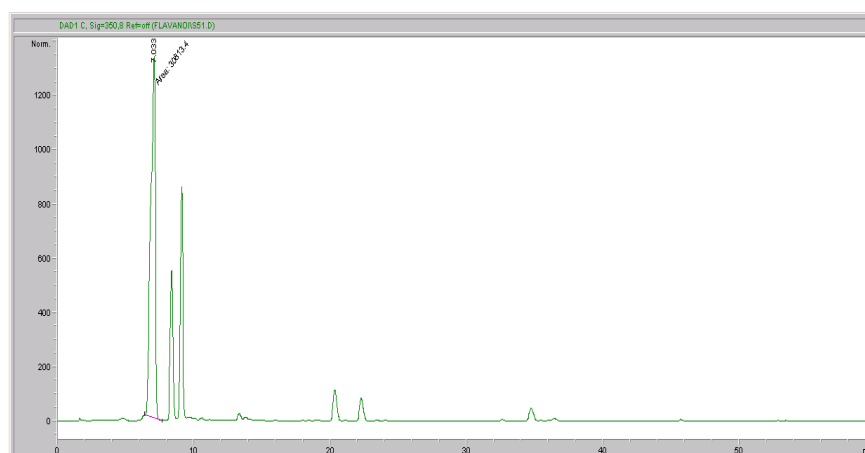


Рисунок 34 - Хроматограмма катехина, при 350 нм

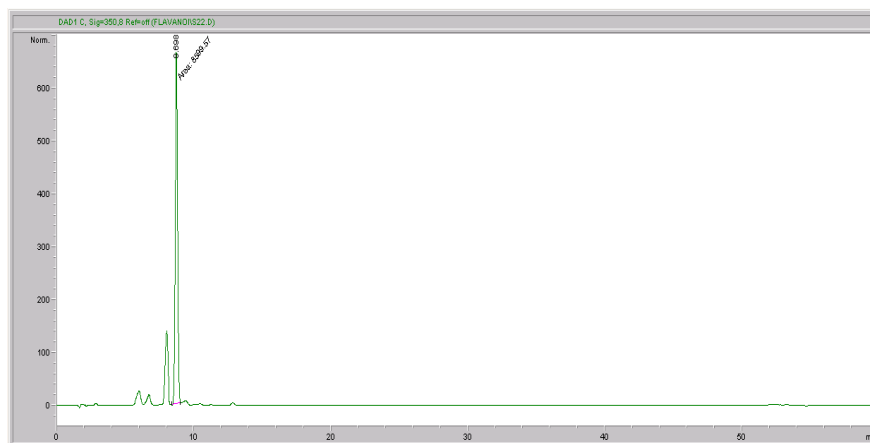


Рисунок 35 - Хроматограмма астрагалина при 350 нм

На хроматограммах образца экстракта были идентифицированы астрагалин при времени удерживании 9,36 мин и катехин при времени удерживания 7,03 мин. Содержание катехина в образце экстракта составило 1,73% и астрагалина 0,227%.

#### 4.3 Изучение антиоксидантной активности экстракта Репешка азиатского

Антиоксидантная активность спиртового экстракта травы репешка азиатского была обнаружено экспериментальным путем в трех модельных средах в лаборатории ПМФИ, Пятигорск, Россия:

1. Нитрозил-радикальная
2. Супероксид-радикальная
3.  $Fe^{2+}$  - хелатирующая.

При изучении с использованием нитрозил-радикальной среды выявили, что натрия нитропруссид может разлагаться в водном растворе при pH 7,2-7,4 и образует NO. С использованием реактива Грисса определяется количество нитрата и нитрита, полученных в качестве продуктов при реакции оксигенации NO с кислородом [82]. Чтобы получить нитрозил радикал, предварительно подготовили смесь, состоящую из 2 мл 10 мМ раствора натрия нитропруссида, и 0,5 мл фосфатного буфера pH 7,4. Чтобы изучить антинитрозил радикального действия, в смесь отдельно добавили 0,5 мл 100 мг/кг раствора экстракта, раствор мексидола 30 мг/кг для применения перорально. Термостатирование такой модельной среды проводили в течение 15 мин при температуре 25<sup>0</sup>С. После окончания инкубации взяли аликвоту 0,5 мл и добавили к ней 0,5 мл реактива Грисса. Дальше данную смесь инкубировали в течение тридцати мин. Оптическую плотность раствора измеряли в СФ ПЭ-5300В при длине волны 546 нм. Чтобы рассчитать степень ингибирования образования нитрозил-радикала, использовали следующую формулу 13:

$$\% NO = \frac{[A_0 - A_1]}{A_0 \times 100} \quad (13)$$

где  $A_0$  – ослабление смеси до реакции;

$A_1$  – ослабление смеси после реакции.

Измерение супероксид радикального действия проводили по методу, описанному Winterbourn [83]. Состав смеси включает 0,1 мл 1,5 мМ раствора ТНС; 0,1 М 0,2 мл ЭДТА; 0,12 мМ 0,05 мл рибофлавина; 2,55 мл фосфатного буфера. 0,5 мл тестируемых растворов добавили в реакционную среду и далее инкубировали при 25<sup>0</sup>С в течение 5 мин. Оптическую плотность смеси регистрировали при 560 нм. Контрольная проба вместо испытуемых растворов содержит 0,5 мл фосфатного буфера. Используя следующую формулу (14), рассчитывали долю ингибирования образования супероксидного радикала:

$$O^{2-} = \frac{[A_0 - A_1]}{A_0 \times 100} \% \quad (14)$$

где  $A_0$  – ослабление контрольной пробы;  $A_1$  – ослабление опытной пробы.

Руководствуясь методом Benzie & Strain, проводили анализ на  $Fe^{2+}$  хелатирующей модельной среде [84]. Смесь содержит:

- 1 мл 0,05% о-фенантролина в метаноле;
- 200 мкМ 2 мл раствора хлорида железа;
- 2 мл тестируемого раствора;

Инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Оптическую плотность регистрировали при 510 нм. Контрольной пробой служила бидистиллированная вода в объеме 2 мл. Используя следующую формулу 15, рассчитывали хелатирующую способность:

$$\% Fe^{2+} = \frac{[A_0 - A_1]}{A_0 \times 100} \quad (15)$$

где  $A_0$  – ослабление контрольной пробы;  $A_1$  – ослабление опытной пробы.

Полученный из наземной части этого растения спиртовой экстракт обладает выраженными антиоксидантными и хелатирующими свойствами, близкими по своему действию препарату мексидол [85]. Полученные данные изучения приведены в таблице 30.

Таблица 30 - Антиоксидантные и хелатирующие свойства экстракта репешка азиатского

Объект	$O^{2-}$ (%)	NO (%)	$Fe^{2+}$ хелатор (%)
Мексидол	32,6±0,117	38,1±0,614	29,9±0,946
Экстракт репешка азиатского	13,2±0,314	15,6±0,494	22,1±0,04

#### 4.4 Изучение противовоспалительной активности экстракта *A. asiatica*

При изучении противовоспалительного действия экстракта мы использовали 3 испытуемые группы животных, 1 контрольную группу и 1 сравнительную группу. В каждой экспериментальной группе было по 6 крыс (самцы из линии Wistar) массой 160-220 г. Контрольной группе ввели только 0,1 мл 1% р-р. формалина субплантарно, 1-ой испытуемой группе фитопрепарат в дозе 150мг/кг, 2-ой испытуемой группе фитопрепарат в дозе 300 мг/кг, к 3-ей испытуемой группе фитопрепарат в дозе 500 мг/кг (см.таблица 31).

Таблица 31 – Группа и количество животных в эксперименте

Группа и количество животных	Доза тест-препарата	Ибупрофен (100 мг/5мл)	Формалин
1	2	3	4
Контрольная группа: 6 крысы-самцы линии Wistar массой 160-220 г.	-		0,1 мл 1% р-р.
Испытуемая группа: 6 крысы-самцы линии Wistar массой 160-220 г.	150 мг/кг	-	0,1 мл 1% р-р.
Испытуемая группа: 6 крысы-самцы линии Wistar массой 160-220 г.	300 мг/кг	-	0,1 мл 1% р-р.
Испытуемая группа: 6 крысы-самцы линии Wistar массой 160-220 г.	500 мг/кг	-	0,1 мл 1% р-р.
Сравнительная группа 6 крысы-самцы линии Wistar массой 160-220 г.	-	100 мг/5мл	0,1 мл 1% р-р.

Спустя три часа у испытуемых крыс выявили выраженный отек пораженных конечностей как результат субплантарного введения 0,1 мл 2% раствора формалина. При этом объем лапы у контрольных животных не изменялся. При введении препарата сравнения отмечалось менее выраженное увеличение объема конечности у опытных крыс. При введении экстракта, снимающего воспаление, выявили min увеличение объема конечности. Результаты испытания представлены в виде таблицы 32.



Таблица 32 – Результаты, полученные в ходе исследования

№ крыс	1 группа контрольная группа (0.1 мл, 1% р-р формалина)		2 группа (150 мг/кг) объем правой лапы, см			3 группа (300 мг/кг) объем правой лапы, см			4 группа (500 мг/кг) объем правой лапы, см			5 группа (100 мг/5мл) объем правой лапы, см		
	До введен ия формал ина	После введения формалин а	До введени я формали на	После введени я формали на	Спустя три часа после примене ния экстракт а	До введени я формали на	После введени я формали на	Спустя три часа после примене ния экстракт а	До введени я формали на	После введе ния форм алина	Спуст я три часа после прим енени я экстр акта	До введ ения фор мал ина	После введен ия формал ина	Спуст я три часа после прим енени я экстр акта
1	1.0	3.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0
2	1.0	3.0	1.0	2.5	2.0	1.5	3.0	2.5	1.0	3.0	3.0	1.0	3.0	2.0
3	1.5	3.0	1.5	3.0	2.5	1.0	3.0	2.0	1.5	3.0	2.0	1.5	3.0	3.0
4	1.0	3.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	3.0	1.0	3.0	2.5
5	1.0	3.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0
6	1.0	3.0	1.5	3.5	1.5	1.5	3.0	2.5	1.0	3.0	2.0	1.0	3.5	2.0
Обще е	0.92	3.0	1.16	3.0	2.0	1.16	3.0	2.2	0.92	3.0	2.3	0.92	3.08	2.25
%			3.0-2.0=1.0			3.0-2.2=0.8			3.0-2.3=0.7			3.0-2.25=0.75		
			1.0x100/3=33.3%			0.8x100%/3=26.7%			0.7x100%/3=23.3%			0.83x100%/3=25%		

В ходе исследования определили эффективную дозу экстракта 150мг/кг, который, по сравнению с контрольным препаратом, снимает отек на 33.3%.

#### 4.5 Разработка спецификации качества экстракта *A. asiatica*

Разработку критерия качества сухого экстракта *Agrimonia asiatica* проводили согласно требованиям ГФ РК и правилам, указанным в Приказе МЗ РК от 19.11.2009 г. № 754. Полученные результаты представлены в таблице 33. Таблица 33 – Результаты создания критериев качества сухого экстракта репешка азиатского (*Agrimonia asiatica Juz.*)

№ п/п	Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
1	2	3	4
1.	Описание	Порошок коричневого цвета с характерным запахом	ГФ РК I, т. 1, общая статья. «Экстракты»
2.	Идентификация: - флавоноиды; - дубильные вещества; - полисахариды	Определение основных групп БАВ (полисахариды, флавоноиды) проводили по общепринятым методикам	Качественные реакции
3.	Потеря в массе при высушивании	Не более 5%	ГФ РК I, т. 1, 2.2.32
4.	Тяжелые металлы	Не более 0,01%	ГФ РК, т. 1, 2.4.8
5.	Микробиологическая чистота	Фитосубстанция должна соответствовать требованиям ГФ РК I, т.1, 5.1.4, категория 4 В. - в 1 г экстракта общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не превышает $10^4$ бактерии и $10^2$ грибов; - в 1 г экстракта присутствие энтеробактерий и грамотрицательных бактерий не должно превышать $10^2$ ; - в 1.0 г экстракта присутствие кишечной палочки, золотистого стафилококка не допускается; - в 10.0 г экстракта присутствие неспороносных бактерии не допускается	ГФ РК, т. 1, 2.6.12, т. 2.6.13
6.	Количественное определение содержания: - катехина; - астрагалина.	Не менее 1,73%; Не менее 0, 227%;	ВЭЖХ ГФ РК т.1, 2.2.29
7.	Упаковка	В широкогорлые банки из ПВХ упаковывают 50 г сухого экстракта. Наклеивают этикетку, отвечающую требованиям СТ РК ГОСТ Р 51958-2010	В соответствии со спецификацией качества «Сухой экстракт <i>Agrimonia asiatica Juz.</i> »

Продолжение таблицы 33

1	2	3	4
8.	Маркировка	В соответствии ГОСТ 14192-96	В соответствии со спецификацией качества «Сухой экстракт <i>Agrimonia asiatica</i> Juz.»
9.	Хранение	В защищенном от света месте при температуре не выше (+25 <sup>0</sup> С)	В соответствии со спецификацией качества «Сухой экстракт <i>Agrimonia asiatica</i> Juz.»
10.	Срок хранения	24 месяцев	В соответствии со спецификацией качества «Сухой экстракт <i>Agrimonia asiatica</i> Juz.»
11.	Транспортирование	В соответствии ГОСТ 17768-90Е	ГОСТ 17768-90Е
12.	Основное фармакологическое действие	Антиоксидантное, противовоспалительное	В соответствии со спецификацией качества «Сухой экстракт <i>Agrimonia asiatica</i> Juz.»

Стабильность экстракта изучали в течение длительного периода при температуре 25±2°С, относительной влажности 60±5%. Спецификация качества стабильности сухого экстракта из Репешка азиатского представлена в таблицах 34 - 36. Изучению стабильности подвергались три серии сухого экстракта, каждая по 500 г. Экстракт, помещенный в первичную упаковку, хранили на протяжении двух лет при температуре 25°С. Во время хранения фитосубстанция сохраняла постоянство состава: качественные и количественные характеристики оставались в пределах установленных норм. В итоге проведенных долгосрочных исследований стабильности серий экстракта при температуре 25±2°С, относительной влажности 60±5%, срок хранения субстанции равен 24 месяцам.

Таблица 34 - Результаты испытаний стабильности «Сухого экстракта травы репешка азиатского (*Agrimonia asiatica* Juz.)», семейства Розацветных (Rosaceae)

Упаковка: банки из ПВХ, широкогорлые								
Т: 25±2°C. RH: 60±5%		Партия: KPA-AAEx-11-17-01 Дата начала испытания: 11.2017 г Дата окончания испытания: 11.2019 г						
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Описание	В соответствии со спецификацией качества	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Идентификация:	- флаваноиды; -полисахариды -дубильные вещества	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	3.64%	3.63%	3.67%	3.68%	3.69%	3.68%	3.68%
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13	+	+	+	+	+	+	+
Количественное определение - катехин - астрагалин	Не менее 1,73%; Не менее 0,227%;	1,73 0,226	1,73 0,227	1,73 0,227	1,73 0,226	1,72 0,227	1,73 0,227	1,73 0,227

Таблица 35 - Результаты испытаний стабильности «Сухого экстракта травы репешка азиатского (*Agrimonia asiatica* Juz.)», семейства Розацветных (Rosaceae)

Упаковка: банки из ПВХ, широкогорлые								
Т: 25±2°C. RH: 60±5%		Партия: KPA-AAEx-11-17-02 Дата начала испытания: 11.2017 г Дата окончания испытания: 11.2019 г						
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Описание	В соответствии со спецификацией качества	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Идентификация:	- флаваноиды; -полисахариды -дубильные вещества	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	3.64%	3.63%	3.67%	3.68%	3.69%	3.68%	3.68%
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13	+	+	+	+	+	+	+
Количественное определение - катехин - астрагалин	Не менее 1,73%; Не менее 0,227%;	1,72 0,227	1,73 0,227	1,72 0,227	1,73 0,227	1,72 0,227	1,73 0,227	1,73 0,226

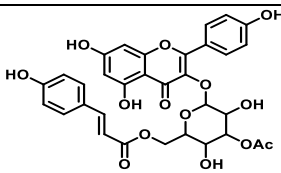
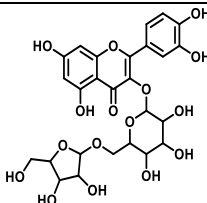
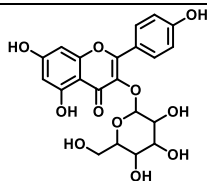
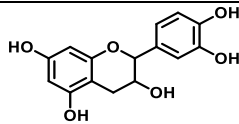
Таблица 36 - Результаты испытаний стабильности «Сухого экстракта травы репешка азиатского (*Agrimonia asiatica* Juz.)», семейства Розацветных (Rosaceae)

Упаковка: банки из ПВХ, широкогорлые								
Т: 25±2°C. RH: 60±5%		Партия: KPA-AAEx-11-17-03 Дата начала испытания: 11.2017 г Дата окончания испытания: 11.2019 г						
Показатели	Нормы	Периоды контроля, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Описание	В соответствии со спецификацией качества	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ	соответ
Идентификация:	- флаваноиды; -полисахариды -дубильные вещества	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ	соответ соответ соответ
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	3.64%	3.63%	3.67%	3.68%	3.69%	3.68%	3.68%
Микробиологическая чистота	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13	+	+	+	+	+	+	+
Количественное определение - катехин - астрагалин	Не менее 1,73%; Не менее 0,227%;	1,72 0,227	1,73 0,227	1,72 0,226	1,73 0,226	1,72 0,227	1,73 0,227	1,73 0,227

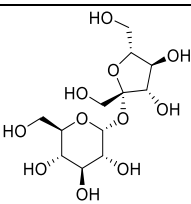
Таким образом, для получения сухого экстракта сначала обрабатывали сырье, сушили и измельчали его, загружали в перколятор и заливали 96% этиловым спиртом. Производили слив после окончания экстрагирования и отжимали шрот. В течении одного дня вытяжку отстаивали при температуре не выше 25°C. Далее экстракт сгущали, используя роторно-испарительное устройство. В сублимационной сушке проводили высушивание экстракта. Полученный продукт обладает коричневым цветом и характерным запахом, легко растворяется в воде и этаноле. Выход экстракта составил 4.4%.

Выделение индивидуальных соединений проводили в лаборатории NCNPR, Университет Миссисипи, Оксфорд. При выделении индивидуальных соединений использовали колоночную хроматографию и выделили пять основных компонентов, которые были идентифицированы как: 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) -β-D-глюкозопиранозид), кемпферол-3-гликозид, кверцетин-3-О-α-арабинофуранозил-β-D-галактозопиранозид, катехин и сахароза методом ЯМР спектроскопии. Химические соединения, выделенные из этанольного экстракта *Agrimonia asiatica*, представлены в таблице 37.

Таблица 37 - Химические соединения, выделенные из этанольного экстракта *Agrimonia asiatica*

№	Растворитель/ Прибор	Структура	Название соединения
1	2	3	4
1	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /500	 <p>Chemical Formula: C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub> Exact Mass: 636.1479</p>	3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) -β-D-глюкозопиранозид [78]
2	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /400	 <p>Chemical Formula: C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub> Exact Mass: 596.1377</p>	кверцетин-3-О-α-арабинофуранозил-β-D-галактозопиранозид [79]
3	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /400	 <p>Chemical Formula: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub> Exact Mass: 448.1006</p>	кемпферол-3-гликозид [80]
4	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /400	 <p>Chemical Formula: C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> Exact Mass: 290.0790</p>	катехин [81]

Продолжение таблицы 37

1	2	3	4
5	MeOD/500	 <p data-bbox="687 450 911 495">Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> Exact Mass: 342.1162</p>	сахароза

Разделение и определение флавоноидов проводили на HPLC Agilent 1200 series. Определили количественное содержание катехина и астрагалина, которое равнялось соответственно 1,72 % и 2.27 %.

Антиоксидантная и хелатирующая активности спиртового экстракта травы репешка азиатского была обнаружена в трех модельных средах в лаборатории ПМФИ, на кафедре ФГЗ и ботаники. При сравнении антиоксидантной и хелатирующей активности с препаратом Мексидол, экстракт репешка азиатского немного уступает. В ходе исследования противовоспалительного действия определили эффективную дозу экстракта 150мг/мл, который, по сравнению с контрольным препаратом (сироп Ибупрофен 100мг/5 мл), снимает отек на 33.3%. Разработали критерии качества сухого экстракта репешка азиатского.



## V. ТОКСИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСТРАКТА *AGRIMONIA ASIATICA*

### 5.1 Изучение острой и подострой токсичности экстракта *A. asiatica*

Для обеспечения безопасности лекарственных средств очень важно изучить их токсичность в *in vitro* и *in vivo* исследованиях. Допуск к проведению неклинических исследований *in vivo* получили при помощи ЛЭК при КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова (выписка из протокола представлена в приложении Й). Изучение острой и подострой токсичности и алергизирующего действия фитосубстанции репешка азиатского проводили в НИИ имени Б. Атчабарова согласно с НД РК:

- Приказ № 142 «Об утверждении Правил проведения неклинических исследований, клинических исследований, клинико-лабораторных испытаний медицинских изделий для диагностики *in vitro*, а также требований к неклиническим и клиническим базам»;

- ГОСТ РК «Надлежащая лабораторная практика», № 392 Приказ «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик».

Условия содержания животных следующие:

- температура окружающей среды  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ;
- относительная влажность  $60 \pm 5\%$ .

Определение острой токсичности проводили на здоровых беспородных белых мышах с массой тела 18-25 г., (4 группы по 5 особей). Сумму фармакологического вещества за один прием находили с учетом единицы массы тела животных, в пересчете на активное вещество. Фитосубстанцию вводили однократно в дозах 500 мг/кг; 1000 мг/кг; 2000 мг/кг натошак, как представлено в таблице 38. Длительность контроля за животными при эксперименте составляет две недели.

Таблица 38 - Оценка острой токсичности спиртового экстракта репешка азиатского

Оценка острой токсичности	1-группа 500 мг/кг	2- группа 1000 мг/кг	3-группа 2000мг/кг	4-группа контрольная группа
		5	5	5
Выжило	5	5	5	5
Погибло	0	0	0	0

После введения экстракта, в течение 14 суток проводили мониторинг за обнаружением каких-либо признаков интоксикации, оценивали поведение и активность животных, потребление воды и пищи, самочувствие.

Оценку подострой токсичности провели на здоровых белых мышах массой тела 18-25 г (4 группы по 5 особей.) при введении в течение 21 дней натошак раствора экстракта, согласно таблице 39. Длительность мониторинга за животными при изучении подострой токсичности составила три недели.

Таблица 39 - Оценка подострой токсичности спиртового экстракта репешка азиатского

Оценка подострой токсичности	1-группа 500 мг/кг	2- группа 1000 мг/кг	3-группа 2000мг/кг	4-группа контрольная группа
		5	5	5
Выжило	5	5	5	5
Погибло	0	0	0	0

В течение трех недель вводили экстракт и наблюдали за появлением симптомов интоксикации. Проводили мониторинг за состоянием животных. При окончании наблюдения, животных вскрывали для морфологического изучения органов. Исследование морфологических признаков органов животных 1-группы показало следующие результаты:

**Почки.** При гистологическом исследовании отмечаются очаги слабо выраженного отёка интерстиция, явления белковой дистрофии эпителия канальцев с пикнотическими изменениями ядер части клеток, парез и слабо выраженное кровенаполнение сосудов, мелкофокусная лимфогистиоцитарная инфильтрация вокруг отдельных почечных телец и сосудов, в соответствии с рисунком 36.

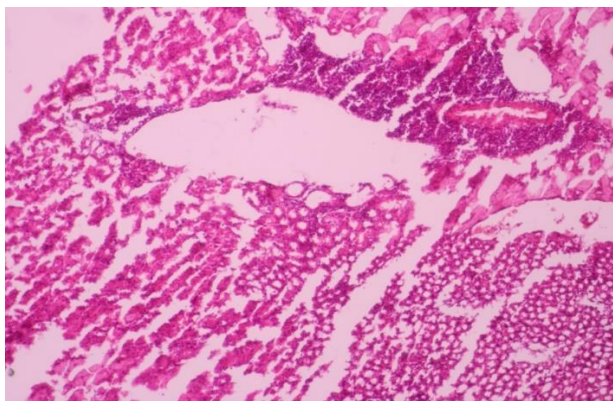


Рисунок 36 – Почка. Очаговый отек стенки x 150

**Желудок.** При гистологическом исследовании определяются мелкие фокусы десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы; неравномерное кровенаполнение сосудов, часть из которых в состоянии слабо и умеренно выраженного полнокровия с наличием единичных эритроцитарных стазов и сладжей, отдельные – в состоянии малокровия; в строме слизистой оболочки и подслизистой основе видна инфильтрация единичными лимфоцитами, в соответствии с рисунком 37.

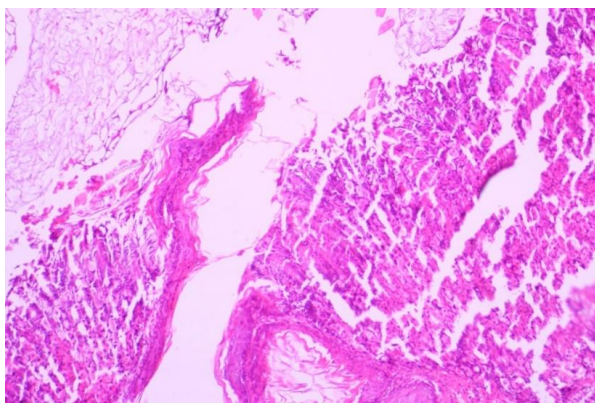


Рисунок 37– Желудок. Очаговый отек ткани x 150

**Кишечник.** При гистологическом исследовании визуализируются мелкие фокусы десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, очаги слабо выраженного отёка и инфильтрации единичными лимфоцитами подслизистой основы и стромы слизистой оболочки, в соответствии с рисунком 38.

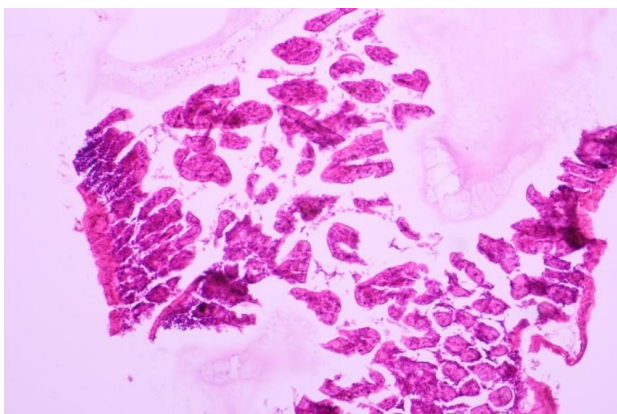


Рисунок 38 - Кишечник. Очаги слабо выраженного отёка x 150

**Печень.** При гистологическом исследовании отмечаются немногочисленные мелкие очаги слабо выраженного отёка интерстиция балочек, белковая дистрофия гепатоцитов; в цитоплазме отдельных гепатоцитов визуализируются мелкие оптически прозрачные вакуоли; явления пикнотических изменений ядер некоторых гепатоцитов; центральные вены и сосуды портальных трактов в состоянии неравномерно выраженного полнокровия, в некоторых из них видны эритроцитарные стазы и сладжи; в строме портальных трактов просматривается слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация, в соответствии с рисунком 39.

