

Некоммерческое акционерное общество
«Медицинский университет Караганды»

УДК 615.453.64:635.74

На правах рукописи

ЛЕВАЯ ЯНА КОНСТАНТИНОВНА

**Фармацевтическая разработка готовой лекарственной формы на
основе биологически активных веществ шалфея степного**

6D074800 – «Технология фармацевтического производства»

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант
д.х.н., профессор Атажанова Г.А.
Зарубежный научный консультант
д.фарм.н., профессор Зилфикаров И.Н.

Республика Казахстан
Караганда 2023

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1.1 Характеристика шалфея как объекта исследований.....	13
1.1.1 Шалфей лекарственный <i>Salvia officinalis</i>	14
1.1.2 Шалфей степной <i>Salvia stepposa</i>	15
1.2 Химический состав растений рода <i>Salvia Lamiaceae</i>	15
1.2.1 Фенольные соединения шалфея.....	15
1.2.2 Дитерпеновые соединения шалфея.....	21
1.2.3 Тритерпеновые соединения шалфея.....	23
1.3 Традиционные методы извлечения биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья.....	25
1.3.1 Перспективы использование электромагнитного поля СВЧ и ультразвука для экстракции.....	26
1.3.1.1 Микроволновая экстракция.....	27
1.3.1.2 Ультразвуковая экстракция.....	29
1.4 Маркетинговый анализ фармацевтического рынка фитопрепаратов Республики Казахстан на основе шалфея.....	30
1.5 Технологии получения таблетированных лекарственных форм.....	31
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	39
2.1 Объекты и материалы исследования.....	39
2.1.1 Объекты исследования.....	39
2.1.2 Препараты сравнения.....	39
2.1.3 Описание тест-систем.....	39
2.1.4 Материалы и реактивы.....	40
2.2 Методы исследований.....	40
2.2.1 Подготовка сырья.....	40
2.2.2 Методы фармакогностического исследования растительного сырья <i>Salvia stepposa</i> Des.-Schost.....	40
2.2.3 Изучение фармацевтико-технологических параметров растительного сырья.....	41
2.2.4 Физические и физико-химические методы исследования.....	42
2.2.5 Методы контроля качества сухого экстракта листьев шалфея степного (МВШС-40).....	43
2.2.6 Методы доклинических (неклинических) исследований сухого экстракта листьев шалфея степного.....	44
2.2.7 Методы контроля качества таблеток на основе сухого экстракта листьев шалфея степного	48
3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТРАВЫ <i>SALVIA STEPPOSA</i>, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В КАРАГАНДИНСКОЙ ОБЛАСТИ.....	50

3.1	Сбор и краткое описание надземной части <i>Salvia stepposa</i> ...	50
3.2	Микро- и макроскопический анализ надземной части <i>Salvia stepposa</i>	51
3.3	Гистохимический анализ надземной части <i>Salvia stepposa</i> ...	59
3.4	Определение фармацевтико-технологических параметров <i>Salvia stepposa</i>	64
3.5	Разработка спецификации качества на растительное сырье <i>Salvia stepposa</i> ..	65
3.6	Исследования по определению срока хранения листьев шалфея степного (<i>Salvia stepposa</i>)	68
4	РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ <i>SALVIA STEPPOSA</i> И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ.....	73
4.1	Теоретическое обоснование технологии получения сухого экстракта <i>Salvia stepposa</i>	73
4.2	Подбор оптимального экстрагента.....	73
4.3	Выбор метода экстракции.....	74
4.4	Химический состав экстрактов и эфирного масла шалфея степного.....	77
4.5	Разработка технологии производства сухого экстракта листьев (МВШС-40)	85
4.6	Разработка спецификации качества сухого экстракта листьев шалфея степного (МВШС-40)	88
4.7	Изучение стабильности сухого экстракта МВШС-40.....	89
5	ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА МВШС-40 ИЗ ЛИСТЬЕВ <i>SALVIA STEPPOSA</i>.....	95
5.1	Исследование антимикробной активности экстрактов из травы <i>Salvia stepposa</i>	95
5.2	Исследование антиоксидантной активности сухого экстракта МВШС-40	101
5.3	Исследование антирадикальной активности сухого экстракта МВШС-40	102
5.4	Исследование противовоспалительной активности сухого экстракта МВШС-40.....	103
5.5	Исследование острой токсичности сухого экстракта МВШС-40	104
5.6	Гистоморфологическое исследования МВШС-40.....	106
5.7	Изучение цитотоксичности сухого экстракта МВШС-40.....	111
6	РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ШАЛФЕЯ СТЕПНОГО <i>SALVIA STEPPOSA</i> (МВШС-40).....	117
6.1	Обоснование выбора состава и вспомогательных веществ.....	117

6.2	Исследование критериев качества разработанных таблеток.....	119
6.3	Разработка технологической схемы, спецификации качества и установление сроков хранения таблеток для рассасывания на основе МВШС-40.....	123
6.4	Изучение стабильности таблеток для рассасывания на основе МВШС-40.....	126
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	134
	ПРИЛОЖЕНИЕ А – Заключение о видовой принадлежности растительного сырья.....	143
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Проект НД «Шалфей степной листья».....	144
	ПРИЛОЖЕНИЕ В – Лабораторный регламент на производство субстанции сухого экстракта листьев шалфея степного МВШС-40...	145
	ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Акт изучения антимикробной активности экстрактов шалфея степного.....	146
	ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Акт изучения антиоксидантной и антирадикальной активности экстрактов шалфея степного.....	147
	ПРИЛОЖЕНИЕ Е – Решение Комитета биоэтики.....	148
	ПРИЛОЖЕНИЕ Ж – Акт по изучению острой токсичности.....	149
	ПРИЛОЖЕНИЕ И – Акт изучения цитотоксичности.....	150
	ПРИЛОЖЕНИЕ К – Лабораторный регламент на производство таблеток Шалфей степной.....	151
	ПРИЛОЖЕНИЕ Л – Проект НД «Таблетки для рассасывания Шалфей степной».....	152
	ПРИЛОЖЕНИЕ М – Справка о наличии публикаций в базе данных Scopus.....	153

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ICH Q8(R2) «Pharmaceutical Development».

ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар

ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

ГОСТ Р 7.0.100-2018 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления»

ГОСТ 8.417-81. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин

Приказа Министра здравоохранения РК №ҚР ДСМ-11 от 27 января 2021 года «Об утверждении правил маркировки лекарственных средств и медицинских изделий»

Решение Совета Евразийской экономической комиссии №15 от 26 января 2018 г. "Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения"

Приказ Министра национальной экономики РК №ҚР ДСМ-19 от 16 февраля 2021 года «Об утверждении правил хранения и транспортировки лекарственных средств и медицинских изделий»

Приказ Министра здравоохранения РК от 16 февраля 2021 года №ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств»

Решение Совета Евразийской экономической комиссии №77 от 3 ноября 2016 г. "Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза"

Фармакопея ЕАЭС №100 от 11 августа 2020 года

Приказа Министра здравоохранения РК №ҚР ДСМ-165/2020 от 28 октября 2020г. «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств»

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии №169 от 07 декабря 2021 г. "Об утверждении Требований к исследованию стабильности растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного сырья) и лекарственных растительных препаратов)"

Приказа Министра здравоохранения РК №ҚР ДСМ-282 от 20 декабря 2020 года «Об утверждении правил проведения оценки качества лекарственных средств и медицинских изделий, зарегистрированных в Республике Казахстан»

Указ Президента РК от 1 августа 2014 года № 874 «Об утверждении Государственной программы индустриально-инновационного развития Республики Казахстан на 2015-2019 годы»

GMP СТ РК 1617-2006 Надлежащая производственная практика
ГОСТ 53886 – 2010 (ИСО 14669 1999). Вода. Методы определения токсичности по выживаемости морских ракообразных.

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

Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2009. – 804 с.

Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 3. – Алматы: Изд. дом «Жибек жолы», 2014. – 872 с.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- АК – Аскорбиновая кислота
АОА – Антиоксидантная активность
АФК – Активная форма кислорода
БАВ – Биологически активные вещества
БАД – Биологически активные добавки
ВИЧ – Вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография
г – Грамм
ГГц – Гигагерц
ГОСТ – Государственный отраслевой стандарт
ГРМ – Питательная среда № 1 ГРМ-агар сухая
ГФ РК – Государственная фармакопея Республики Казахстан
ГХ – Газовая хроматография
ГХ-МС – Газовая хроматография с масс-детектором
ЕД – Единица действия
ЖКТ – Желудочно-кишечный тракт
кг – Килограмм
КК – Карназоловая кислота
ЛВ – Лекарственное вещество
ЛРС – Лекарственное растительное сырье
ЛС – Лекарственное средство
ЛФ – Лекарственная форма
мг – Миллиграмм
мг/кг – Миллиграмм/киллограмм
мкл – Микролитр
мкм – Микрометр
мл – Миллилитр
мм – Миллиметр
МВ – Микроволновое
МВШС-40 – Микроволновой экстракт листьев шалфея степного 40 %
МКЦ – Микрокристаллическая целлюлоза
МПК – Минимальная подавляющая концентрация
НАО «МУК» – Некоммерческое акционерное общество Медицинский университет Караганды
НД – Нормативный документ
нм – Нанометр
ОК – Олеаноловая кислота
ООО – Общество с ограниченной ответственностью
ОФС – Общая фармакопейная статья
РК – Розмариновая кислота
РС – Растительное сырье
РФ – Российская Федерация
см – Сантиметр

СВЧ-излучение – Сверхвысокочастотное электромагнитное излучение
СССР – Союз советских социалистических республик
США – Соединенные Штаты Америки
ТЛФ – Твердая лекарственная форма
ТОО – Товарищество с ограниченной ответственностью
ТСХ – Тонкослойная хроматография
Ув – Увеличение
УЗ – Ультразвук
УЗШС – Ультразвуковой экстракт шалфея степного
УК – Урсоловая кислота
УФ – Ультрафиолет
ФС – Фармакопейная статья
ШС – Шалфей степной
ҚР ДСМ – Қазақстан Республикасы денсаулық сақтау министрлігі
API – Активный фармацевтический ингредиент
ATCC – American Type Culture Collection
ВНА – Бутилгидроксианизол
СОХ – Циклооксигеназа
DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилрадикал
EMDEX – Микронизированная форма декстрана
FDA – US Food and Drug Administration
FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power assay
NIST – National Institute of Standards and Technology
USB – Universal Serial Bus
USP – United States Pharmacopeia
ХО – Ксантинооксидаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В настоящее время в Республике Казахстан произрастает 8 видов растений рода Шалфей. В Государственную фармакопею Республики Казахстан включен шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*), который рекомендован к применению в качестве противовоспалительного и антисептического средства, также используется при заболеваниях верхних дыхательных путей, ранозаживляющего средства при ожогах или заболеваниях кожи.

Однако, другие виды рода *Salvia* L. еще недостаточно изучены и не востребованы для медицинского использования. Так, шалфей степной (*Salvia stepposa* Des.-shost.) произрастает практически на всей территории Республики Казахстан, химический состав которого не изучен до сих пор. Виды рода шалфей являются сверхпродуцентами фенолпропаноидов и розмариновой кислоты. Кроме того, исследование на поиск фенолпропаноидов и розмариновой кислоты в *Salvia* L. в Казахстане ранее не проводилось.

Таким образом, исследование перспективного растительного сырья шалфея степного, с целью его использования для производства отечественных лекарственных средств, свидетельствует об актуальности данной диссертационной работы и её практическом значении для фармацевтической отрасли.

Цель - разработать состав, технологию и провести стандартизацию твердой лекарственной формы на основе экстракта шалфея степного.

Задачи исследования

- провести фармакогностическое исследование травы *Salvia stepposa* Des.-Schost и определить показатели и нормы качества, сроки хранения растительного сырья *Salvia stepposa* Des.-Schost;

- провести сравнительное исследование химического состава, технологических свойств, биологической активности экстрактов из шалфея степного, полученных традиционными способами и методами УЗ- и микроволновой активации;

- провести исследования по выбору оптимального способа получения сухого экстракта из листьев шалфея степного, разработать технологию получения субстанции с выраженным биологическим действием. Определить показатели и нормы качества, сроки хранения и исследовать биологическую активность сухого экстракта шалфея степного;

- разработать оптимальный состав и технологию получения готовой лекарственной формы, содержащей экстракт шалфея степного, обладающего фармакологической активностью. Определить показатели и нормы качества, сроки хранения готовой лекарственной формы.

Объекты исследования: лекарственное сырье: надземная часть *Salvia stepposa* Des.-Schost; водно-спиртовые экстракты шалфея степного, полученные с применением традиционной экстракции, ультразвука и СВЧ; таблетки на основе сухого экстракта шалфея степного.

Предмет исследования: определение фармакогностических и товароведческих особенностей надземной части *Salvia stepposa* Des.-Schost; стандартизация; оптимальный способ экстракции шалфея степного; сумма экстрактивных веществ; биологическая активность и доклинические (неклинические) испытания сухого экстракта листьев шалфея степного; концентрация розмариновой кислоты в сырье, экстракте, таблетках; состав и технология получения таблеток, оценка показателей качества таблеток, разработка нормативной документации на сырье и готовую лекарственную форму.

Научная новизна

Впервые в Республике Казахстан:

- проведен фармакогностический анализ и проведена оценка показателей качества растительного сырья *Salvia stepposa* Des.-Schost, изучена стабильность, разработан проект НД;

- проведена ультразвуковая и микроволновая экстракция *Salvia stepposa* Des.-Schost определен оптимальный способ получения с сохранением максимальной биологической активности образца;

- разработана готовая лекарственная форма в виде таблеток на основе *Salvia stepposa* Des.-Schost;

- разработана технология получения сухого экстракта из листьев *Salvia stepposa* Des.-Schost и проведена оценка показателей качества, изучена стабильность, разработан лабораторный регламент;

- на основании экспериментальных, физико-химических, технологических исследований разработан оптимальный состав и технология производства нового лекарственного средства, обладающего выраженной фармакологической активностью на основе *Salvia stepposa* Des.-Schost, произрастающего на территории Республики Казахстан;

- разработана спецификация качества и проведена стандартизация готовой лекарственной формы в виде таблеток, изучена стабильность, разработан проект НД.

Основные положения, выносимые на защиту

- результаты фармакогностического анализа травы *Salvia stepposa* Des.-Schost;

- экспериментальные данные по технологии получения сухого экстракта листьев шалфея степного *Salvia stepposa* Des.-Schost;

- результаты исследования биологической активности и безопасности сухого экстракта из листьев *Salvia stepposa* Des.-Schost;

- результаты фармацевтической разработки таблеток на основе сухого экстракта листьев *Salvia stepposa* Des.-Schost.

Практическая значимость исследования

Значимость работы в международном масштабе заключается в применении современных инновационных методов для получения экстрактов на основе шалфея степного, произрастающего на территории Республики Казахстан, а именно микроволновые и ультразвуковые методы активации, что, безусловно, окажет влияние на развитие науки и технологии в Казахстане.

Инновационное и конкурентное преимущество от реализации работы связаны с разработкой и внедрением системы импортозамещения жизненно-важных для Республики Казахстан видов фармацевтической промышленной продукции. Использование современной технологии в создании новых фармакологически активных веществ позволит значительно повысить производительность и снизить себестоимость.

Получены фармакогностические и товароведческие данные *Salvia stepposa* Des.-Schost, что в дальнейшем позволит использовать данное сырье в производстве отечественных лекарственных средств. Разработан проект НД «Шалфей степной листья».

Применение разработанной технологии получения сухого экстракта шалфея степного, путем использования микроволновой экстракции, позволит сократить продолжительность и повысить производительность технологического процесса и при этом, существенно снизить себестоимость целевого продукта, проведена оценка качества сухого экстракта, разработан лабораторный регламент на производство сухого экстракта листьев шалфея степного (МВШС-40).

Сухой экстракт использован в качестве субстанции для разработки нового лекарственного средства на основе шалфея степного, проведена разработка оптимального состава готовой лекарственной формы в виде таблеток, проведена оценка качества и разработан проект НД «Таблетки для рассасывания Шалфей степной».

Личный вклад докторанта

Диссертантом по теме диссертационной работы самостоятельно подобрана и проанализирована научная литература по теме диссертации, проведены эксперименты, получены и систематизированы экспериментальные данные, подготовлены публикации.

Апробация результатов диссертации

Результаты и основные положения научной работы представлены на:

- XXXXV Международной студенческой научно-практической конференция: Междисциплинарные исследования. современное состояние и перспективы развития (РФ, г. Екатеринбург, 2019 г.).

- 60-й Международной научной конференции Евразийского Научного Объединения (РФ, г. Москва, 2020 г.).

- Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Фараби Әлемі» (Казахстан, г. Алматы, 2019 г.).

-VI Международной научной-практической конференции «SCIENCE AND EDUCATION IN THE MODERN WORLD: CHALLENGES OF THE XXI CENTURY» (Казахстан, г. Нур-Султан, 2020 г.).

- VIII Международной научно-практической конференции «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям» (Украина, г. Полтава, 2020 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе:

- статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования (КОКСНВО) РК - 3;
- статьи в зарубежных научных изданиях, входящих в базы данных Scopus - 2;
- тезисы в материалах международных научно-практических конференций - 5;
- в других научных изданиях - 1.

Связь задач исследований с планом научных программ

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований НАО «МУК» в рамках научного проекта AP19176476 «Разработка нового лекарственного средства на основе экстракта шалфея степного».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста и состоит из введения; обзора литературы; 6 разделов, описывающих материалы и методы исследования; основной части, содержащей результаты и обсуждение собственных исследований, выводов; заключения; списка использованной литературы, включающий 119 литературных источника; 11 приложений. Диссертация иллюстрирована 46 таблицами и 49 рисунками.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Характеристика шалфея как объекта исследований

Salvia является крупнейшим родом растений семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), которое насчитывает около 1000 видов кустарников, травянистых многолетних и однолетних растений [1]. Систематика шалфея предстает следующим образом, в семействе *Lamiaceae*, *Salvia* является частью трибы *Mentheae* подсемейства *Nepetoideae* (рисунок 1).

- Надцарство: Eukaryota (Эукариоты)
 - Царство: Plantae (Растения)
 - Отдел: Angiosperms (Цветковые растения, или Покрытосеменные - APG IV)
 - Класс: Magnoliopsida (Двудольные)
 - Порядок: Lamiales (Губоцветные)
 - Семейство: Lamiaceae (Губоцветные, или яснотковые)
 - Подсемейство: Nepetoideae
 - Триба: Mentheae
 - Род: *Salvia* (Шалфей)
 - Вид: *Salvia aethiopsis* (Шалфей эфиопский)
 - Вид: *Salvia officinalis* (Шалфей лекарственный)
 - Вид: *Salvia sclarea* (Шалфей мускатный)
 - Вид: *Salvia stepposa* (Шалфей степной)

Рисунок 1 – Систематика растений рода Шалфей

Род *Salvia*, принадлежащий к семейству *Lamiaceae*, широко распространен практически во всех регионах мира, особенно в Средиземноморском регионе и Азии. На территории Республики Казахстан произрастает 8 видов шалфея [2]. Все виды этого рода издавна вошли в культуру как лекарственные несмотря на то, что многие из них до сих пор не исследованы.

Название *Salvia* («сальвия») происходит от латинского *salvere* («чувствовать себя хорошо и здоровым, здоровье, лечить»), глагола, относящегося к *salus* (здоровье, благополучие, процветание или спасение), что характеризует целебные свойства травы.