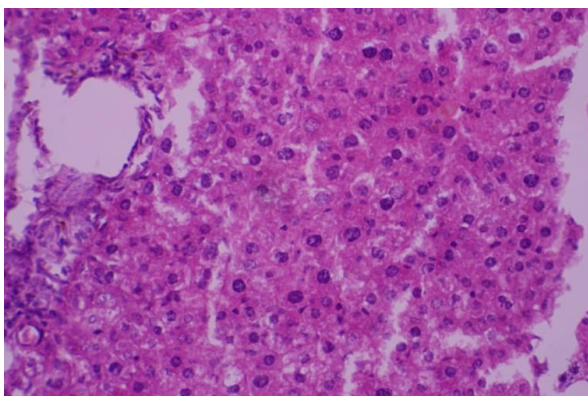


Рисунок 39 - Печень. Слабо выраженный отёк интерстиция балочек x 150

При морфологическом исследовании органов и тканей животных второй группы выявили следующие:

**Почки.** При гистологическом исследовании отмечаются явления белковой дистрофии нефротелия канальцев с пикнотическими изменениями ядер, в некоторых полях зрения встречаются фигуры рексиса и лизиса ядер нефротелия; очаги слабо и умеренно выраженного отёка интерстиция; неравномерное кровенаполнение сосудов – от слабо до умеренно выраженного, отдельные сосуды в состоянии малокровия; в строме встречаются мелкие фокусы лимфогистиоцитарной инфильтрации, в соответствии с рисунком 40.

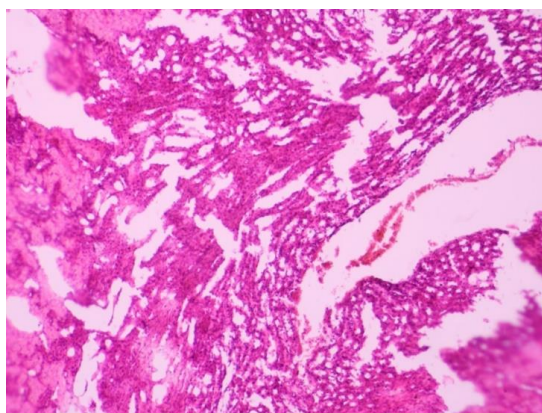


Рисунок 40 - Почки. Мелкие фокусы лимфогистиоцитарной инфильтрации

**Желудок.** При гистологическом исследовании отмечаются явления очаговой десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы; мелкие фокусы клеточной инфильтрации стромы слизистой оболочки и подслизистой основы, представленные лимфоцитами и гистиоцитами, в соответствии с рисунком 41.

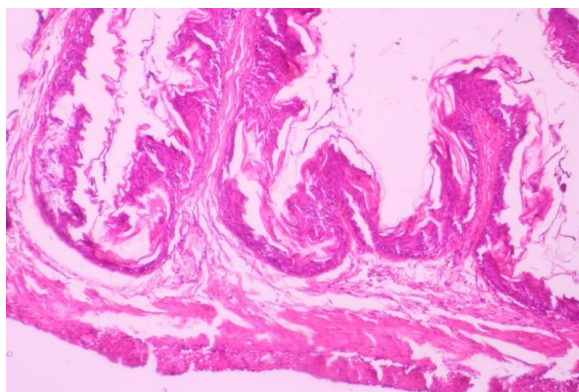


Рисунок 41 - Желудок. Очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы

**Кишечник.** При гистологическом исследовании отмечаются очаги десквамации покровного эпителия слизистой оболочки и слабо выраженный отёк подслизистой основы; мелкофокусная инфильтрация лимфоцитами и гистиоцитами стромы слизистой оболочки и подслизистой основы, в соответствии с рисунком 42.

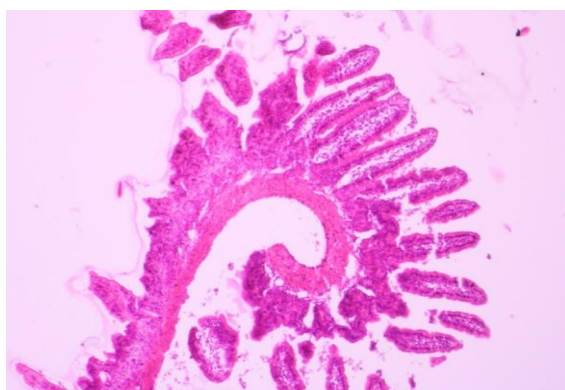


Рисунок 42 - Кишечник. Слабо выраженный отёк подслизистой основы

**Печень.** При гистологическом исследовании гепатоциты в состоянии белковой дистрофии, цитоплазма части гепатоцитов выглядит оптически полупустой и представлена бледно-эозинофильными хлопьевидными массами, в некоторых гепатоцитах просматриваются мелкие оптически прозрачные вакуоли, цитоплазма отдельных гепатоцитов замещена крупной оптически прозрачной вакуолью; просветы большинства центральных вен и сосудов портальных трактов в состоянии умеренно выраженного полнокровия с явлениями сладжирования эритроцитов, просветы отдельных сосудов выглядят запустевшими; в строме балочек между гепатоцитами и в строме портальных трактов определяется слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация, в соответствии с рисунком 43.

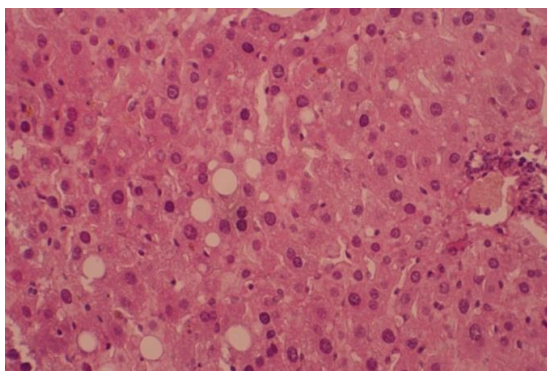


Рисунок 43 - Печень. Бледно-эозинофильные хлопьевидные массы

При морфологическом исследовании органов и тканей животных третьей группы выявили следующие:

**Почки.** При гистологическом исследовании отмечается белковая дистрофия эпителия канальцев, в цитоплазме отдельных эпителиоцитов видны оптически прозрачные вакуоли; ядра нефротелия в состоянии пикноза, рексиса и лизиса; отдельные клетки с явлениями цитолиза, ядра в них не визуализируются; в строме обнаруживается мелкофокусная лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью единичных лейкоцитов; большинство сосудов имеют неравномерно расширенные и запустевшие просветы, отдельные – в состоянии слабо выраженного кровенаполнения, в соответствии с рисунком 44.

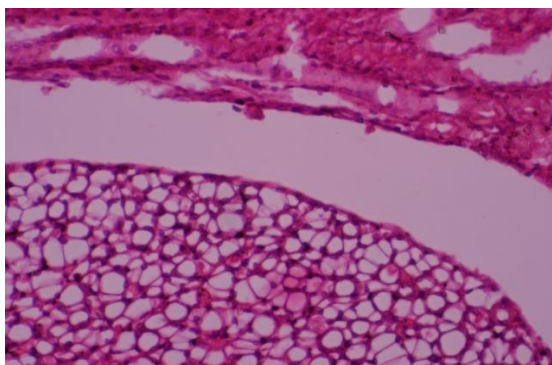


Рисунок 44 - Почки. Оптически прозрачные вакуоли

**Желудок.** При гистологическом исследовании определяются мелкие фокусы десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы; в строме слизистой оболочки и подслизистой основе видна мелкофокусная инфильтрация лимфоцитами; неравномерное полнокровие сосудов с явлениями эритроцитарных стазов и сладжей, в соответствии с рисунком 45.

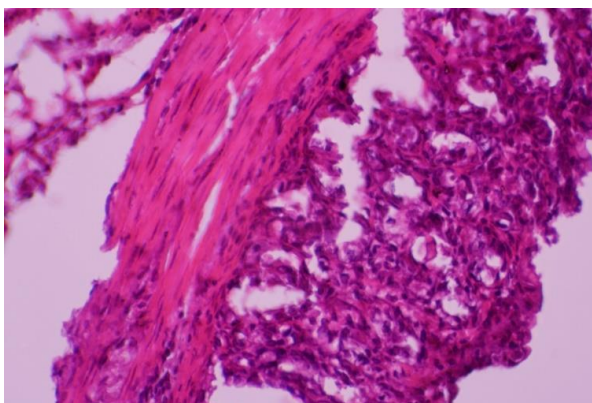


Рисунок 45 - Желудок. Очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы

**Кишечник.** При гистологическом исследовании отмечаются очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы с инфильтрацией их единичными лимфоцитами, мелкие фокусы десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, неравномерное полнокровие сосудов с наличием в отдельных сосудах эритроцитарных сладжей, в соответствии с рисунком 46.

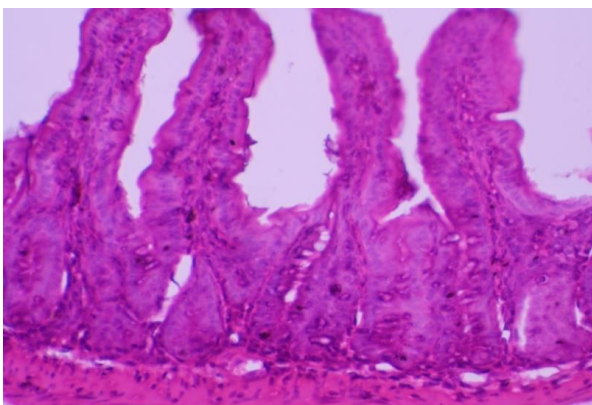


Рисунок 46 - Кишечник. Очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы

**Печень.** *Микропрепарат № 1* – При гистологическом исследовании отмечаются очаги дисконфлексации балочного строения, гепатоциты в состоянии белковой дистрофии, цитоплазма части гепатоцитов оптически просветлена, в цитоплазме некоторых гепатоцитов просматриваются оптически прозрачные вакуоли; просветы центральных вен и сосудов портальных трактов в состоянии выраженного полнокровия с обилием эритроцитарных сладжей; в строме балочек между гепатоцитами и в строме портальных трактов определяется слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация с примесью небольшого количества лейкоцитов; в отдельных полях зрения встречаются явления диапедеза эритроцитов, в соответствии с рисунком 47.

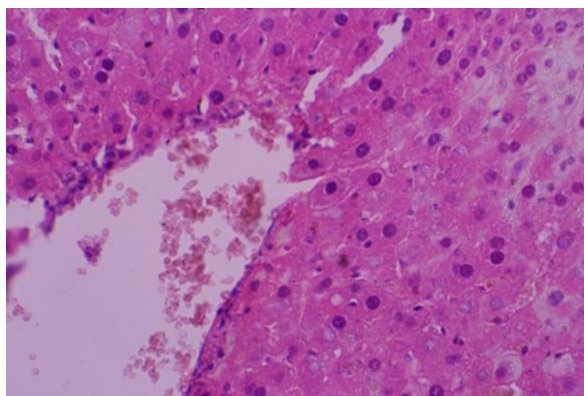


Рисунок 47 - Печень. Очаги дискомплексации балочного строения

При морфологическом исследовании органов и тканей животных контрольной группы выявили следующие:

**Почки.** При гистологическом исследовании отмечаются очаги слабо выраженного интерстициального отёка и малокровие сосудов, в соответствии с рисунком 48.

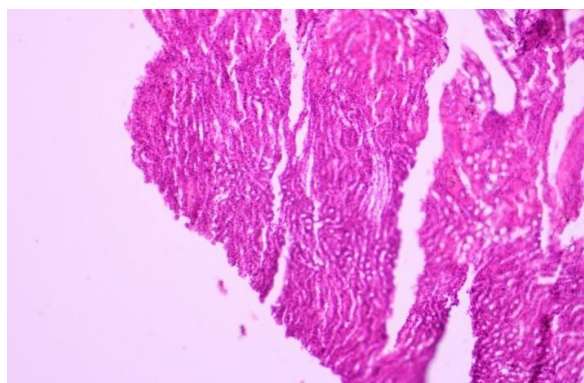


Рисунок 48 - Почки. Слабо выраженный интерстициальный отёк

**Желудок.** При гистологическом исследовании отмечаются очаги десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, очаговый слабо выраженный отёк подслизистой основы, в соответствии с рисунком 49.

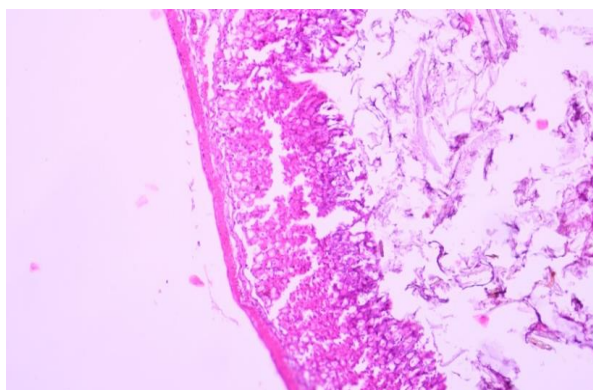


Рисунок 49 - Желудок. Очаговый слабо выраженный отёк подслизистой основы



**Печень.** При гистологическом исследовании отмечается очаговый слабо выраженный отёк интерстиция балочек, умеренное и неравномерно выраженное полнокровие центральных вен и сосудов портальных трактов, слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация стромы портальных трактов, в соответствии с рисунком 50.

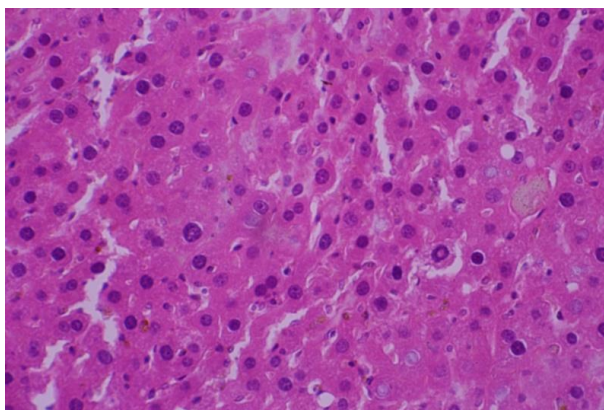


Рисунок 50 - Печень. Очаговый слабо выраженный отёк интерстиция балочек

**Кишечник.** Структура строения не нарушена в соответствии с рисунком 51.

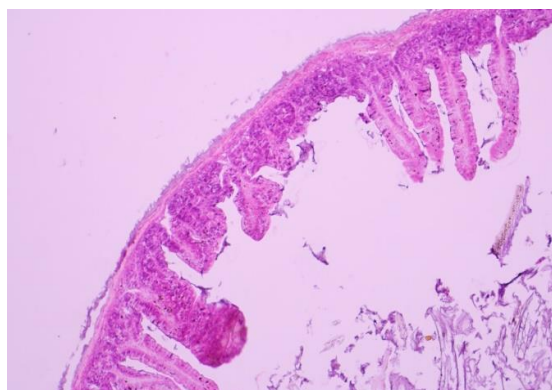


Рисунок 51 - Кишечник

В итоге при *per os* введении трех доз фитосубстанции для изучения острой и подострой токсичности полученные результаты морфологических и анатомических исследований органов и тканей животных доказывают, что препарат не обладает ядовитым действием. При гистологическом изучении видно, что органы и ткани сохранили свою типичную анатомическую структуру. По классификации токсичности по Hodge и Sterner (1943) данный экстракт можно отнести к классу 4, к малотоксичным веществам.

## 5.2 Изучение аллергизирующего действия экстракта *A. asiatica*

При изучении аллергизирующего действия фитосубстанции опыт проводили на беспородных морских свинках массой тела 250-300 г. Морские свинки предоставил виварий НИИ имени Атчабарова. Животные прошли карантин в течение 14 дней. В целях стандартизации перед исследованием животных не кормили в течение суток. Животные получали стандартную диету, представленную в виде набора натуральных кормов. Животные были разделены на 2 группы, по 10 особей. Морским свинкам вводили тестируемую фитосубстанцию в тах дозе (500 мг/мл). Сенсibiliзирующие свойства проверяли путем конъюнктивальной пробы. Методика проведения опыта: одну каплю водного раствора фитосубстанции капали в глаза пипеткой под верхнее веко и во второй глаз капали одну каплю очищенной воды. Спустя 15 мин, 24 ч, 48 ч оценивали реакцию. Для этого воспользовались следующими критериями:

- первая шкала (наблюдается незначительное покраснение слезного потока);
- вторая шкала (наблюдается покраснение склеры и слезного потока);
- третья шкала (наблюдается покраснение всей конъюнктивы, включая склеру).

Индикаторы состояния роговицы и радужной оболочки у сенсibiliзированных и у контрольных животных: при однократном применении тестируемой фитосубстанции не менялся нормальный первоначальный физиологический уровень. Во всех экспериментальных группах не наблюдались изменения в конъюнктиве, роговице, радужке, не было отмечено каких-либо изменений слизистой оболочки, за исключением того, что появилось легкое покраснение слезного потока, которое исчезло в течение 5 мин. Таким образом, можно сделать вывод о том, что сухой экстракт репешка азиатского относится к 1 шкале анафилоктогенной активности изучения аллергизирующего свойства.

Таким образом, при оценке острой токсичности экстракта после однократного введения растворенного экстракта в очищенной воде в организм мышей через зонд, проводили ежедневный контроль за появлением симптомов интоксикации в течение двух недель. В результате наблюдений координация движений, потребление воды и корма животными были нормальными.

При оценке подострой токсичности в течение 21 дней вводили экстракт и наблюдали за появлением симптомов интоксикации. В гистологических исследованиях отмечали тот факт, что в почках животных, принимавших экстракт в дозе 500 мг/кг, отмечаются очаги слабо выраженного отёка интерстиция, явления белковой дистрофии эпителия канальцев с пикнотическими изменениями ядер части клеток. В желудках животных, принимавших экстракт в дозе 500 мг/кг, отмечались очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы. В кишечниках животных, принимавших экстракт в дозе 500 мг/кг, отмечали очаги слабо выраженного отёка и инфильтрации единичными лимфоцитами подслизистой основы и стромы слизистой оболочки. В печени животных, принимавших экстракт в дозе 500 мг/кг, отмечали немногочисленные мелкие очаги слабо выраженного отёка интерстиция балочек, белковую дистрофию гепатоцитов.

В почках животных, принимавших экстракт в дозе 1000 мг/кг, отмечаются явления белковой дистрофии нефротелия канальцев с пикнотическими изменениями ядер, в некоторых полях зрения встречаются фигуры рексиса и лизиса ядер нефротелия. В желудках животных, принимавших экстракт в дозе 1000 мг/кг, отмечались явления очаговой десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы. В кишечниках животных, принимавших экстракт в дозе 1000 мг/кг, отмечали десквамацию покровного эпителия слизистой оболочки. В печени животных, принимавших экстракт в дозе 1000 мг/кг, отмечали гепатоциты в состоянии белковой дистрофии.

В почках животных, принимавших экстракт в дозе 2000 мг/кг, отмечаются ядра нефротелия в состоянии пикноза, рексиса и лизиса; отдельные клетки с явлениями цитолиза. В желудках животных, принимавших экстракт в дозе 2000 мг/кг, отмечались очаги слабо выраженного отёка подслизистой основы. В кишечниках животных, принимавших экстракт в дозе 2000 мг/кг, отмечали слабо выраженный отёк подслизистой основы с инфильтрацией ее единичными лимфоцитами. В печени животных, принимавших экстракт в дозе 2000 мг/кг, отмечали явления диапедеза эритроцитов.

В контрольной группе животных в почках отмечаются очаги слабо выраженного интерстициального отёка и малокровие сосудов. В желудках отмечаются очаги десквамации покровного эпителия слизистой оболочки, очаговый слабо выраженный отёк подслизистой основы. В печени отмечается очаговый слабо выраженный отёк интерстиция балочек. Структура строения кишечника не нарушена.

Результаты аллергизирующего действия сухого экстракта оцениваются как слабовыраженные (1 шкала). Можно считать, что экстракт не оказывает сильного аллергического действия на слизистые оболочки.

## **6. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТАБЛЕТОК С ЭКСТРАКТОМ ТРАВЫ *A. ASIATICA***

### **6.1 Анализ рынка таблеток для рассасывания при заболеваниях горла**

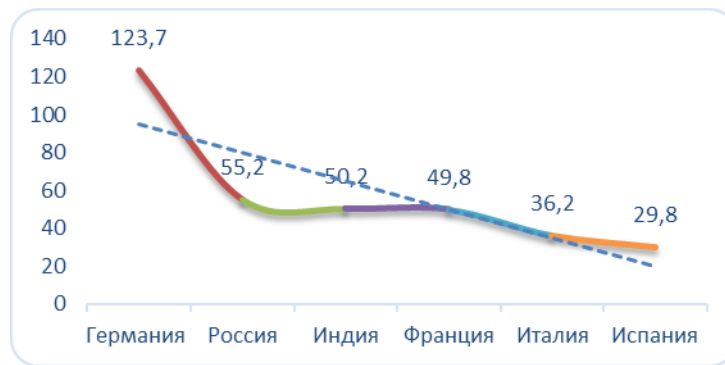
Имея более чем вековую историю, фармацевтическая индустрия РК представлена в наибольшем количестве дженериками и традиционными дешевыми медикаментами, которые во многом направлены на внутренний рынок. Основным импульсом росту отечественного фармацевтического производства в этот период придал высокий рост спроса внутреннего рынка. По объемам продаж в Казахстане в ТОП-5 входят медикаменты, применяемые при лечении органов пищеварения и нарушений метаболизма (1), противомикробные средства (2), препараты для лечения заболеваний дыхательной (3), сердечно-сосудистой системы (4) и половые гормоны (5) [86].

На сегодня, фармацевтический рынок Казахстана входит в число наиболее развитых в Союзе. Но несмотря на внушительную динамику роста за последние два года, вклад фармацевтической промышленности в ВВП страны остается достаточно низким в связи со слабой рыночной базой.

В мировом масштабе производство лекарств в Казахстане все еще развивается медленно. Кроме того, казахстанская фармацевтическая промышленность значительно уступает в валовой доходности зарубежным компаниям, которые занимают доминирующее положение на рынке из-за низких технологических и производственных возможностей местных производителей. Доля иностранной продукции, продающаяся на розничном рынке, составляет около 70%. Производство фармацевтической продукции в 2018 г. составило 228,6 млн. долл., что выше показателей предыдущего года на 1,6% [87].

Лекарственные препараты в Казахстан привозят из шестидесяти четырех стран. Импорт медикаментов из европейских стран, по результатам за 9 месяцев, составляет \$427,3 млн. Доля импорта медикаментов из стран Азии составляет 14% (\$83,8 млн), доля стран СНГ составляет 13% (\$83,8 млн).

Основными экспортерами ЛП в Казахстан считаются 6 стран: Германия, Россия, Индия, Франция, Испания и Италия. Процентная доля этих стран составляет 44% всего импорта в соответствии с данными, указанными в диаграмме 3. Абсолютное лидерство по поставке ЛП занимает РФ, что можно понять по итогам 9 месяцев 2019 г. Импорт ЛП составил 6,7 тысячи тонн ЛП [88].



Источник: аналитика сайта [www.pharm.reviews](http://www.pharm.reviews)

Диаграмма 3 - Импортёры ЛС в январе-сентябре 2019 года (в млн долларов, по данным КС РК)

Боль в горле сопровождается огромным количеством болезней, при этом больные всегда прибегают к самолечению. Надо учитывать тот факт, что подбор медикаментов для лечения заболеваний, сопровождающихся болью в горле, имеет большое значение, потому что неправильное лечение всегда приводит к ухудшению здоровья [89].

Кашель является распространенным, постоянным симптомом многих острых и хронических заболеваний. Его разрушительные последствия заставляют многих пациентов обращаться к своим врачам и поддерживают многомиллионную индустрию безрецептурных лекарств [90]. Острые симптомы кашля обычно возникают в результате инфекции (инфекции верхних дыхательных путей (ОРВИ) или простуды), а также воздействия дыма и/или аллергенов в окружающей среде. Хотя большинство людей хотя бы раз в жизни испытывают кашель, его частота связана с такими факторами, как пол и чувствительность к аллергенам [91-92]. Нет никаких доказательств того, что какой-либо классический муколитик, включая N-ацетилцистеин (NAC), облегчает симптомы пациентов, помогая им отхаркивать слизь [93]. Испытания лекарств, отпускаемых без рецепта, таких, как сиропы от кашля и средства от кашля, также не выявили последовательных, объективных преимуществ [94]. Травяные лекарства являются частью широкого спектра методов лечения, таких, как фитотерапия, гидротерапия и традиционная китайская медицина (ТСМ), немногие из которых применяются в традиционной медицине. В то время как лечение травами имеет длительную историю применения в различных культурах, данные рандомизированного контролируемого исследования (РКИ) об их эффектах обычно отсутствуют [95-96]. Доказанную клиническую эффективность имеют препараты на основе плюща, примулы, тимьяна, которые рекомендуются в качестве отхаркивающих средств [97].

Изучение биологической активности флавоноидов *Origanum*, *Viola tricolor*, *Pelargonium* показывают, что для них характерно также противоаллергическое, противовоспалительное, противовирусное, цитопротекторное и антиоксидантное действия. Способность флавоноидов к образованию хелатных

комплексов с солями железа, может лежать в основе их антиоксидантной активности. Известно, что противовоспалительный эффект проявляется остановкой образования простагландинов и лейкотриенов. Подбор известных фитопрепаратов с противокашлевым эффектом представлен в таблице 40:

Таблица 40 - Лекарственные растения, применяющиеся в комплексной терапии кашля различного генеза

№	Виды воздействия	Фитопрепараты и ЛР
1	Иммуностимулирующее	Сок <i>Kalanchoe</i> , сок <i>Aloe</i> , сок <i>Plantago</i> , настойка <i>Aralia</i> , настойка <i>Echinacea</i> , экстракт <i>Rhodiola</i>
2	Восстанавливающие	Эфирные масла для ингаляций из <i>Mentha</i> , <i>Lavandula</i> , <i>Anisum</i> , <i>Coriandrum</i> , <i>Melaleuca</i> , <i>Abies</i>
3	Активирующие процесс фагоцитоза	Водные настои <i>Urtica</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Pulmonaria</i> , <i>Saintpaulia</i> , <i>Cetraria islandica</i> , <i>Polygonum</i>
4	Оказывающие бактерицидные воздействия	Почки <i>Betula</i> , <i>Populus</i> , <i>Pinus</i> , трава <i>Ledum palustre</i> , листья <i>Plantago</i> , <i>Salvia</i> , корни <i>Inula</i> , <i>Ziziphus</i> , <i>Hyssopus</i> , <i>Alpinia</i> , <i>Capsicum</i>
5	Оказывающие муколитические воздействия	Настой листьев <i>Ledum</i> , глауцин из <i>Glaucium flavum</i> , <i>Ipecacuanha</i> , <i>Glycyrrhizae</i> , <i>Salvia</i> , <i>Millefolium</i> , <i>Saintpaulia</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Mentha</i> , <i>Thymus</i> , <i>Melissa</i> , <i>Althaea</i> , <i>Adhatoda vasica</i>
6	Противовоспалительное	Препараты <i>Pinus</i> , <i>Hypericum</i> , <i>Calendula</i> , <i>Chamomilla</i> , <i>Tussilago</i> , <i>Salvia</i> , <i>Sainpaulia</i>

Противокашлевые средства афферентного действия, такие, как обволакивающие средства, оказывают периферическое воздействие и рекомендуются при раздражении слизистой оболочки верхних отделов дыхательного тракта. К осмотически активным медикаментам можно отнести отхаркивающие растения (*Glycyrrhizae*, *Althaea*, *Plantago* и др.) [98].

Лечебный эффект таблеток для рассасывания проявляется за счет впитывания слизистыми оболочками ЛВ и их кумуляции в мягких тканях. В местах накопления ЛВ создается высокая концентрация активного вещества, которая оказывает действие в течении длительного времени. Кроме снятия признаков болезни, таблетки могут тормозить развитие воспалительного процесса [99]. Анализ ассортимента и состава таблеток, а также пастилок для рассасывания проведен на основе Государственного реестра РК и России, также информационных источников «Интернета» [Государственный реестр ЛС МЗ РК] дает возможность создать таблицу, включающую список таблеток для рассасывания, представленный в таблице 41. В списке имеется девятнадцать торговых наименований медикаментов. Только три препарата отечественного производства: Ангисепт, в состав которого входит настойка прополиса и аскорбиновая кислота, оказывает антисептическое действие; Ларингал, в состав которого входит флурбипрофен - местное обезболивающее; пастилки Анзибел в состав которых входят хлоргексидин, бензокаин и эноксолон.