Стебли шалфея, как правило, расположены под углом, как и у других растений семейства *Lamiaceae*. Листья цельные, но иногда зубчатые или перистые. Цветущие стебли несут небольшие прицветники, не похожие на базальные листья - у некоторых видов прицветники декоративные и эффектные. Чашечка обычно трубчатая или колоколообразная и разделена на две части или губы, верхняя губа целая или трехзубая, нижняя двухстворчатая. Венчики имеют клешневидную форму. Нижняя губа обычно имеет две доли [2].

У многих представителей шалфея на листьях, стеблях и цветках растут трихомы (волоски), которые помогают предотвратить потери воды у некоторых видов. Иногда волоски железистые, как правило, такие волоски

содержат жирные и эфирные масла, которые обычно придают особый аромат растению.

Традиционно, виды *Salvia* применялись в медицине для лечения проблем с пищеварением, простуды и кашля, язвенных болей и сердечных заболеваний. В настоящее время, на основании современных фармакологических исследований, виды *Salvia* проявляют различную активность, в том числе антиоксидантную, антимикробную, противовоспалительную, антидиабетическую эффективны при лечении болезни Альцгеймера и проявляют цитотоксичность. Эти свойства обусловлены нахождением в составе шалфея различных активных полифенолов и терпеноидов [3, 4].

1.1.1 Шалфей лекарственный *Salvia officinalis*

Шалфей лекарственный является адептом семейства *Lamiaceae* и представляет собой многолетнее травянистое лекарственное растение. Шалфей лекарственный имеет прямостоячий пушистый стебель высотой от 20 до 55 см и двугубые сине-фиолетовые цветки. У основания стебля находятся супротивные черешковые, овальнойцевидные, морщинистые, пушистые, мелкозубчатые, суживающиеся к основанию серо-зеленые листья. Период цветения шалфея лекарственного июнь-июль, период плодоношения июль-август.

Шалфей лекарственный обитает преимущественно в регионах сухой и средней влажности, районы высокой влажности могут быть опасными для данного растения. Растет в степях и на сухих степных лугах на хорошо дренированной почве и солнце. Шалфей широко распространен на территории Европейской части СССР и Западной Сибири [2].

Шалфей лекарственный является хорошо изученным растением семейства *Lamiaceae* как по морфологическим характеристиками, так и по основным фитохимическим веществам в цветках, листьях и стеблях. Шалфей лекарственный содержит широкий спектр разных классов химических соединений, таких как алкалоиды, углеводы, жирные кислоты, гликозидные и фенольные соединения (например, кумарины, флавоноиды, дубильные вещества), полиацетилены, стероиды, терпены/терпеноиды [5]. Кроме того, эфирное масло надземной части *S. officinalis* богато различными природными соединениями. В эфирном масле шалфея степного обнаружено более 120 компонентов. Основными компонентами являются цинеол (до 15%), линалоол, α - и β - пинен, борнеол и его ацетат, туйон, линалилацетат и другие терпеновые соединения. Спиртовые и водные экстракты богаты флавоноидами, в частности розмариновой кислотой и лютеолин-7-О-гликозидом [6].

Шалфей используется с древности в нетрадиционной медицине. Например, в Древнем Египте шалфей применяли для лечения заболеваний желудка, зубной боли, астмы, зуда. Также были высоко оценены его кровоостанавливающие и укрепляющие свойства. Название *Salvia* происходит от латинского слова «salvare», означающего лечить, и «salvere», означающего быть здоровым.

Противовоспалительный эффект шалфея обусловлен наличием эфирного масла, витаминов Р и РР, дубильных веществ, флавоноидов, а также урсоловой и олеаноловой кислот и кровоостанавливающих свойств, что обеспечивает снижение проницаемости стенок сосудов и капилляров [7]. Традиционно шалфей используется при лечении бронхита, астмы, стенокардии, воспаления тканей рта, депрессий или различных кожных заболеваний. Антимикробная активность растения обусловлена наличием цинеола, туйона и камфоры и наиболее выражена в большей степени по отношению к грамположительным штаммам, в меньшей степени к грамотрицательным штаммам микроорганизмов [8]. Листья шалфея лекарственного используют при заболеваниях суставов, для полосканий, ингаляций, также шалфей лекарственный используют в гомеопатии.

Основными диагностическими признаками шалфея лекарственного являются на микропрепаратах листа, характерные для губоцветных круглые железки, многочисленные простые многоклеточные трихомы с длинной изогнутой конечной клеткой, головчатые трихомы с одно- и трёхклеточной ножкой и одно- и двухклеточной головкой, расположенные на нижней стороне листа диацидные устьица. Стенки клеток эпидермиса верхней стороны листа слабо извилистые, нижней — более извилистые.

1.1.2 Шалфей степной *Salvia stepposa*

Шалфей степной многолетнее травянистое растение, 35-60 см высотой. Стебель прямой в нижней части голый или опушенный редкими короткими волосками, четырёхгранный, жёсткий, ветвистый. Листья опушённые серо-зелёные, продолговато-ланцетные, по краю зубчатые. Ярко-синие цветки расположены на верхушках стеблей и ветвей в густых кольцах. Венчик сине-фиолетовый, 13-18 мм длиной, прикорневая розетка листьев не выражена, соцветие негустое, мутовки 4-6 цветковые. Чашечка опушена железистыми волосками. Цветет в июне — июле. Растёт шалфей степной на пустырях, по берегам рек. Широко распространён в Восточной Европе, Западной Сибири, Средней Азии. Произрастает в черноземной полосе и пограничных районах Нечерноземья. В Чувашской Республике произрастает на южных остепененных склонах. Является фоновым видом в немногих сохранившихся фрагментах луговых степей Порецкого района. Места обитания степи, сухие склоны [9].

1.2 Химический состав растений рода *Salvia* L.

1.2.1 Фенольные соединения шалфея

Фенольные соединения являются основным классом вторичных метаболитов в растениях и подразделяются на фенольные кислоты и полифенолы. Полифенолы, так же как и терпены, обнаружены во всех растениях и даже в каждой растительной клетке [10]. В настоящее время число известных фенольных структур превышает девять тысяч. Эти соединения обнаруживаются в сочетании с моно- и полисахаридами, связаны с одной или

несколькими фенольными группами или могут встречаться в виде производных, таких как сложные эфиры или сложные метиловые эфиры [11].

Фенольные соединения образуются в шикимовой кислоте растений и пентозофосфате в результате метаболизма фенолпропаноидов [12]. Они содержат в своей молекуле бензольные кольца с одним или несколькими гидроксильными заместителями и варьируются от простых фенольных молекул до высокомолекулярных соединений [13] (рисунок 2).

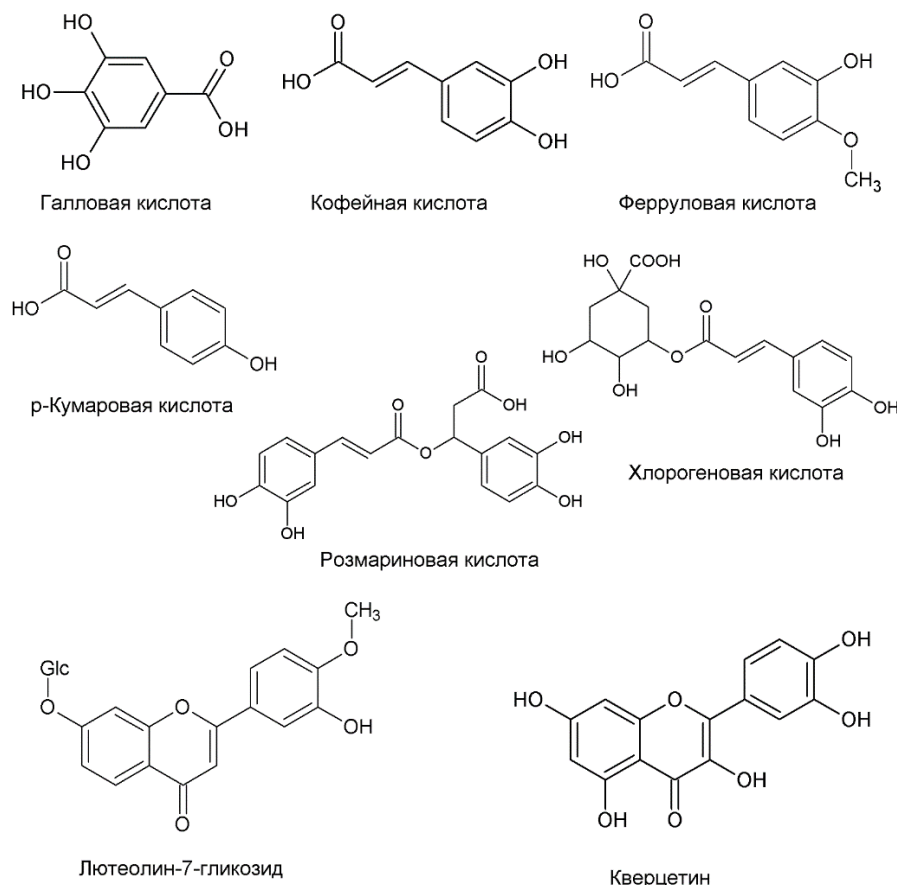


Рисунок 2 – Наиболее распространенные фенольные соединения

Фенольные соединения широко распространены в природе, основное количество этих веществ синтезируются в тканях растений. С физиологической точки зрения, фенольные соединения имеют жизненно важное значение в защитных реакциях, таких как гепатопротекторная, противовоспалительная, антиоксидантная и антипролиферативная активность.

Изучение химического состава лекарственных растений, традиционно используемых в медицине, важно для прогнозирования и интерпретации их потенциальной биологической активности. В литературе указывается, что большинство исследований шалфея в основном сосредоточены на изучении состава эфирных масел [14,15]. Однако в последние годы большое внимание уделяется также биологически активным, гидрофильным компонентам [16, 17].

Предполагается, что благодаря наличию в структуре фенольных соединений гидроксильных групп они проявляют антиоксидантные свойства. Следовательно, важно определить общее количество этих соединений в образцах растений, поскольку оно указывает на возможность их медицинского применения.

Полифенольные соединения играют жизненно важную роль в борьбе с некоторыми заболеваниями, включая пролиферацию опухолевых клеток, канцерогенез, бронхиальную астму, пептическую язву, атеросклероз, спазмогенные расстройства, апоптоз, ишемическую болезнь сердца, гипергликемию, гепатотоксичность, депрессию, катаракту [18].

Среди нескольких классов фенольных соединений фенольные кислоты, флавоноиды и дубильные вещества рассматриваются в качестве основных фенольных соединений [19].

1.2.1.1 Флавоноиды

Флавоноиды принадлежат к классу вторичных метаболитов растений, имеющих полифенольную структуру, широко встречающихся во фруктах, овощах и некоторых напитках. В настоящее время флавоноиды считаются незаменимым компонентом для различныхнутрицевтических, фармацевтических, медицинских и косметических применений [20]. Это связано с их антиоксидантными, противовоспалительными, антимуtagenными и антиканцерогенными свойствами в сочетании с их способностью модулировать функцию ключевых клеточных ферментов [21]. Информация о механизмах действия флавоноидов до сих пор не изучена должным образом. Однако на протяжении веков было известно, что производные растительного происхождения обладают широким спектром биологической активности.

Также известно, что флавоноиды являются мощными ингибиторами некоторых ферментов, таких как ксантиноксидаза (ХО), циклооксигеназа (СОХ), липоксигеназа и фосфоинозитид-3-киназа.

В настоящее время насчитывается около 6000 флавоноидов.

Флавоноиды можно подразделить на различные подгруппы называются изофлавоны, неофлавоноиды, флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванололы, флаванолы или катехины, антоцианы и халконы (рисунок 3).

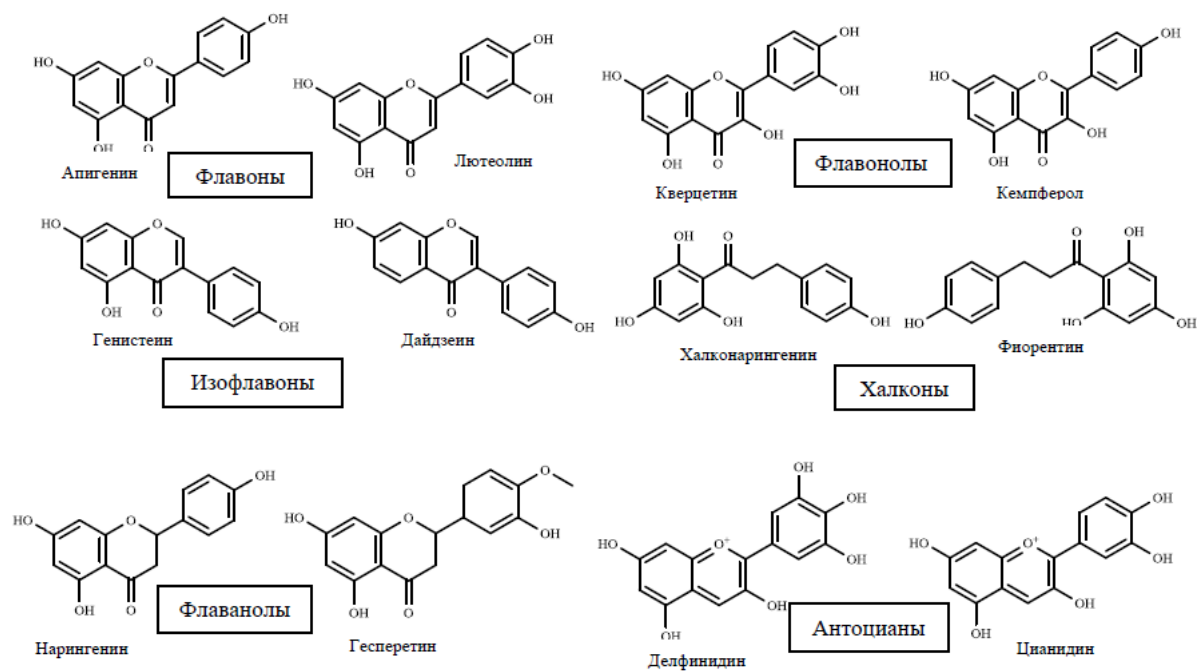


Рисунок 3 – Основное строение флавоноидов и их классов

Флавоноиды, идентифицированные в *S. Officinalis*: апигенин, апигенин 7-метиловый эфир, апигенин 7,4'-диметиловый эфир, лютеолин, 7-метиловый эфир лютеолина, скutelларин, 6-метиловый эфир скutelларина, скutelларин, 6,7-диметиловый эфир, скutelларин 7,4'-диметиловый эфир, скutelларин 6,7,4'-триметиловый эфир, скutelларин 5,6,7,4'-тетраметиловый эфир, 6-метиловый и 6,7-диметиловый эфиры 6-гидроксилютеолин, 8-гидроксиапигенин (изоскutelларин), 5,7,3'-гидрокси4'-метоксифлаваноны (гесперетин), апигенин 7-О-глюкозид, скutelларин 7-О-глюкозид, апигенин 6-С-глюкозид-7-О-глюкозид, апигенин 6,8-ди-С-глюкозид, лютеолин, 7-О-глюкозид, лютеолин, 7-оглюкуронид, лулеолин 3'-О-глюкуронид, 6-гидроксилютеолин 7-О-глюкозид, 6-гидроксилютеолин, 7-О-глюкуронид, лютеолин 7-О-рутинозид, лютеолиндиглюкуронид [22].

1.2.1.2 Фенольные кислоты

Одной из ярких представителей фенольных кислот является розмариновая кислота.

Розмариновая кислота (РК) ($C_{18}H_{16}O_8$) представляет собой эфир кофейной и 3,4-дигидроксифенилмолочной кислоты [23]. РК содержит в своем составе 2 ароматические аминокислоты, фенилаланин и тирозин, которые связаны через сложноэфирную связь. Кофейная кислота и 3,4-дигидроксифенилмолочная кислота синтезируются по двум различным путям биосинтеза шикимовой кислоты (рисунок 4).

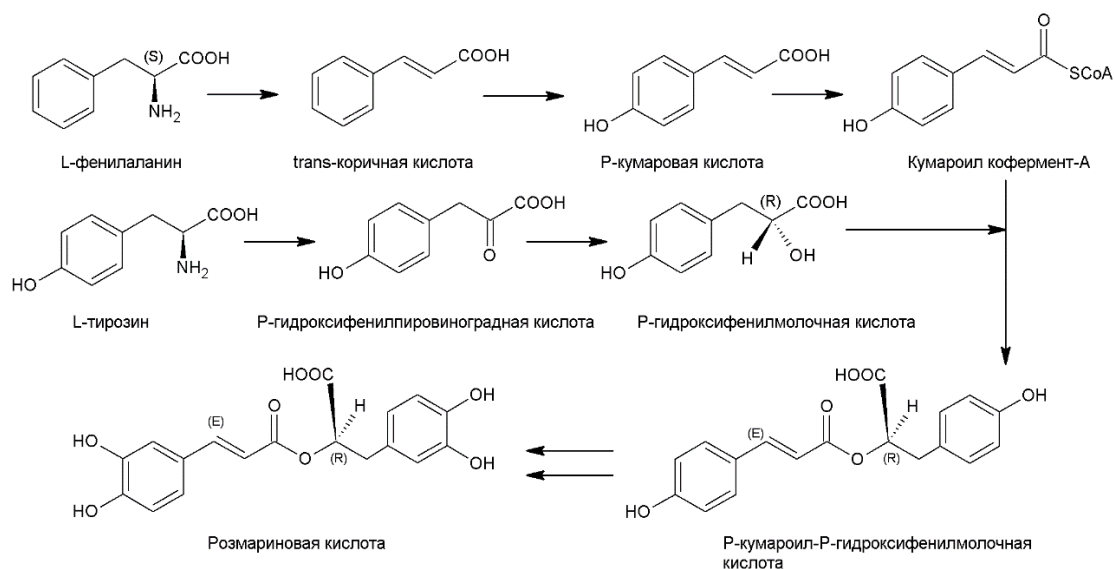


Рисунок 4 – Синтез розмариновой кислоты

Часть кофейной кислоты образуется только из фенилаланина, а 3,4-дигидроксифенилмолочная кислота - только из тирозина [24]. РК считается одним из важнейших полифенолов, присутствует в природных растениях, таких как розмарин (*Rosmarinus officinalis* L.), базилик (*Ocimum basilicum*), душица (*Origanum vulgare*), шалфей (*Salvia officinalis*), мелисса (*Melissa officinalis*) и многие другие [25].

РК обладает важными биологическими свойствами, представленными на рисунке 5.



Рисунок 5 – Биологическая активность розмариновой кислоты

Розмариновая кислота вызывает значительный интерес для применения в фармации и медицине, как вещество, обладающее высокой антиоксидантной, антимикробной, иммуностимулирующей, противовирусной, противоопухолевой активностью и имеющее терапевтический потенциал против различных заболеваний (таблица 1).

Таблица 1 – Фармакологическая активность розмариновой кислоты [26]

| Вид активности | Вид исследования | Результат |
|---|-------------------------------------|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Антимикробная | <i>In vivo</i> | Снижение количества патогенных бактерий, таких как кишечная палочка, <i>L.monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> |
| Иммуномодулирующая | <i>In vivo</i> | Увеличение веса лимфоидных органов и улучшение функции макрофагов;
Индукция апоптоза в Т и НК-клетках путем выявления митохондриальной дисфункции:
Снижение провоспалительных медиаторов и усиление уровня IL-10 |
| Противовоспалительная
Иммуномодулирующая | <i>In vitro</i> | Ингибирование эозинофильного воспаления, слизистых клеток;
Накопление, Th2 цитокинов и ингибирование аллергенспецифичных IgG и снижение IL-4 и IL-5;
Ингибирование повреждения синовиальной ткани, снижение показателей артритного индекса и экспрессии COX-2, а также ингибирование TCR-опосредованной пролиферации и активации Т-клеток |
| Антивирусная
противовоспалительная | <i>In vitro</i> | Снижение IL-12, TNF- α , IFN- γ и IL-6, повышение выживаемости, ингибирование экспрессии вирусных белков и снижение транскриптов вирусной мРНК |
| | <i>In vitro</i>
И <i>in vivo</i> | Снижение концентрации гистамина, IgE, IL-1 β , IL-6, TNF- α , снижение уровней COX-2 и NF- κ B, уменьшение инфильтрации эозинофилов |
| Антиоксидантная
Нейропротекторная | <i>In vitro</i>
и <i>in vivo</i> | Снижает выработку перекиси водорода (H ₂ O ₂) и супероксид (O ₂ [•]) радикалов. Повышенная регуляция каталазы, гемоксигеназы-1 и супероксиддисмутазы, восстановленного малонового диальдегида;
Предотвращает нарушения памяти и нитрования белков |
| | <i>In vitro</i> | Ингибирование транслокации NF- κ B и повышение экспрессии PPAR-g, ингибирование гибели клеток в условиях окислительного стресса, экситотоксичности и условий ишемии-реперфузии. |
| Противоаллергическая | <i>In vivo</i> | Ингибируется активность α -глюкозидазы |
| Противоопухолевая | <i>In vivo</i> | Снижает фактор транскрипции за счет ингибирования AP-1, который отвечает за активацию COX-2 |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 | 3 |
|----------------------------|----------------|--|
| Фертильная | <i>In vivo</i> | Улучшенная прогрессирующая и общая подвижность сперматозоидов и поддержание целостности акросомы и плазматической мембраны |
| Противодиабетическая | <i>In vivo</i> | Ингибирует α -глюкозидазу, снижает клубочковую гипертрофию |
| | | Увеличение экспрессии GLUT4 и снижение экспрессии PEPCK |
| Против болезни Альцгеймера | <i>In vivo</i> | Ингибирование активации NF- κ B, снижение гистопатологического повреждения и отека мозга |

1.2.2 Основные дитерпеновые соединения

Карнозоловая кислота (КК) - это природный фенольный дитерпен ($C_{20}H_{28}O_4$), специфичный для семейства *Lamiaceae*, который содержится в розмарине (*Rosmarinus officinalis*) и в шалфее (*Salvia officinalis*) [27]. Высушенные листья розмарина и шалфея содержат 1,5-2,5% КК. Молекула КК является наиболее активной, по сравнению с её производными, но она является нестабильной и имеет тенденцию легко окисляться с последующим образованием карнозола, который в свою очередь преобразуется в розманол, изорозманол и другие производные (рисунок 6) [28].

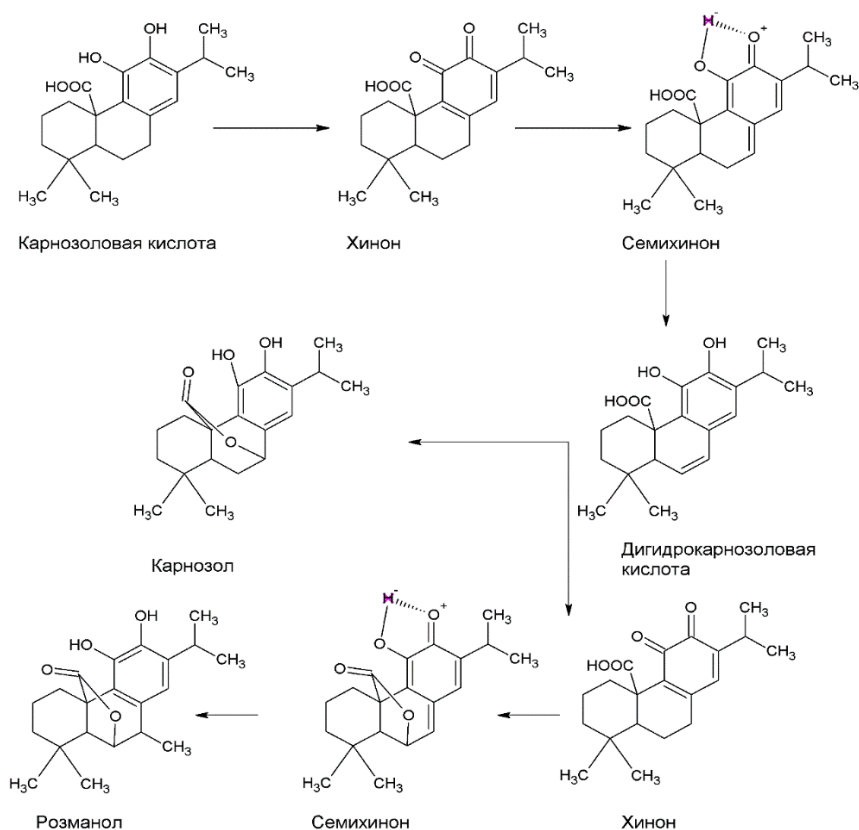


Рисунок 6 – Первый предложенный путь окисления карнозоловой кислоты [29]

По этой причине концентрации КК в лекарственных растениях сильно различаются в течение года [30].

КК и родственные дитерпены обладают широким спектром интересных биологических свойств, которые вызывают интерес для применения в медицине и фармакологии. Карнозоловая кислота выступает в качестве противоопухолевого, антибактериального агента, антиоксиданта, ингибитора ВИЧ-протеазы, агента модулирующего ангиогенез, индуктора апоптоза, растительного метаболита, противовоспалительного агента и пищевого консерванта [31, 32]. Противоопухолевая активность этих соединений представляет особый интерес, учитывая значительное увеличение числа больных раком из-за старения и роста населения мира.

Несмотря на широкое применение в фармацевтической и косметической промышленности в качестве антиоксидантного вещества, антиоксидантному механизму карнозоловой кислоты уделялось мало внимания, за исключением нескольких исследований. Анализы *in vitro* с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, ультрафиолетовой и люминесцентной визуализации показали, что КК и ее основное производное, карнозол, защищают липиды от окисления. Оба соединения сохранили линоленовую кислоту и моногалактозилдиацилглицерин из синглетного кислорода и из гидроксильного радикала. Различные уровни карнозоловой кислоты и карнозола у двух контрастных сортов розмарина коррелировали с толерантностью к перекисному окислению липидов. При окислении липидов активными формами кислорода (АФК), карнозоловая кислота имеет тенденцию к окислению до различных производных, в том числе до карнозола. Антиоксидантная функция карнозола основана на другом механизме, заключающемся непосредственно в процессе окисления липидов [33]. В окислительных условиях, не связанных с образованием АФК, карнозол ингибирует перекисное окисление липидов, в отличие от карнозоловой кислоты.

Авторами [34] показано, что КК является мощным антиоксидантом, способным эффективно защищать липиды от окисления как *in vitro* (растворы липидов), так и *in vivo* (биомембраны). Это исследование также дает некоторое представление о механизме, лежащем в основе антиоксидантной активности карнозоловой кислоты. Было обнаружено, что КК обладает очень высокой реакционной способностью в отношении АФК, легко окисляясь и превращаясь в различные метаболиты. Таким образом, карнозоловая кислота действует как поглотитель АФК, который может устранить токсичные АФК путем ее окисления.

Кроме того, КК обладает противовирусной активностью против респираторно-синцитиального вируса человека, эффективно блокируя репликацию этого вируса [35].

КК может применяться для лечения остеопороза. Авторами [36] замечено ингибирование образования многоядерных остеокластов в культуре посредством подавления экспрессии мРНК RANKL.

1.2.3 Основные тритерпеновые соединения

Урсоловая кислота (УК) (рисунок 7) представляет собой пентациклическое тритерпеноидное карбоновое соединение ($C_{30}H_{48}O_3$), которое присутствует в форме свободной кислоты или в виде агликонов для тритерпеноидных сапонинов [37]. Олеаноловая кислота (ОК) является изомером УК, они имеют сходную молекулярную структуру и фармакологическую активность (рисунок 6) [38]. У растений биологическая роль урсоловой и олеаноловой кислот в основном связана с образованием барьера для предотвращения потери воды и попадания патогенных микроорганизмов [39].

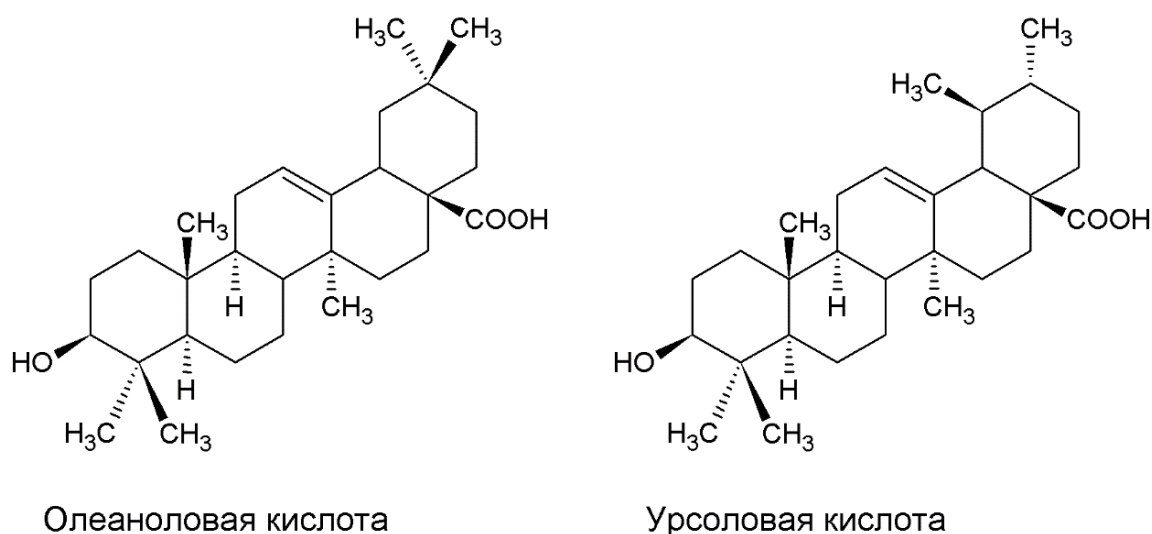


Рисунок 7 – Структурные формулы олеаноловой и урсоловой кислот

ОК и ее производные обладают рядом интересных фармакологических активностей, таких как противовоспалительное, антиоксидантное, противоопухолевое и гепатопротективное действие. Ранее ОК была выделена из почти 2000 видов растений, и основным источником этого соединения являются растения семейства *Oleaceae*, такие как *Olea europaea* (маслина) [40, 41]. Подобно УК, биологическая роль ОК в растениях, по-видимому, связана с защитой от травоядных животных и патогенов [42]. Более того, аллелопатические свойства уже описаны для этого соединения [43]. Некоторые лекарственные растения производят и накапливают ОК и ее производные в качестве основных метаболитов, которые могут быть непосредственно связаны с их биологической активностью.

Олеаноловая кислота и урсоловая кислота являются повсеместно распространенными тритерпеноидами в лекарственных травах. Научный интерес к этим биологически активным соединениям связан с благотворным воздействием на здоровье человека благодаря антиоксидантной, антимикробной, противовоспалительной, гепатопротективной, иммуномодулирующей, противоопухолевой, химиопрофилактической, кардиопротективной, антигиперлипидемической и гипогликемической

активностям [44]. УК может увеличить устойчивость кожного барьера к раздражителям, предотвратить сухость кожи и может рассматриваться как сырье для разработки антивозрастных продуктов. Кроме того, УК и ОК в последнее время получили огромное внимание благодаря их сильному ингибирующему действию на активность α -глюкозидазы, которая является эффективной при сахарном диабете [45]. Поэтому в последние годы многие ученые были привлечены к разработке эффективных аналитических методов для разделения УК и ОК. Однако их структурное сходство привело к затруднениям при одновременном определении этих тритерпеновых кислот в растительных экстрактах. Из-за относительно неполярных особенностей этих соединений методы анализа были сосредоточены в основном на ГХ, ГХ-МС.

Одним из важных фармакологических свойств ОК является ее гепатопротекторное действие. Было показано, что ОК эффективно защищает печень от острого химического повреждения, фиброза и цирроза, вызванного хроническими заболеваниями печени. Благодаря гепатопротекторному действию ОК используется в Китае в качестве перорального лекарственного средства, для лечения людей при заболеваниях печени, таких как вирусный гепатит [46]. ОК увеличивает накопление в ядре Nrf2, ключевого регулятора транскрипции антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, тем самым приводя к индукции Nrf2-зависимых генов, которые играют роль в защите печени [47].

Были получены результаты о важности ОК и УК в качестве антибиотиков. Одно из первых исследований, целью которого было оценить возможное влияние ОК и УК на бактерии, было проведено Kozai et al. [48]. В этой работе продемонстрировано, что ОК и УК ингибируют синтез нерастворимого глюкана, катализируемого неочищенной глюкозилтрансферазой (GTase) из кариогенного мутанта *Streptococcus mutans*. Недавно потенциал УК против *S. mutans* и *S. sobrinus* был усилен минимальной подавляющей концентрацией (МПК) 50, равной 2,0 мкг/мл [49], что указывает на то, что эти соединения могут ингибировать зубной кариес. При использовании против *Mycobacterium tuberculosis*, которая является бактерией, поражающей около трети человеческой популяции и являющейся инфекцией, вызывающей наибольшее количество смертей во всем мире, было обнаружено, что ОК, выделенная из *Lantana hispida*, также является эффективной при МПК 25 мкг/мл [50]. Кроме того, при МПК 50 мкг/мл ОК использовалась против штаммов, устойчивых к *M. tuberculosis*, стрептомицину, изониазиду, рифампину и этамбутолу. Разнообразие антибактериальных свойств ОК и УК также проиллюстрировано в отношении других бактериальных патогенов человека, таких как *S. pneumonia* (МПК 16 мкг/мл), метициллин-чувствительный и устойчивый к метицилину *Staphylococcus aureus* (МПК 8 мкг/мл. и 64 мкг/мл, соответственно) [51], *Bacillus subtilis* (МПК 8 мкг/мл), *B. cereus*, *Enterococcus faecalis* (МПК 6,25–8,00 мкг/мл), *E. faecium* (МПК 8 мкг/мл) и *Pseudomonas aeruginosa* (МПК 256 мкг/мл) [52, 53].

ОК и УК действуют на различных стадиях развития опухоли, ингибируя инициацию и продвижение опухоли, а также индуцируя апоптоз опухолевых клеток. В двухстадийной модели канцерогенеза кожи мыши защита олеаноловой кислоты от канцерогенеза, стимулированного 12-отерадеканойлфорбол-13-ацетатом, связана с ингибированием аберрантной экспрессии генов. Производные олеаноловой кислоты также эффективны при остром миелобластном лейкозе, вызывая апоптоз опухолевых клеток [54]. Тритерпеноиды и их производные также эффективны в ингибировании ангиогенеза, инвазии опухолевых клеток и метастазирования, а также в качестве нового класса химиотерапевтических средств. Механизмы противоопухолевых эффектов тритерпеноидов требуют дальнейшего изучения.

1.3 Методы извлечения БАВ из лекарственного растительного сырья

Экстракция является важным шагом в анализе лекарственных растений, потому что с ее помощью можно извлечь желаемые химические компоненты из растительного сырья для дальнейшего разделения и определения их характеристик. Основные операции включают такие этапы, как предварительная промывка, сушка растительных материалов или сублимационная сушка, измельчение для получения гомогенного образца и улучшение кинетики экстракции, а также увеличение контакта поверхности образца с системой растворителей [55]. Должны быть предприняты надлежащие действия, чтобы гарантировать, что потенциальные активные компоненты не будут потеряны, искажены или разрушены во время приготовления экстракта из образцов растений. Выбор системы растворителей во многом зависит от природы извлекаемого БАВ [56]. Для экстракции гидрофильных соединений используются полярные растворители, такие как метанол, этанол или этилацетат. Для экстракции более липофильных соединений используют дихлорметан или смесь дихлорметан/метанол в соотношении 1:1. В некоторых случаях для удаления хлорофилла используется экстракция гексаном.

Мацерация представляет собой процесс настаивания растительных тканей в различных жидких растворителях — например, воде, маслах, спирте — с целью отдачи своих свойств растворителю. Лекарственный материал помещается в емкость, которую заполняют растворителем до полного покрытия сырья. Емкость закрывают и оставляют настаиваться не менее трех дней [57]. Содержимое емкости периодически перемешивают и время от времени встряхивают, чтобы обеспечить полное извлечение БАВ. В конце экстракции экстракт отделяют от выжимок фильтрованием или декантацией. Этот метод удобен и очень подходит для термолабильного растительного материала.

Перколяция. Аппарат, используемый в этом процессе, называется перколятором. Это стеклянный сосуд узко-конической формы с отверстиями на обоих концах. Высушенный, измельченный и мелко измельченный

растительный материал смачивают экстракционным растворителем в чистой емкости. Добавляют большее количество растворителя, и смесь выдерживают в течение 4 часов. Затем содержимое переносится в перколятор с закрытым нижним концом и выдерживается в течение 24 ч. [58]. Растворитель для экстракции затем заливается сверху до тех пор, пока лекарственное вещество не станет полностью насыщенным. Затем открывают нижнюю часть перколятора и позволяют жидкости медленно стекать. Некоторое количество растворителя добавлялось непрерывно, и экстракция происходит под действием силы тяжести, проталкивая растворитель через лекарственный материал вниз. Добавление растворителя прекращается, когда объем добавленного растворителя достигает 75 % от намеченного количества всего препарата. Экстракт отделяют фильтрованием с последующей декантацией. Затем выжимки объединяются и добавляется окончательное количество растворителя для получения требуемого объема. Данный метод малоэффективен – протекает медленно, сырье полностью не истощается.

Экстракция в аппарате Сокслета. Этот процесс также известен как непрерывная горячая экстракция. Аппарат называется экстрактором Сокслета и состоит из круглодонной колбы, экстракционной камеры, сифонной трубки и конденсатора наверху. Высушенный, измельченный растительный материал помещают в пористый мешок (наперсток), состоящий из чистой ткани или прочной фильтровальной бумаги, и плотно закрывают [59, 60]. Растворитель для экстракции наливают в нижнюю колбу, а затем гильзу в камеру для экстракции. Затем растворитель нагревается из нижней колбы, испаряется и проходит через конденсатор, где он конденсируется, стекает в камеру экстракции и экстрагирует лекарство, вступая в контакт. Следовательно, когда уровень растворителя в экстракционной камере достигает верхней части сифона, растворитель и экстрагированный растительный материал стекают обратно в колбу. Весь процесс повторяется многократно до тех пор, пока сырье не будет полностью экстрагировано. Этот метод подходит для растительного материала, частично растворимого в выбранном растворителе, и для растительного материала с нерастворимыми примесями. Однако этот метод не подходит для термолабильных растительных материалов. Преимуществом является способность экстрагирования большого количества сырья меньшим количеством растворителя.