Таблица 41 - Таблетки и пастилки для рассасывания против боли в горле, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории РК и России

№	Торговое название	Производитель и страна производителя	Активные ингредиенты	Регистрация в стране		АТХ
				Казахстан	Россия	
1	2	3	4	5	6	7
1	Доктор Мом® растительные пастилки от кашля	Юник Фармасьютикал Лабораториз (отделение фирмы "Дж.Б.Кемикалс энд Фармасьютикалс Лтд."), Индия	Сухие экстракты, выделенные из корней солодки голой, корневищ имбиря лекарственного, плодов эмблики лекарственной и левоментол	Перерегистрация	+	R05
2	Стрепсилс®	Рекитт Бенкизер Хелскэр Интернешнл Лимитед, Великобритания	Амилметакрезол + Дихлорбензиловый спирт	+	+	R02AA20
3	Трависил™	Плетхико Фармасьютикалз ЛТД, Индия	Листья адатода васики, плоды перца длинного, плоды перца черного, корневища зингибера лекарственного, корни солодки голой, плоды эмблики лекарственной, корневища куркумы длинной, кора акации катеху, меиена фенхеля обыкновенного, трава базилика, плоды терминалии хебулы, плоды терминалии белерики, корневища калгана большого, листья абруса молитвенного, ментол	Перерегистрация	+	R05FB02
4	Граммидин® нео	Валента Фарма, Россия	Грамицидин С+Цетилпиридиния хлорид	Перерегистрация	+	R02A
5	Гексорал® Табс Классик	Uinic Pharmaceutical Laboratories, Индия	Амилметакрезол+Дихлорбензиловый спирт+Лидокаин	Перерегистрация	+	R02AA20

Продолжение таблицы 41

1	2	3	4	5	6	7
6	Фарингосепт	С.К. ТЕРАПИЯ С.А., Румыния	Амбазон	+	+	R02AA01
7	Лизобакт®	Босналек АО, Босния и Герцеговина	Лизоцим+пиридоксин	+	+	R02AA20
8	Линкас Лор	Хербион Пакистан (Пвт) Лтд, Пакистан	Солодки голой корней экстракт, Альпинии Галанги корневищ экстракт, Иссопа лекарственного экстракт, Фиалки душистой экстракт, Адатоды сосудистой листьев экстракт, Перца длинного плодов и корней экстракт	Перерегистр ация	+	R05CA10
9	Септолете® тотал	КРКА, д.д., Ново место, Словения	Бензидамин+Цетилпиридиния хлорид	+	+	R02AA20
10	Ренгалин	Материа Медика Холдинг НПФ, Россия	Антитела к брадикинину аффинно очищенные+ антитела к гистамину аффинно очищенные+	+	+	R05DB
11	Доктор Тайсс Анги Септ	Др. Тайсс Натурварен ГмбХ, Германия	Рацементол+ Мята перечной листьев масло+ Дихлорбензиловый спирт+анетол	Перерегистр ация	+	R02AA20
12	Аджисепт® пастил ки для рассасывания	Аджио Фармацевтикалз Лимитед, Индия	Амилметакрезол+ Дихлорбензиловый спирт	Перерегистр ация	+	R02AA20
13	Ангисепт®	ТОО "ПЛП "ЖАНАФАРМ", Казахстан	Настойка прополиса + кислота аскорбиновая	Перерегистр ация	-	R02AA20
14	Декатилен™	Асино Фарма АГ, Швейцария	Деквалиния хлорид	Перерегистр ация	-	R02AA20
15	Нео-ангин®	Дивафарма ГмбХ, Германия	Амилметакрезола, левоментола, дихлорбензилового спирта	Перерегистр ация	+	R02AA20
16	Фарингомед	Материа Медика Холдинг НПФ, Россия	Phytolacca americana (Phytolacca) C24, Atropa belladonna (Belladonna) C30, Hepar sulfuris C12, Acidum silicicum (Silicea) C12	+	+	R02A



Продолжение таблицы 41

1	2	3	4	5	6	7
17	Ларингал®	ВИВА ФАРМ, Казахстан	Флурбипрофен	+	-	R02AX01
18	АНЗИБЕЛ® пастилки для рассасывания	Нобел Илач Санаи ве Тиджарет А.Ш, Турция	Хлоргексидин+бензокаин+эноксолон	+	-	R02AA
	АНЗИБЕЛ® пастилки для рассасывания	Нобел Алматинская Фармацевтическая Фабрика, Казахстан	Хлоргексидин+бензокаин+эноксолон	Перерегистрация	-	R02AA20
19	Имудон®	Фармстандарт- Томскхимфарм, Россия	Лизаты микроорганизмов [Candida albicans+Corynebacterium pseudodiphtheriticum+Enterococcus faecalis+Enterococcus faecium+Fusobacterium nucleatum subsp] (Microbial lysates [Candida albicans+Corynebacterium pseudodiphtheriticum+Enterococcus faecalis+Enterococcus faecium+Fusobacterium nucleatum+Klebsiella])	Перерегистрация	+	A01AB11

## 6.2 Разработка состава и технологии получения таблеток с экстрактом *A. asiatica*

В соответствии с физико-химическими и фармако-технологическими свойствами сухого экстракта травы репешка азиатского, для получения таблеток нами был выбран метод прямого прессования. Критерием выбора связывающих веществ стало обеспечение высокой продолжительности рассасывания таблеток в ротовой полости и оптимального проявления терапевтического эффекта ЛВ. В связи с этим мы подобрали в качестве связывающего Коллидон VA 64. Исследовали три вида наполнителя, чтобы выбрать наиболее подходящий для прямого прессования (Таблица 42).

Таблица 42 - Технологические свойства наполнителей

Наполнитель	Фракционный состав %					Насыпная плотность (г/см <sup>3</sup> )	Сыпучесть (г/с)	Прессуемость (Н)
	>1,0 мм	1,0-0,5 мм	0,5-0,25 мм	0,25-0,1 мм	<0,1 мм			
Сорбитол	15	95	0,6	0,7	0,4	0,65±0,2	9,2±1,2	77±6,0
МКЦ 102	6,2	57	23	2,0	40	0,65±0,25	5,5±0,25	100,4±0,5
Лактоза моногидрат	0,5	17,8	60	6,7	10	0,67±0,25	5,58±0,5	100,2±0,5

Значения показателей, приемлемые для прямого прессования, должны соответствовать следующим требованиям [100]:

1. фракции с размером частиц 0,5-2 мм – более 60%;
2. фракции с размером частиц до 0,2 мм – менее 20%;
3. насыпная плотность – 0,6-0,7 г/см<sup>3</sup>;
4. сыпучесть – 6-10 г/с;
5. прессуемость – 70-100 Н.

Вышеуказанным требованиям сорбитол полностью соответствует, таким образом, мы выбрали сорбитол в качестве наполнителя.

На основе активной субстанции было сформировано 5 образцов состава таблеток. В качестве скользящего и антифрикционного вещества были использованы аэросил и кальция стеарат (таблица 43).

Таблица 43 - Состав моделей таблеток с экстрактом репешка азиатского

Названия ингредиентов	Состав, мг				
	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	6
Экстракт травы репешка азиатского сухой	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0
Сорбитол	-	-	1041	1050	-
Маннитол	1041,5	1045	-	-	1045
Коллидон AV64	62,0	60,0	60,0	56,5	50,0
Аэросил	2,4	-	2,4	-	3,8
Тальк	-	2,8	-	2,4	-
Сукралоза	2,4	2,4	2,4	2,4	3,0

Продолжение таблицы 43

1	2	3	4	5	6
Краситель ЖОЖ	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Ароматизатор «Апельсин»	7,0	2,0	6,0	5,5	10,0
Кальция стеарат	8,5	11,6	12,0	7,0	12,0
Всего	1200	1200	1200	1200	1200

Из числа представленных моделей, в качестве самой оптимальной была выбрана третья модель, так как межпродукты по параметрам фармако-технологического описания, удовлетворяют необходимому качеству для высвобождения активных ингредиентов. Функциональное назначение вспомогательных веществ представлено в таблице 44.

Таблица 44 - Функциональное назначение вспомогательных веществ

Наименование вспомогательных веществ	НД регламентирующее качество	Содержание в таблетке	Функциональное назначение
Сорбитол	ГФ РК, ЕФ	Не регламентируется	Наполнитель
Коллидон VA 64	ГФ РК, ЕФ	Не регламентируется	Связывающее вещество
Аэросил	ГФ РК, ЕФ	не более 10 %	Глидант
Сукролоза	ГФ РК, ЕФ	Не регламентируется	Подсластитель
Краситель ЖОЖ	ГФ РК, ЕФ	Не регламентируется	Корригент
Ароматизатор «Апельсин»	ГФ РК, ЕФ	Не регламентируется	Корригент
Кальция стеарат	ГФ РК, ЕФ	не более 1%	Антифрикционное вещество

Результаты технологических параметров приготовленной массы представлены в таблице 45.

Таблица 45 - Результаты технологических параметров приготовленной массы

Технологические параметры	Проба №1	Проба №2	Проба №3
Насыпная плотность, г/мл			
$P_0$	0,6	0,65	0,67
$P_{10}$	0,57	0,60	0,59
$P_{500}$	0,52	0,50	0,55
$P_{1250}$	0,52	0,52	0,53
Сыпучесть, г/сек			
Ø 25 мм	100/6	100/7	100/6
Ø 15 мм	100/13	100/13	100/12
Ø 10 мм	100/18	100/17	100/18
Уголь естественного откоса			
$\lambda$	28°	28°	28°

Таблица 46 - Результаты фармако-технологических параметров полученных таблеток-ядер

Фармако-технологические параметры	Проба №1	Проба №2	Проба №3	Проба №4	Проба №5
1	2	3	4	5	6
Усилие прессования	20-25 кН	20-25 кН	20-25 кН	20-25 кН	20-25 кН
Описание по спецификации	Соответс.	Соответс.	Соответс.	Соответс.	Соответс.
Прочность, Н	250	250	250	250	250
	230	230	230	230	230
	260	260	260	260	260
	260	260	260	260	260
	250	250	250	250	250
	240	240	240	240	240
	255	255	255	255	255
	250	250	250	250	250
	255	255	255	255	255
250	250	250	250	250	
Распадаемость, мин	12	13	12	12	11
Истираемость, %	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Высота, мм	4,90	4,90	4,89	4,90	4,90

Технология получения таблеток без оболочки состоит из следующих технологических стадий: подготовка сырья и материалов, смешивание эксципиентов, опудривание, таблетирование, обеспыливание, упаковка готовых таблеток.

Полученные таблетки круглые с вдавленной частью по центру с обеих сторон, бледно-желтого цвета с оттенками экстракта и с запахом апельсина. Блок-схема получения таблетки «Агримол» представлена на рисунке 52.



Рисунок 52 – Блок-схема производства таблеток «Агримол»

Для производства таблеток, в технологических емкостях взвешивают на весах субстанции: репешка азиатского сухой экстракт, сорбитол, коллидон AV64, аэросил, сукралоза, краситель ЖОЖ, ароматизатор «Апельсин» и кальция стеарат. Взвешенные материалы, за исключением стеарата кальция, просеивают через сито в технологическую емкость. Полученную смесь из просеянных компонентов взвешивают. Стеарат кальция просеивают в отдельную емкость, взвешивают. Сухой экстракт репешка азиатского, сорбитол, коллидон AV64, аэросил, сукралоза, краситель ЖОЖ, ароматизатор «Апельсин» смешивают в течение 20 мин на оборудовании и добавляют опудривающее вещество (кальция стеарат). Смешивают в течение 5 мин при скорости 36 об/мин. Из полученной таблеточной массы отбирают пробу для контроля качества промежуточного продукта, взвешивают массу, определяют процент потерь, маркируют емкость.

Таблеточной массе присваивается статус «Карантин» до получения разрешения ОКК на таблетирование. Готовую таблеточную массу таблетуют на таблетпрессе, установив необходимый пресс инструмент. Таблеточную массу загружают в бункер таблеточного пресса. Регулируют глубину заполнения матриц пресс инструмента массой для таблетирования, давление предварительного и основного прессования таблеток, скорость питателя и ротора таблетпресса. В процессе работы периодически проводится внутриоперационный контроль качества таблеток. Обеспыливатель устанавливается таким образом, чтобы таблетки из выходного желоба таблеточной машины попадали во входное отверстие обеспыливателя и оттуда в подающий вибротранспортер. Пылеотделитель удаляет пыль с таблеток, которая собирается в пылесборнике. Обеспыленные таблетки далее проходят контроль металлических включений с помощью металлодетектора. Готовые таблетки собирают в сборники. Отбирают пробу для контроля качества промежуточного продукта, взвешивают, определяют процент потерь. Каждый сборник маркируют. Полученным таблеткам присваивают статус «Карантин» до получения разрешения ОКК на проведение дальнейшей стадии технологического процесса. Фасовка таблеток в блистеры осуществляется с помощью блистерного автомата. По 10 таблеток фасуют в блистер из пленки поливинилхлоридной прозрачной и алюминиевой фольги. Перед началом фасовки таблеток получают несколько пустых блистеров, проверяют их качество и герметичность.

Если полученные блистеры имеют надлежащее качество, то включают линию фасовки. Упаковка блистеров в картонную коробку производится вручную или с использованием картонажной машины.

Перед началом работы проверяют, чтобы серия и срок годности на контурных ячейковых упаковках соответствовала номеру серии и сроку годности, которые нанесены на картонную коробку и групповую этикетку.

Производят осмотр блистеров с таблетками на целостность упаковки, наличие таблеток в упаковках, чёткую кодировку, печатный текст. Печатная и тисненая маркировка должна быть четкой, понятной и нанесена несмываемой краской. Один блистер с маркировкой оборачивают инструкцией по применению и вкладывают в картонную коробку.

При упаковке следят за качеством коробок, правильным заполнением блистерами и инструкциями по применению. Полученная упаковка не должна иметь внешних дефектов. Номер серии, дата производства и срок годности на картонной коробке должны быть нанесены четко, и соответствовать номеру серии и сроку годности на контурных ячейковых упаковках. Качество упаковки контролируется визуально. Получение таблетки для рассасывания «Агримол» было внедрено в виде акта внедрения в производства ВИВА ФАРМ (Приложения Й).

### 6.3 Стандартизация таблеток с экстрактом *A. asiatica* в соответствии с требованиями ГФ РК

Оценку спецификации качества таблеток «Агримол» проводили в соответствии с требованиями ГФ РК и определили описание, среднюю массу и однородность массы, распадаемость, микробиологическую чистоту, упаковку и транспортировку. Данные по спецификации качества таблетки Агримол представлены в таблице 47.

Таблица 47. - Спецификация качества таблетки Агримол

Показатели качества	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Круглые таблетки с вдавленной частью по центру с обеих сторон бледно-желтого цвета с оттенками экстракта и с запахом апельсина	ГФ РК 1 т, 1.1 статья «Таблетки»
Идентификация	с 1% раствором ванилина в концентрированной HCl должен образовывать красно-малиновое окрашивание	В соответствии со спецификацией качества
Средняя масса и однородность массы	Средняя масса составляет 1205 мг. Отклонение в массе допускается - у 90% таблеток не более $\pm 5,0\%$ ; - у 10% таблеток не более $\pm 10\%$ .	ГФ РК, 1т, 2.9.5
Аэросил	Не должен превышать 10% от массы таблетки	ГФ РК, т. 1, Приложение 1
Истираемость	Не более 1 %	ГФ РК т. 1, 2.9.7
Растворение	Не менее 75% за 45 мин в воде	ГФ РК, т. 1, 2.9.1
Распадаемость	Не более 15 мин	ГФ РК, т.1, 2.9.1
Микробиологическая чистота	Препарат должен отвечать критериям, приведенным в ГФ РК т. 1, 5.1.4, категории 3 А	ГФ РК, т.1, 2.6.12
Количественное определение	ВЭЖХ, катехин не менее 0.136%	ВЭЖХ ГФ РК т.1, 2.2.29
Упаковка	Безъячейковая контурная упаковка	В соответствии со спецификацией качества
Маркировка	Смотрите утв.макет упаковки	В соответствии со спецификацией качества
Транспортирование	Согласно с МЕСТ 17768-90	МЕСТ 17768-90
Хранение	При температуре не выше 25 <sup>0</sup> С, в месте, защищенном от попадания солнечного света	В соответствии со спецификацией качества
Срок хранения	Условно 2 года	В соответствии со спецификацией качества
Основное фармакологическое действие	Противовоспалительное	В соответствии со спецификацией качества

Описание. Круглые таблетки с вдавленной частью по центру с обеих сторон, бледно-желтого цвета с оттенками экстракта и запахом апельсина. ГФ РК 1 т, 1.1 статья «Таблетки».

Идентификация. В результате реакции с 1% раствором ванилина, в концентрированной соляной кислоте должно появиться красно-малиновое окрашивание (катехины).

Испытания. Средняя масса и однородность массы. (2.9.40). В соответствии с требованиями.

Содержание аэросила не более 10 % от массы таблетки.

Распадаемость. В течение 12 мин все таблетки должны распасться. ГФ РК, 1т, 2.9.1

Микробиологическая чистота (5.1.4). В соответствии с требованиями.

Количественное определение. Определение проводят методом ВЭЖХ. ГФ РК т.1, 2.2.29. Хроматографирование проводили HPLC Agilent 1200 series (Agilent, Германия), оснащенном четырехканальным градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и диодно-матричным детектором. Разделение проводили на колонке Agilent Zorbax SB-C18 4,6x150 мм, диаметр частиц 3,5 мкм, при скорости 1 мл/мин. Время анализа составляло 60 мин. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрила и 0,5 % (об.) водного раствора ортофосфорной кислоты. Температуру колонки поддерживали постоянной на уровне 30°C. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 350±8 нм. В результате анализа, в образце таблетки была идентифицирована катехин 0.136%, в соответствии с рисунком 53.

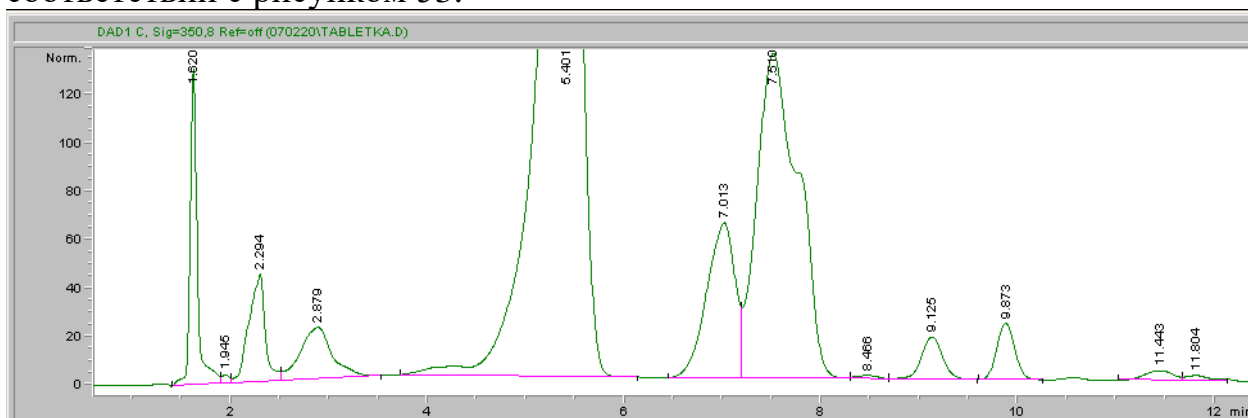


Рисунок 53 - Хроматограмма таблетки при 350 нм

Упаковка: безычейковая контурная упаковка.

Хранение: при температуре не превышающей 25°C.

Срок годности: условно 2 года.

Основное фармакологическое действие: противовоспалительное.

#### 6.4 Изучения стабильности таблеток с экстрактом *A. asiatica*

Стабильность таблеток с условным названием Агримол изучали на трех лабораторных сериях. Лабораторные серии были получены в ТОО «ВИВА



ФАРМ», город Алматы, РК. В ходе эксперимента использовали долгосрочное испытание параметров качества. Для стандартизации препарата использовали фармакопейные методы.

Условия изучения стабильности: температура  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , нормальная влажность  $60\pm 5\%$ , испытания таблеток проводятся в упаковке, применяемой для хранения и реализации лекарственного средства. Исследуемые серии таблеток представлены в таблице 48.

Таблица 48 – Характеристика лабораторной серии «Агримол»

№	Размер (шт)	Дата производства	Регламент исследования/месяц
01AG0620	386	Январь 2020	0,3,6,9,12,18,24
02AG0620	386	Январь 2020	0,3,6,9,12,18,24
03AG0620	386	Январь 2020	0,3,6,9,12,18,24

В таблицах 49 - 51 представлены полученные результаты изучения стабильности таблеток. В процессе установления стабильности препарата проводим изучение по основным индикаторам качества, описанным в спецификации качества.

В промежутке девяти месяцев хранения в предложенных условиях фитопрепарат, сохраняет постоянство состава. В данный момент исследования стабильности продолжаются.

Таблица 49 - Результаты испытаний стабильности таблеток «Агримол», серия 1

Т: 25±2°C RH: 60±5% Дата начала испытания: 01.2020 Дата окончания испытания: 01.2022								
Показатели	Нормы	Контрольные периоды, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
Описание	Круглые таблетки с вдавленной частью по центру с обеих сторон, бледно-желтого цвета с оттенками экстракта и с запахом апельсина	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Исследования стабильности и установление сроков хранения продолжается		
Средняя масса	Средняя масса составляет 1205 мг. Отклонение в массе допускается - у 90% таблеток не более ±5,0%; - у 10% таблеток не более ±10%.	1200	1210	1205	1207			
Распадаемость	Не более 15 мин	12	13	12	13			
Растворение	Не менее 75% за 45 мин в воде	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			
Истираемость	Не более 1%	0,35	0,15	0,25	0,15			
Количественное содержание катехина	Не менее 0,136%	0,135%	0,136%	0,136%	0,136%			
Прочность, Н	Не менее 250Н	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			
Микробиологическая чистота	Препарат должен отвечать критериям, приведенным в ГФ РК т. 1, 5.1.4, категории 3 А	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			

Таблица 50 - Результаты испытаний стабильности таблеток «Агримол», серия 2

Т: 25±2 <sup>0</sup> С RH: 60±5% Дата начала испытания: 01.2020 Дата окончания испытания: 01.2022								
Показатели	Нормы	Контрольные периоды, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
Описание	Круглые таблетки с вдавленной частью по центру с обеих сторон, бледно-желтого цвета с оттенками экстракта и с запахом апельсина	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Исследования стабильности и установление сроков хранения продолжается		
Средняя масса	Средняя масса составляет 1205 мг. Отклонение в массе допускается - у 90% таблеток не более ±5,0%; - у 10% таблеток не более ±10%.	1155	1209	1220	1210			
Распадаемость	Не более 15 мин	13	12	12	13			
Растворение	Не менее 75% за 45 мин в воде	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			
Истираемость	Не более 1%	0,25	0,15	0,15	0,15			
Количественное содержание катехина	Не менее 0,136%	0,135%	0,136%	0,136%	0,136%			
Прочность, Н	Не менее 250Н	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			
Микробиологическая чистота	Препарат должен отвечать критериям, приведенным в ГФ РК т. 1, 5.1.4, категории 3 А	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			

Таблица 51 - Результаты испытаний стабильности таблеток «Агримол», серия 3

Т: 25±2 <sup>0</sup> С RH: 60±5% Дата начала испытания: 01.2020 Дата окончания испытания: 01.2022								
Показатели	Нормы	Контрольные периоды, мес.						
		0	3	6	9	12	18	24
Описание	Круглые таблетки с вдавленной частью по центру с обеих сторон, бледно-желтого цвета с оттенками экстракта и с запахом апельсина	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.	Исследования стабильности и установление сроков хранения продолжается		
Средняя масса	Средняя масса составляет 1205 мг. Отклонение в массе допускается - у 90% таблеток не более ±5,0%; - у 10% таблеток не более ±10%.	1205	1217	1210	1210			
Распадаемость	Не более 15 мин	12	11	13	13			
Растворение	Не менее 75% за 45 мин в воде	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			
Истираемость	Не более 1%	0,15	0,15	0,15	0,15			
Количественное содержание катехина	Не менее 0,136%	0,135%	0,136%	0,136%	0,136%			
Прочность, Н	Не менее 250Н	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			
Микробиологическая чистота	Препарат должен отвечать критериям, приведенным в ГФ РК т. 1, 5.1.4, категории 3 А	соотв.	соотв.	соотв.	соотв.			

## 6.5 Техничко-экономическое обоснование производства таблеток с экстрактом *A. asiatica*

В результате расчета затрат денежных средств, для надлежащего производства и продажи фитопрепарата «Агримол», нами была предложена предполагаемая оптовая цена, равная 405 тенге. Экономическая нестабильность ситуации в стране может изменить стоимость в большую или меньшую сторону. Далее мы представили в виде таблицы 52 данные ожидаемых расходов при внедрении фитопрепарата в производство.

Таблица 52 – Техничко-экономическое обоснование таблеток Агримол

Производственная себестоимость, на 10 000 коробок					
№	Название	Единица измерения	Норма расхода	Цена (тенге)	Стоимость (тенге)
<b>Основное сырье</b>					
1	Экстракт репешка азиатского, сухой	кг	75	40 000	300000
2	Сорбитол	кг	1041	1000	1041000
3	Коллидон AV64	кг	60,0	4000	240000
4	Аэросил	кг	2,4	2000	4800
5	Сукралоза	кг	2,4	1500	3600
6	Краситель ЖОЖ	кг	1,2	1000	1200
7	Ароматизатор «Апельсин»	кг	6,0	1500	9000
8	Кальция стеарат	кг	60,0	700	42000
В общей сумме					1641600
<b>Дополнительные материалы</b>					
1	Коробочки	шт.	10000	20	200000
2	Лейблы (этикетка)	шт.	10000	5	50000
3	Гофра картонные коробки	шт.	400	70	28000
4	Скотч	м.	800	5	4000
5	Групповой лейбл	шт.	400	10	4000
6	Износ важных средств			20000	20000
7	Другие дополнительные материалы			5000	5000
В общей сумме					311000
<b>Прочие затраты</b>					
1	Зарплата				100000
2	Другие затраты				7000
В общей сумме					107000
Окончательная производственная себестоимость					2059600
<b>Тотальная себестоимость</b>					
Производственная себестоимость					2059600
Административные затраты			30%		617880
Рыночные затраты			20%		411920
В общей сумме					3089400
Тотальная себестоимость одной продукции					309
<b>Ставочная минимальная цена продажи</b>					
Тотальная себестоимость					3089400
Рентабельность			30%		926,820
В общей сумме ставочная минимальная цена					4016220
Цена одной единицы					402

Цена таблетки составила 309 тг, в то время, как минимальная ставочная цена продажи при минимальной доходности 30% равна 402 тг, что представлено в таблице 53. Цена других импортируемых аналогов на фармацевтическом рынке РК составляет более 700 тг.

Таблица 53 – Окупаемость и чистая прибыль продукта

Годовой выпуск готовой продукции: 100000 коробок				
Себестоимость ед. продукции (тг)	Оптовая цена ед. продукции (тг)	Стоимость годового объема готовой продукции (тг)	Чистая прибыль (П) (тг)	Окупаемость (год)
309	402	40200000	9300000	3 года 3 месяца

Чтобы рассчитать окупаемость, использовали следующую формулу 16 [101]:

$$T = \frac{K}{П} \quad (16)$$

где T – окупаемость;

K – себестоимость 100000 коробок

П – чистая прибыль

В итоге, представленное технико-экономическое обоснование показывает целесообразность продажи проекта по производству ЛС.