1.3.1 Перспективы использования электромагнитного поля СВЧ и ультразвука для экстракции БАВ

БАВ, извлеченные из растительного сырья, имеют большое значение для фармацевтической промышленности и производства пищевых добавок. Процесс экстракции, протекающий не в полной мере, приводит к получению некачественного продукта. Обычно традиционные методы экстракции, такие как экстракция с помощью аппарата Сокслета, мацерация, дефлегмация и гидродистилляция, которые используются на протяжении многих десятилетий, являются стандартным и наиболее популярным выбором для экстракции фитохимических веществ [61]. Однако эти методы также имеют

серьезные недостатки, такие как длительное время экстракции и низкая эффективность, особенно когда присутствуют следовые количества соединений. Более того, многие натуральные продукты термически нестабильны и могут разлагаться при повышении температуры во время экстракции. Использование больших объемов органических растворителей, применяемых в традиционных методах экстракции, наносит ущерб окружающей среде, и их последующее удаление также становится проблемой. В этом отношении идеальной технологической процедурой будет та, которая позволит получить экстракты в кратчайшие сроки, с низкими производственными затратами и с минимальным использованием органических растворителей. Современные методы, такие как экстракция с помощью СВЧ-излучения и экстракция с помощью ультразвука, в последнее время вызвали интерес у учёных всего мира. СВЧ-излучение и ультразвуковая экстракция способны разрушить структуру растительной клетки за счет увеличения внутреннего давления и, таким образом, высвободить БАВ [62,63].

1.3.1.1 Микроволновая экстракция

Экстракция с помощью СВЧ-излучения является одним из новейших видов технологии экстракции, в которой используется СВЧ энергия для бесконтактного нагрева и экстракции ингредиентов. Микроволновое излучение создает мгновенную поляризацию молекул. Дипольные молекулы образцов и растворителей многократно совершают движения миллиард раз в секунду, что приводит к колебаниям химических связей, контакту и реакции активных частей молекул. Следовательно, ускоряется разрыв и рекомбинация слабых химических связей, в связи с чем химическая структура компонентов может неизбежно измениться [64]. Однако при использовании неполярного растворителя высвобождающееся микроволновое излучение будет производить лишь небольшое количество тепла; следовательно, этот метод не подходит при использовании неполярных растворителей [65].

В микроволновой экстракции ускорение процесса и высокий выход экстракта могут быть результатом синергетического сочетания двух явлений переноса: градиентов тепла и массы, действующих в одном направлении [66]. С другой стороны, в обычных экстракциях массоперенос происходит изнутри наружу, хотя передача тепла происходит снаружи внутрь субстрата (рисунок 8). Кроме того, при обычном извлечении тепло передается от нагревающей среды внутрь образца, при микроволновой экстракции тепло рассеивается объемно внутри облучаемой среды.

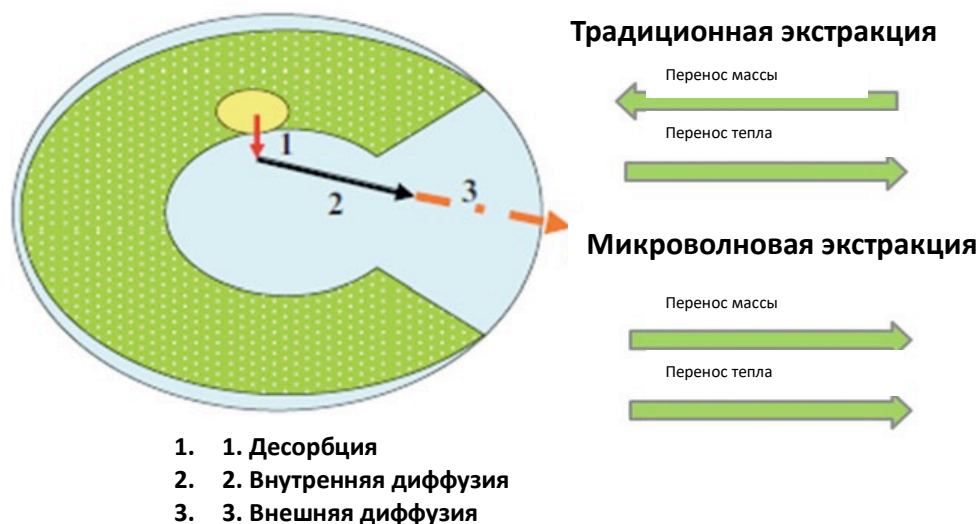


Рисунок 8 – Основные механизмы тепломассопереноса в СВЧ и традиционном экстрагировании натуральных продуктов [65]

Прямое взаимодействие микроволн со свободными молекулами воды, присутствующими в сырье, вызывает повышение внутреннего давления внутри растительной клетки из-за испарения влаги, которое приводит к последующему разрыву растительной ткани и высвобождению БАВ в экстрагент [67].

Растворитель проникает в твердую матрицу путем диффузии и растворенное вещество растворяется до достижения концентрации, ограниченной характеристиками твердого вещества. Раствор, содержащий растворенное вещество, диффундирует к поверхности за счет эффективной диффузии. Наконец, путем естественной или принудительной конвекции раствор переносится с поверхности в объемный раствор. Процесс экстракции происходит в три этапа: фаза равновесия, в которой вмешиваются явления солиubilизации и разделения, в которой субстрат удаляется с внешней поверхности частицы с приблизительно постоянной скоростью. Затем за этой стадией следует промежуточная фаза перехода к диффузии. На границе твердое тело – жидкость начинает проявляться сопротивление массопереносу; в этот период преобладает массоперенос за счет конвекции и диффузии. На последней стадии растворенное вещество должно преодолеть взаимодействия, которые связывают его с матрицей, и диффундировать в экстрагирующий растворитель. Скорость экстракции в этот период низкая, что характеризует удаление экстракта посредством диффузионного механизма. Этот момент является необратимым этапом процесса извлечения; его часто считают лимитирующим этапом процесса [68].

Эффективность процесса напрямую зависит от выбранных условий эксплуатации. Особое внимание следует уделять составу растворителя, соотношения растворитель: сырье, температура и время экстракции, мощность микроволн и характеристики матрицы, включая содержание в ней воды.

Понимание влияния и взаимодействия этих факторов на процесс имеет большое значение.

Было опубликовано множество работ о положительном влиянии СВЧ на лекарственные растения, причем по сравнению с традиционными методами экстракции СВЧ имеет множество преимуществ таких как, сокращение времени экстракции, меньшее потребление растворителя и более высокая скорость экстракции [69]. Эти преимущества позволяют снизить производственные затраты и соответственно снизить стоимость конечного продукта. Таким образом, СВЧ является интересной альтернативой традиционным методам экстракции растительного сырья.

Несмотря на растущую популярность микроволновой экстракции использование данного метода для экстракции растений рода *Salvia* было проведено лишь несколькими группами авторов. Авторами была проведена микроволновая экстракция и экстракция кипячением *Salvia officinalis* с целью извлечения полифенолов [70]. Оптимальные условия экстракции составили: мощность 500 Вт и время экстракции 9 минут. Растворы этанола и ацетона были одинаково эффективными экстракционными растворителями, оба из которых обеспечивали более высокую экстракционную способность, чем вода.

Авторами [71] было получено эфирное масло из *Salvia officinalis* с помощью СВЧ-излучения с использованием модифицированного аппарата Клевенджера. Предложенная процедура значительно ускорила процесс экстракции и продемонстрировала высокий выход за счет снижения потерь тепла. Более того, в эфирных маслах, экстрагированных с помощью СВЧ, обнаружено более высокое содержание монотерпенов и меньшее терпеновых углеводов по сравнению с методом гидродистилляции.

1.3.1.2 УЗ-экстракция

Ультразвук используется в различных процессах химической и пищевой промышленности; это быстрый метод, потребляющий небольшое количество энергии и позволяющий снизить расход растворителя, что приводит к получению более чистого продукта и более высоких выходов. Принцип мощного ультразвука был связан с явлением акустической кавитации, которое возникает, когда в жидкости генерируются акустические волны высокой интенсивности [72]. Механизм экстракции включает два типа физических явлений: диффузию через клеточные стенки и вымывание содержимого клетки после разрушения стенок [73]. Ультразвуковые волны изменяют свои физические и химические свойства после взаимодействия с подвергнутым воздействию растительным материалом, а их кавитационные эффекты способствуют высвобождению экстрагируемых соединений и усиливают массоперенос, разрушая стенки растительных клеток [74]. Преимуществом использования ультразвука является сокращение времени экстракции и количества используемого растворителя, а также увеличение выхода конечного продукта. Недостатком является возможность того, что большое количество приложенной энергии может разрушить фитохимические вещества, производя свободные радикалы [75].

Авторами [76] было проведено извлечение полифенолов из *Salvia officinalis* с помощью ультразвуковой экстракции. В сравнении с традиционными методами экстракции время протекания реакции удалось сократить на 20%.

Комбинация обработки сырья ультразвуком и микроволнами была изучена для извлечения липидов из овощей и источников микроводорослей. Одно только ультразвуковое облучение, только микроволновое облучение или комбинация обоих методов позволяет получить достаточно хороший результат экстракции с точки зрения сокращения времени в 10 раз, и увеличением выхода с 50% до 500% в сравнении с традиционными методами экстракции [77]. Таким образом, вышеперечисленные преимущества делают методы УЗ и СВЧ наиболее привлекательными для выбора методов экстракции. В таблице 2 представлены сравнительные характеристики некоторых методов экстракции растительного сырья.

Таблица 2 – Методы экстракции БАВ из растительного сырья [78]

| Метод экстракции | Растворители | Температура, °С | Давление, атм. | Время, мин | Количество растворителя | Полярность выделенных БАВ |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------|------------|-------------------------------|---|
| Мацерация | Вода, водные и неводные растворители | 15-25 | 1 | 10080 | Большое | Зависит от растворителя |
| Перколяция | Вода, водные и неводные растворители | 15-25, иногда 60-180 | 1 | 1440-2880 | Большое | Зависит от растворителя |
| Экстракция в аппарате Сокслета | Органические растворители | 50-70 | 1 | 720-1440 | Умеренное | Зависит от растворителя |
| Сверхкритическая флюидная экстракция | CO ₂ | 30-70 | 100-350 | 20-80 | Отсутствует или незначительно | Неполярные и умеренно полярные соединения |
| Ультразвуковая экстракция | Вода, водные и неводные растворители | 15-25 | 1 | 60 | Умеренное | Зависит от растворителя |
| Микроволновая экстракция | Вода, водные и неводные растворители | 15-75 | 1 | 5-20 | Отсутствует или умеренное | Зависит от растворителя |
| Гидродистилляция | Вода | 50-90 | 1 | 180 | Умеренное | Эфирные масла (обычно неполярные) |

1.4 Маркетинговый анализ фармацевтического рынка фитопрепаратов Республики Казахстан на основе шалфея

За последние годы в фармацевтической отрасли Казахстана наблюдается значительный рост производства - объём выпущенной продукции отечественными производителями составил 42 млрд тенге. Одними из

приоритетных факторов в выборе сырья для разработки лекарственных средств являются эффективность и безопасность сырья, а также его доступность [79]. Территория Казахстана богата природными ресурсами, в том числе и растительными. Флора Казахстана удивляет редкими видами растений, здесь растут специфические для полупустынь и пустынь кустарники и ценные лекарственные травы, многие из которых обладают выраженной биологической активностью. Количество высших растений Казахстана в различных ботанических источниках варьирует от 5,5 до 6 тысяч видов, 1067-1118 родов и около 160 семейств [80].

Несмотря на широкую распространенность шалфея на территории Республики Казахстан, растительное сырье не пользуется высоким спросом у отечественных производителей в связи с тем, что шалфей лекарственный, используемый для производства, приобретает за пределами Республики Казахстан.

В ходе сегментационного анализа по производственному признаку установлено преобладание доли лекарств, содержащих в своем составе шалфей: зарубежного производства - 75 наименований (87%), остальные - 11 наименований (13%) отечественного производства (рисунок 9). Казахстанскими производителями ЛС, содержащих шалфей являются и БАДов на основе шалфея: ТОО «Леовит» и ТОО «Зерде-Фито».



Рисунок 9 – Доля рынка Казахстанских производителей по производству препаратов шалфея

В ходе анализа, выявлено, что фармацевтический рынок лекарственных средств, содержащих шалфей представлен 86 наименованиями (таблица 3).

Таблица 3 – Анализ ассортимента ЛС, содержащих шалфей по странам-производителям [81]

| Страны-производители | Количество препаратов | |
|----------------------|-----------------------|-----------------|
| | число препаратов, ед | удельный вес, % |
| Россия | 47 | 54,65 |
| Казахстан | 11 | 12,79 |
| Германия | 9 | 10,46 |
| Польша | 4 | 4,65 |
| Нидерланды | 3 | 3,48 |
| Швейцария | 2 | 2,32 |
| Украина | 1 | 1,16 |
| Австрия | 1 | 1,16 |
| Канада | 1 | 1,16 |
| Китай | 1 | 1,16 |
| Беларусь | 1 | 1,16 |
| Словакия | 1 | 1,16 |
| Франция | 1 | 1,16 |
| Чехия | 1 | 1,16 |
| Италия | 1 | 1,16 |
| Испания | 1 | 1,16 |
| Всего | 86 | 100 |

Как следует из данных таблицы 3, рынок шалфей-содержащих лекарственных препаратов представлен товарами 16 стран-производителей. Лидерами по производству данной группы являются: Россия 47 наименований (54,65%), Казахстан 11 наименований (12,79%) и Германия 9 наименований (10,46%).

По проведенному исследованию установлено, что лекарственные средства, содержащие шалфей выпускаются в разнообразных лекарственных формах (рисунок 10).

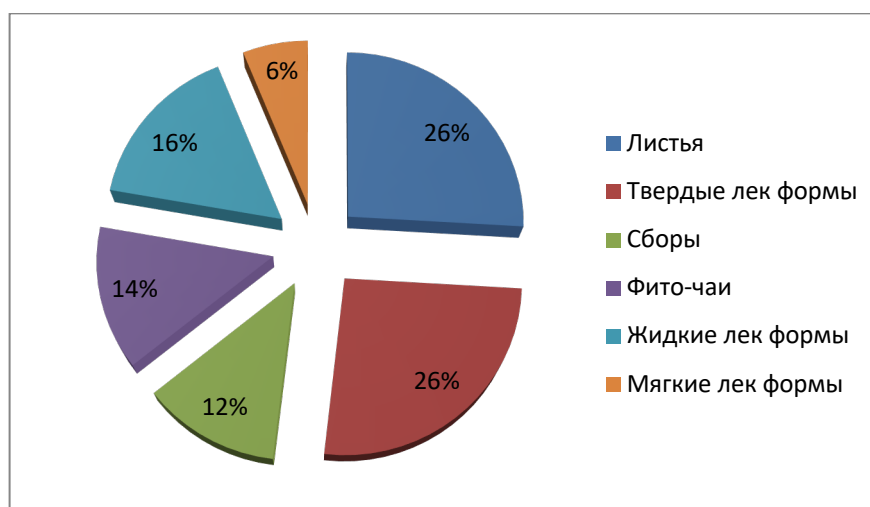


Рисунок 10 – Лекарственные формы препаратов, содержащих шалфей всех стран-производителей

Из рисунка 10 следует, что наибольший удельный вес в общей номенклатуре занимают твердые лекарственные формы (26%) и листья (26%), затем следуют жидкие лекарственные формы 16% и фито-чай 14%. Наименее распространенной лекарственной формой является мягкая лекарственная форма и составляет 6% от общего числа.

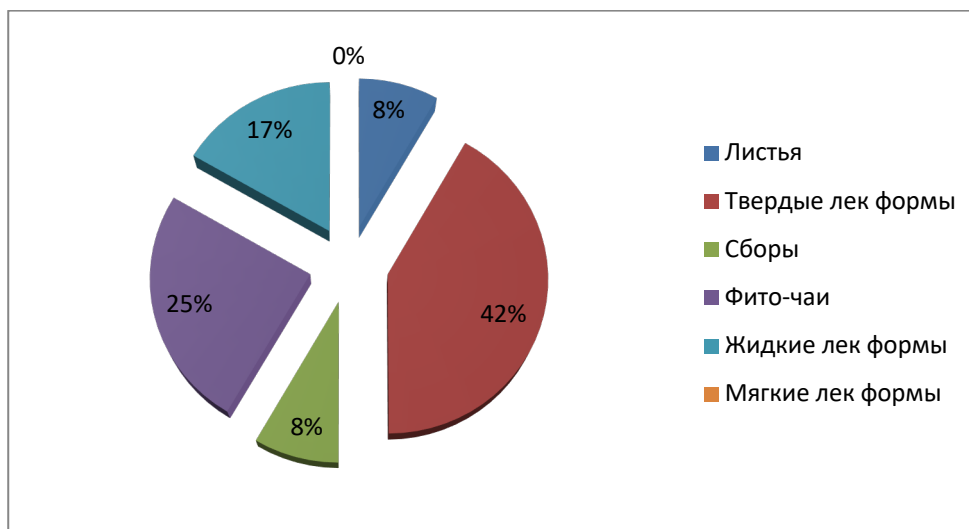


Рисунок 11 – Лекарственные формы препаратов, содержащих шалфей отечественного производства

Из рисунка 11 видно, что мягкие лекарственные формы, содержащие шалфей в Республике Казахстан разработаны не были. На рисунке 10 всего 6 % из общей доли приходится на мягкие лекарственные формы, из которых странами производителями мази, содержащей шалфей являются: Чехия (Dr. Poroв), Испания (Scala Dei) и Италия (Хeniya Global). Кроме того, установлено, что твердые лекарственные формы являются наиболее популярной формой выпуска лекарственных средств на основе шалфея, доля содержания которых составляет 42%.

На основании анализа фармацевтического рынка лекарственных средств Казахстана выявлено, что большая часть препаратов выпускается в твердой лекарственной форме, также установлено, что в Казахстане ведущим отечественным производителем твердых лекарственных форм является ТОО «Леовит», производителем лекарственных форм в виде листьев, сборов и фито-чаев является ТОО «Зерде-фито». С помощью анализа удалось определить, что на фармацевтическом рынке Казахстана все лекарственные средства отечественного производства изготовлены на основе шалфея лекарственного (*Salvia officinalis*), ареал распространения которого находится за пределами Республики Казахстан. Шалфей степной (*Salvia stepposa*), произрастающий на территории Республики Казахстан не изучен для применения в медицине и соответственно не используется для производства шалфей-содержащих лекарственных средств отечественными производителями, несмотря на то что запасы шалфея на территории

Казахстана достаточно велики и доступны. Таким образом, актуальной является разработка твердых лекарственных форм на основе шалфея степного, в связи с популярностью таблеток для рассасывания на основе шалфея лекарственного на территории РК.

1.5 Технологии получения таблетированных лекарственных форм

Согласно маркетинговым исследованиям, прогнозируется рост мирового рынка твердых лекарственных форм (ТЛФ) для перорального применения, который к концу 2027 года может достичь 926,3 миллиарда долларов [82]. ТЛФ являются наиболее распространенной лекарственной формой, используемой в мире, преимущества которых заключаются не только в простоте и экономичности изготовления, относительной стабильности, но также обеспечивают преимущества с точки зрения простоты упаковки и транспортировки по сравнению с другими лекарственными формами.

Для пациентов простота изготовления, удобство введения, точная дозировка и стабильность по сравнению с пероральными жидкостями, защита от несанкционированного доступа по сравнению с капсулами, безопасность по сравнению с исходными лекарственными формами делают эту лекарственную форму популярной и универсальной.

Таблетки представляют собой прессованную твердую лекарственную форму, содержащую лекарственные средства с наполнителями или без них, приготовленные путем прессования лекарственного средства или смеси лекарств со вспомогательными веществами.

Разработка и производство фармацевтических таблеток – это сложный многоступенчатый процесс, при котором необходимо учитывать множество факторов: правильная дозировка лекарственного вещества, время доставки БАВ с надлежащей скоростью и в нужное место. Большинство лекарственных веществ не обладают необходимыми свойствами, обеспечивающими удовлетворительный перенос в полость матрицы таблеточного пресса. В результате они подвергаются предварительной обработке либо по отдельности, либо в комбинации с подходящими наполнителями для образования сыпучих гранул, которые поддаются таблетированию [83].

ТЛФ должны обладать следующими свойствами:

- Механическая прочность. ТЛФ должны обладать достаточной прочностью для защиты от повреждений при механических воздействиях в процессе упаковки, транспортировки и хранения.
- Физическая стабильность с течением времени.
- Точность дозирования, не должна выходить за пределы норм установленных в НД.
- Распадаемость и растворимость, т.е. способность распадаться в сроки, установленные НД на определенные виды таблеток.
- Химическая стабильность с течением времени, для предотвращения химических реакций между компонентами с течением времени.

Таблица 4 – Преимущества и недостатки таблеток [84]

| Преимущества | Недостатки |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Из всех лекарственных форм для перорального применения имеют максимальную точность дозирования; 2. Самая низкая стоимость среди всех лекарственных форм для перорального приема; 3. Легче и компактнее; 4. Легкость в употреблении; 5. Возможность получения ЛС с замедленным высвобождением; 6. Возможность замаскировать неприятный запах и горечь, используя различные техники нанесения покрытия; 7. Возможность крупносерийного производства; 8. Наибольшая химическая и микробная стабильность из всех пероральных лекарственных форм; 9. Идентификация продукта осуществляется легко и быстро, не требуя дополнительных действий. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Трудность при глотании у детей и больных без сознания; 2. Некоторые препараты невозможно спрессовать в плотные компакты из-за аморфной природы, низкой плотности; 3. Трудность изготовления препаратов с плохим смачиванием, медленным растворением, оптимальной абсорбцией с высоким содержанием ЖКТ, которые все же будут обеспечивать полную биодоступность лекарства средства; 4. Раздражающее действие на слизистую желудочно-кишечного тракта некоторыми твердыми веществами (например, аспирином); 5. Возможность проблем с биодоступностью в результате медленного распада или растворения. |

Таблетки можно получить путем влажного гранулирования, сухого гранулирования или прямого прессования. Производство таблеток требует ряда единичных операций, таких как взвешивание, измельчение, гранулирование, сушку, смешивание, прессование, нанесение покрытия и упаковка. Независимо от используемого метода единичные процессы - взвешивание, измельчение и смешивание - одинаковы; последующие шаги отличаются. В общем, выбор процесса приготовления, используемого при производстве таблеток, зависит от следующих факторов: свойства сжатия ЛВ, физической и химической стабильности ЛВ в процессе производства, размер частиц, наличие необходимого технологического оборудования, стоимость процесса изготовления [85].

В основном различают 2 типа таблеток:

- Тритурационные таблетки (формованные и микропланкетки);
- Прессованные таблетки.

Тритурационные таблетки. Хотя большинство имеющихся в продаже таблеток в основном получают методом прессования, таблетки также можно получить путем формования. Тритурационные таблетки получают с помощью оборудования для производства таблеток или вручную путем формования увлажненного таблеточного материала в форму. Сцепление частиц в тритурационных таблетках осуществляется в результате аутогезии [86]. Такие таблетки обладают малой прочностью и не подвергаются действию давления, в отличие от прессованных [87]. Данный вид таблеток получают в нескольких случаях: дозировка лекарственного вещества незначительна либо

использование давления не допустимо по объективным причинам. Изготовление таких таблеток на таблеточном прессе технически достаточно не просто в связи с малым размером ($d = 1-2$ мм). Кроме того, тритурационные таблетки изготавливают только в тех случаях, когда необходимы таблетки, быстро растворяющиеся в воде, в связи с тем, что в них не используются антифрикционные вещества, которые являются нерастворимыми в воде.

Прессованные таблетки. Это наиболее широко используемые ТЛФ, поэтому они должны удовлетворять ряду физических требований в отношении твердости, толщины, хрупкости и однородности веса [88]. Для обеспечения этих характеристик таблеток в соответствии с выбранными ингредиентами существует три различных технологии обработки:

- Прямое прессование;
- Сухое гранулирование;
- Влажное гранулирование.

Прямое прессование. Прямое прессование заключается в прессовании таблеток непосредственно из порошковых материалов без изменения физической природы материалов [89]. Этот метод применим для кристаллических веществ, имеющих хорошие характеристики прессуемости и текучести, таких как: калиевая соль (хлорат, хлорид, бромид), хлорид натрия, хлорид аммония, метенамин и т.д. Прессованные таблетки получают путем однократного прессования с использованием таблеточных машин. После того, как некоторое количество порошкообразного или гранулированного таблетизирующего материала перетекает в фильеру, верхний и нижний пуансоны таблеточной машины сжимают материал под высоким давлением (\sim тонн /дюйм²). Прямое прессование является наиболее популярным методом производства прессованных таблеток, поскольку оно обеспечивает самый короткий, наиболее эффективный и наименее сложный способ изготовления таблеток [90]. Производитель может смешать АРІ с наполнителем и лубрикантом с последующим прессованием, что упрощает обработку продукта [91]. Никаких дополнительных этапов обработки не требуется. Ингредиенты, чувствительные к влаге или нагреванию, которые были бы противопоказаны при влажном гранулировании, также могут использоваться в этом типе процесса. Однако он требует очень тщательного выбора вспомогательных веществ по сравнению с процессами гранулирования, поскольку сырье должно демонстрировать хорошую текучесть и сжимаемость [92].

При изготовлении прессованных таблеток для контроля качества следует контролировать внешний вид, физические характеристики и терапевтическую активность. Форма и размер таблеток определяются матрицей и штампами, используемыми для сжатия таблетки. Для изготовления таблеток с оттиском используются штампы с оттиском. Пуансоны с выпуклыми оттисками создают углубленные (тисненные) оттиски на таблетках, и наоборот. Согласно постановлению FDA, вступившему в силу в 1995 г., все твердые лекарственные формы, предназначенные для употребления в пищу человеком, должны иметь идентификационные коды продукта. Отпечатки кода в

сочетании с размером, формой и цветом продукта позволяют однозначно идентифицировать лекарственный продукт и его производителя или дистрибьютора. Отпечатки кода могут содержать любую комбинацию букв и цифр или номер национального кода лекарственного средства продукта, а также любые знаки, символы, логотипы или монограммы, присвоенные фармацевтической компанией продукту. Выходные данные каждого продукта должны быть зарегистрированы в FDA. Таблетки должны быть достаточно твердыми, чтобы они не ломались во время упаковки, транспортировки и обычного обращения. В то же время как таблетки должны быть распадаться и растворяться должным образом после приема.

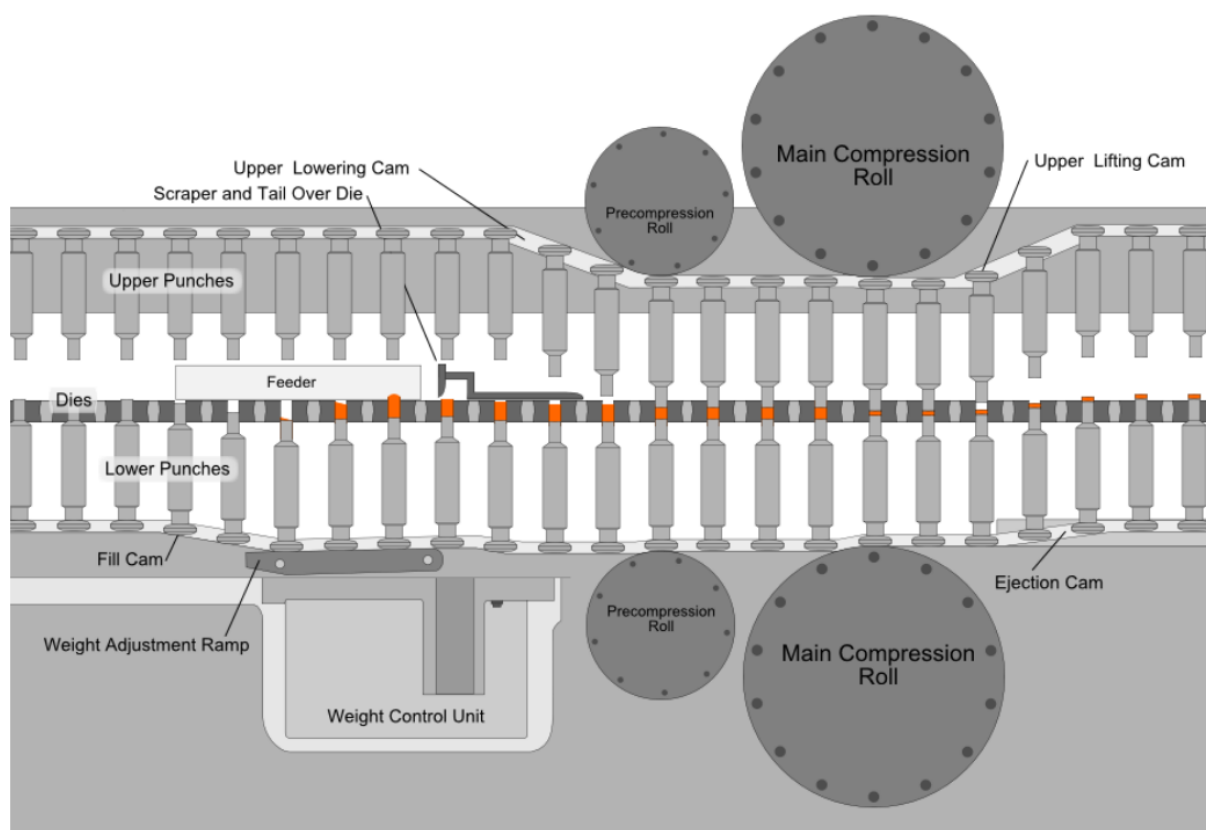


Рисунок 12 – Технология прессования [93]

Гранулирование. Гранулирование представляет собой процесс превращения порошкообразного материала в зерна определенной величины для улучшения сыпучести таблетлируемой смеси и предотвращения ее расслаивания [94]. Гранулирование бывает «влажным» и «сухим». Эти характеристики необходимы для сведения к минимуму вариаций веса таблеток и обеспечения высокой плотности для высокого веса заполнения таблетки и высокой пластичности при производстве твердых таблеток. Гранулирование сужает гранулометрический состав основного порошка таблеточного состава, устраняя проблемы сегрегации. Это, в свою очередь, обеспечивает превосходную прессуемость в процессе таблетирования, позволяя использовать более высокие количества АРІ и обеспечивать хорошее

активное распределение в таблетке. Однако гранулирование является более трудоемкой технологией по сравнению с прямым прессованием, и также существует риск перекрестного загрязнения продукта и потери продукта на различных этапах обработки (гранулирование, сушка, просеивание) [95]. Все эти факторы могут увеличить затраты по сравнению с прямым прессованием [96].

Сухое гранулирование. В настоящее время процесс сухого гранулирования представляет собой несколько стадий (уплотнений). При первоначальном уплотнении в таблеточную массу вводят сухие связывающие вещества, обеспечивающие сцепление частиц и затем порошкообразный материал подвергают прессованию, в ходе чего получают гранулят, который затем таблетуют – вторичное уплотнение [97].

Влажное гранулирование. При влажном гранулировании активный ингредиент, разбавители и разрыхлители хорошо перемешиваются или перемешиваются в смесителе-грануляторе (RMG) [98]. RMG - это многоцелевой измельчитель, который состоит из крыльчатки и измельчителя и используется для высокоскоростного диспергирования сухих порошков и гранулирования в воде или растворителе. Влажные материалы после стадий мокрого помола помещаются на большие поддоны и помещаются в сушильные камеры с циркулирующим воздушным потоком и термостабильным регулятором температуры. Обычно используемые сушилки - лотковая сушилка, сушилка с псевдоожиженным слоем. После сушки гранулы уменьшаются в размере за счет прохождения через сито с меньшим размером ячеек. После этого в виде мелкодисперсного порошка добавляется смазка или средство для скольжения, чтобы способствовать течению гранул. Затем эти гранулы прессуют, чтобы получить таблетку. Сухое гранулирование по сравнению с влажным гранулированием имеет более короткий и экономичный производственный процесс [99]. Поскольку сухая грануляция не требует тепла или влаги, она особенно подходит для активных ингредиентов, которые чувствительны к растворителям или неустойчивы к влаге и повышенным температурам.

Контроль качества таблеток. Одним из основных этапов промышленного производства таблеток является соответствие готовой продукции требованиям действующей нормативно-технической документации. Качество выпускаемых таблеток определяется различными показателями: органолептическими, физическими, химическими, бактериологическими и биологическими.

На определение качества таблеток влияют условия прессования, адгезионные и когезионные свойства, влажность таблетуемой массы, поверхность и точность пресс-инструмента, способ покрытия и др [100].

Контроль качества готовых таблеток проводят согласно требованиям фармакопейной статьи «Таблетки», а также частным фармакопейным статьям.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты и материалы исследования

2.1.1 Объекты исследования

Объекты исследования – дикорастущее растение флоры Казахстана *Salvia stepposa* Des.-Schost (шалфей степной), собранное в экспедиционных выездах по Карагандинской области, Республика Казахстан координаты сбора (N 49°88898'; E 73°15569') в фазе бутонизации и цветения в июле-августе 2020.

Экстракты, полученные из РС шалфея степного методами ультразвуковой, микроволновой экстракции и традиционной экстракцией (кипячением).

Таблетки, содержащие сухой экстракт листьев шалфея степного (МВШС-40).

2.1.2 Препараты сравнения

Бензилпенициллин - антибиотик группы биосинтетических пенициллинов, концентрация 1 млн. ЕД. Оказывает бактерицидное действие за счёт ферментативного ингибирования синтеза клеточной стенки микроорганизмов. Активен в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Нистатин - полиеновый противогрибковый антибиотик, высокоактивный в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Цефтриаксон - полусинтетический цефалоспориновый антибиотик III поколения широкого спектра действия, высокоактивный в отношении грамотрицательных палочковидных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

Аптечное сырье Шалфей 50 г листья «Алтайские травы» производитель Фармгрупп ООО (Россия), состав шалфей лекарственный (листья) *Salvia officinalis*. Сырье растительное измельченное. Настой шалфея обладает противомикробным, местным противовоспалительным и вяжущим действием.

2.1.3 Описание тест-систем

Антимикробная активность. Для изучения антимикробной активности использовали следующие штаммы микроорганизмов, полученных из Американской коллекции типовых культур: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231) и *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

Экспериментальные животные. При изучении острой токсичности исследуемого экстракта использовались белые аутбредные самки и самцы мышей 20-37 г и белые аутбредные самки и самцы крыс массой 150-300 г., полученные из Национального центра биотехнологии (Астана, Казахстан). Все животные содержались в условиях вивария НАО «Медицинский университет Караганды». Животные содержались в вентилируемых клетках с подстилкой из древесной стружки в контролируемых условиях при

температуре окружающей среды $21 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность $50 \pm 10\%$. Кормление животных проводилось 2 раза в сутки, кормом, содержащим натуральные ингредиенты. Вода была в распоряжении животных *ad libitum*.

2.1.4 Материалы и реактивы

Метиленовый синий, 10% раствор тимола в конц. H_2SO_4 , реактив Люголя, 70-% раствор $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, конц. H_2SO_4 , 10% спиртовой раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 1-% спиртовой раствор FeCl_3 , реактив Драгендорфа, хлороформ, метанол, спирт 96%, вода высокой степени очистки была приготовлена с помощью системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Франция), гексан, раствор формалина, муравьиная кислота (99-100%, AnalaR NORMAPUR®, VWR Chemicals, Франция).

Стандарты 20 фенольных соединений: кофейная кислота, галловая кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид (цинарозид), кверцетин-3-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол (Sigma – Aldrich, США).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Подготовка сырья

Анализируемое сырье заготовлено в период цветения в июне-июле 2020 г. в окрестностях Карагандинской области и представляет собой отдельно собранные листья и цветки. Сушку сырья проводили при $23\text{--}25^\circ\text{C}$, избегая воздействия прямых солнечных лучей, в течение 7 дней. Влажность травы шалфея степного после высушивания составила не более 6,51%. Полученное сырье упаковывали и хранили в соответствии с требованиями нормативной документации (ГОСТ 2226-88) при комнатной температуре в сухом защищенном от света, хорошо проветриваемом помещении при температуре не выше 25°C .

2.2.2 Методы фармакогностического исследования растительного сырья *Salvia stepposa* Des.-Schost

Макроскопический анализ. Изучение макроскопических признаков растительного сырья *Salvia stepposa* Des.-Schost проводилось в соответствии с требованиями ГФ РК т. I и Ф ЕАЭС 2.1.8.17. РС, представляющее собой надземные органы (стебли, листья и соцветия) высушивали и рассматривали при увеличении $\times 5$ и $\times 10$ раз. Микрофотографии делали с помощью USB-микроскопа Levenhuk. Описание морфологического строения осуществляли при помощи методических указаний Лотовой [102].

Микроскопический анализ. Свежесобранные органы (лист, стебель, черешок и соцветия) фиксировали в смеси спирта (70%), глицерина и дистиллированной воды в соотношении 1: 1: 1 (раствор Страуса-Флеминга). При определении анатомических особенностей листовой пластинки

исследуемых видов были отобраны наиболее развитые интактные листья в средней части жилки, а также проанализированы фрагменты (поверхностные и поперечные срезы) в средней части между главной жилкой и крайней частью. Поперечные срезы стебля и черешка проводили по всей длине через каждые 2-3 см. Анализ микроскопических признаков сырья проводился по ГФ РК, т. I 2.8.3 и Ф ЕАЭС 2.1.8.17. Работа проводилась на микроскопе «Биомед-4» с окулярами 10 ×, 20 ×, линзами 4 ×, 10 ×, 20 ×, 40 ×.

Гистохимический анализ. Свежесобранные органы консервировали в смеси спирта (70%), глицерина и дистиллированной воды в соотношении 1: 1: 1 (раствор Страуса-Флеминга). Гистохимическое исследование проводилось для поперечных срезов стебля, листьев, черешка и цельного цветка с целью определения следующих групп метаболитов: эфирное масло, полисахариды, крахмал, инулин, сесквитерпеновые лактоны, фенольные соединения, флавоноиды, алкалоиды [103-105]. Изменение окраски определенных тканей служило признаком локализации определенных групп метаболитов в тканях шалфея степного. Гистохимический анализ сырья проводился по ГФ XI, ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Измельченность сырья. Определение измельченности сырья проводили методом ситового анализа в соответствии с ГФ РК, т. I «Определение степени измельченности лекарственного растительного сырья». Для цельного сырья количество частиц, проходящих сквозь сито с указанным размером отверстий, не должно превышать 5 %, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Содержание примесей. Содержание посторонних примесей определяли путем визуального осмотра согласно ГФ РК, т. I, 2.8.2 «Определение содержания примесей» и монографией Ф ЕАЭС 2.1.8.2 [106].