Таким образом, был проведен анализ рынка таблеток для рассасывания при боли в горле, зарегистрированных в хРК. Разработка медикаментов с максимальной биологической доступностью и доказанной безопасностью, на основе лекарственного сырья для лечения болезни горла является актуальным направлением. В соответствии с физико-химическими и фармако-технологическими свойствами сухого экстракта травы репешка азиатского, нами был выбран метод получения таблеток прямым прессованием. Подбор связывающих веществ осуществляли, таким образом, чтобы они могли обеспечить высокую продолжительность рассасывания таблеток в ротовой полости и нужное проявление лечебного эффекта ЛВ. На основе активной субстанции было сформировано 5 образцов состава таблеток. В качестве скользящего и антифрикционного вещества были использованы аэросил и кальция стеарат. Полученные таблетки круглые с вдавленной частью по центру с обеих сторон, бледно-желтого цвета с оттенками экстракта и с запахом апельсина. Стабильность таблеток с условным названием Агримол изучали на трех опытно-промышленных сериях, полученных в ТОО «ВИВА ФАРМ», город Алматы, РК. В ходе эксперимента использовали долгосрочные испытания основных параметров качества. Рассчитали прогнозируемую оптовую стоимость таблетки «Агримол». Цена упаковки таблетки составляет 402 тг, но в связи с экономической ситуацией в стране цена может варьировать.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования, в рамках выполнения диссертационной работы можно сделать следующие выводы:

1) Проведено фармакогностическое изучение надземной части репешка азиатского, были установлены следующие макроскопические признаки:

- Листья репешка азиатского непарноперистосложные, листочки эллиптические с крупнозубчатым краем. Сверху листья зеленые, снизу - серовато-зеленые, прерывисто-перистые, сверху - слабоопушенные, снизу - бархатисто-опушенные с примесью мелких железок.

Установлены следующие микроскопические признаки растения *Agrimonia asiatica* Juz.:

- верхний эпидермис листа характеризуется сильной извилистостенностью клеток, в то время как нижний эпидермис имеет прямостенные клетки, устьица аномоцитного типа. Волоски простые в виде одноклеточных выростов.

Определены фармако-технологические параметры ЛРС как  $d_n=1,7454$  г/см<sup>3</sup>;  $d_0=0,1176$  г/см<sup>3</sup>;  $d_H=0,3465$  г/см<sup>3</sup>; пористость составляет 0,9304 г/см<sup>3</sup>; порозность равна 1,9508 г/см<sup>3</sup>; свободный объем слоя составляет 0,8001 г/см<sup>3</sup>. Потеря в массе при высушивании составила 5,83%, зола общая равна 6,3% и нерастворимая зола в 10% растворе НСІ составила 1,35%. Результаты испытания микробиологической чистоты показали, что ЛРС относится к категории 4 В.

В траве репешка азиатского установлено наличие полисахаридов, фенольных соединений, сапонинов, дубильных веществ, флавоноидов, карбоновых кислот. По итогам изучения эфирного масла, полученного из травы репешка азиатского, его основными компонентами были  $\beta$ -селинен (36,4%),  $\alpha$ -панасинсен (21,7%), пальмитиновая кислота (7,8%), 1,2-нонадиен (6,2%), нонанал (4,2%), гермацерен А (2,5%) и  $\beta$ -гуайен (2,4%). Определили количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин (9%) и сумму полисахаридов (20%) в траве репешка азиатского.

2) При разработке оптимальной технологии получения экстракта из травы *Agrimonia asiatica* Juz. достигли следующих результатов:

- методом перколяции получили экстракт из травы репешка азиатского и сушили сублимационной сушкой, чтобы приготовить сухой экстракт. Выход экстракта составил 4,4%. Полученный продукт обладает коричневым цветом и характерным запахом, легко растворяется в воде и этаноле.

Выделение индивидуальных соединений провели колоночной хроматографией. Выделили пять основных компонентов, которые были идентифицированы как: 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид), кемпферол-3-гликозид, кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид, катехин и сахароза методом ЯМР спектроскопии. Определили количественное содержание катехина и астрагалина в процентном соотношении 1,73 % и 0,227% соответственно методом ВЭЖХ.

3) Проведена стандартизация сухого экстракта из сырья *Agrimonia asiatica* Juz. Согласно НД, определены следующие спецификации качества сухого экстракта из сырья *Agrimonia asiatica* Juz.: описание, идентификация, потеря в массе при высушивании, тяжелые металлы, микробиологическая чистота, количественное определение. Все показатели качества соответствуют предъявляемым требованиям. Стабильность экстракта изучали при длительных испытаниях при температуре  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , относительной влажности  $60\pm 5\%$ .

4) Проведена оценка острой, подострой токсичности сухого экстракта *Agrimonia asiatica* Juz. Установлено, что сухой экстракт *Agrimonia asiatica* Juz. относится классу 4, к малотоксичным веществам. Определена антиоксидантная и противовоспалительная активность сухого экстракта *Agrimonia asiatica* Juz.

5) Проведена фармацевтическая разработка таблеток для рассасывания с сухим экстрактом Репешка азиатского и разработан рациональный состав, оптимальная технология получения таблеток, условно установлен срок хранения таблеток методом долгосрочного исследования при температуре  $25\pm 2$ , при влажности  $60\pm 5\%$  в течение 2 лет. Изучено технико-экономическое обоснование производства таблеток с экстрактом Репешка азиатского.

**Оценка полноты решения поставленных задач.** Все поставленные задачи для достижения конечной цели полностью выполнены.

- Проведены фармакогностическое, фармако – технологическое изучение и стандартизация ЛРС (травы) *Agrimonia asiatica* Juz.

- Отработана оптимальная технология получения экстракта из травы *Agrimonia asiatica* Juz.

- Разработаны фармакопейные критерий качества и проведена стандартизация сухого экстракта из сырья *Agrimonia asiatica* Juz.

- Проведены неклинические исследования острой, подострой токсичности и антиоксидантной, противовоспалительной активности экстракта *Agrimonia asiatica* Juz.

- Разработаны способ, технология производства лекарственного средства и проведено технико-экономическое обоснование для производства лекарственного средства из экстракта *Agrimonia asiatica* Juz.

**Разработка рекомендаций и исходных данных по конкретному использованию результатов.**

- получен акт внедрения в производство таблеток для рассасывания из сухого экстракта репешка азиатского;

- методы изучения и блок-схема разделения на фракции могут быть использованы в ходе НИ практики в учебном процессе.

**Оценка технико-экономической эффективности внедрения и научного уровня диссертационной работы** отражается в следующих полученных результатах:

- разработана схема выделения БАВ из растения репешка азиатского. Выявлено одно новое соединение для *Agrimonia asiatica* Juz. 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) -β-D-глюкозопиранозид.



- изучены острая, подострая токсичности, антиоксидантная и противовоспалительная активности фитосубстанции *Agrimonia asiatica* и установлена его безопасность. Новизна подтверждена патентом на изобретения РК;

- проведены исследования по разработке технологии производства таблеток «Агримол» на основе фитосубстанции *Agrimonia asiatica* Juz.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Трошина А.И., Стручкова Ю.Ю. Общая характеристика семейства розоцветные //Электронный ресурс: <http://www.econf.rae.ru/> - 2010. – 500 с.
2. Chisholm H. Plague //Encyclopedia Britannica (11<sup>th</sup> ed). Cambridge University Press. Vol. 694. - P. 1911.
3. Josifović M., Stjepanović L., Janković M.M., Gajić M., Kojić M., and M. Diklić (1973) //Flora of Serbia. Vol. 58.
4. Крылов П. Н. Флора Западной Сибири: руководство к определению западно-сибирских растений. Вып. 2 / П. Крылов при сотрудничестве Б. К. Шишкина, Л. П. Сергиевской, Л. Ф. Ревердатто, Е. И. Штейнберг. - Томск: Изд. Томского отд. Рус. геогр. о-ва, 1928. С. 284–287.
5. Khare C.P. Indian medicinal plants, an illustrated dictionary //Springer Science and Business Media, LLC, 2007. - P. 26
6. Александрова Т.А. Обыкновенный репешок творит чудеса //Уральский садовод, - 2010. №46
7. Махов А.А. Зеленая аптека //Красноярск, книжное изд. 1993. – 528 с.
8. Лесовая Ж.С., Писарев Д.И., Новиков О.О. Разработка методики стандартизации травы репешка обыкновенного *Agrimonia Eupatoria* по флавоноидам //Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2010. – №22. Вып. 12/2. С. 150-154.
9. Зыкова И. Д., Ефремов А. А. Состав эфирного масла надземной части репешка обыкновенного, произрастающего в Сибирском регионе //Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2013. – Т. 118. – № 3. – С. 98-100
10. Xu X. et al. Separation and determination of flavonoids in *Agrimonia pilosa* Ledeb. by capillary electrophoresis with electrochemical detection //Journal of separation science. – 2005. – V. 28. – №. 7. – P. 647-652.
11. Ханина М. Г., Ханина М. А., Родин А. П. Элементы надземной части *Agrimonia pilosa* Ledeb //Journal of Siberian Medical Sciences. – 2012. – №. 4.
12. Соколов П. Д. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства *Hydrangeaceae* — *Haloragaceae* // Наука, 1987. - С. 19–21.
13. British Herbal Pharmacopoeia, 1996. – 212 с.
14. Федосеева Г. М. и др. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды //Методическое пособие по фармакогнозии. Иркутск. – 2009.
15. Писарева Н.А, Писарев Д.И., Новиков О.О., Севрук И.А., Ванхин О.А. Изучение полифенольного состава и разработка способов оценки качества травы репешка обыкновенного, научные ведомости, серия медицина. Фармация, 2013 №25 (168) выпуск 24/1. - С. 104-105.
16. Ханина М.Г. Фармакогностическое исследования травы репейничка волоситого (*Agrimonia pilosa* Ledeb.). - Самара 2013. - С. 7-9
17. Егоров В.А., Мошкова Л.В., Куркин В.А., Петрухина И.К. Гепатопротекторные и иммуностропные ЛС: состояние и перспективы фармрынка //Монография – СамГМУ, 2000. – 120 с.

18. Куркин В.А. Основы фитотерапии. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. - 963 с.
19. Ivanova D. et al. Antioxidative potential of *Agrimonia eupatoria* L. //Medicine. – 2011. – Т. 1. – №. 1. – P. 20-24.
20. Petkov V. Bulgarian traditional medicine: A source of ideas for phytopharmacological investigations. J Ethnopharmacol, 15, 1986. – P. 121-132.
21. Ghaima K.K. Antibacterial and wound healing activity of some *Agrimonia eupatoria* extracts. J Baghdad for Sci, 10(1), 2013. - P. 152-160.
22. Watkins F., Pendry B., Sanchez-Medina A. and Corcoran O. Antimicrobial assays of three native British plants used in AngloSaxon medicine for wound healing formulations in 10<sup>th</sup> century England. J Ethnopharmacol, 144(2), 2012. – P. 408-415
23. The Wealth of India. Raw Materials, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, I (A), 2000. - P. 111- 112.
24. Kwon D.H., Kwon H.Y., Kim H.J., Chang E.J., Kim M.B., Yoon S.K., Song E.Y., Yoon D.Y., Lee Y.H., Choi I.S. and Choi Y.K. Inhibition of hepatitis B virus by an aqueous extract of *Agrimonia eupatoria* L. Phytother Res, 19(4), 2005. -P. 355-358.
25. Ad'hiah, Ali H., Orooba NH Al-Bederi, and Khulood W. Al-Sammarræ. "Cytotoxic effects of *Agrimonia eupatoria* L. against cancer cell lines in vitro." Journal of the association of Arab Universities for basic and applied sciences 14.1 (2013). – P. 87-92.
26. Santos, Telmo N., et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activities of *Agrimonia eupatoria* L. infusion //Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. - 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8309894>
27. Bukovsky M., Blanimir P. Immunomodulative effects of ethanolic-aqueous extracts of herba *Agrimoniae*, flos *Chamomillae* and flos *Calendulae* cum calyce. //Farmaceutiky Obzor. – 1994. - Vol. 63. - P. 149-156.
28. Petkov V. Plants with hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action //The American Journal of Chinese Medicine. – 1979. - Vol. 7, № 3. - P. 197-236.
29. Giachetti D, Taddei E, Taddei I. Ricerche sull'attivita diuretica ed uricosurica di *Agrimonia eupatoria* //Boll Soc Ital Biol Sper. - 1986. – Vol. 62. - P. 705-711.
30. Patrascu V., Chebac P. Rezultate terapeutice favorabile in *Porfiria cutanata* cu *Agrimonia eupatoria* //Dermato-venerologia. – 1984. – Vol. 29. – P. 153-157.
31. Pamukov, Ahtardziev, 1989. Prirodna apteka, Zemizdat, Sofia
32. Huzio, N.M., Grytsyk, A.R. Research of the amino acid composition of *Agrimonia eupatoria* //The Pharma Innovation Journal. – 2015. – Vol. 4(2). – P. 28-29.
33. Al-Snafi A.E. The pharmacological and therapeutic importance of *Agrimonia eupatoria* - a review //Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology. – 2015. - Vol. 5(2). – P. 112-117.
34. Feng X.L., He Y.B., Liang Y.Z., Wang Y.L., Huang L.F., Xie J.W. Comparative analysis of the volatile components of *Agrimonia eupatoria* from leaves and roots by gas chromatography-mass spectrometry and multivariate curve

resolution //Journal of Analytical Methods in Chemistry. – 2013. - P. 1-9.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/246986>

35. Correia H., Gonzalez-Paramas A., Amaral M., Santos-Buelga C., Batista M. Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices //Biomedical Chromatography. – 2006. - Vol. 20(1). – P. 88-94.

36. Giao M.S., Pereira C.I., Pintado M.E., Malcata F.X. Effect of technological processing upon the antioxidant capacity of aromatic and medicinal plant infusions: From harvest to packaging //LWT-Food Science and Technology. – 2013. - Vol. 50(1). – P. 320-325.

37. Carnat A., Lamaison J.L. Comparative study of *Agrimonia eupatoria* L. and *Agrimonia procera* Wallr. //Plantes Medicinales et Phytotherapie. – 1991. - Vol. 25(4). - P. 202-211.

38. Bilia A.R., Palme E., Marsili A., Pistelli L., Morelli I. A flavonol glycoside from *Agrimonia eupatoria* //Phytochemistry. – 1993. - Vol. 32(4), P. 1078-1079.

39. Bisset N.G. Herbal drugs and phytopharmaceuticals //Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers.- 1994. – 568 p.

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

41. Вехов В.Н. Практикум по анатомии и морфологии высших растений. - Москва. – 1980. – С. 3 – 26.

42. Козубова Г.М. Атлас ультраструктуры растительных клеток. - Петрозаводск. – 1972. – С. 9 – 12.

43. Hayat M.A. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. - New York: Cambridge University Press 4<sup>th</sup> ed., 2000.

44. Государственная фармакопея XI издания - Москва: Медицина, 1990. - В. 2. – 400 с.

45. Чуешов В.И., Гладух Е.В., Сайко И.В. Технология лекарств промышленного производства: Учебник для студ.высш.учеб.завед.в 2ч., ч 2 / - Винница: Нова Книга, 2014. – 664 с.

46. Коничев А.С. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки //Вестник МГОУ. Серия естественные науки, 2011. - №3. - С. 49-54.

47. Luque-Garcia J. L., Luque de Castro M. D. Ultrasound: A powerful tool for leaching //Trends in Analytical Chemistry. – 2003. Vol. 22. – P. 41–47.

48. Чуешов В.И. Промышленная технология лекарств. - Х.: НФАУ, 2002. – Т. 2. - 716 с.

49. Lijun Wang, Curtis L. Weller. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants //Trends in Food Science & Technology. – 2006. Vol. 300. – 312 p.

50. Luque de Castro M. D., Garcia-Ayuso L. E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future //Analytica Chimica Acta. – 1998. Vol. 369. – P. 1–10.

51. Brachet A., Rudaz, S. Mateus, L. Christen, P., Veuthey J. Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves //Journal of Separation Science. – 2001. Vol. 24. – P. 865–873.
52. Okoh O. O. The effects of hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods on the chemical composition and toxicity of essential oils from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis //African Journal of Pharmacy and Pharmacology. - 2011. - Vol. 5(22) - P. 2474-2478.
53. Матасова С. А., Митина Н.А., Рыжова Г.Л., Жуганов Д.О., Дычко К.А. Получение сухого экстракта из корней девясила высокого и изучение его химического состава //Химия растительного сырья. – 1999. – №. 2. - С. 119–123
54. Wang L., Weller C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants //Trends in Food Science & Technology. – 2006. – Vol. 17. – №. 6. – P. 300-312.
55. Chemat S., Lagha, A., AitAmar H., Bartels P. V., Chemat F. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds //Flavour and Fragrance Journal. – 2004. – Т. 19. – №. 3. – С. 188-195.
56. Cravotto G., Binello A., Merizzi G., & Avogadro M. Improving solvent free extraction of policosanol from rice bran by high-intensity ultrasound treatment //European Journal of Lipid Science and Technology. – 2004. – Vol. 106. – №. 3. – P. 147-151.
57. Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J. P., Mason T. J. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry //Ultrasonics Sonochemistry. – 2004. – Vol. 11. – P. 261– 265.
58. Bruni R., Guerrini A., Scalia S., Romagnoli C., Sacchetti G. Rapid techniques for the extraction of vitamin E isomers from *Amaranthus caudatus* seeds: ultrasonic and supercritical fluid extraction //Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques. – 2002. – Vol. 13. – №. 5. – P. 257-261.
59. Жматова Г. В., Нефедов А. Н., Гордеев А. С., Килимник А. Б. К вопросу о применении ультразвука для экстракции жидкой фракции из вторичного растительного сырья в производстве плодово-овощных соков //Вестник Тамбовского государственного технического университета, 2005. – Т. 11. – №. 4.– С. 896-901.
60. Жматова Г. В., Нефедов А. Н., Гордеев А. С., Килимник А. Б. Методы интенсификации технологических процессов экстрагирования биологически активных веществ из растительного сырья //Вестник Тамбовского государственного технического университета. – 2005. – Т. 11. – №. 3.– С. 701-706.
61. Хелдт Г.В. Биохимия растений: пер. с англ. //М.: БИНО М. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.
62. Гладилович В. Д., Подольская Е. П., Возможности применения метода ГХ-МС (обзор) //Научное приборостроение, 2010. - Т. 20. - № 4. - С. 36–49.

63. Миронов А.Н. Руководство по проведению неклинических исследований. – Москва, 2012. – Т. 1. – 944 с.
64. Мяделец О.Д. Практикум по гистологии, цитологии и эмбриологии. Учебно-методическое пособие. - Витебск: ВГМУ. – 2010. – Изд. 2. – 440 с
65. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. - Страсбург, 18 март 1986 год.
66. Kozykeyeva R.A., Patsayev A.K., Makhatov V.K., Patsayeva K.K.. Morphological and anatomical features of the *Agrimonia asiatica* herb //Вестник № 1 (78), 2017, ТОМ I. Сборник научных трудов международной научно-практической конференции «Инновационные достижения в современной фармации и медицине», 21-22 апреля 2017 года, г.Шымкент, Республика Казахстан. - С. 100-103.
67. Kozykeyeva R.A., Raman V., Datkhayev U.M., Patsayev A.K., Srivedavyasari R., Ross S. Anotomo-morphological features of *Agrimonia Eupatoria* Subsp. *Asiatica* skalicky fruits //Фармация Казахстана, №9 (218) сентябрь. – 2019. - С. 22-24.
68. Приказ министра национальной экономики от 27 февраля 2015 года №155 об утверждении нормативов «Санитарно-эпидемиологических требований к обеспечению радиационной безопасности».
69. Козыкеева Р.А. Изучение микробиологической чистоты растения *Agrimonia asiatica*.Juz. //Фармация Казахстана, №10 (220) ноябрь. – 2019. - С. 37-39
70. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю, Абилов Ж.А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах, Алматы: Казахский университет. - 2004. – 288 с.
71. Калинкина Г.И., Сальникова Е.Н., Исайкина Н.В., Коломиец Н.Э. Методы фармакогностического анализа лекарственного растительного сырья. // Химический анализ. – 2008. – Ч. II. - 55 с.
72. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов //Химия растительного сырья. - 2006. - №4. - С. 29–33.
73. Лесовая Ж. С., Писарев Д. И., Новиков О. О. Разработка методики стандартизации травы репешка обыкновенного *Agrimonia eupatoria* по флавоноидам //Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2010. - №22 (93). – В. 12/2. – С. 150-154.
74. Adams R.P. Identification of Essential Oil Components by GC/QM. – IL: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2001. – 456 p.
75. Kozykeyeva R.A., Patsayev A.K., Datkhayev U.M. Extractive substances from *Agrimonia Asiatica* //Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine. – 2017. - Vol.1. - №4. - P. 38-41.
76. Kozykeyeva R.A., Patsayev A.K., Datkhayev U.M. Chemical constituents of the *Agrimonia asiatica* extract //Тезисы докл. III Межд. научно-практической конф.- Нур-Султан, 10-12 июля 2019. – С. 353-356.

77. Kozykeyeva R.A., Datkhayev U.M., Srivedavyasasri R., Ajayi T., Patsayev K., Kozykeyeva R.A., Samir R. Isolation of Chemical Compounds and Essential Oil from *Agrimonia asiatica* Juz. and Their Antimicrobial and Antiplasmodial Activities //The Scientific World Journal. - Vol. 2020. - <https://doi.org/10.1155/2020/7821310>
78. KR Patent 2012090262 A 20120817. Repub Korean Kongkae Taeho Kongbo, 2012.
79. Lee S.Y., Shin Y.J., Choi S.U. and Lee K.R. A new flavonol glycoside from the aerial part of *Rudbeckia laciniata* //Archives of Pharmacal Research. - 2014. - Vol. 37. - №7. – P. 834–838.
80. Okuyama T., Hosoyama K., Hiraga Y., Kurono G., Takemoto T., A new flavonol glycoside of *Osmunda asiatica* //Chemical & Pharmaceutical Bulletin. – 1978. Vol. 26. - №10. – P. 3071–3074.
81. Abd-El-Razek M. H., NMR assignments of four catechin epimers //Asian Journal of Chemistry. – 2007. - Vol. 19. - №6. – P. 4867–4872.
82. Amudha M, Rani S. Evaluation of in Vitro Antioxidant Potential of *Cordia retusa* // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2016. -Vol. 78(1). - P. 80-86.
83. Winterbourn C.C., Hawkins R.E., Brian M., Carrell R.W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity // J Lab Clin Med. - 1975. - Vol.85. - P. 337–41.
84. Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay // Anal Biochem. - 1996. - Vol. 239. – 70 p.
85. Козыкеева Р. А., Поздняков Д. И., Патсаев А. К., Воронков А. В.. Антирадикальная активность некоторых лекарственных растений, применяемых в традиционной медицине Казахстана //Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству. – 2017. – С. 35-36.
86. Гуськов В., Марзилович О. Состояние и прогноз развития фармацевтического рынка Казахстана //Алматы: БТА Аналитика. – 2008. – С. 23-25.
87. <https://pharm.reviews/analitika/item/4387-proizvodstvo-farmatsevticheskoy-produktsii-v-eaes-v-2018-godu-ekspress-informatsiya>
88. <https://pharm.reviews/analitika/item/4709-za-devyat-mesyatsev-2019-goda-kazakhstan-importiroval-19-5-tysyachi-tonn-medikamentov>
89. Ворошилина М. А., Иванова Е. П. Фармакоэпидемиологическое исследование потребительского поведения при выборе лекарственных средств для лечения боли в горле //Бюллетень медицинских интернет-конференций. – ООО «Наука и инновации», 2013. – Т. 3. – №. 2.
90. Morice A. H. Epidemiology of cough //Pulmonary pharmacology & therapeutics. – 2002. – Vol. 15. – №. 3. – P. 253-259.
91. Barbee R. A., Halonen M., Kaltenborn W. T., Burrows B. A longitudinal study of respiratory symptoms in a community population sample: correlations with smoking, allergen skin-test reactivity, and serum IgE //Chest. – 1991. – Vol. 99. – №. 1. – P. 20-26.

92. McGarvey L. P. A., Heaney L. G., Lawson J. T., Johnston B. T., Scally C. M., Ennis, M., MacMahon J. Evaluation and outcome of patients with chronic non-productive cough using a comprehensive diagnostic protocol //Thorax. – 1998. – Vol. 53. – №. 9. – P. 738-743.
93. Rubin B. K. Mucolytics, expectorants, and mucokinetic medications //Respiratory Care. – 2007. – Vol. 52. – №. 7. – P. 859-865.
94. Schroeder K., Fahey T. Systematic review of randomised controlled trials of over the counter cough medicines for acute cough in adults //BMJ. – 2002. – Vol. 324. – №. 7333. – 329 p.
95. Brendler T., Van Wyk B. E. A historical, scientific and commercial perspective on the medicinal use of *Pelargonium sidoides* (Geraniaceae) //Journal of ethnopharmacology. – 2008. – Vol. 119. – №. 3. – P. 420-433.
96. Kindscher K. Ethnobotany of purple coneflower (*Echinacea angustifolia*, Asteraceae) and Other *Echinacea* Species //Economic Botany. – 1989. – Vol. 43. – №. 4. – P. 498-507.
97. Kardos P, Berck H, Fuchs KH: Guidelines of German Respiratory Society for diagnosis and treatment of adults suffering from acute or chronic cough. *Pneumologie*. – 2010. – Vol. 64. – P. 336–373.
98. Якимова С. С. Растительные препараты при кашле: клиническая эффективность и целесообразность // МС. 2012. №3.
99. Панкрушева Т. А., Маравина И. Н., Медведева О. А., Чекмарева М. С. Исследования по разработке таблеток для рассасывания с азитромицином //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №. 2. – С. 84-88.
100. С.А.Сизяков, К.В.Алексеев, А.С.Сульдин, С.К.Алексеева Современные вспомогательные вещества в технологии прямого прессования //Фармация, 2008. №4.- С. 52-56.
101. Грязнова А. Г., Федотова. Оценка бизнеса //М.: Финансы и статистика. – 2006. – С. 485- 501







## Приложение В

### Удостоверение автора №107774

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ  
УДОСТОВЕРЕНИЕ АВТОРА

№ 107774

Козыкеева Раушан Айдарбековна (KZ)

*және/и* Махатов Бауыржан Калжанович (KZ); Патсаев Анапия Каныбекович (KZ);  
Кучербаев Камал Джамалович (KZ); Коновалов Дмитрий Алексеевич (RU); Воронков  
Андрей Владиславович (RU)

*өнертабыс авторы(лары) болып табылатындығы осымен куәландырылады  
является(ются) автором(ами) изобретения*

(11) 33804

(54) Антиоксидантты және хелаттаушы белсенділігі бар өсімді құрал алу тәсілі  
Способ получения растительного средства, обладающего антиоксидантной и  
хелатирующей активностью

(73) Козыкеева Раушан Айдарбековна (KZ); Кучербаев Камал Джамалович (KZ)





Е. Осанов

«Үлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры  
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»

## Приложение Г

### Справка определения вида растения *Agrimonia Asiatica*

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ  
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым  
Министрлігі ғылым Комитетінің шаруашылық  
жүргізу құқығындағы Республикалық  
мемлекеттік кәсіпорныны «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

№ 9-08/3

«10» сентября 2019 г.

Зав. кафедрой организации, управления и  
экономики фармации и клинической фармации Школы фармации  
АО КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова  
PhD, доценту Жакипбекову К.С.

Уважаемый Кайрат Сапарханович!

В ответ на Ваше письмо (вх. № 01-07/311 от 12 ноября 2018 г.) по поводу содействия в определении видовой принадлежности лекарственного растения репешка азиатского *Agrimonia asiatica* Juz. и предоставления ресурсоведческих данных по указанному виду в рамках выполнения докторской работы PhD-докторанта 2-го года обучения Козыкеевой Р.А. сообщаем, что:

репешок азиатский *Agrimonia asiatica* Juz., Азия ошаған из сем. *Rosaceae* Juss. – многолетнее травянистое растение, которое произрастает рассеянно, иногда образуя небольшие заросли, в основном повсеместно на территории Казахстана, кроме пустынь и высокогорий.

По литературным данным, сырьем служит надземная часть, содержащая флавоноиды, дубильные вещества, тритерпеноиды; фенольные соединения. Используется при заболеваниях желудка, при парадонтозе, как антибактериальное, гемостатическое, диуретическое; проявляет антигистаминную, противоаллергическую, мембраностабилизирующую и антибактериальную активность. Применяется в народной и экспериментальной медицине (Аннотированный список лекарственных растений Казахстана, 2014, с. 125).

Представленные Вами гербарные образцы растения с этикеткой и указанием даты сбора и места произрастания растения идентифицированы как вид *Agrimonia asiatica* Juz.

Современные данные о сырьевой базе этого вида отсутствуют.

Небольшие запасы (1,78 т надземной фитомассы) сырья были выявлены на хребте Западный Тарбағатай (Аталыкова, 1988).

Генеральный директор,  
академик КазНАЕН, д.б.н.



Ситпаева Г.Т.

Отв. исп.: зав. лаб. растительных ресурсов,  
член-корр. РАЕ, д.б.н. Гемеджиева Н.Г.  
Тел.: 394-72-87.

## Приложение Д

### Параметры контроля инструмента ГХ МС

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: USDA 5975

C:\MSDCHEM\1\METHODS\USDA KOVAT.M  
Tue Jun 04 14:13:02 2019

Control Information

Sample Inlet : GC  
Injection Source : GC ALS  
Mass Spectrometer : Enabled

No Sample Prep method has been assigned to this method.

Oven  
Equilibration Time 0.25 min  
Max Temperature 250 degrees C  
Slow Fan Disabled  
Oven Program On  
60 °C for 0 min  
then 3 °C/min to 240 °C for 5 min  
Run Time 65 min  
Cryo Off

Front Injector  
Syringe Size 10 µL  
Injection Volume 5 µL  
Solvent A Washes (PreInj) 2  
Solvent A Washes (PostInj) 2  
Solvent A Volume 8 µL  
Solvent B Washes (PreInj) 2  
Solvent B Washes (PostInj) 2  
Solvent B Volume 8 µL  
Sample Washes 2  
Sample Wash Volume 8 µL  
Sample Pumps 4  
Dwell Time (PreInj) 0 min  
Dwell Time (PostInj) 0 min  
Solvent Wash Draw Speed 300 µL/min  
Solvent Wash Dispense Speed 6000 µL/min  
Sample Wash Draw Speed 300 µL/min  
Sample Wash Dispense Speed 6000 µL/min  
Injection Dispense Speed 6000 µL/min  
Viscosity Delay 0 sec  
Sample Depth Disabled  
Injection Type Standard  
L1 Airgap 0.2 µL

Sample Overlap  
Sample overlap is not enabled

Front SS Inlet He  
Mode Split  
Heater On 240 °C  
Pressure On 34.872 psi  
Total Flow On 78 mL/min  
Septum Purge Flow Off  
Gas Saver Off  
Split Ratio 25 :1  
Split Flow 75 mL/min

Back SS Inlet He  
\*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*  
Mode Split  
Heater Off  
Pressure Off  
Total Flow Off  
Septum Purge Flow Off

USDA KOVAT.M Tue Jun 04 14:13:02 2019

Page: 1

Gas Saver Off  
Split Ratio 100 :1  
Split Flow 0 mL/min

Thermal Aux 2 (MSD Transfer Line)  
Heater On  
Temperature Program On  
280 °C for 0 min  
Run Time 65 min

Column #1  
J&W 122-5032: 122-5032  
DB-5  
325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm  
In: Front SS Inlet He  
Out: PCM C-1

(Initial) 60 °C  
Pressure 34.872 psi  
Flow 3 mL/min  
Average Velocity 41.518 cm/sec  
Holdup Time 1.2043 min  
Flow Program On  
3 mL/min for 0 min  
Run Time 65 min

Column #2  
Agilent 160-7625-5: 2057.64216  
Retention gap  
450 °C: 0.99 m x 150 µm x 0 µm  
In: PCM C-1 He  
Out: Front Detector FID

(Initial) 60 °C  
Pressure 14.967 psi  
Flow 5 mL/min  
Average Velocity 336.37 cm/sec  
Holdup Time 0.0049053 min  
Flow Program On  
5 mL/min for 0 min  
Run Time 65 min

Column #3  
Agilent 160-7625-5a: 2057.64352  
gap  
450 °C: 3.08 m x 150 µm x 0 µm  
In: PCM C-1 He  
Out: Vacuum

(Initial) 60 °C  
Pressure 14.967 psi  
Flow 2.1299 mL/min  
Average Velocity 166.81 cm/sec  
Holdup Time 0.030774 min  
Pressure Program On  
14.967 psi for 0 min  
Run Time 65 min

Front Detector FID  
Heater On 300 °C  
H2 Flow On 30 mL/min  
Air Flow On 400 mL/min  
Makeup Flow On 25 mL/min  
Const Col + Makeup Off  
Flame On  
Electrometer On

PCM C-1 He: Supplies Column 2

PCM C-2 He

USDA KOVAT.M Tue Jun 04 14:13:02 2019

Page: 2

\*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*

Pressure Program            Off  
10 psi for 0 min  
Run Time                    65 min

Signals  
Signal #1: Front Signal            Save On  
   5 Hz  
Signal #2: Test Plot                Save Off  
   50 Hz  
Signal #3: Test Plot                Save Off  
   50 Hz  
Signal #4: Test Plot                Save Off  
   50 Hz

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File                    : atune.u  
Acquisition Mode            : Scan

MS Information

Solvent Delay                : 3.50 min  
EMV Mode                    : Gain Factor  
Gain Factor                  : 1.00  
Resulting EM Voltage        : 1282

[Scan Parameters]

Low Mass                    : 50.0  
High Mass                    : 550.0  
Threshold                    : 150  
Sample #                    : 2    A/D Samples    4  
Plot 2 low mass              : 50.0  
Plot 2 high mass             : 550.0

[MSZones]

MS Source                  : 230 C    maximum 250 C  
MS Quad                    : 150 C    maximum 200 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US12303A26

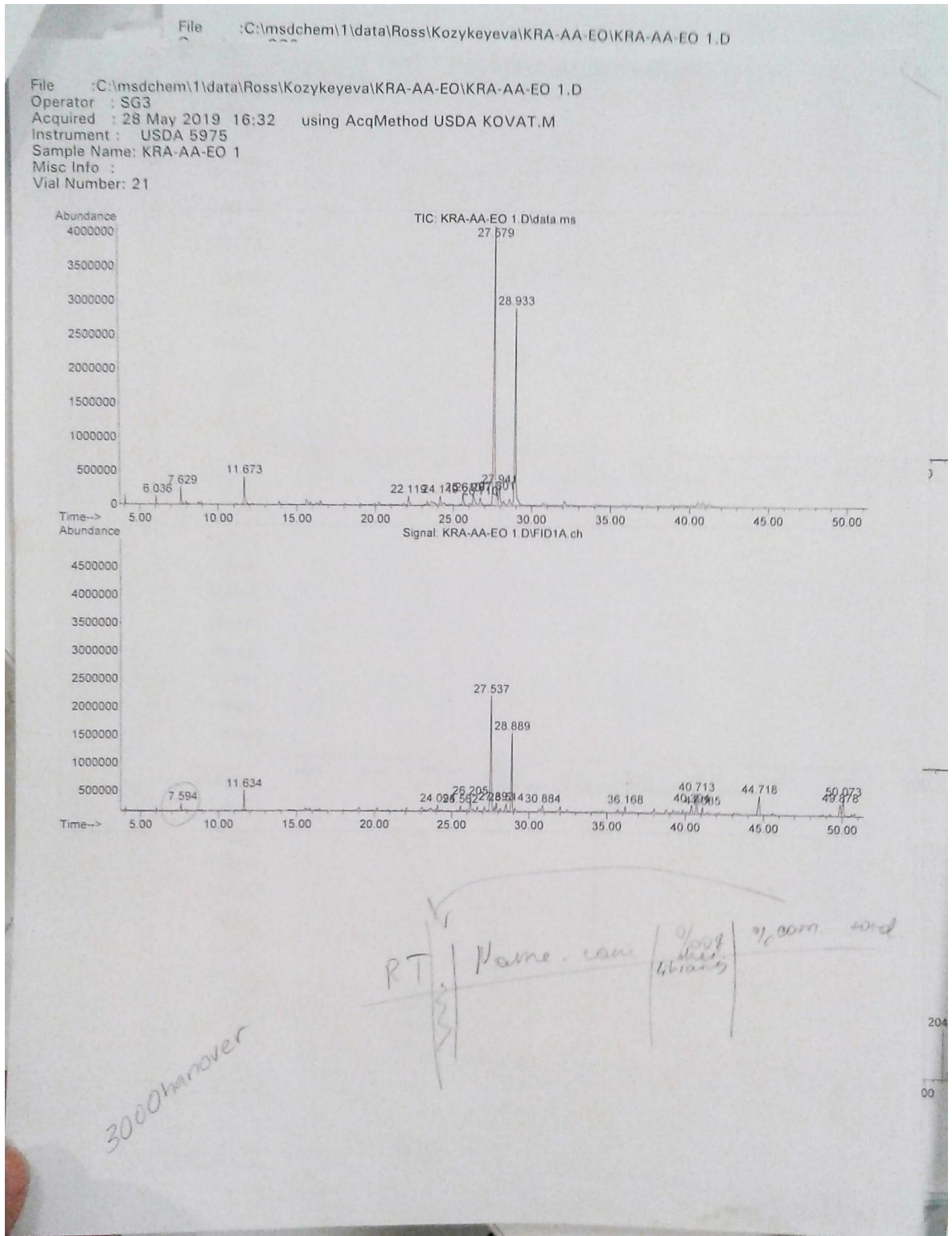
Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION    : 34.610  
ENERGY       : 69.922  
REPELLER    : 34.814  
IONFOCUS    : 88.259  
ENTRANCE\_LE : 22.000  
EMVOLTS     : 1117.647  
              Actual EMV : 1282.35  
              GAIN FACTOR : 1.05  
AMUGAIN     : 1238.000  
AMUOFFSET   : 122.375

USDA KOVAT.M Tue Jun 04 14:13:02 2019

# Приложение Е

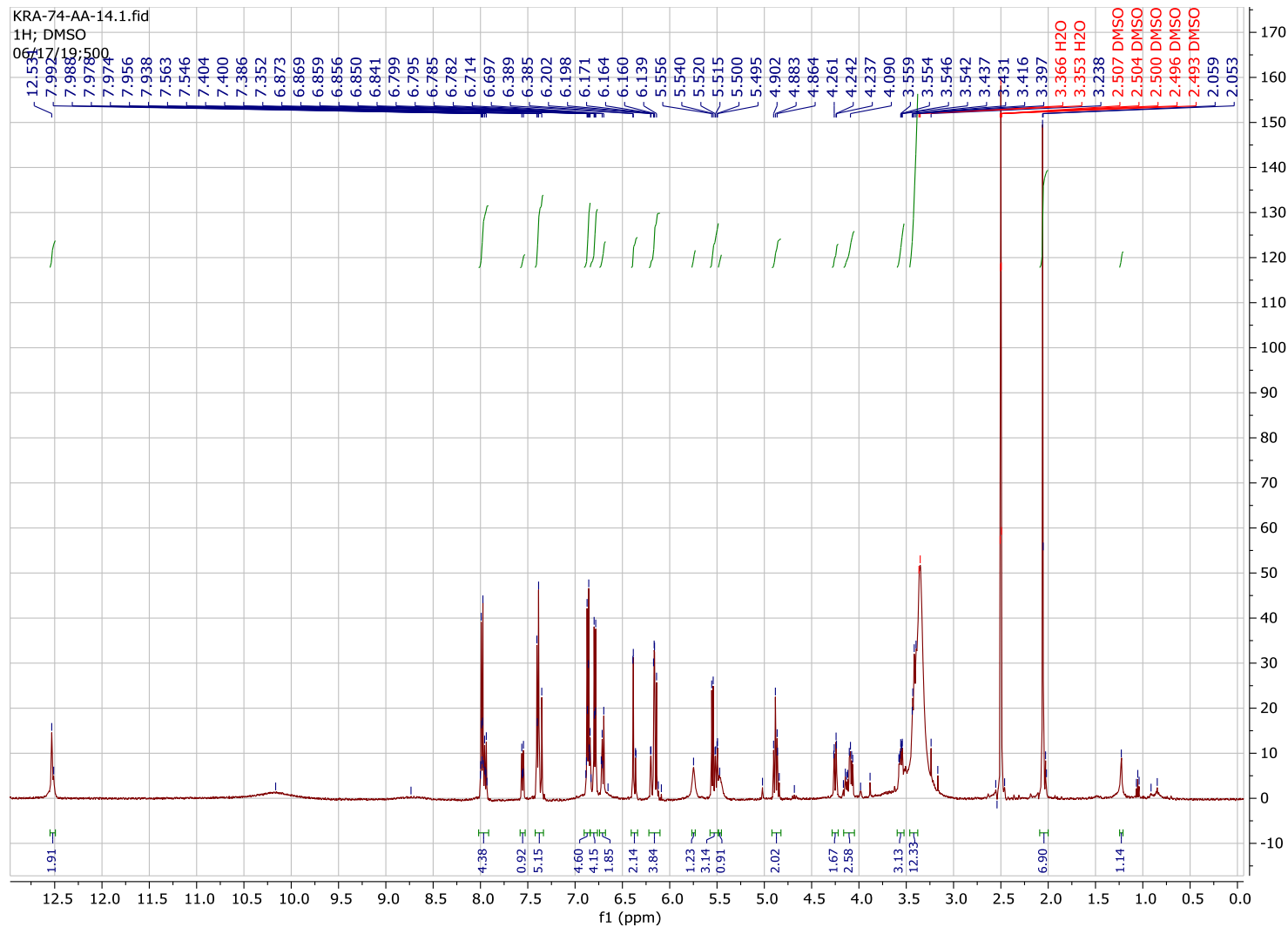
## ГХ МС спектры эфирного масла Репешка азиатского