Тяжелые металлы в растительном сырье. Определение содержания тяжелых металлов проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой по ГФ РК, т. I «Определение тяжелых металлов растительном сырье» 2.2.23 и Ф ЕАЭС 2.1.2.41.

2.2.3 Изучение фармацевтико-технологических параметров растительного сырья.

Определение удельной массы, объемной массы, насыпной массы, пористости, порозности, свободного объема слоя сырья проводили в соответствии с методиками, приведенными в учебном пособии Мининой [107].

Общая зола. Определение общей золы высушенного сырья проводили в соответствии с ГФ РК, т. I, 2.4.16 «Зола общая» и фармакопейному методу Ф ЕАЭС 2.1.4.16.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Определение золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте проводили по ГФ РК, т.

I, 2.8.1 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» и фармакопейному методу Ф ЕАЭС 2.1.8.1.

Потеря в массе при высушивании. Определение потери в массе при высушивании лекарственного растительного сырья проводили по ГФ РК т. I, 2.2.32 «Потеря в массе при высушивании» и Ф ЕАЭС 2.1.2.31.

Эфирные масла. Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье проводили по ГФ РК, т. I, 2.8.12 «Определение эфирных масел в лекарственном растительном сырье» и Ф ЕАЭС 2.1.8.12.

Экстрактивные вещества в лекарственном растительном сырье. В качестве экстрагента использовали воду и этанол (30%, 40%, 70%, 90%). Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье проводили по ГФ РК, т. I «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье».

Микробиологическая чистота. Определение микробиологической чистоты лекарственного растительного сырья проводили по ГФ РК, т. I, 2.6.12, ГФ РК, т. I, 2.6.13, ГФ РК, т. I, 5.1.4 категория 4B и Ф ЕАЭС 2.3.1.4.

2.2.4 Физические и физико-химические методы исследования

ТСХ. Тонкослойная хроматография была выполнена в соответствии с ГФ РК, т.1, 2.2.27 и Ф ЕАЭС 2.1.2.26 с использованием пластин «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», длина волны УФ 366 нм, система растворителей хлороформ-метанол-вода очищенная P, 26:14:3.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Анализ полифенольных соединений экстрактов проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с ультрафиолетовым детектором (УФ) и тандемной масс-спектрометрией в реальном времени (ESI-MS/MS) по методике [72]. Анализ выполняли на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» (Agilent Technologies, США), оборудованном четырехканальным насосом G1311C 1260 Pump VL, автосамплером G1329B 1260 ALS, термостатом колонки G1316A 1260 TCC; детектором с переменной длиной волны G1314C 1260 VWD VL + и масс-спектрометром G6130A Quadrupole LC-MS/MS. Использовалось программное обеспечение ChemStation с управлением Windows NT.

Хроматографическое разделение проводили на колонке с обращенно-фазовым сорбентом «Zorbax Eclipse Plus C18» (150 мм × 4,6 мм, 3,5 мкм, Agilent Technologies, США). Для разделения использовали градиент подвижной фазы А (2,5% раствор муравьиной кислоты в воде) и подвижной фазы В (2,5% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле). Профиль градиента был установлен следующим образом: 0,00 мин 3% элюент В, 7,00 мин 20% элюент В, 7,10 мин 30% элюент В, 27,00 мин 40% элюент В, 35,00 мин 50% элюент В, 35,10 мин 20% элюент В и 40.00 мин. 3% элюент В. Скорость потока 0,4 мл/мин, температура колонки 30 °С. Ультразвуковые экстракты и стандарты растворяли в смеси растворителей ацетонитрил: вода

очищенная $P = 1:1$ (об./об.). Объем инъекции составлял 20 мкл для растворов экстрактов и стандартов. Выходящий из колонки поток проходил через УФ-детектор до попадания на интерфейс МС. Длины волн УФ-детектирования составляли 280 нм и 360 нм. Детектирование масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением проводили в отрицательном режиме со следующими оптимизированными параметрами: температура капилляра 350°C; осушающий газ N_2 8 л/мин; давление распылителя 45 фунтов на квадратный дюйм. Сбор данных осуществлялся с использованием метода мониторинга множественных реакций, который отслеживает только определенные массовые переходы в течение заданного времени удерживания.

Идентификация каждого соединения была выполнена путем сравнения их времени удерживания с аутентичными стандартами, а также подтверждена спектрометром Agilent G6130A LC-MS/MS, оборудованным источником ионизации электрораспылением. Уровень содержания фенольных соединений в экстрактах рассчитывали методом внешнего стандарта.

Газовая хроматография. Исследование компонентного состава эфирного масла шалфея степного проводили методом ГХ-МС по ГФ РК т. I 2.2.28 и Ф ЕАЭС 2.1.2.27 на газовом хроматографе Agilent 7890 с масс-спектрометрическим детектором.

Приготовление пробы 150 мкл эфирного масла растворяли в 800 мкл гексана и перемешивали до полного смешения масла.

Хроматографические условия: колонка капиллярная, объем пробы 1 мкл, газ носитель гелий, скорость газа носителя 1 мл/мин, деление потока 1:25, температура колонки 40 °С, увеличение температуры с 2 °С/мин до 280°C, температура испарителя - 280°C, масс-спектрометрический детектор: температура - 240°C, $EI^+ = 70$ eV, время сканирования с 5 по 50 мин, режим сканирования ионов 39-500 м/з. Процентное содержание компонентов вычисляли автоматически, исходя из площадей пиков на хроматограмме. Компоненты идентифицировали по масс-спектрам и временам удерживания с использованием библиотеки NIST.

2.2.5 Методы контроля качества сухого экстракта листьев шалфея степного (МВШС-40)

Описание в соответствии с ГФ РК т. I, с. 556-558. Общая статья «Экстракты» и ГФ РК т. I, 2.8.8.

Растворимость в соответствии с ГФ РК т. I, 1.4, с.25.

Идентификация. Качественная реакция в соответствии с НД.

Потеря в массе при высушивании в соответствии с ГФ РК т. I, 2.8.17 и Ф ЕАЭС 2.1.8.16.

Тяжелые металлы в соответствии с ГФ РК т. I, 2.2.23 и Ф ЕАЭС 2.1.2.41.

Микробиологическая чистота по ГФ РК, т. I, 2.6.12, ГФ РК, т. I, 2.6.13, ГФ РК, т. I, 5.1.4 категория 4В и Ф ЕАЭС 2.3.1.4

Количественное определение. Количественное определение розмариновой кислоты проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» в соответствии с НД.

Процентное содержание розмариновой кислоты (X) в сухом экстракте листьев *Salvia stepposa* рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 1 \cdot 100}$$

где, S_1 -значение площади пика розмариновой кислоты;
 m_0 -масса стандартного образца розмариновой кислоты, г.;
 m_1 -масса сухого экстракта листьев *Salvia stepposa*, г.;
P-содержание розмариновой кислоты в стандартном образце, выраженное в процентах. Розмариновая кислота (молекулярная формула $C_{18}H_{16}O_8$), CAS – 20283-92-5, чистота 98% (Sigma – Aldrich, USA).

2.2.6 Методы доклинических (неклинических) исследований сухого экстракта листьев шалфея степного

Скрининг на выявление антимикробной активности эфирного масла и экстрактов шалфея степного. Антимикробную активность экстрактов определяли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII, ОФС.1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» с тест-культурами: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231) и *Pseudomonas aeruginosa* 9027 согласно требованиям ГФ РК. Высеивали данные культуры методом газона на следующих питательных средах: среда Чистовича (желточно-солевой агар), питательный агар, среда Эндо, среда Сабуро и питательная среда №9 ГРМ соответственно.

Водные, водно-спиртовые экстракты шалфея степного были растворены в стерильной дистиллированной воде, 30%, 40%, 70%, 90% этиловом спирте. Концентрации растворов находились в кратном соотношении (1:1,5:2) – 0,025; 0,0375; 0,05 г навески (экстракта) на 0,25 мл, 0,375 мл и 0,5 мл растворителя соответственно. Диски, пропитанные исследуемыми соединениями, переносили в чашки Петри, содержащие суспензию микробов в инкубационном бульоне. Взвесь суточной бульонной культуры тест-штаммов составила 10^5 - 10^6 КОЕ/мл. Затем чашки Петри с посевами инкубировали в течение суток для бактерий при $36 \pm 1^\circ\text{C}$, для грибов - 28°C . Бензилпенициллин, цефтриаксон для бактерий и нистатин для грибов являлись стандартами антимикробной активности в концентрации 1 мг/мл и были включены в каждый анализ. Результаты оценивали визуально, определяя наличие или отсутствие роста в среде, содержащей различные концентрации испытуемого соединения.

Скрининг на выявление противовоспалительной активности. Исследования проводились на 48 белых крысах обоего пола массой 210-220 г, которые были распределены на 8 групп по 6 животных в каждой: 1-6 опытные группы - животные, получавшие сухой экстракт листьев шалфея степного в дозе 25 мг/кг; 7 группа сравнения- животные, получавшие препарат сравнения диклофенак натрия, 8 группа контрольная – животные, получавшие растворитель.

Острую экссудативную реакцию (перитонит) вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты в объеме 1 мл на 100 г массы тела крыс. Через 3 часа животных забивали, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и оценивали его объем [108]. Исследуемые объекты изучали в дозе 25 мг/кг при пероральном введении в виде крахмальной слизи. Препарат сравнения диклофенак натрия вводили животным внутривентриально однократно в его эффективной дозе 8 мг/кг (ЕД₅₀). Контрольные животные получали эквивалентное количество крахмальной слизи. Исследуемые объекты вводили однократно за 1 час до введения 1% раствора уксусной кислоты.

Противовоспалительную активность выражали в процентах уменьшения количества воспалительного экссудата в брюшной полости у опытных крыс по сравнению с контрольными.

Скрининг на выявление антиоксидантных свойств. Изучение антиоксидантных свойств сухого экстракта листьев шалфея степного проводили методом FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power assay).

К 1 мл исследуемых экстрактов в диапазоне концентраций 0-1 мг/мл добавляли 2,5 мл фосфатного буфера (0,2М, рН 6,6) и 2,5 мл 1% раствора гексацианоферрата (III) калия. Реакционную смесь инкубировали в течение 25 минут при температуре 50°C реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Смесь центрифугировали 3 минуты (1,5 оборотов/мин). Верхний слой объемом 2,5 мл смешивали с 2,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 0,1 % FeCl₃. Измерение оптической плотности производили при $\lambda = 700\text{nm}$.

Скрининг на выявление антирадикальной активности. Антирадикальное действие исследовали в отношении радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH•) [109].

Для оценки антирадикальной активности в тесте с DPPH-радикалом использовали этаноловый раствор 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (100 μM). Для отбора образцов с выраженной антирадикальной активностью смешивали 2 мл 100 μM этанолового раствора DPPH с 20 мкл исследуемого образца, растворенного в этаноле в концентрации 10 мг/мл. Таким образом, финальная концентрация испытуемого образца в реакционной смеси составила 100 $\mu\text{g/ml}$. Через 10 минут после добавления раствора испытуемого образца к раствору DPPH-радикала измеряем снижение оптической плотности при 515 нм. Для образцов, способных снижать оптическую плотность более чем на 50%, проводили тест на взаимодействие с DPPH-радикалом в финальных концентрациях исследуемых экстрактов от 5 до 100 $\mu\text{g/ml}$. После чего определяли концентрацию испытуемого экстракта, способную на 50% снижать оптическую плотность 100 μM раствора IC₅₀ (DPPH).

Определение острой токсичности. Период наблюдения животных после введения исследуемого экстракта 14 суток, метод введения экстракта внутрибрюшинный. Расчет вводимой дозы производился с учетом веса экспериментальных животных. Стартовая доза 500 мг/кг, средняя 1000 мг/кг и максимальная 2000 мг/кг. Рассчитанную дозу необходимую для введения

растворяли в воде объемом для мышей 0.2 мл, для крыс 0.5 мл. Животных взвешивали при формировании групп, перед введением исследуемого экстракта, а также на 1, 3, 5, 7 и 14 сутки после введения экстракта. После введения ежедневно оценивали влияние корма и воды, а также поведение животных.

Гистоморфологическое исследование.

Гистологическое исследование. После выведения животных из эксперимента вырезка тканей печени и селезенки (определение оптимальной локализации, размера образца, направления среза и количества срезов) проводилась в соответствии [110].

Печень: поперечный разрез левой и правой медиальной доли печени.

Селезенка: поперечный разрез по наибольшему выступу селезенки.

Каждый из образцов ткани, взятых из печени и селезенки, фиксировали погружением в 10% нейтральный забуференный формалин при комнатной температуре. Образцы оставляли в фиксаторах на 24 часа. После фиксации ткани промывали в проточной воде, обезвоживали погружением в этиловый спирт возрастающей концентрации, очищали в двух сменах ксилола, заливали в парафиновые блоки при комнатной температуре.

Срезы тканей толщиной 5 мкм делали на ротационном микротоме «Leica SM 2000R». Ленты, содержащие 8-10 срезов, собирали и помещали во флотационную ванну для тканей при 40°C, а затем помещали на предметные стекла для микроскопии. Перед окрашиванием срезы тканей депарафинировали ксилолом и гидратировали этанолом. После промывания предметных стекол в дистиллированной воде срезы окрашивали гематоксилином Майера. Срезы кратковременно промывали проточной водопроводной водой и докрашивали 1% спиртовым эозином в течение 1 мин. Срезы исследовали методом световой микроскопии. Микроскопирование препаратов производилось на микроскопе Zeiss AxioLab 4.0 увеличениями x100, x200 и x400. Для фотографирования изображений была использована программа AxioVision 7.2 для Windows.

Морфометрическое исследование. Морфометрический анализ проводился двумя независимыми экспертами, полуколичественно, вслепую (без сведений о принадлежности животного к группе и проведенном вмешательстве).

Гистопатологические изменения группировались на основе двух основных критериев:

(1) сосудистые изменения, включая застой сосудов, экстравазацию эритроцитов и образование гематомы;

(2) воспалительно-некротические изменения, включая структурные изменения, некроз, фиброз, гидропическую дегенерацию, вакуолизацию цитоплазмы, ядерные изменения, абсцессы, регенерацию клеток и наличие воспалительного инфильтрата.

Так печеночную ткань дополнительно оценивали на предмет изменений в архитектуре, портальных триад, гепатоцитов, воспаления и наличия дегенерации, некроза и жировых изменений [111].

Полуколичественное сравнение структурных изменений в срезах тканей варьировало от 0 (нормальная структура) до 5 баллов (тяжелые патологические изменения).

Гистопатологические изменения в тканях печени и селезенки оценивались следующим образом:

- без изменений - 0 (без различимых изменений, 0%);
- легкие изменения - 1 (инициация изменений, до 10%);
- минимальные изменения - 2 (очаговые изменения, 11-25%);
- умеренные изменения – 3 (распространенные изменения, 26-75%);
- выраженные изменения – 4 (диффузные изменения, 76-90%);
- тяжелые изменения - 5 (широко распространенные изменения, 91-100%) [112].

Изучение цитотоксичности. Тест-объектом являлись дрожжи *S.cerevisiae* (препарат сушеных пекарских дрожжей “GRAND”). Из МВШС-40 (96-% этиловый спирт) приготовили разведение 1:30. Антибиотик нистатин растирали в ступке до получения однородной массы и готовили раствор с концентрацией 0,3 мг/мл. В 20 мл исследуемой пробы были внесены 1,36 г дрожжей, полученная смесь суспензировалась, было добавлено 0,4 г глюкозы. Полученную смесь разлили по 7 мл в мерные пробирки и инкубировали в течение 15 минут, при 30 °С. По истечении 15 минут определяли объем образовавшейся пены и вычисляли скорость ее подъема по следующей формуле:

$$V = v/t \quad (7)$$

где v — скорость подъема пены (мл/мин), V — объем пены, мл, t — время, мин.

Ингибирующим эффектом являлось снижение скорости подъема пены, а стимулирующим – повышение скорости подъема пены. Контролем служила суспензия дрожжей, приготовленная на основе физиологического раствора. Эксперименты проводили в 3-х независимых опытах, с 3 параллельными измерениями.

В качестве тест-систем во второй части эксперимента были выбраны простейшие класса *Protozoa*. ГОСТ 53886 – 2010 (ИСО 146669:1999). Вода. Методы определения токсичности по выживаемости морских ракообразных.

Для получения инфузорий была набрана вода из аквариума в стерильную банку. После чего в течении 3-х дней в сухом и хорошо освещенном месте была высушена кожура от бананов. После почернения кожура была помещена в сосуд с аквариумной водой. Далее в течении 5-6 суток на поверхности сосуда образовалась прозрачно-белая пенка, напоминающая пелену. Это свидетельствовало о наличии простейших класса *Protozoa* в воде. Далее сосуд с инфузориями был помещен в термостат для обеспечения дальнейшего интенсивного роста.

Для начала была проведена прижизненная микроскопия. Для этого необходимо капнуть на предметное стекло 1-2 мкл жидкости, накрыть покровным стеклом и провести световую микроскопию. Для микроскопии

использовался световой коммерческой компании micros Austria на увеличении $\times 40$. В ходе микроскопии в одном препарате были обнаружены клеточные структуры, напоминающие животных класса protozoa вида *Ciliphora u Amoeba*. При прижизненной микроскопии были отмечены незначительные движения структур, что свидетельствует о жизнеспособности клеточных структур. В мазке, который был сделан из 1-2 мкл жидкости с материалом содержалось примерно 2-3 подвижные структуры. Соответственно в 1 мл жидкости содержится примерно 1500-2000 структур.

Для проведения теста мы добавили в 2 пробирки по 2 миллилитра раствора в каждую и добавили заранее подготовленный раствор исследуемого препарата в концентрации 1 мг, 0,5 мг и 0,25 мг на 1 л растворителя. В качестве растворителя использовалась вода очищенная Р. Далее проводилась микроскопия раствора из каждой пробирки. Для получения наиболее достоверного результата, эксперимент повторялся 3 раза с перерывом в 1 сутки.

Третьим тест-объектом для исследования стали рачки *Artemia salina*. Для проведения эксперимента был использован набор, содержащий в себе цисты *Artemia salina*. В качестве резервуара была выбрана пластиковая тара размерами 18см x 35см x 8см для обеспечения хорошей аэрации. Для Освещения была выбрана диодная лампа артикула E17 мощностью 110 В. Прораствание цист так же зависит от температурного режима в комнате хранения. Тара с цистами хранилась при комнатной температуре 24°C.

Прораствание цист *Artemia salina* в общей сложности заняло 3-е суток. На 3-е сутки в резервуаре появились полноценные зрелые особи, с характерной двигательной активностью. Для проведения эксперимента были подготовлены 10 пробирок. В эти пробирки с помощью дозатора была добавлена вода очищенная Р, по 2 мл в каждую и живые *Artemia salina* в количестве 30 штук. В течении 20 минут проводилось наблюдение за жизнеспособностью *Artemia salina* в пробирке, для исключения получения ложных данных.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка данных проведена в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РК. Достоверность численных данных оценивали, используя критерий Стьюдента и критерий Фишера. Различия между группами считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

2.2.7 Методы контроля качества таблеток на основе сухого экстракта листьев шалфея степного

Описание. ГФ РК, т. 1, с. 550 общая статья «Таблетки» и Ф ЕАЭС 2.1.6.0. *Идентификация* в соответствии с НД.

Средняя масса таблеток. Определение средней массы таблеток проводили в соответствии требованиями ГФ РК т. I, 2.9.5 и Ф ЕАЭС 2.1.9.5.

Распадаемость. Распадаемость проводили в соответствии с ГФ РК т. I, 2.9.1 и Ф ЕАЭС 2.1.9.1 на тестере распадаемости Julabo (Германия).

Растворение. Тест растворение проводили в соответствии требованиями ГФ РК т. I, 2.9.3 и Ф ЕАЭС 2.1.9.3.

Родственные примеси в соответствии с НД.

Истираемость. Истираемость таблеток проводили согласно ГФ РК т. I, 2.9.7 и Ф ЕАЭС 2.1.9.6 на тестере истираемости АЕ-1 фирмы Charles Isch AG.

Устойчивость таблеток к раздавливанию. Устойчивость таблеток к раздавливанию проводили в соответствии с ГФ РК т. I, 2.9.8 и Ф ЕАЭС 2.1.9.7 на тестере прочности таблеток НС 6.2 фирмы Kraemer Elektronik GmbH.

Микробиологическая чистота по ГФ РК, т. I, 2.6.12, ГФ РК, т. I, 2.6.13, ГФ РК, т. I, 5.1.4 категория 3В и Ф ЕАЭС 2.3.1.4.

Потеря в массе при высушивании. Определение потери в массе при высушивании проводили по ГФ РК т. I, 2.2.32 «Потеря в массе при высушивании» и Ф ЕАЭС 2.1.2.31.

Количественное определение. Количественное определение розмариновой кислоты проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» в соответствии с НД.

Процентное содержание розмариновой кислоты (X) в таблетках, содержащих сухой экстракт листьев *Salvia stepposa* рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 1.100}$$

где, S_1 -значение площади пика розмариновой кислоты;

m_0 -масса стандартного образца розмариновой кислоты, г.;

m_1 - масса таблеток, содержащих сухой экстракт листьев *Salvia stepposa*, г.;

P-содержание розмариновой кислоты в стандартном образце, выраженное в процентах. Розмариновая кислота (молекулярная формула $C_{18}H_{16}O_8$), CAS – 20283-92-5, чистота 98% (Sigma – Aldrich, USA).

3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТРАВЫ *SALVIA STEPPOSA*, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В КАРАГАНДИНСКОЙ ОБЛАСТИ

3.1 Сбор и краткое описание надземной части *Salvia stepposa*

При выборе сырья для разработки лекарственного средства акцент был сделан на новое, не изученное ранее сырье. В результате анализа литературных данных был выбран шалфей степной (*Salvia stepposa* Des.-Schost), в связи с отсутствием в литературе данных о составе, свойствах и применении данного вида в медицине. Шалфей степной относится к семейству *Lamiaceae* и является родственным шалфею лекарственному (*Salvia officinalis*), включенному в ГФ РК. Ареал распространения шалфея степного в РК достаточно обширный, что позволяет использовать данный вид сырья без вреда для флоры Казахстана. Растёт шалфей степной на пустырях, по берегам рек, в степях и сухих склонах. Широко распространен в Восточной Европе, Западной Сибири, Средней Азии.

В качестве растительного объекта исследования использовалась надземная часть шалфея степного, собранная в Центральном Казахстане в окрестностях г. Караганды (рисунок 13). Исследуемое сырье собрано в период цветения в июне-июле 2020 года и представляет собой смесь стеблей (до 35-50 см), черешков, листьев и цветов. Заключение о видовой принадлежности сырья представлено в Приложении А.



Рисунок 13 – *Salvia stepposa* Des.-Schost

Идентификация проводилась путем сравнения собранного сырья с коллекционным материалом Гербария Института ботаники и фитоинтродукции МНВО РК и по определителям [113].

Оценена совокупная площадь зарослей *Salvia stepposa* на территории Карагандинской области, которая составила 45,4 га, урожайность изменялась от 284 до 462 кг/га. Итоговый эксплуатационный запас оценен в 16677 кг, объем возможного сбора – 8339 кг.

3.2 Микро- и макроскопический анализ надземной части *Salvia stepposa*

Макроскопический анализ. Лист шалфея степного удлиненный, узко-яйцевидный, с клиновидным основанием, тупой верхушкой и мелко-городчатым краем. Верхняя сторона листа окрашена в темно-зеленый цвет, нижняя в светло-коричнево-зеленый (рисунок 14). Поверхность листа с обеих сторон шероховатая, бархатистая, опушена мелкими простыми трихомами, кроме того, вдоль жилок листа расположены более удлиненные белые трихомы. Жилки хорошо заметны как с нижней, так и с верхней стороны, но по большей части выступают с нижней стороны листа. Тип жилкования – сетчато-нервное, листорасположение – супротивное.



Верхняя сторона листа



Нижняя сторона листа

Рисунок 14 – Внешний вид верхней и нижней стороны листа шалфей степного

Стебель прямостоячий в диаметре достигает 3-5 мм, на поперечном срезе 4-угольный. Поверхность стебля густо покрыта многочисленными прямыми и изогнутыми волосками белого цвета. Стебель в верхней части окрашен в зеленый цвет, в нижней – в фиолетовый (рисунок 15).



Нижняя часть стебля



Верхняя часть стебля

Рисунок 15 – Внешний вид стебля шалфея степного

Соцветие длиной 8-15 см расположено на концах побегов мутовчатое, имеет двойной околоцветник. Листочки зелено-фиолетового цвета, поверхность которых покрыта белыми трихомами, образующими густые дорожки по краю чашечки. Сама чашечка почти двугубая, сросшаяся в трубку, образует в верхней части зубцы с длинными шиловидными отростками (рисунки 16, 17). Поверхность чашечки имеет многочисленные ребрышки, вдоль которых располагаются ряды волосков.

Венчик темно-сиреневого цвета, двугубый, выступает из чашечки на 3-5 мм. Нижние части лепестков венчика, сросшиеся в трубочку. Верхняя губа является более крупной по отношению к нижней и образует небольшое вздутие. Нижняя губа имеет три коротких отростка.



Рисунок 16– Внешний вид фрагмента соцветия шалфея степного



Рисунок 17 – Цветок шалфея степного

Диагностическими признаками цельного и измельченного сырья на макроуровне являются: особенности опушения и жилкования листьев,

опушение и окраска побегов, строение и тип опушения чашечки и венчика цветка.

Микроскопический анализ. При рассмотрении препарата листа с поверхности можно отметить, что клетки верхнего эпидермиса многоугольные с прямыми стенками, над жилками листа - почти-прямоугольные, с ровными и утолщенными стенками, сверху покрыты слоем кутикулы (рисунок 18). Под эпидермисом листа хорошо заметны продолговатые вместилища с эфирным маслом (рисунок 19).



Ув. 20x40

А



Ув. 20x10

Б

1 – трихомы, 2 – основные клетки эпидермы

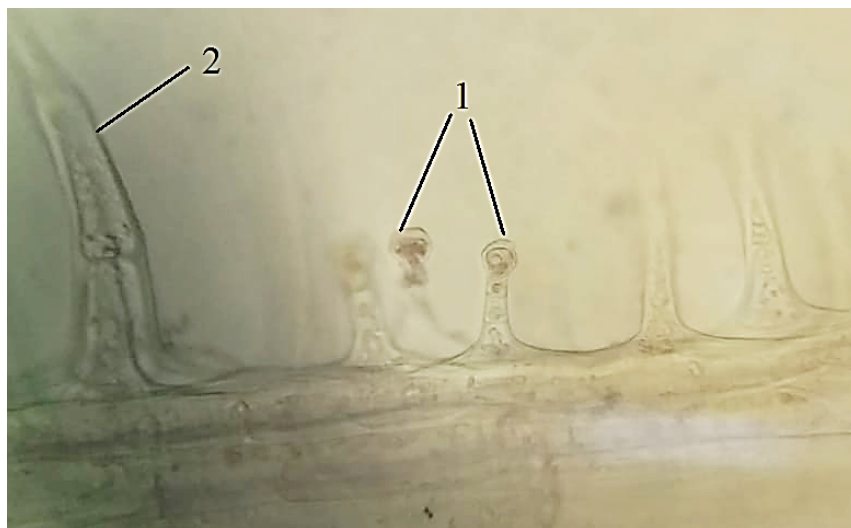
Рисунок 18 – Строение верхнего эпидермиса листа над средней жилкой (А) и основной части (Б) шалфея степного



1 – вместилища

Рисунок 19 – Вместилища с эфирным маслом под эпидермисом листа шалфея степного

Нижний эпидермис листа состоит из прозенхимных клеток с утолщенными и прямыми стенками (рисунки 20-22). Устьица немногочисленные, расположены преимущественно с нижней стороны листа, диацидного типа. Вдоль жилок листа отмечены многочисленные мелкие железистые трихомы, состоящие из многоклеточной ножки и округлой головки. Простые трихомы более крупные. Эфирно-масличные железки немногочисленные, приподнимающиеся над поверхностью.



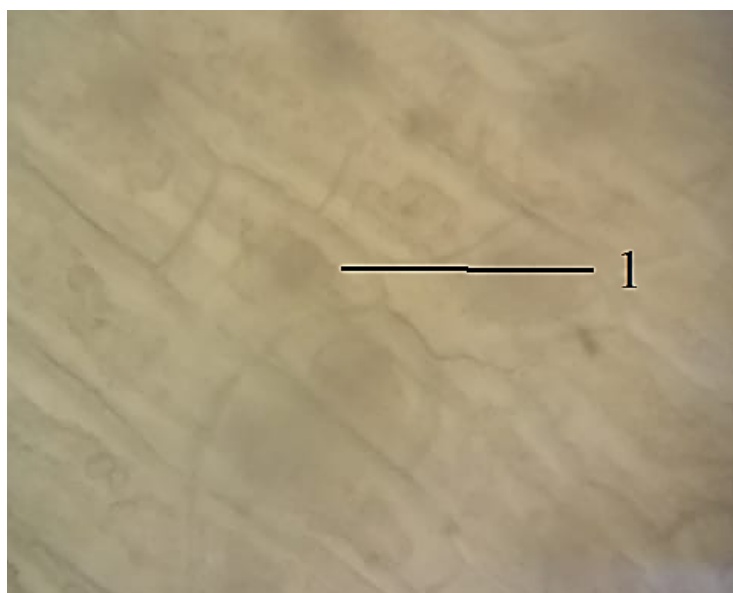
1 – железистые трихомы, 2 – простые трихомы

Рисунок 20 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа шалфея степного вдоль средней жилки. Ув. 20х40



1 – эфирно-масличная железка

Рисунок 21 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа шалфея степного вдоль края. Ув. 20х40



1 – основные клетки эпидермиса

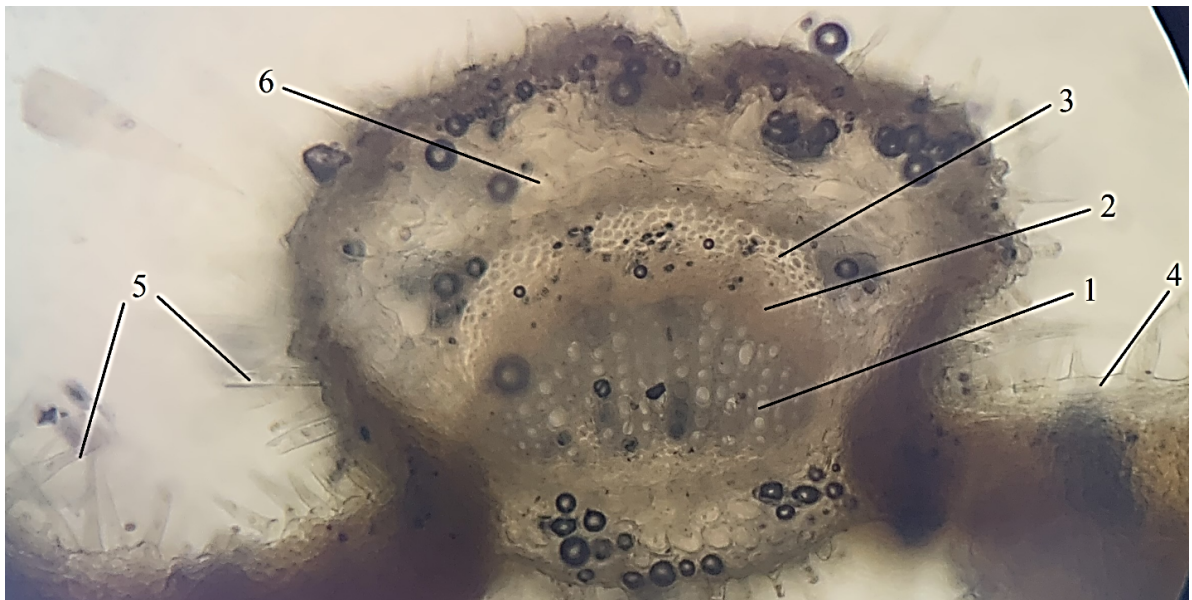
Рисунок 22 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа шалфея степного. Ув. 20x40

На поперечном срезе лист уплощенный, изолатерального типа (столбчатый мезофилл расположен под верхним и нижним эпидермисом) с практически не выраженным губчатым мезофиллом (рисунки 23, 24).



1 – нижний эпидермис, 2 – верхний эпидермис, 3 – простые многоклеточные волоски, 4 – простые одноклеточные волоски, 5 – столбчатый мезофилл, 6 – губчатый мезофилл

Рисунок 23 – Поперечный срез боковой части листа шалфея степного. Ув. 10x20



1 – ксилема, 2 – флоэма, 3 – уголковая колленхима, 4 – эпидермис, 5 – простые трихомы, 6 – губчатый мезофилл

Рисунок 24 – Поперечный срез листа в области средней жилки листа шалфея степного. Ув. 10x20

Эпидермис 1-слойный, состоит из округлых вытянутых клеток, у которых наружные стенки толще внутренних. Сверху эпидермис покрыт тонким слоем кутикулы. Обе стороны листа густо опушенными, причем с нижней стороны отмечены простые 2-3-клеточные и железистые трихомы, с верхней стороны – простые 1-клеточные трихомы. Проводящие пучки расположены в области главной и боковой жилок листа. Пучок коллатеральный, закрытого типа, состоит из тяжа ксилемы, обращенной к верхней стороне листа, и тяжа флоэмы, ориентированной к нижней стороне. Ксилемные сосуды мелкие, округлой или слабо-овальной формы, расположены цепочками. Флоэма состоит из мелких клеток; со стороны флоэмы пучок армирован тяжем уголковой колленхимы.

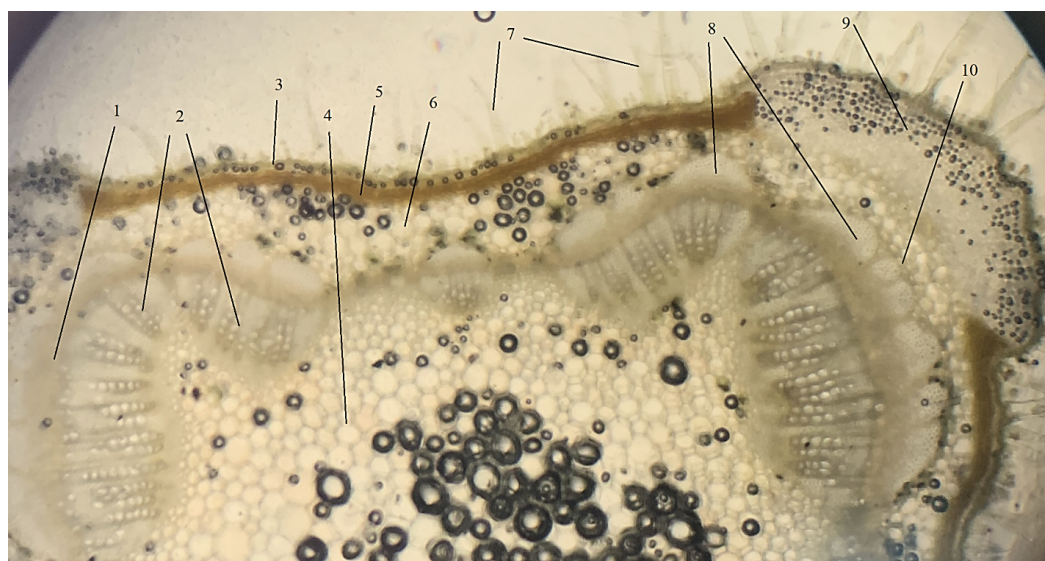
Черешок на поперечном срезе почковидной формы, изогнутый. По периметру расположен 1-слойный эпидермис, под которым залегает паренхима, а в углах – небольшие участки хлоренхимы. Поверхность опушена редкими 1-3-клеточными простыми трихомами (рисунок 25). В толще паренхимы залегают проводящие пучки, коллатеральные, закрытого типа. Состоят из тяжа ксилемы и флоэмы, со стороны флоэмы отмечены «шапки» из склеренхимы. Пучки разные по строению: в центральной части – вытянутые и более крупные, по бокам – мелкие и эллиптические.



1 – простые трихомы, 2 – эпидермис, 3 – хлоренхима, 4 – паренхима, 5 – проводящие пучки

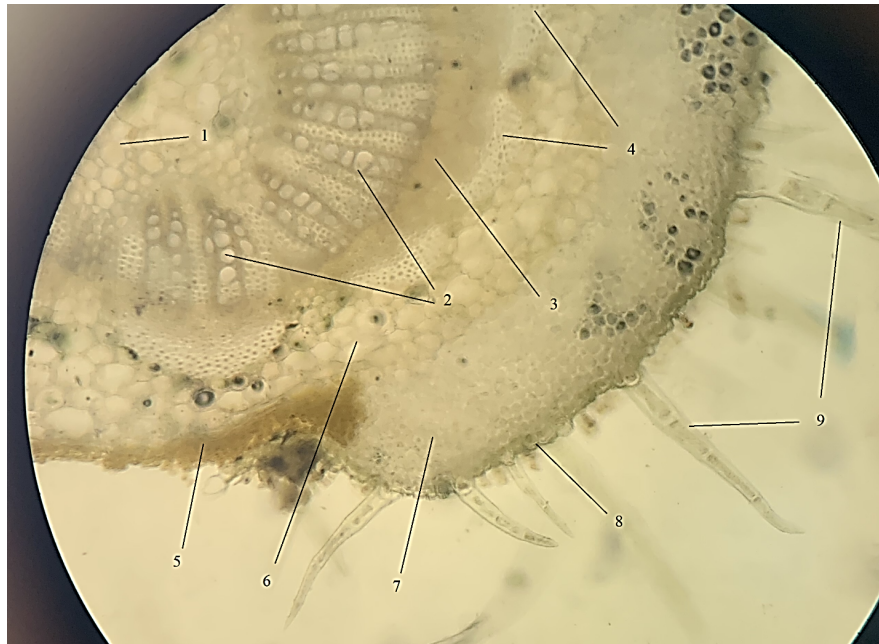
Рисунок 25 – Поперечный срез черешка листа шалфея степного. Ув. 10x20

Стебель на поперечном срезе 4-гранный, с хорошо выраженными углами (рисунки 26, 27). По периферии расположен 1-слойный эпидермис, по поверхности которого разбросаны редкие простые многоклеточные трихомы.