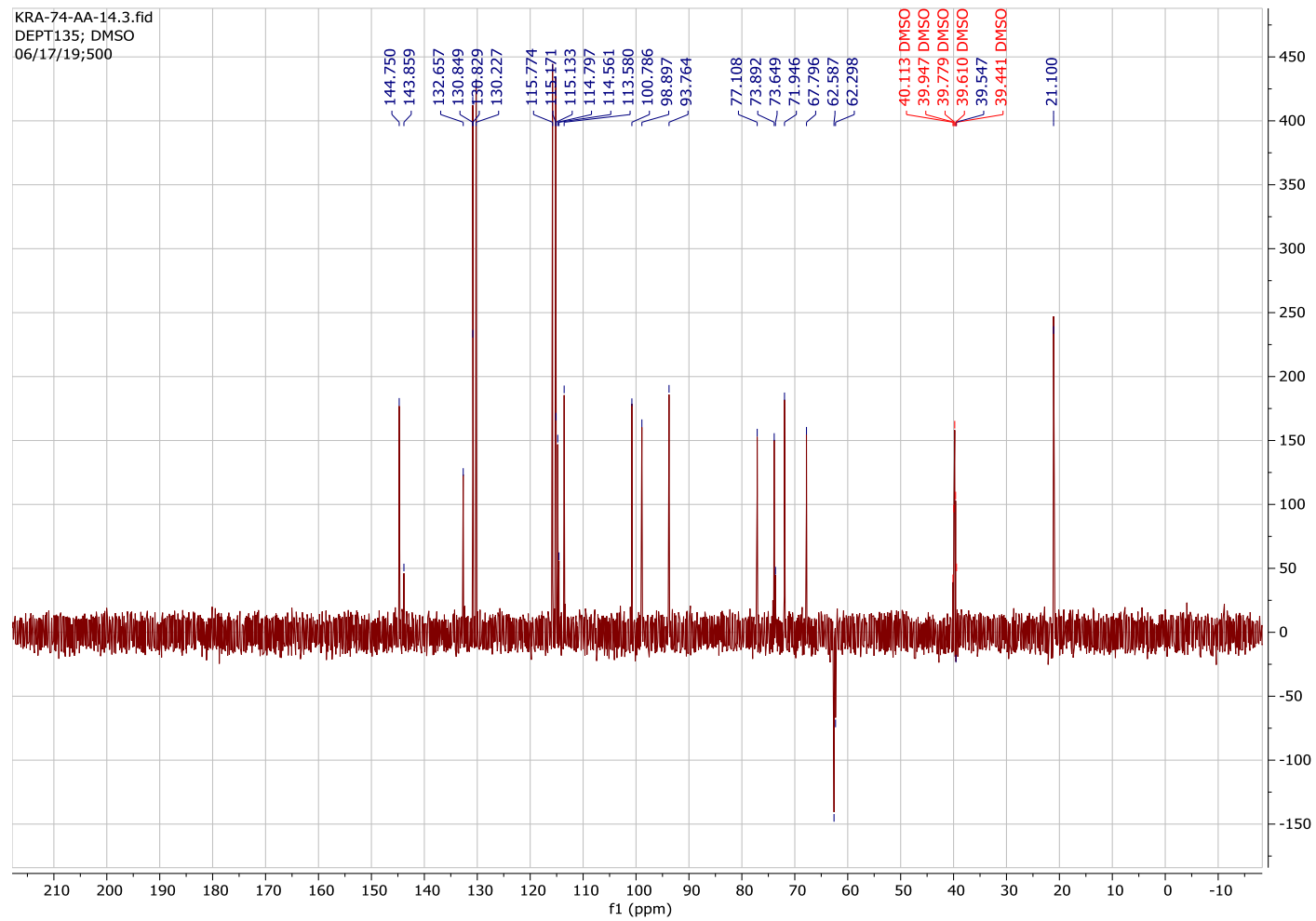
## Приложение Ж

$^1\text{H}$  ЯМР спектр 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид



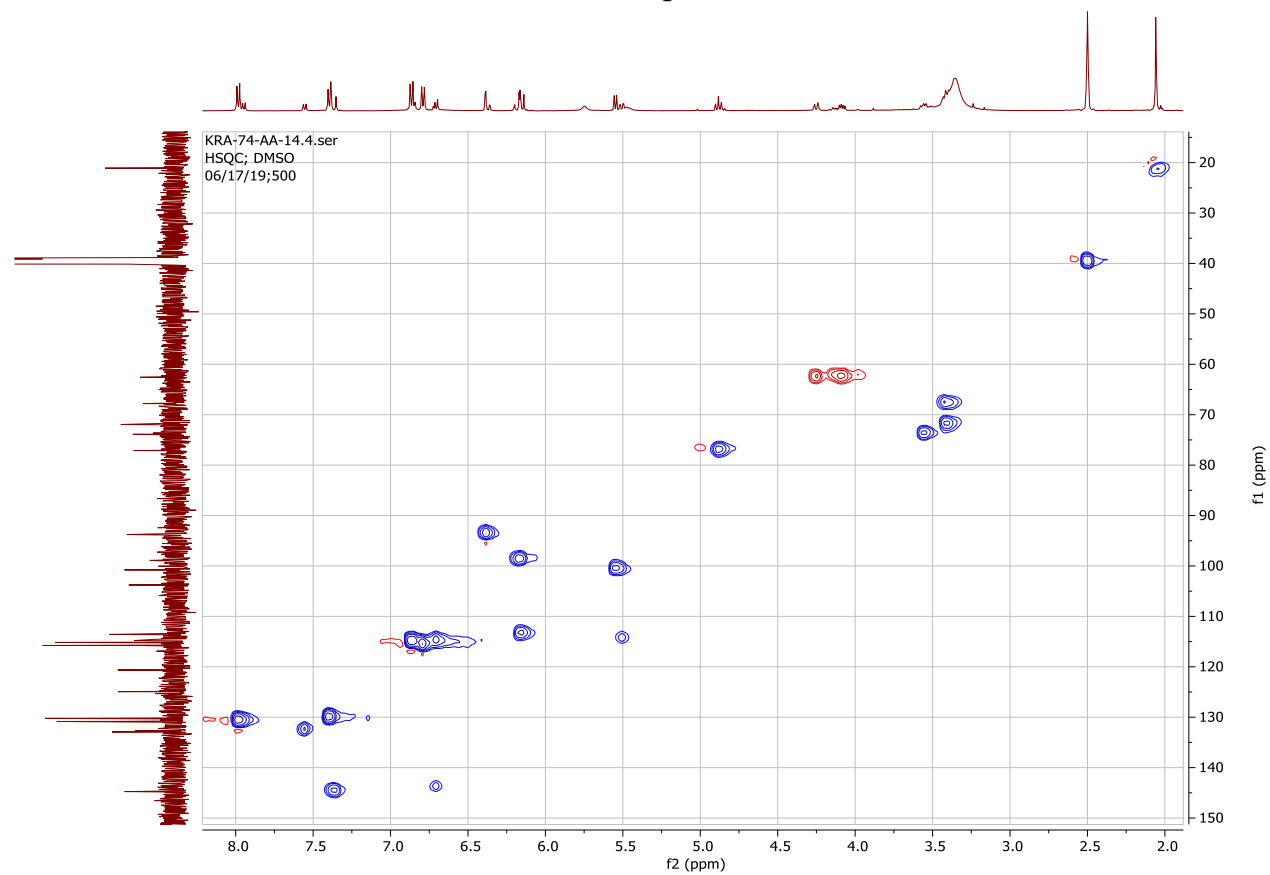
## Приложение Ж 2

DEPT 135 ЯМР спектр 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид



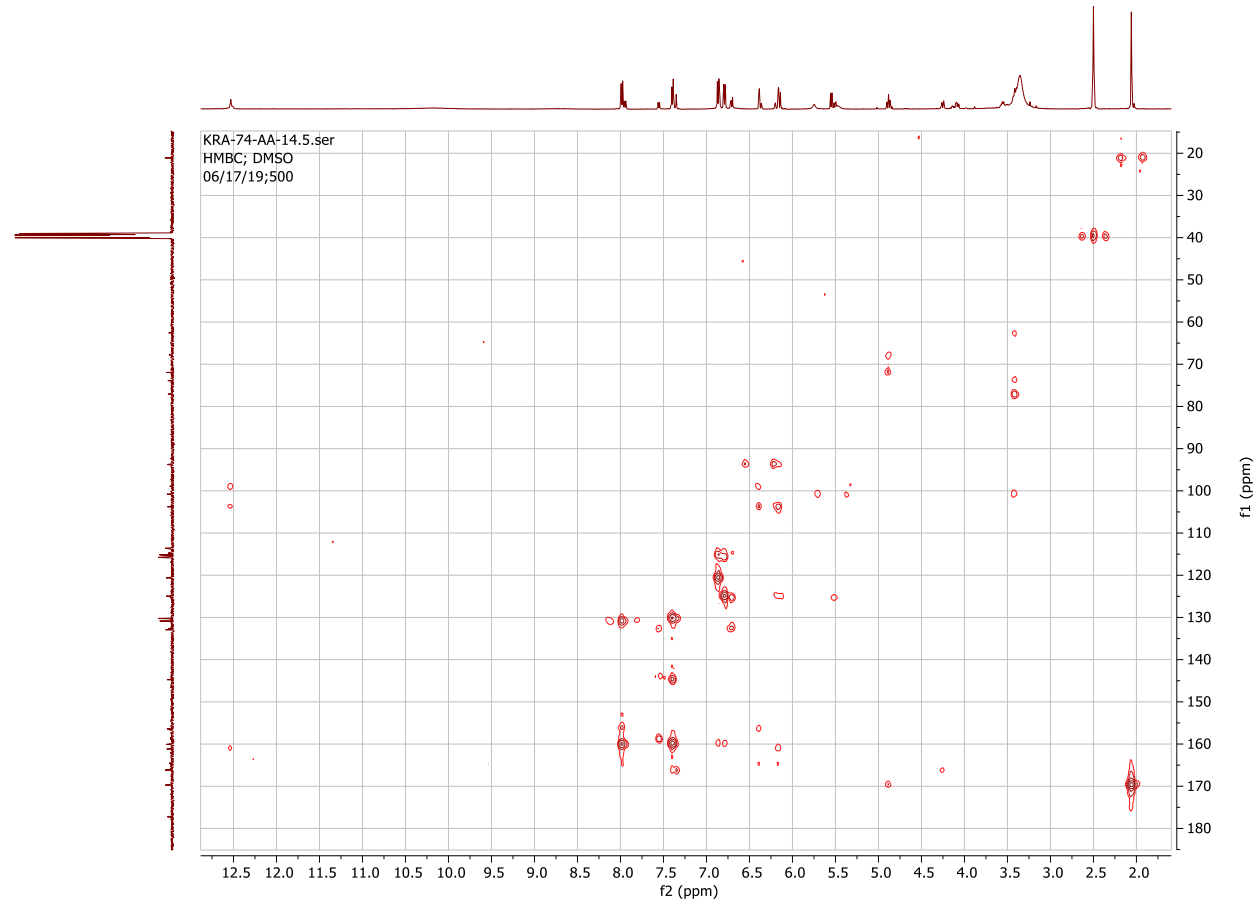
### Приложение Ж 3

HSQC ЯМР спектр 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид



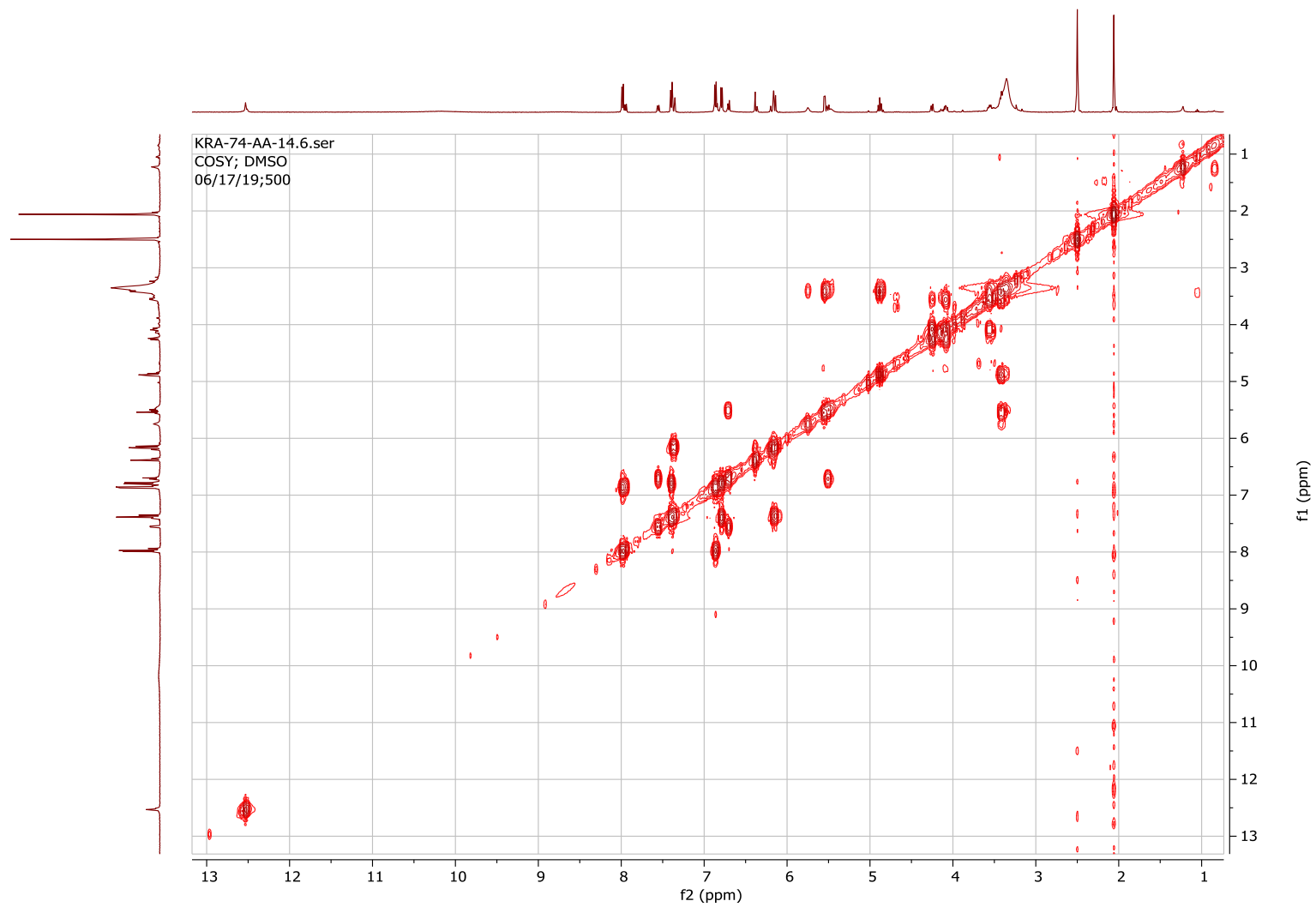
## Приложение Ж 4

HMBC ЯМР спектр 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид



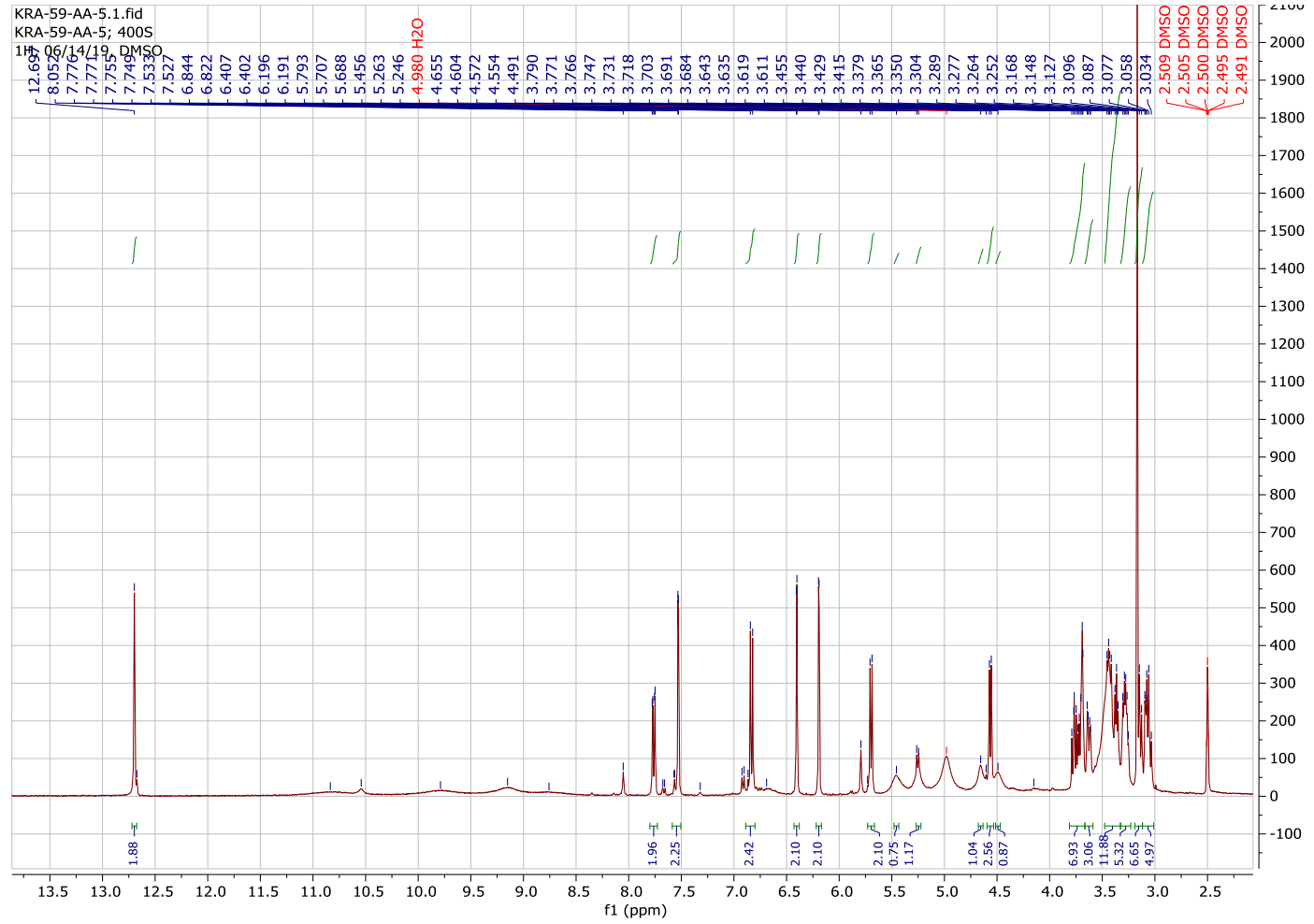
## Приложение Ж 5

COSY ЯМР спектр 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид



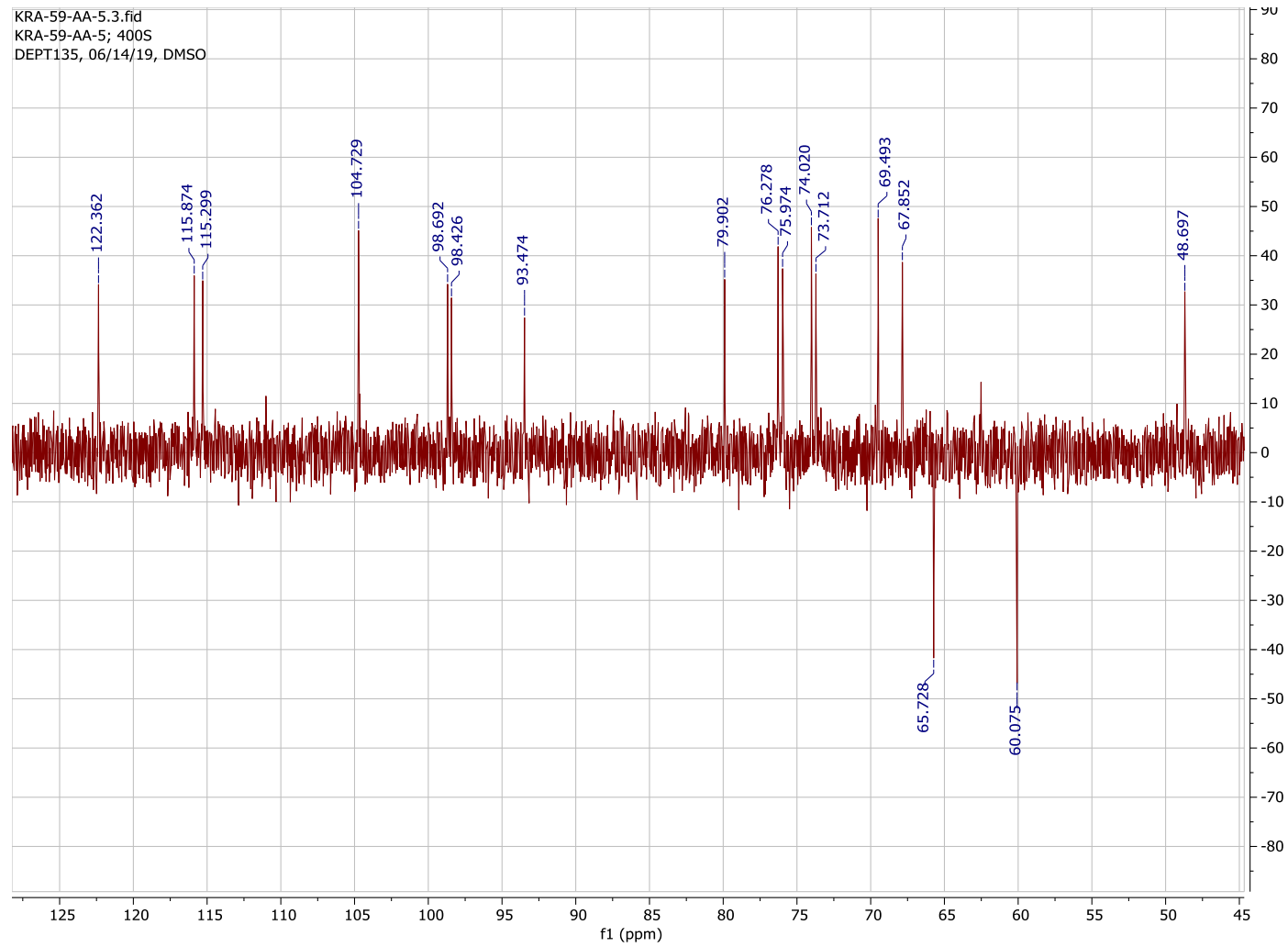
# Приложение Ж 6

## $^1\text{H}$ ЯМР спектр кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид



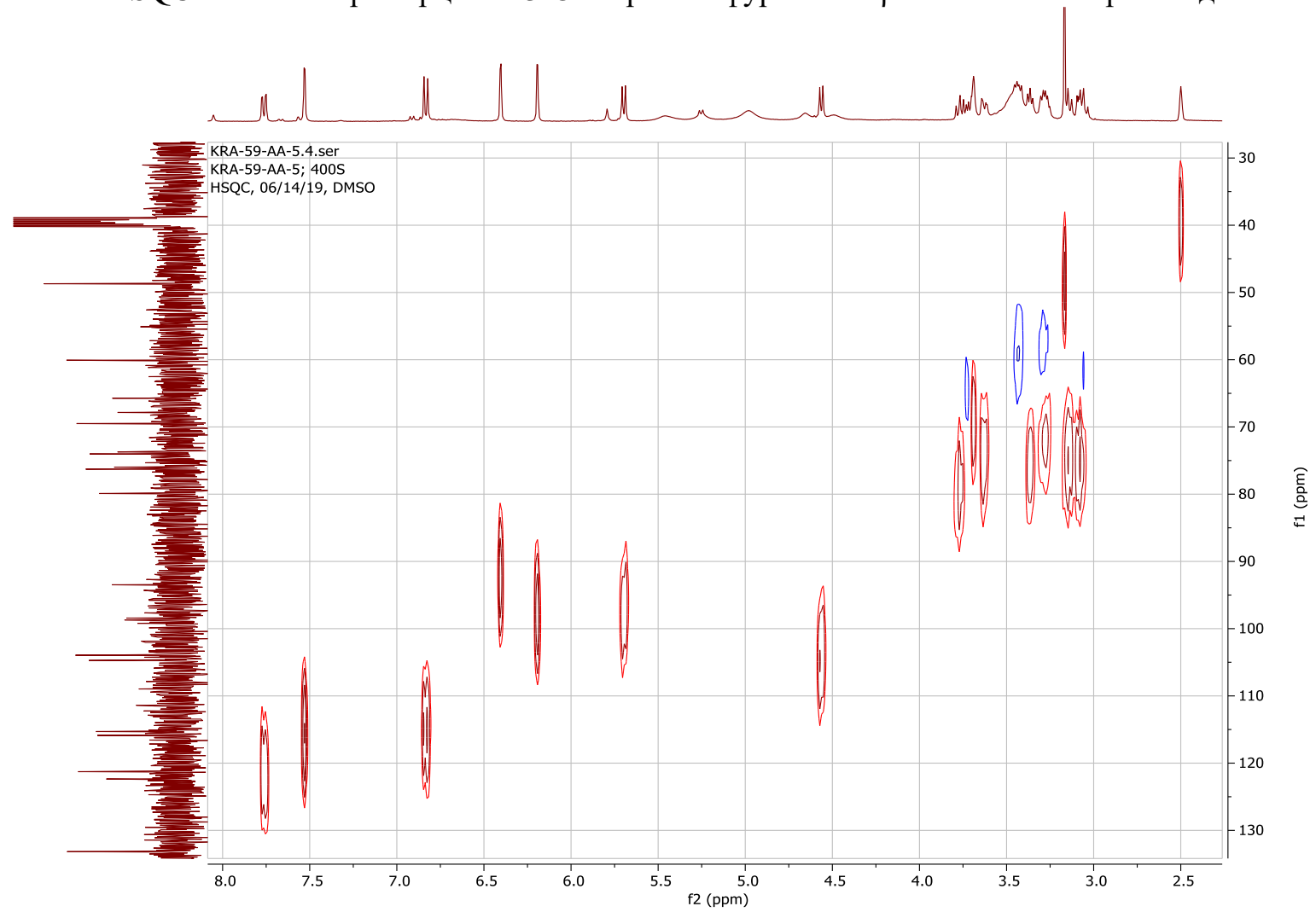
## Приложение Ж 7

### DEPT 135 ЯМР спектр кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид



## Приложение Ж 8

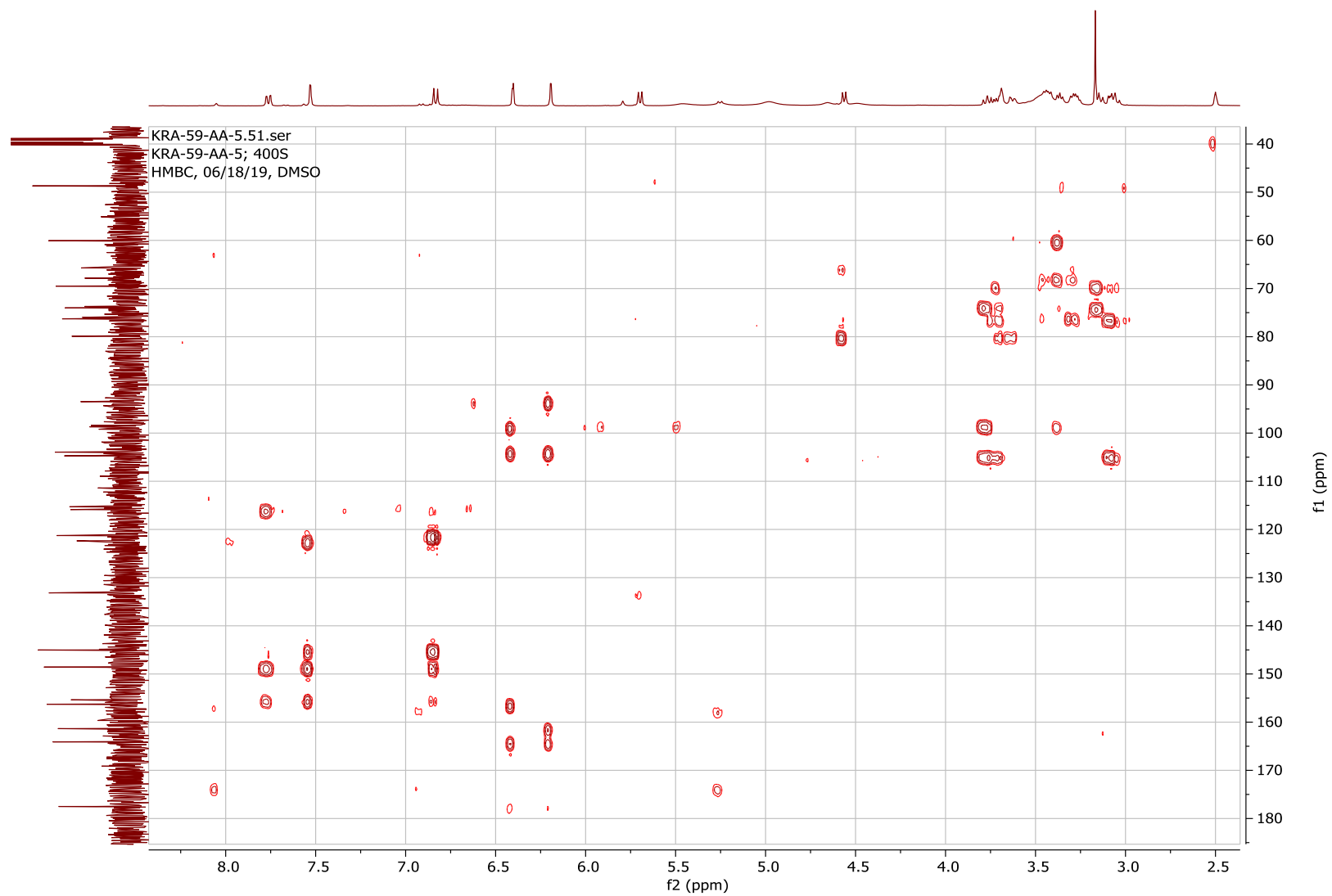
HSQC ЯМР спектр кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид





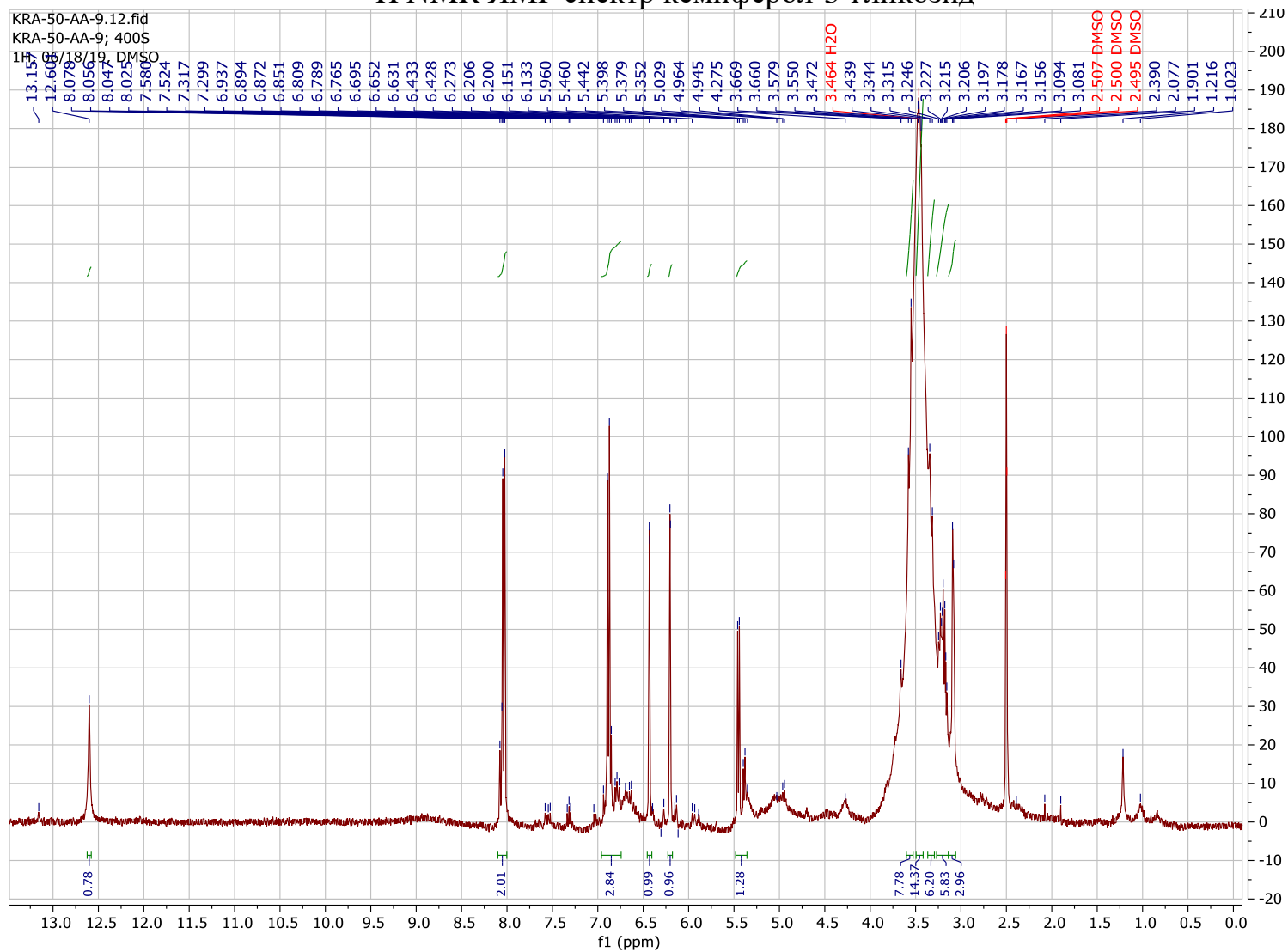
## Приложение Ж 9

HMBC ЯМР спектр кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид



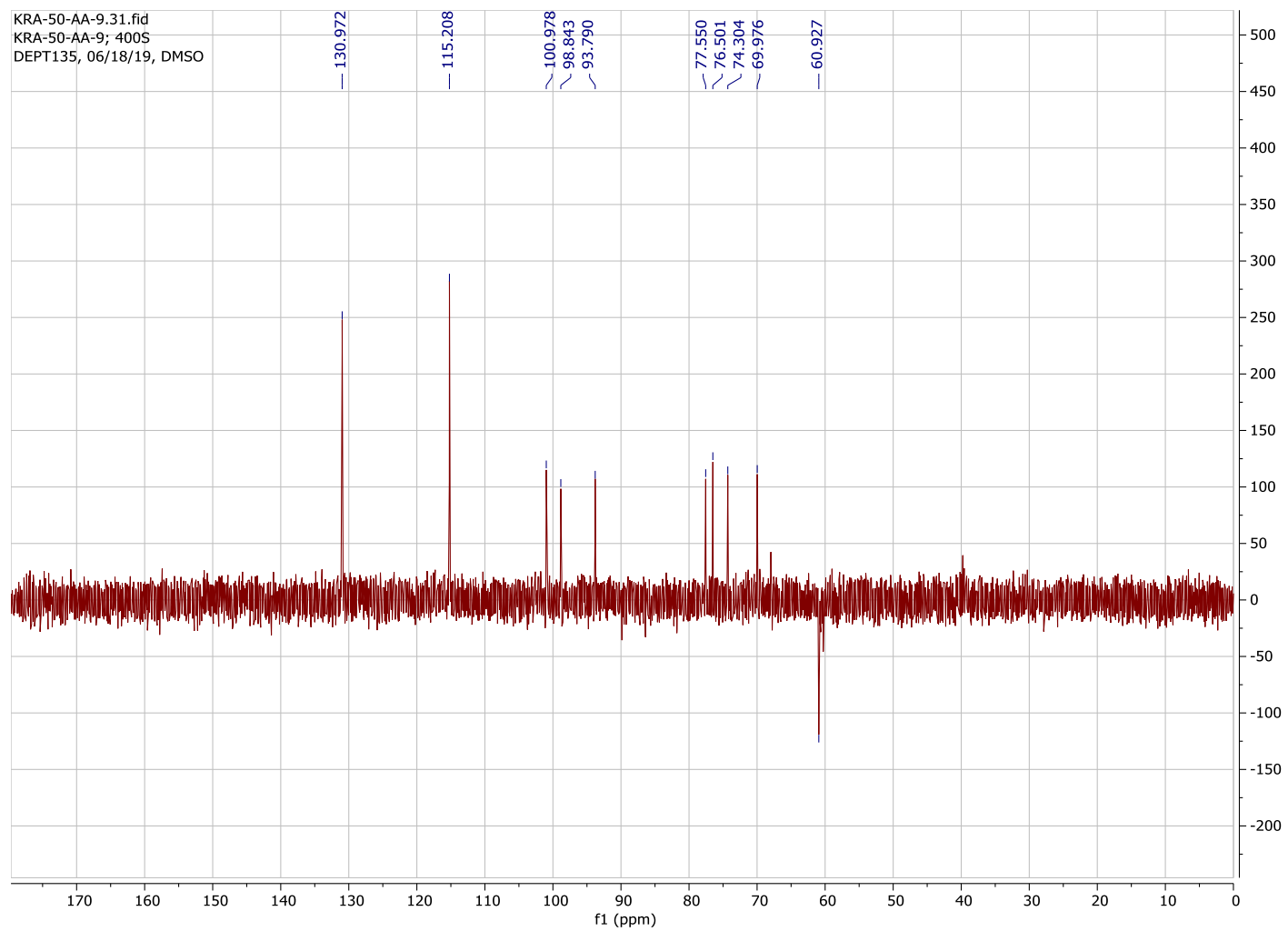
# Приложение Ж 10

## $^1\text{H}$ NMR ЯМР спектр кемпферол-3-гликозид



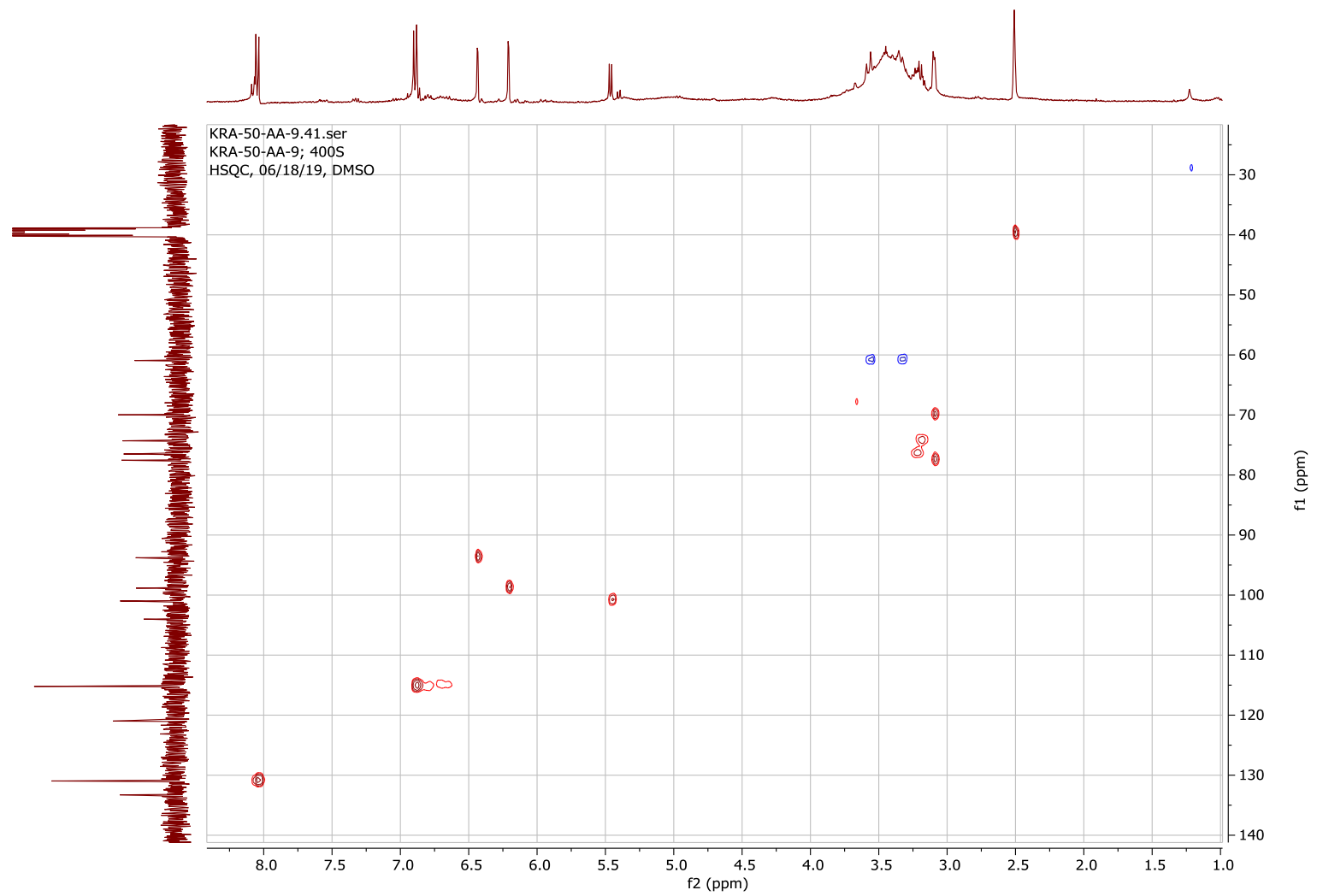
# Приложение Ж 11

## DEPT 135 ЯМР спектр кемпферол-3-гликозид



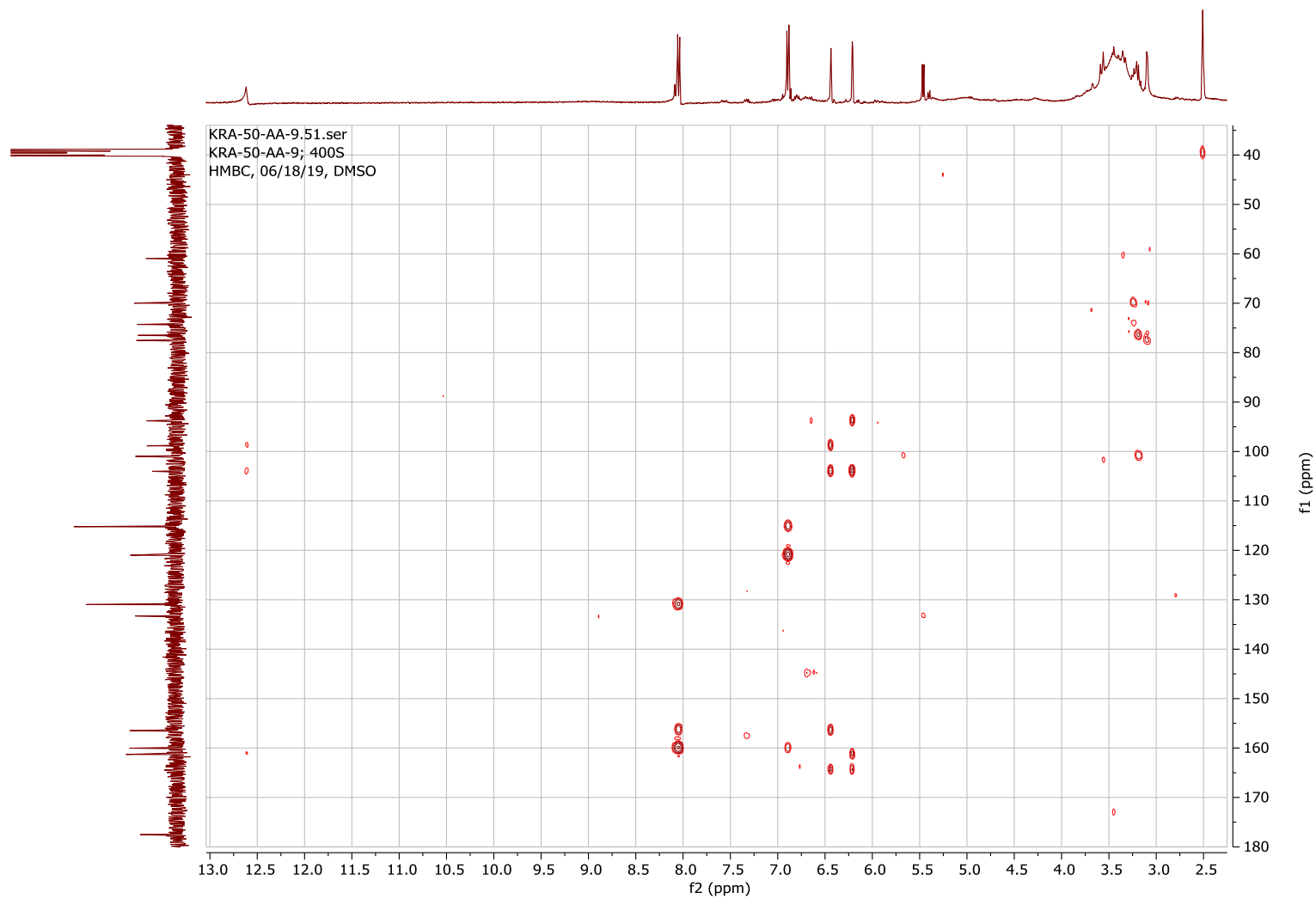
# Приложение Ж 12

## HSQC ЯМР спектр кемпферол-3-гликозид



# Приложение Ж 13

## HMBC ЯМР спектр кемпферол-3-гликозид



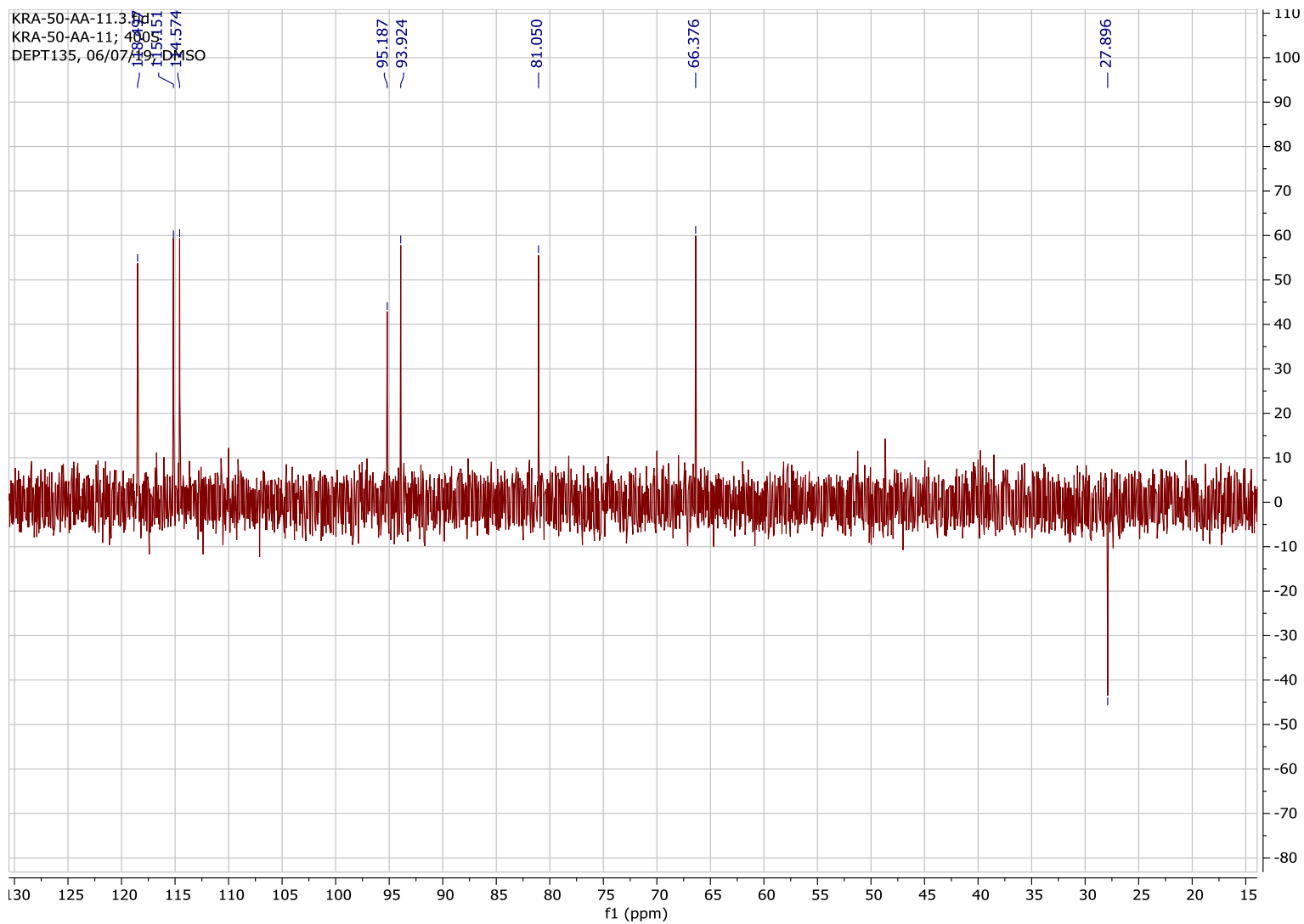
# Приложение Ж 14

## $^1\text{H}$ ЯМР спектр катехина



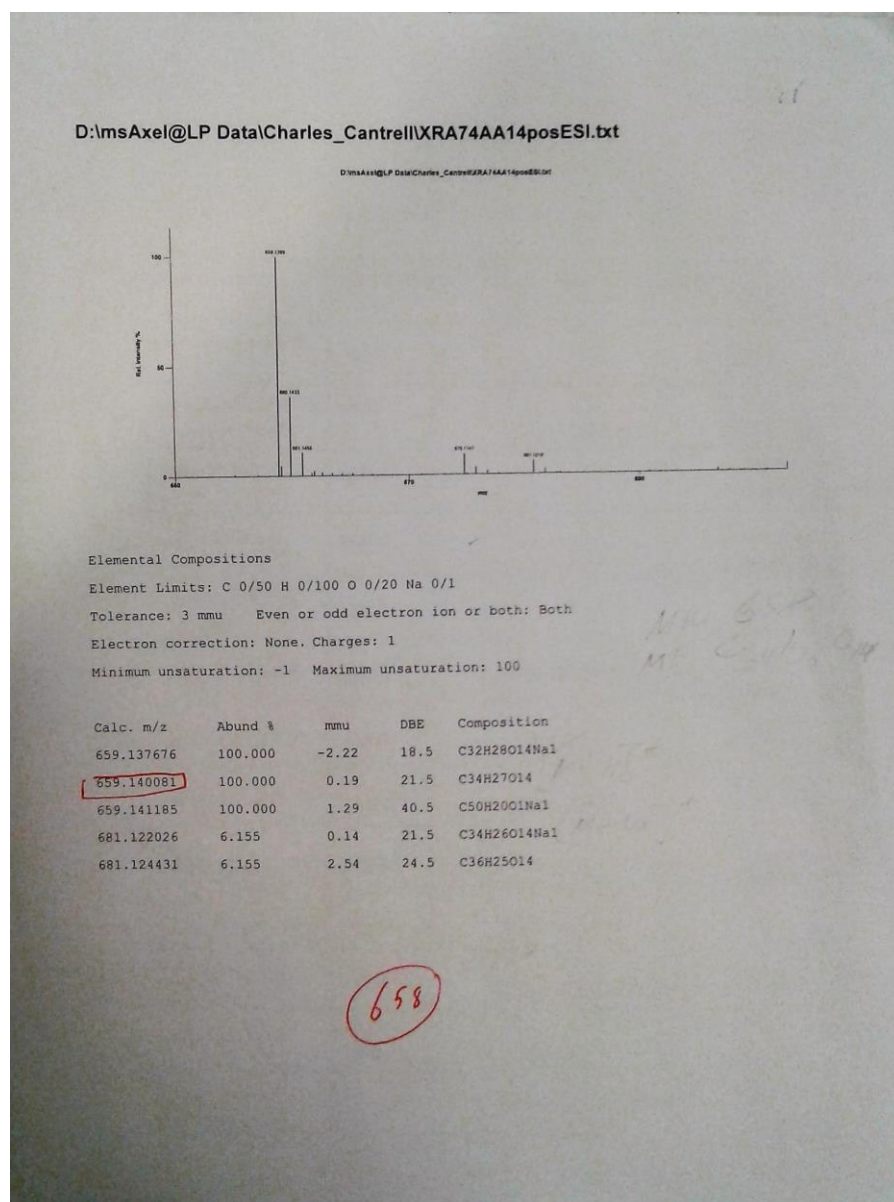
# Приложение Ж 15

## DEPT 135 ЯМР спектр катехина



# Приложение 3 1

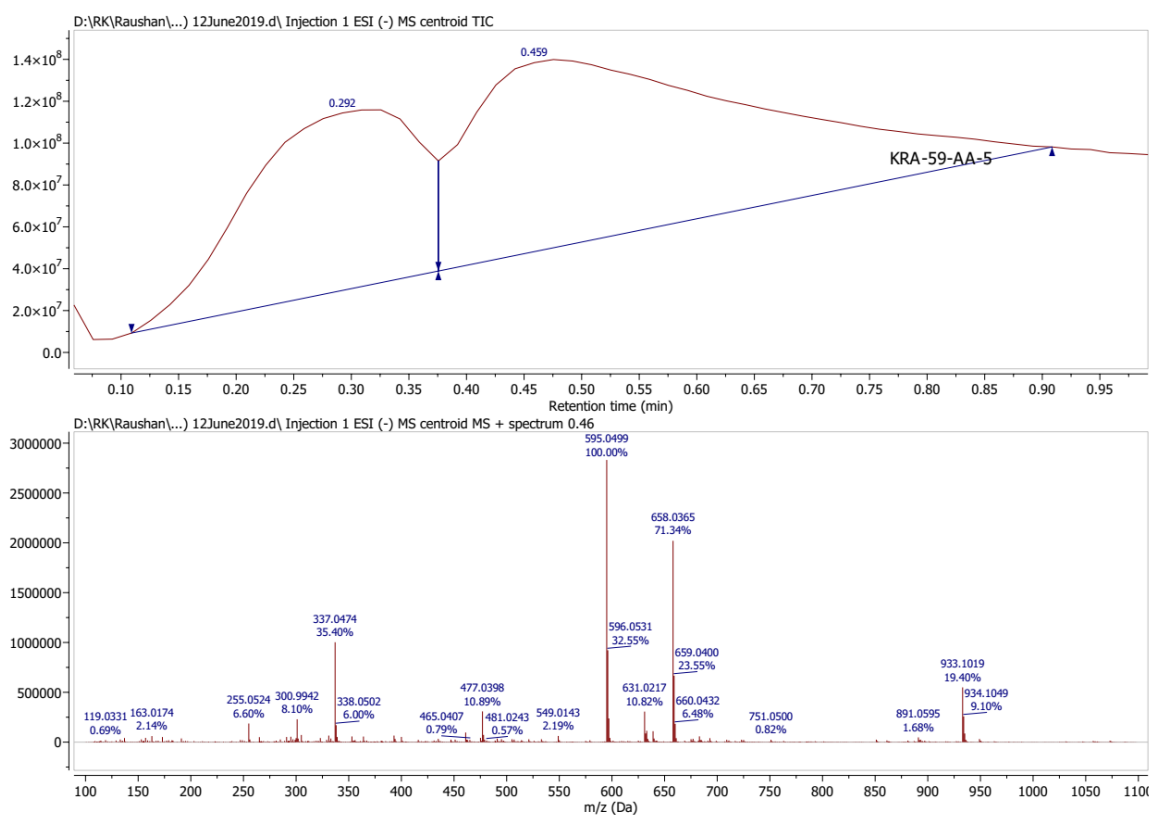
ЖХ МС спектры 3-О-кемпферол-2,3-ди-О-ацетил-4-О- (цис-п-кумароил) -6-О- (транс-п-кумароил) - $\beta$ -D-глюкозопиранозид





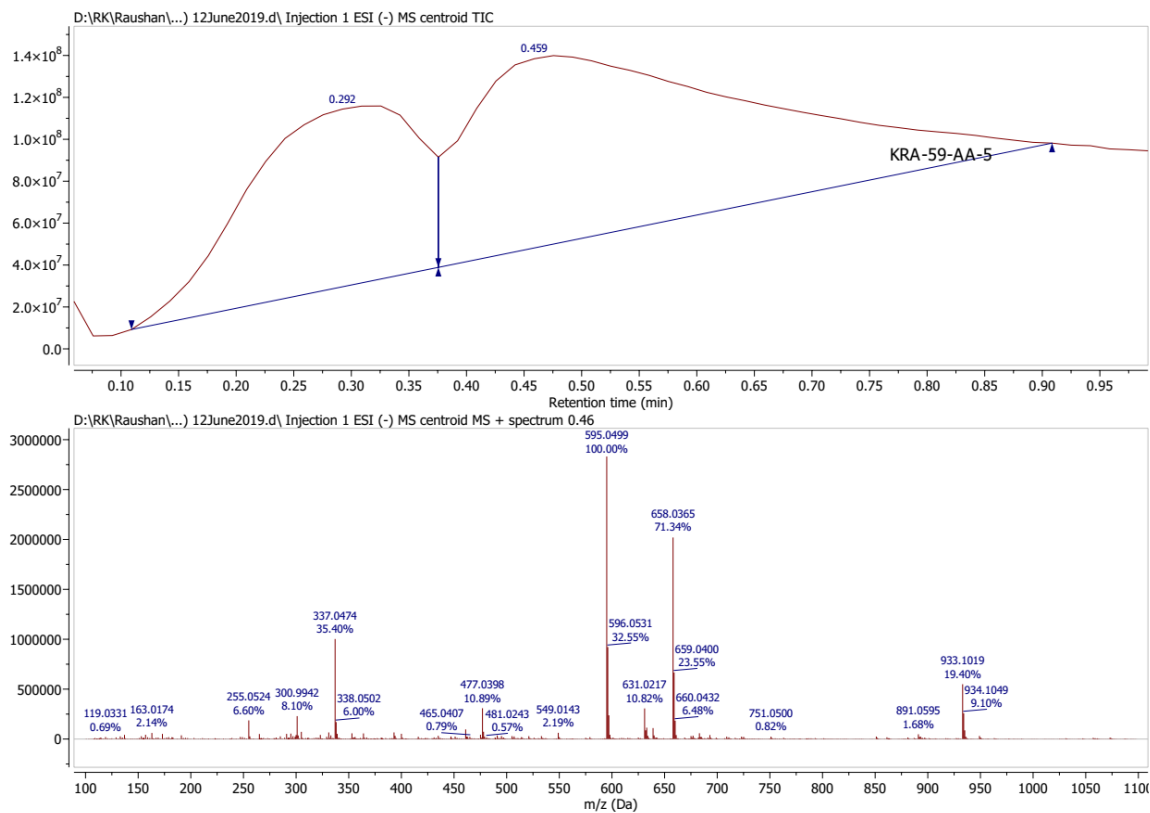
## Приложение 3 2

### ЖХ МС спектры кверцетин-3-О- $\alpha$ -арабинофуранозил- $\beta$ -D-галактозопиранозид



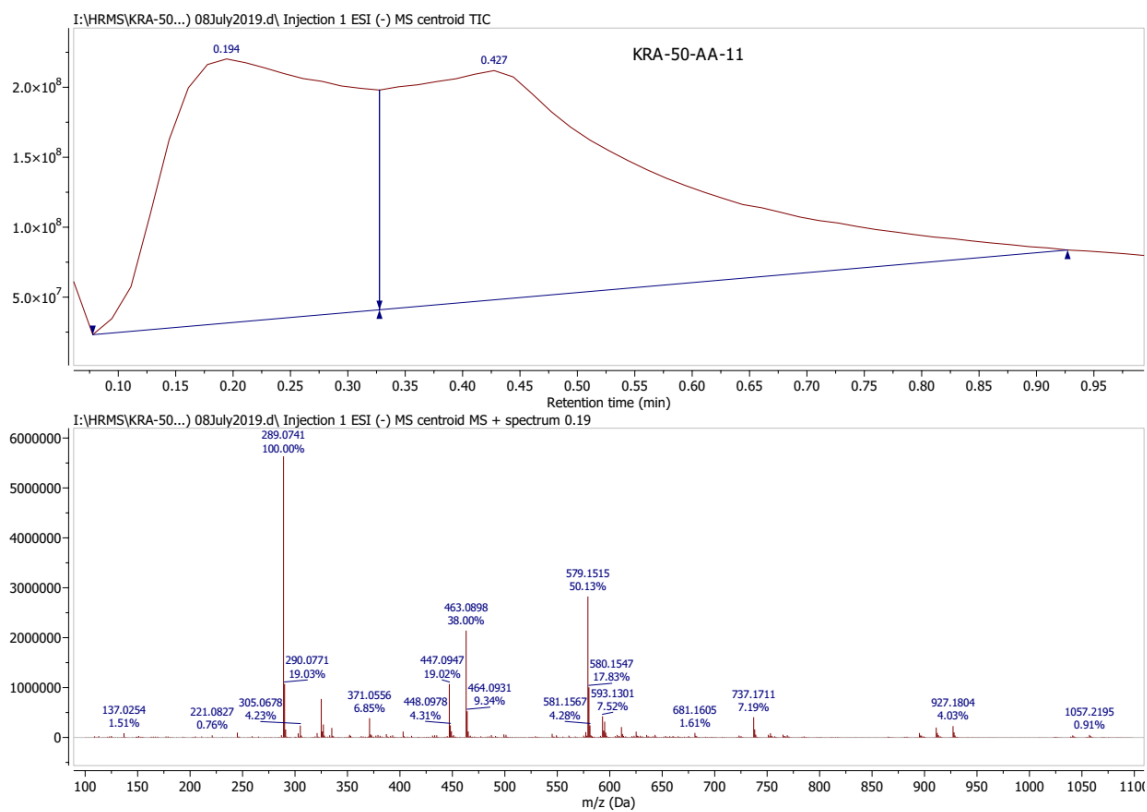
# Приложение 3 3

## ЖХ МС спектры кемпферол-3-гликозид



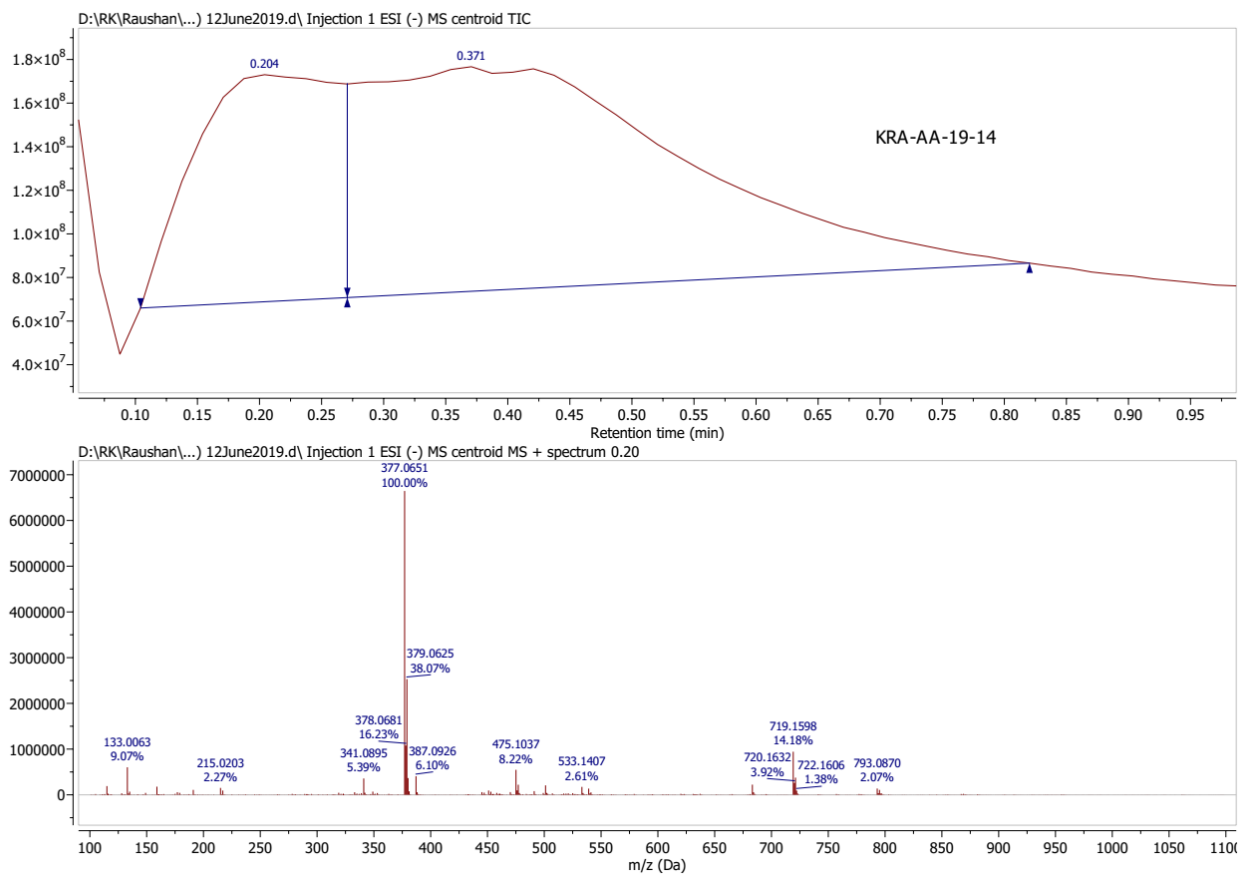
# Приложение 3 4

## ЖХ МС спектры катехина




# Приложение 3 5

## ЖХ МС спектры сахарозы



## Приложение И

Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78) от 30.01.2019 г

	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>		
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78)	Редакция: 1 Страница 1 из 7

### ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА

Заседания № 1 (78)

Локальная этическая комиссия (ЛЭК)  
АО «Национальный медицинский университет»

Дата заседания: 30 января 2019 года.

Присутствовали:


**Заместитель председателя: Жусупов Б.С.** - проректор по исследовательской деятельности

**Секретарь:** Тажиева А.Е.

**Члены Локальной Этической Комиссии (ЛЭК):**

1. **Балмуханова А.В.** - д.м.н., профессор, руководитель департамента науки и инноваций
2. **Айтхожин Г.К.** – д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней №3;
3. **Супнев Т. К.** - д.м.н., профессор кафедры «Стоматология детского возраста»;
4. **Устенова Г.О.** - д. фарм.н., зав. кафедры «Технология лекарств и инженерных дисциплин»;
5. **Рахимов К.Д.** – д.м.н., профессор, академик НАН РК, заведующий кафедрой Клинической фармакологии;
6. **Салиев Т.М.** - директор Научно-исследовательского института фундаментальной медицины им. Б.А. Атчабарова;
7. **Аймаханова А.Ш.** - канд. физ.-мат. наук, и.о. заведующего кафедрой «Биостатистика и основы научного исследования»;
8. **Батырбаева Д.Ж.** - к.м.н., заведующая научной клинико-диагностической лабораторией НИИФМ им. Б. Атчабарова;
9. **Сатбаева Э.М.** - к.м.н., ассоциированный профессор, заведующая кафедрой «Фармакология», директор центра экспериментальной фармакологии НИИ ФМ им. Б. Атчабарова;
10. **Нысанова Б.Ж.** – к.м.н., доцент кафедры ортопедической стоматологии;
11. **Касенов Б.Ж.** - к.м.н., доцент кафедры «Патологическая физиология»;
12. **Сейталиева А.М.** – к.м.н., доцент кафедры фармакологии;
13. **Фахрадиев И.Р.** - заведующий лабораторией экспериментальной медицины Научно-исследовательского института фундаментальной медицины им. Б.А. Атчабарова, онколог, общий хирург, эндовидеохirurg, докторант кафедры "Клиническая анатомия и оперативная хирургия";
14. **Испаева Г.Б.** – д.ю.н., профессор кафедры медицинского права АО «Национальный медицинский университет»;
15. **Есжанова П.Р.** – к.х.н., ассоц. профессор кафедры «Технология и безопасность пищевых продуктов» НАО «КазНАУ» (неаффилированное лицо).

Число голосов, принадлежащим членам ЛЭК, принявшим участие в заседании по вопросам повестки дня - «10». Кворум для проведения заседания Комиссии имеется. Из 17 членов ЛЭК присутствуют 10. Заседание Комиссии признано правомочным принимать решения по всем вопросам повестки дня.

	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78)

#### ПОВЕСТКА ДНЯ

Дата: 30.01.2019г.

Рассмотрение материалов исследования: Заявка, регистрац. №671. Диссертационное исследование на соискание степени доктора PhD по специальности 6D110400- «Фармация» на тему: **«Стандартизация и перспективы разработки технологии получения новых фитопрепаратов на основе травы *Agrimonia asiatica*»**. Главный исследователь: Козыкеева Р.А. PhD докторант 2 года обучения. Научный консультант: д. фарм.наук., проф. Датхаев У.М.

#### Перечень документов, представленных на экспертизу:

1. Заявка с протоколом исследования;
2. Аннотация;
3. Сведения об исследователях (резюме).

На заседаниях ЛЭК от 28 ноября 2018 года (Протокол №12 (76)) и от 26 декабря 2018г. (Протокол №13 (77)) по рассматриваемой заявке было принято решение: отложить принятие решения до устранения замечаний с последующим рассмотрением материалов исследования на очередном заседании Локальной этической комиссии ввиду следующих замечаний экспертов:

#### Эксперт № 1:

Виды доклинических исследований:


1. Токсикологические: острая/подострая; аллергенность.
2. Общие фармакологические;
3. Специфические фармакологические (анальгетическая и противовоспалительная активности);
4. Фармакокинетические;
5. Биохимические и патоморфологические исследования.

Научная новизна работы заключается в том, что диссертант впервые планирует провести стандартизацию и разработать технологию получения новых фитопрепаратов на основе травы *Agrimonia asiatica*, произрастающего на юге Казахстана. На основании результатов исследований предполагается разработать новый фитопрепарат. Доклинические исследования безопасности ЛС имеют цель установить характер и выраженность их повреждающего действия на организм экспериментальных животных и оценка его безопасности. Выбор экспериментальных моделей основан на правилах проведения медико-биологических экспериментов, доклинических (неклинических) и клинических исследований (Приказ МЗРК от 12 ноября 2009 года № 697, зарегистрирован в Министерстве Юстиции РК 26 ноября 2009 года 5932).

**Заключение эксперта:** Рекомендовать к одобрению проведения исследования без повторного обсуждения.


#### Эксперт № 2:

Цель и задачи исследования: Стандартизация экстракта *Agrimonia asiatica* и разработка технологии получения новых фитопрепаратов. Задачи научно-исследовательской работы: 1) Провести фитохимический анализ экстракта надземной части Репешка азиатского 2) Выявить острую и хроническую токсичности экстракта надземной части Репешка азиатского 3) Провести экспериментальные фармакологические испытания экстракта надземной части Репешка азиатского 4) Стандартизировать экстракт надземной части Репешка

	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78)
		Редакция: 1 Страница 3 из 7

азиатского 5) Разработать новый фитопрепарат. Определить острую, подострую фитосубстанций; Определить алергизирующее действие. Специальная фармакологическая активность (анальгетической и местноанестезирующей активности). Фармакокинетические исследования. Методы исследования: Оценка острой токсичности будет проведена на 20 белых беспородных белых мышах (масса 18-25 г.), которые будут разделены на 4 групп по 5 особей. Препарат будет введен однократно, перорально. Количество фармакологического вещества получаемого животными за один прием, рассчитывают на единицу массы тела животного в пересчете на действующее вещество. Все препараты будут вводятся перорально в виде суспензии в воде очищенной в дозах: 500, 2000, 5000 мг/кг. Оценка подострой токсичности будет проведена в течение 3-4 недель на 20 белых беспородных белых мышах (масса 18-25 г.), которые будут разделены на 4 групп по 5 особей. Препарат будет введен однократно, перорально. Количество фармакологического вещества получаемого животными за один прием, рассчитывают на единицу массы тела животного в пересчете на действующее вещество. Все препараты будут вводятся перорально в виде суспензии в воде очищенной в дозах: 500, 2000, 5000 мг/кг. Определение алергизирующего действия проводится реакцией гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах. Мышей сенсибилизируют однократно путем внутрикожного введения в основание хвоста 60 мкл эмульсии препарата в ПАФ — дозы, эквивалентной 10 мМ раствору в ПАФ в соотношении 1:1. Для выявления сенсибилизации через 5 сут мышам в подушечку задней лапы вводят 40 мкл 10 мМ раствора тест-препарата в растворе Хенкса. Через 6–22–24 ч после тестирования измеряют величину отека с помощью инженерного микрометра МК-0-25. Разница в толщине обеих лапок характеризует величину отека, по которой можно судить об интенсивности реакции ГЗТ.

*Методы оценки аналгетического действия. Формалиновый тест.* Эксперименты проводят на крысах. Острую воспалительную реакцию вызывают субплантарным (под подошвенный апоневроз) или подкожным введением формалина (50 мкл). Регистрируют число болевых реакций (постукивание лапой об пол, грызение лапы и т.д.) в первые 5–10 мин - I фаза и с 30 по 50 минуту — II фаза. Критерием аналгетического эффекта считают достоверное уменьшение числа болевых реакций в получавших ЛС группе относительно контрольной группы. Оценка сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для аналгетиков. Метод оценки влияния на моторику желудочно-кишечного тракта. В исследованиях на мышах оценивают скорость продвижения активированного угля по кишечнику животных в сравнении с контрольной группой и группой, получившей препарат сравнения. Критерием снижения моторной деятельности ЖКТ считают достоверное уменьшение времени выхода активированного угля. Изучение механизма действия нового аналгетика. Оценка способности антагонистов опиоидных рецепторов блокировать аналгетическое действие веществ. Оценку опиоидного компонента механизма обезболивающего действия изучаемых веществ проводят с помощью анализаторов опиоидергической и каннабиноидергической систем. Тестирование болевой чувствительности по одному или двум методам оценки аналгетической активности проводят на фоне совместного введения испытуемого вещества и блокаторов разных подтипов рецепторов. Для этой цели можно использовать: налоксон (1 мг/кг, подкожно) — неселективный антагонист опиоидных рецепторов; налтриндол (5 мг/кг, подкожно) — антагонист  $\delta$ -опиоидных рецепторов. Изучение противовоспалительной активности препарата. Исследование проводится на крысах-самцах линии Wistar массой 160-220 г. Животные разделяют на 7 групп: интактная, контрольная и 5 опытных. Интактной группе (10 крыс) внутривенно вводится 2 мл изотонического раствора без индукции воспаления. Контрольной группе (10 крыс) индуцируют воспаление без фармакологической коррекции. В 5 опытных группах по 10 крыс в каждой исследуют противовоспалительное действие следующих препаратов: ацетилсалициловая кислота (группа 1), диклофенак (группа


	<b>«УЛТЫҢ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТИ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78)

2), гипоксен (группа 3), метапрот (группа 4) и гесперидин (группа 5) на фоне каррагинин-индуцированного воспаления. **Рекомендации эксперта по протоколу исследования:** Сроки выполнения работы необходимо изменить (в протоколе указано – март 2018г, в аннотации – сентябрь 2017г. Возможно работа уже сделана?) **Ответ заявителя:** Планируемые сроки проведения исследования - 01.01.2019 – 07.09.2019. **Рекомендации эксперта по протоколу исследования:** В аннотации диссертационной работы задачами исследования являются изучение острой, подострой и хронической токсичности, здесь же описаны методы их изучения, а в протоколе исследования - описаны только острая и подострая токсичность. Необходимо уточнить, будут ли проводиться исследования по хронической токсичности (предполагается длительный эксперимент – от 1-го до 12 мес), если нет, то необходимо откорректировать задачи исследования. Протокол исследования должен соответствовать цели и задачам диссертационной работы, изложенной в аннотации. **Ответ заявителя:** задачи научно-исследовательской работы: 1) Выявить острую, подострую и хроническую токсичности экстракта надземной части Репешка азиатского 2) Провести экспериментальные фармакологические испытания экстракта надземной части Репешка азиатского. **Рекомендации эксперта по протоколу исследования:** В описании методики анальгезирующего действия даны два варианта его изучения – «формалиновый тест» и «оценка способности антагонистов опиоидных рецепторов блокировать анальгетической действие веществ». Будут ли оба метода проводиться? Второй метод достаточно сложный и предполагает применение антагонистов наркотических анальгетиков – налоксон и налтрексон. Доступа к этим препаратам в НИИ им. Б. Атчабарова нет, также как и возможности проводить такие исследования. Складывается впечатление, что докторант не имеет адекватного представления о планируемых исследованиях. Планируемые фармакологические исследования достаточно сложные, самостоятельно проведение этих исследований ставит под сомнение их достоверность полученных результатов. В связи с этим, необходимо решить вопрос, кто будет проводить эти исследования, возможно нужен консультант, владеющий методами экспериментальных работ с животными. **Ответ заявителя:** Удалила второй метод изучения анальгезирующего действия. **Рекомендации эксперта по протоколу исследования:** В описании метода изучения противовоспалительного действия приведен метод карагининового отека. При этом планируется 5 групп животных для изучения действия 5-ти веществ – ацетилсалициловая кислота, диклофенак, гипоксен, метапрот и гесперидин. Среди них нет испытуемого вещества, последние 3 – не обладают противовоспалительным действием. Какой смысл проводить эти исследования, определять противовоспалительный эффект веществ, которые не являются объектом диссертационного исследования? Кроме того, в задачах исследования не указано изучение противовоспалительного действия. **Ответ заявителя:** Изучение противовоспалительной активности препарата. Исследование проводится на крысах-самцах линии Wistar массой 160-220 г. Животные разделяют на 7 групп: интактная, контрольная и 5 опытных. Интактной группе (10 крыс) внутривенно вводится 2 мл изотонического раствора без индукции воспаления. Контрольной группе (10 крыс) индуцируют воспаление без фармакологической коррекции. В 5 опытных группах по 10 крыс в каждой исследуют противовоспалительное действие следующих препаратов: ацетилсалициловая кислота (группа 1), диклофенак (группа 2), экстракт репешка азиатского (группа 3) на фоне каррагинин-индуцированного воспаления. Все исследуемые препараты вводятся внутривенно в дозах: ацетилсалициловая кислота - 100 мг/ кг, диклофенак - 8 мг/кг, экстракт репешка азиатского - 50 мг/кг за час до индукции воспаления. Во всех группах измеряют объем задней левой конечности дважды - до индукции воспаления и спустя 3 часа после индукции воспаления и рассчитывают прирост объема конечностей. В интактной группе воспаление не индуцируют. Острую воспалительную реакцию вызывают путем




	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78)
		Редакция: 1 Страница 5 из 7

субплантарного введения 0,1 мл 1% раствора каррагинина в виде водного раствора в левую заднюю лапу крысы. После этого осуществляют забор крови у крыс всех 7 групп для последующего анализа и расчета индекса противовоспалительной активности. Подсчет общего числа лейкоцитов проводится стандартным методом в камере Горяева. **Рекомендации эксперта по протоколу исследования:** В протоколе исследования в разделе «задачи исследования» указано изучение местноанестезирующей активности и фармакокинетических исследований, но в разделе «методы исследования» нет упоминания и описания методик. **Ответ заявителя:** Удалила местноанестезирующей активности и фармакокинетических исследований. **Рекомендации эксперта по протоколу исследования:** Требуется четкое обоснование количества животных в разделе «методы исследования» и Форме В-6. **Ответ заявителя:** Общее количество – мыши – 40 шт., крысы – 20 шт. **Рекомендации эксперта по протоколу исследования:** В работе предполагается проведение гистологических исследований органов животных, в связи с этим необходимо указать методы эвтаназии животных. **Ответ заявителя:** Эвтаназия животных не производится в помещении, где присутствуют или содержатся другие животные. Эвтаназия будет проводиться методом передозировки наркотических средств – введением препарата в летальной дозе (Фторотан). Фторотан (Phthorothanum) -мощное наркотическое вещество: в 4-5 раз сильнее эфира, в 50 раз сильнее закиси азота. Тем не менее, наряду с выраженным наркотическим действием, фторотан практически не обладает анальгетическими свойствами. Вводят в наркоз постепенно повышая концентрацию фторотана до 1-2 об.%, а затем снижают до 0,5-1,5 об.%. Введение в наркоз происходит значительно легче, стадия возбуждения практически не выражена, рвота возникает редко. Фторотан не взрывоопасен, позволяет использовать большие объемы кислорода, что положительно отражается на состоянии организма, обеспечивает хорошую релаксацию мышц, подавляет секрецию слюнных и бронхиальных желез. **Рекомендации и замечания эксперта по протоколу исследования:** Докторант не имеет представления о планируемых исследованиях, протокол составлен небрежно, многие пункты протокола не освещены. Задачи не соответствуют методам исследования, протокол исследования не соответствует аннотации, в аннотации приведены одни методики, в протоколе другие. В описании методов исследования указаны ссылки, которых нет в списке литературы. Создается впечатление, что были взяты отдельные фрагменты чужих работ и включены в протокол. В связи с этим настоятельно рекомендуется пересмотреть протокол исследования, привести его в соответствие с целями и задачами исследования. Подавать заявку на рассмотрение в ЛЭК только после тщательной проверки научного руководителя! В методике изучения противовоспалительного действия необходимо исключить их контрольной группы ацетилсалициловую кислоту, т.к. она обладает минимальным противовоспалительным действием и в настоящее время не применяется как противовоспалительный препарат (используется больше как антиагрегант). В описании распределения животных по группам почему вы указываете 5 опытных групп, если в описании вы пишете, что 1 группа - аспирин, 2 - диклофенак и 3 – экстракт репешка? У вас получается только одна опытная группа и одна контрольная, т.к. аспирин надо исключить. В конце у вас получается вообще 7 групп. После этого осуществляют забор крови у крыс всех 7 групп для последующего анализа и расчета индекса противовоспалительной активности. **Ответ заявителя:** *Изучение противовоспалительной активности препарата.* Исследование проводится на крысах-самцах линии Wistar массой 160-220 г. Животные разделяют на 4 группы: интактная, контрольная и 2 опытных. Интактной группе (10 крыс) внутривенно вводится 2 мл изотонического раствора без индукции воспаления. Контрольной группе (10 крыс) индуцируют воспаление без фармакологической коррекции. В 2 опытных группах по 10 крыс в каждой исследуют противовоспалительное действие следующих препаратов: диклофенак (группа 1), экстракт

	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78)
		Редакция: 1 Страница 6 из 7

репешка азиатского (группа 2) на фоне каррагенин-индуцированного воспаления. Все исследуемые препараты вводятся внутривенно в дозах: диклофенак - 8 мг/кг, экстракт репешка азиатского - 50 мг/кг за час до индукции воспаления. Во всех группах измеряют объем задней левой конечности дважды - до индукции воспаления и спустя 3 часа после индукции воспаления и рассчитывают прирост объема конечностей. В интактной группе воспаление не индуцируют. Острую воспалительную реакцию вызывают путем субплантарного введения 0,1 мл 1% раствора каррагенина в виде водного раствора в левую заднюю лапу крысы. После этого осуществляют забор крови у крыс всех 4 групп для последующего анализа и расчета индекса противовоспалительной активности. Подсчет общего числа лейкоцитов проводится стандартным методом в камере Горяева. **Замечания эксперта:** В таблице 3 (Продолжительность введения фармакологического вещества в хроническом токсикологическом исследовании) вы указываете срок 1 месяц, и в подострой токсичности у вас те же сроки - 4 недели. Хроническая токсичность должна быть не менее 3 месяцев. **Ответ заявителя:** Длительность клинических исследований: до 3 месяцев. Минимальная длительность исследований токсичности многократной дозы (грызуны). Фаза I/II - 3 месяца/ 3 месяца. Фаза III - 3 месяца. **Замечания эксперта:** Методы эвтаназии. Здесь вы указываете метод передозировки фторотаном, но этот препарат применяется только в клиниках, т.к. вводится через наркозный аппарат и для животных сейчас не применяется. Тем более НИИ Атчабарова не имеет лицензии на его закуп и использование. Для этого нужно специальное разрешение и обученный персонал. Где вы собирались его взять и каким образом давать животным? **Ответ заявителя:** Выберу другой метод эвтаназии: Отравление эфиром для наркоза (этиловый или диэтиловый эфир). Подача эфирно-кислородной смеси начинают с 1-2 об.% и постепенно увеличивают до 10-20 об.%. **Замечания эксперта:** У вас спиртовой экстракт репешка, но спирт сам по себе может оказать токсическое действие. Необходимо выпаривание спирта и приготовление из него либо раствора, либо суспензии (если он не растворим в воде). **Ответ заявителя:** Спирт отгоняли в роторно-испарительном аппарате. Будем готовить из него раствор, он хорошо растворим в очищенной (*aqua purificata*) воде. **Замечания эксперта:** Еще раз пересчитайте количество животных, с учетом внесенных изменений. Заполните Форму Б-6 - Лабораторные животные и условия их содержания. **Ответ заявителя:** Форма В-6. Лабораторные животные и условия их содержания: Вид - мыши, крысы. Порода - беспородные. Пол - обоих полов, самцы. Масса тела - мыши - 18-25 г, крысы - 160 - 220 г. Общее количество - мыши - 60 шт., крысы - 30 шт. **Рекомендации эксперта:** Метод передозировки эфиром в настоящее время не рекомендуется, тем более вы описываете ингаляционное введение эфирно-кислородной смеси, что требует наличие специального оборудования, которым не располагает НИИ ФПМ им. Атчабарова и для его использования также необходима специальная лицензия. В связи с этим наиболее приемлемым в данной ситуации может быть метод цервикальной дислокации, который рекомендуется в соответствии с Европейской директивой 2010/63. **Ответ заявителя:** Цервикальная дислокация должно выполняться подготовленным персоналом. При эвтаназии мышцей и крыс, большой и указательный пальцы помещаются с обеих сторон шеи у основания черепа или накладывают металлический прут у основания черепа. Другой рукой делают рывок за основание хвоста или задних конечностей, производя отрыв позвоночника от черепа. Будем использовать этот метод эвтаназии. **Заключение эксперта:** Рекомендовано одобрить проведение исследование без повторного рассмотрения ЛЭК, при условии ответов на поставленные вопросы в рабочем порядке.

**Принятое решение:** Одобрить проведение исследования после устранения замечаний, без повторного рассмотрения ЛЭК.

	<b>«ЎЛТТИҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТИ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Локальная этическая комиссия (ЛЭК)	Выписка из протокола заседания ЛЭК №1 (78)

Редакция: 1  
Страница 7 из 7

Решение ЛЭК с рекомендациями экспертов по устранению замечаний было своевременно передано заявителю. Замечания устранены, ответы на вопросы экспертов предоставлены в полном объеме.

**ПОСТАНОВИЛИ:** Локальная этическая комиссия АО Национального медицинского университета считает представленные документы согласно рекомендациям экспертов ЛЭК соответствующими установленным этическим требованиям.

**РЕШЕНИЕ ЛЭК: ОДОБРИТЬ** проведение исследования: №671. Диссертационное исследование на соискание степени доктора PhD по специальности 6D110400- «Фармация» на тему: «Стандартизация и перспективы разработки технологии получения новых фитопрепаратов на основе травы *Agripomia asiatica*». Главный исследователь: Козыкеева Р.А. PhD докторант 2 года обучения. Научный консультант: д. фарм.наук., проф. Датхаев У.М.

Заключение об одобрении ЛЭК действует один год, с 30 января 2019 года по 30 января 2020 года. По истечении указанного срока необходимо представить в ЛЭК отчет о выполненной работе за год, не позднее 30 января 2020 года. Ответственность за представление в ЛЭК отчета по исследованию возлагается на главного исследователя Р.А. Козыкееву PhD докторанта 2 года обучения и ее научного консультанта д. фарм. наук., профессора У.М. Датхаева.

Зам. председателя ЛЭК

Секретарь ЛЭК

ҚОҒАМ РАСТАЙЫМЫН  
«ЎЛТТИҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТИ»  
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Б. Жусупов  
ВОЗВРАЩАЮЩИЙ  
Руководитель отдела документационного обеспечения  
АО «Национальный медицинский университет»  
А. Тажиева

# Приложение Й

## Акт внедрения в производство

АКТ ВНЕДРЕНИЯ №           

г. Алматы

« 14 » 03 2020

результатов PhD диссертационной работы Козыкеевой Р.А.

- 1) Наименование: разработка состава и технологии таблетки для рассасывания под условным названием «Агримол», внедрение результатов работы по теме диссертационной работы «Стандартизация и перспективы разработки технологии получения новых фитопрепаратов на основе травы *Agrimonia asiatica*» в производство ТОО «ВИВА ФАРМ», г.Алматы, Республики Казахстан.
- 2)Название организации: ТОО "ВИВА ФАРМ", Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Жарокова, 334.
- 3) Область применения: фармацевция, в области технологии лекарственных форм.
- 4) Основное содержание внедрения, разработанного в рамках PhD диссертационной работы:

Боль в горле одна из наиболее часто встречающихся жалоб на приеме врача общей практики.

Этот симптом может сопровождать большое количество патологических состояний, которых пациенты начинают лечить самостоятельно. Выбор лекарственных препаратов (ЛП) для лечения заболеваний, сопровождающихся болью в горле очень важен, т.к. несвоевременное и неадекватное лечение может привести к осложнениям.

Фармакологическое действие лекарственных препаратов зависит от вида растения и определяется содержанием в них биологически активных веществ: алкалоидов, гликозидов, фитонцидов, эфирных масел, кумаринов, дубильных веществ, смол. Изучение биологической активности наиболее широко представленных в природе флавоноидов показало, что для них характерно противоаллергическое, противовоспалительное, противовирусное, цитопротекторное и антиоксидантное действие. В основе их антиоксидантной активности лежит способность к хелатообразованию с солями железа и высокая способность к переносу электронов, что химически объясняется присутствием большого количества гидроксильных групп в молекуле. Противовоспалительное действие обусловлено способностью тормозить образование медиаторов воспаления — простагландинов и лейкотриенов. Они также принимают участие в активизации ряда типов клеток, в т.ч. базофилов, нейтрофилов, эозинофилов, Т- и В-лимфоцитов, макрофагов.

При кашле, возникающем при раздражении слизистой верхних отделов респираторного тракта, применяют обволакивающие средства, которые

действия. Действие их основано на создании защитного слоя для слизистой оболочки носа и ротоглотки. Обычно они представляют собой таблетки для рассасывания во рту или сиропы и чаи, содержащие растительные экстракты (эвкалипта, акации, лакрицы, дикой вишни и др.) и другие компоненты.

Терапевтическое действие рассасывающихся таблеток обусловлено тем, что за счет адсорбции слизистыми оболочками лекарственных веществ и их накопления в мягких тканях создается высокая концентрация действующего вещества, которая поддерживается в течение длительного времени и обеспечивает необходимый бактерицидный или бактериостатический эффект лекарственного препарата в местах локализации возбудителя. Таблетки не только быстро купируют симптомы возникающей патологии, но и останавливают прогрессирование воспалительного процесса, который и является причиной всей клинической картины болезни.

#### 5) Формы и методы внедрения:

Таблетки для рассасывания для лечения боли в горле содержат в качестве активного вещества экстракт сухой Репешка азиатского, вспомогательные вещества наполнитель – сорбитол, связывающее вещество – коллидон VA64, глидант – аэросил, подсластитель – сукролоза, корригент цвета – краситель ЖОЖ, корригент вкуса «Ароматизатор апельсин», антифрикционное вещество – стеарат кальция при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Экстракт Репешка азиатского сухой	6.25
Сорбитол	86.75
КоллидонAV64	5
Аэросил	0.2
Сукролоза	0.2
Краситель ЖОЖ	0.5
Ароматизатор«Апельсин»	0.5
Кальция стеарат	1

Определена концентрация активной субстанции на основании изучения противовоспалительного действия *in vivo* на крысу-самца линии Wistar методом формалинового отека, антиоксидантное и хелатирующее свойства изучены *in vitro* в трех модельных средах: нитрозил-радикал модельная среда (NO), супероксид-радикал модельная среда ( $O_2^{\cdot-}$ ),  $Fe^{2+}$  - хелатирующая модельная среда ( $Fe^{2+}$ ).

Объект	$O_2^{\cdot-}$ (%)	NO (%)	$Fe^{2+}$ хелатор (%)
Экстракт Репешка азиатского	13,2±0,314	15,6±0,494	22,1±0,04

Разработана технологическая схема получения таблеток для рассасывания с экстрактом Репешка азиатского.

Источники информации:

1. Р.А. Козыкеева, Д.И. Поздняков, А.К. Патсаев, А.В. Воронков «Антирадикальная активность некоторых лекарственных растений, применяемых в традиционной медицине Казахстана»//Материалы III международной научно-практической конференции «Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии: от молекулы к лекарству», г. Пятигорск, 16-17 ноября 2017 г.
2. Kozykeyeva R.A., Patsayev A.K., Datkhayev U.M. Chemical constituents of the *Agrimonia asiatica* extracts III Международная научно-практическая конференция «Наука и образование в современном мире: вызовы XXI века» 10-12 июля 2019 Нур-Султан, стр. 353-356
3. Kozykeyeva R.A., Patsayev A.K., Datkhayev U.M. Extractive substances from *Agrimonia Asiatica* Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine. – Vol.1, №4. – 2017. ISSN 2570-5911 (Print); ISSN 2570-5903 (On-Line) DOI: 10.29256/v.01.04.2017.escbm01-22 38 DOI: 10.29256/v.01.04.2017.escbm13/Přikop 838/6, Zábřovice, 60200 Brno, Česká republika, p.38-41
4. Козыкеева Р.А. Изучение микробиологической чистоты растения *Agrimonia asiatica*.Juz, Фармация Казахстана, №10 (220) ноябрь, 2019 стр. 37-39
5. R.A.Kozykeyeva, Vijayasankar Raman Datkhayev U.M., Patsayev A.K., Radhakrishnan Srivedavyasari, Ross S. Anotomo-morphological features of *Agrimonia Eupatoria* Subsp. *Asiatica* skalicky fruits//Фармация Казахстана, №9 (218) сентябрь, 2019, стр. 22-24
6. R.A.Kozykeyeva, A.K.Patsayev, B.K.Makhatov, K.K.Patsayeva Morphological and anatomical features of the *Agrimonia asiatica* herb//Вестник № 1 (78), 2017, ТОМ I. Сборник научных трудов международной научно-практической конференции «Инновационные достижения в современной фармации и медицине», 21-22 апреля 2017 года, г.Шымкент, Республика Казахстан.С.100-103.
7. Raushan A. Kozykeyeva Ubaidilla M. Datkhayev, Radhakrishnan Srivedavyasari, Temitayo O. Ajayi, Anapiya K. Patsayev, Raikhan A. Kozykeyeva, Samir A. Ross Isolation of Chemical Compounds and Essential Oil from *Agrimonia asiatica* Juz. and Their Antimicrobial and Antiplasmodial Activities// Hindawi, The Scientific World Journal Volume 2020, Article ID 7821310, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2020/7821310>
8. Kozykeyeva Raushan, Datkhayev Ubaidilla, Zhakipbekov Kairat, Patsayev Anapiya, Satbayeva Elmira, Seytalyieva Aida, Kapsalyamova Elmira, Mombekov Serzhan Flavonoid content and anti-inflammatory activity of *agrimonia asiatica* extract/ Ways of science development in modern crisis conditions: abstracts of the 1st International Scientific and Practical Internet Conference, May 28-29, 2020. – Dnipro, 2020. – P.1. – 608 p.
9. Государственная фармакопея XI издания, М.: Медицина, в. 2, 1990, 400с.

10. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства. Учебник для студ.высш.учеб.завед.в 2ч., ч 2./Чуешов В.И., Гладух Е.В., Сайко И.В. и др.-Винница: Нова Книга, 2014, 664 стр

11. Кони́чев, А.С. Традиционные и современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: перспективы, достоинства, недостатки / А.С. Кони́чев, П.В., Баурин // Вестник МГОУ. Серия естественные науки, 2011. - №3. - С.49-54.

12. Государственная фармакопея Республики Казахстан: в 1 т. – Алматы: Издательский дом «Жибекжолы», 2009. – т.2.

13. Патент на изобретения №33804 «Способ получения растительного средства, обладающего антиоксидантной и хелатирующей активностью» от 26.07.2019.

6) Эффективность внедрения: импортозамещение, создание конкурентноспособных отечественных брендов.

7) Охраноспособность объекта: Объект охраноспособен. Предполагается получение полезной модели.

Директор ТОО "ВИВА ФАРМ"

*А. Кунисбаев Т. М.*

Начальник производства

*Валентина Турмыбекова Т. М.*

Руководитель ОКК

*Валентина Турмыбекова Т. М.*



Протокол № 5

от «09» 03 2020