1 – флоэма, 2 – ксилема, 3 – эпидермис, 4 – сердцевинная паренхима, 5 – хлоренхима, 6 – коровая паренхима, 7 – простые многоклеточные трихомы, 8 – склеренхима, 9 – уголковая колленхима, 10 – эндодерма

Рисунок 26 – Поперечный срез стебля шалфея степного. Участок. Ув. 10x20

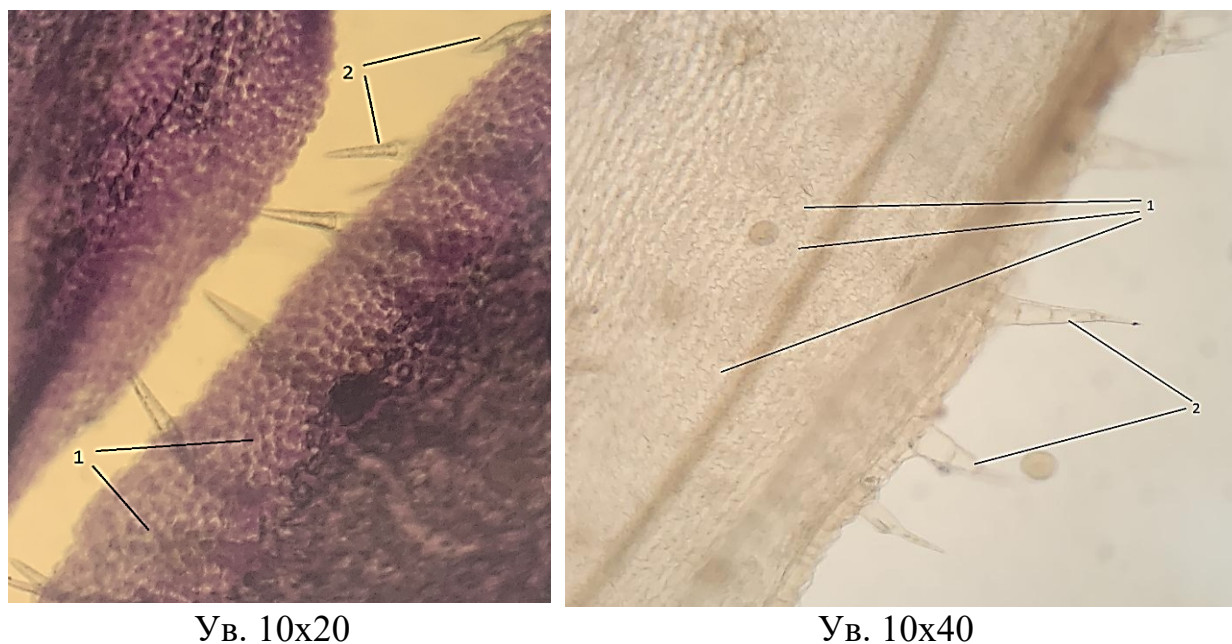


1 – сердцевинная паренхима, 2 – ксилема, 3 – флоэма, 4 – склеренхима, 5 – хлоренхима, 6 – коровая паренхима, 7 – уголковая колленхима, 8 – эпидермис, 9 – простые многоклеточные трихомы

Рисунок 27 – Поперечный срез стебля шалфея степного в области бокового ребра. Ув.10х40

Под эпидермисом в углах залегают крупные тяжёлые уголковой колленхимы, между углами – 1-2-слойная хлоренхима. Под хлоренхимой и колленхимой отмечены участки коровой паренхимы, состоящей из округлых и рыхлых клеток. Коровую зону от проводящей отделяет 1-слойная эндодерма. Проводящая система пучкового типа. Пучки коллатеральные, закрытого типа. Пучки состоят из цепочек ксилемы и тонкого слоя флоэмы. Над каждым пучком в виде «шапки» расположены тяжёлые механической ткани склеренхимы. Отмечено, что пучки разного размера: в углах пучки крупные, удлиненные, между углами – мелкие и округлые. Центральная часть заполнена округлыми клетками сердцевинной паренхимы.

Эпидермис венчика цветка состоит из мелких вытянутых, плотно-прилегающих друг к другу клеток с извилистыми стенками (рисунок 28). На свежем сырье клетки окрашены в лилово-фиолетовый цвет, на фиксированном – бесцветные. По краю эпидермиса отмечены редкие простые одно- и многоклеточные волоски.



1 – клетки эпидермиса, 2 – простые трихомы

Рисунок 28 – Фрагмент эпидермиса венчика шалфея степного.

Таким образом, диагностическими признаками являются:

Эпидермис листа: наличие 3-х типов трихом (простые одноклеточные, простые многоклеточные и железистые), их локализация и форма; размещение с нижней стороны и форма эфирно-масличных железок; форма и размещение под верхним эпидермисом – вместилищ с эфирным маслом; форма основных клеток эпидермы.

Поперечный срез листа: тип мезофилла, строение трихом.

Поперечный срез черешка листа: строение мезофилла, наличие участков хлоренхимы, наличие 2-х крупных проводящих пучков в центре черешка и 2-х мелких – по краю черешка.

Поперечный срез стебля: форма и расположение проводящих пучков – крупные в углах, мелкие – между углами, хорошо развитая зона уголкового колленхимы и «шапки» склеренхимы над пучками.

Эпидермис венчика: форма и расположения клеток эпидермиса, наличие редких простых трихом по краю.

3.3 Гистохимический анализ надземной части *Salvia stepposa*

На сегодняшний день существует множество методов исследования, позволяющих оценить принадлежность лекарственных растений к той или иной группе. К таким методам относят гистохимический анализ, позволяющий выявить наличие биологически активных веществ и их локализацию в тканях и органах. Лекарственные растения содержат множество вторичных метаболитов, например алкалоиды, дубильные вещества, фенольные вещества, флавоноиды, полисахариды и т.д. Эти вторичные метаболиты пользуются большим спросом в фармацевтической

промышленности и обладают различным рядом фармакологической активности.

В результате исследования было выявлено характерное окрашивание клеток разных типов, которое характеризуется результатом взаимодействия реактивов с детектируемыми метаболитами. Результаты проведения гистохимического анализа для выявления определенных групп метаболитов в надземных органах *Salvia stepposa* представлены в таблице 5 и на рисунках 29-31.

Таблица 5 – Гистохимический анализ надземной части *Salvia stepposa*

| Определяемый компонент | Реактив | Окрашивание | Вид надземных органов | | | |
|--------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------|------|---------|--------|
| | | | Стебель | Лист | Черешок | Цветок |
| Эфирное масло | Метиленовый синий | Синее | + | + | + | + |
| Сесквитерпеновые лактоны | конц. H ₂ SO ₄ | Желтое | - | - | - | - |
| Флавоноиды | 1-% спиртовой раствор FeCl ₃ | Черно-синее-зеленое | + | + | + | - |
| Фенольные соединения | 10% спиртовой раствор K ₂ Cr ₂ O ₇ | Коричневое, желтое | + | + | + | + |
| Полисахариды | 10% раствор тимола, конц. H ₂ SO ₄ | Оранжево-красное | - | - | - | - |
| Крахмал | Реактив Люголя | Синее | - | - | - | - |
| Инулин | 70-% раствор C ₂ H ₅ OH | Сферокристаллы шарообразной формы | - | - | - | - |
| Алкалоиды | Реактив Драгендорфа | Черное | - | - | - | - |

Примечание: – отрицательная реакция; + положительная реакция

Идентификация эфирного масла в надземных органах шалфея степного. Обработка микропрепаратов листа, стебля, черешка и цветка раствором метиленового синего показала, что специфической окраски поверхности в синий цвет не наблюдается, однако основным местом локализации эфирного масла являются эфирномасличные железки и головчатые волоски (рисунок 29).

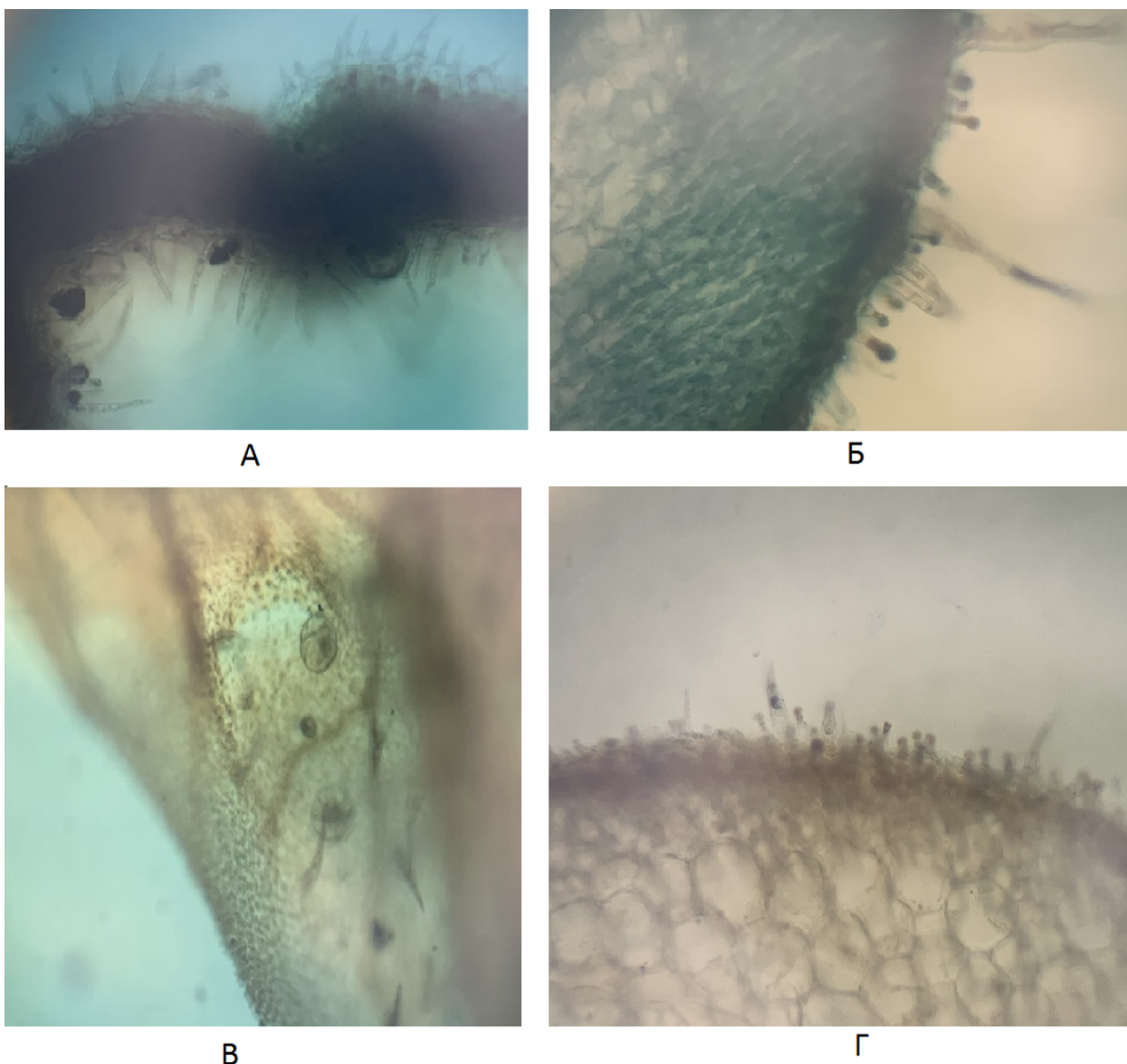


Рисунок 29– Результат гистохимических реакций с метиленовым синим (ув.×10). А-поперечный срез листа, Б-поперечный срез стебля, В-цветок, Г- поперечный срез черешка

Идентификация флавоноидов в надземных органах шалфея степного. После обработки микропрепарата исследуемого материала 1-% спиртовым раствором $FeCl_3$ наблюдали интенсивное окрашивание мезофилла листа; уголковой колленхимы, эпидермиса, хлоренхимы и сосудисто-проводящих пучков стебля; хлоренхимы и проводящих пучков черешка; окрашивание цветка не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии флавоноидов в цветке (рисунок 30).



А



Б



В



Г

Рисунок 30 – Результат гистохимических реакций с 1-% спиртовым раствором $FeCl_3$ (ув. $\times 10$). А-поперечный срез листа, Б-поперечный срез стебля, В-цветок, Г-поперечный срез черешка

Идентификация фенольных кислот в надземных органах шалфея степного. Для идентификации фенольных кислот в 10-% раствор бихромата калия, помещали исследуемый материал и оставляли на 7 суток. Наличие фенольных кислот было подтверждено интенсивным желто-коричневым окрашиванием во всех исследуемых органах шалфея степного, что свидетельствует о присутствии фенольных соединений во всех клетках. Однако, окрашивание микропрепаратов было неравномерным, что позволяет судить о различной степени накопления фенольных соединений в клетках. Таким образом, участками с максимальным накоплением фенольных соединений являются склеренхима и хлоренхима листа, коровая и проводящая зона стебля, проводящая зона и механические ткани черешка (рисунок 31).

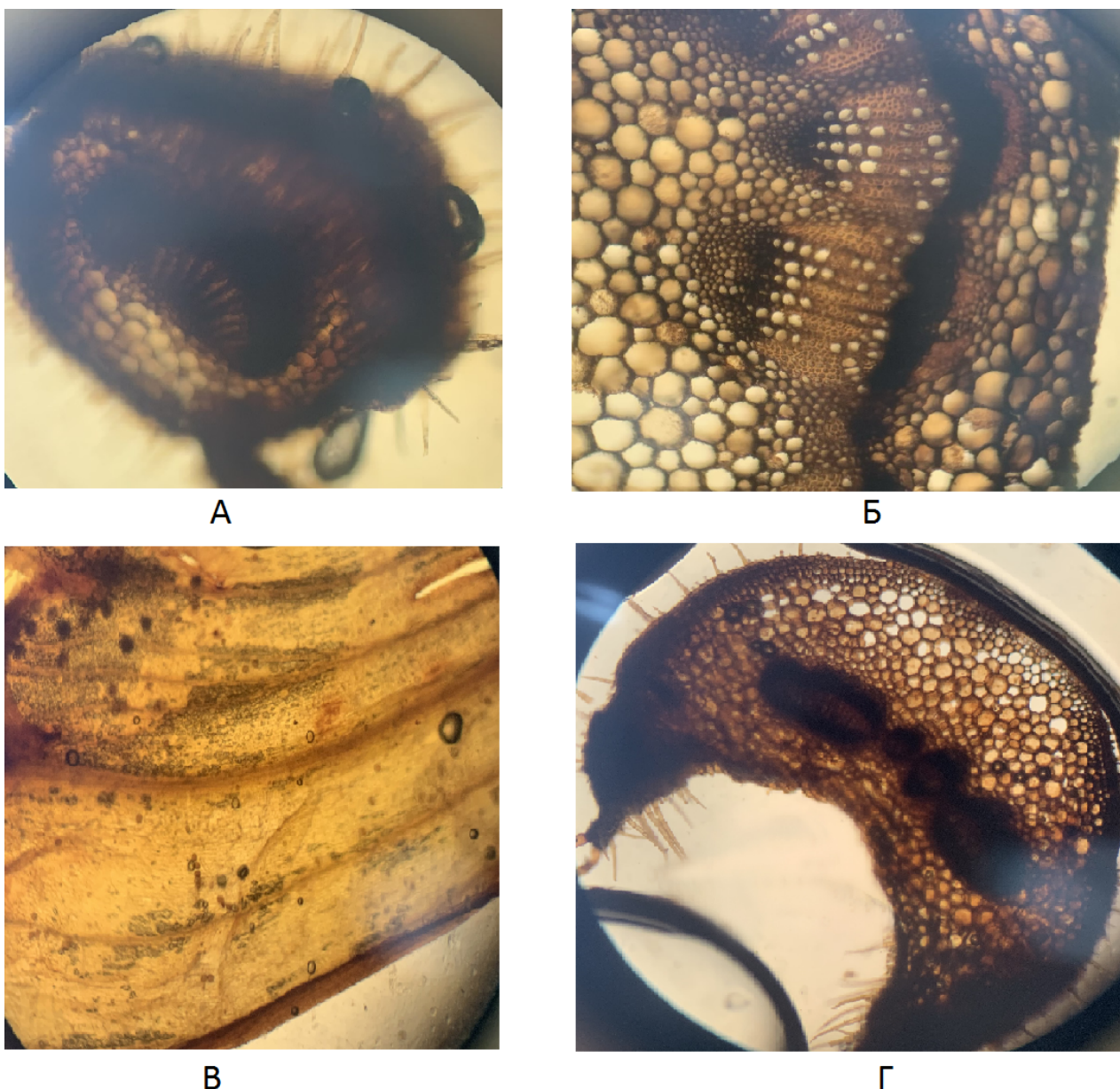


Рисунок 31 – Результат гистохимических реакций с 10-% спиртовым раствором бихромата калия(ув.×10). А-поперечный срез листа, Б-поперечный срез стебля, В-цветок, Г-поперечный срез черешка

Идентификация сесквитерпеновых лактонов в надземных органах шалфея степного. Обработка микропрепаратов надземных органов концентрированной серной кислотой не сопровождалась аналитическим эффектом.

Идентификация полисахаридов (крахмал, инулин) в надземных органах шалфея степного. Обработка микропрепаратов 10-% раствором тимола и конц. серной кислоты и реактивом Люголя показала, что ткани не окрашиваются в оранжево-красный и синий цвета соответственно, что предполагает отсутствие полисахаридов, в т.ч крахмала в исследуемом сырье. Для идентификации инулина исследуемое сырье помещается в 70-% раствор спирта этилового на 7 суток. В результате проведенной реакции образование сферокристаллов не наблюдалось.

Идентификация алкалоидов в надземных органах шалфея степного. Отрицательная реакция с реактивом Драгендорфа (отсутствие черного окрашивания) свидетельствует об отсутствии алкалоидов в надземных органах шалфея степного.

Таким образом, на основании изучения макро-, микроскопических и гистохимических особенностей *Salvia stepposa*, определены внешние и диагностические признаки шалфея степного необходимые для идентификации данного вида сырья.

3.4 Определение фармацевтико-технологических параметров *Salvia stepposa*

С целью обеспечения максимального экстрагирования шалфея степного важным является определение основных технологических параметров сырья.

По морфологическим признакам все заготовленные образцы сырья шалфея степного отвечали требованиям ГФ РК т. III. Запах высушенного сырья ароматный, особенно при растирании, вкус горьковато-пряный, слегка вяжущий.

Определение основных технологических параметров качества сырья шалфея степного проводили в соответствии с методиками, приведенными в учебном пособии Минуиной и Кауховой [107] и в соответствии с ГФ РК т. I. В таблицах 6-8 представлены результаты определения технологических параметров листьев шалфея степного, фармакопейных показателей и определение содержания тяжелых металлов.

Таблица 6 – Технологические параметры листьев шалфея степного

| Технологические параметры | Установленные значения, г/см ³ |
|----------------------------|---|
| Удельная масса | 0,63±0,01 |
| Объемная масса | 0,23±0,02 |
| Насыпная масса | 0,08±0,02 |
| Пористость | 0,63±0,01 |
| Порозность | 0,65±0,01 |
| Свободный объем слоя сырья | 0,87±0,01 |

Таблица 7 – Товароведческие показатели качества листьев шалфея степного

| Наименование сырья | Посторонние примеси, % | Общая зола, % | Зола нерастворимая в 10% HCl, % | Потеря в массе при высушивании, % | Эфирное масло | Содержание экстрактивных веществ |
|-------------------------------|------------------------|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------|----------------------------------|
| Шалфей степной листья | 1,58 | 12 | 1,66 | 6,51 | 0,99 | 64,17 |
| Листьев шалфея лекарственного | не более 2% | не более 12 | не более 3 | не более 14 | не менее 0,8 | не менее 30 |

Таблица 8 – Содержание тяжелых металлов в листьях шалфея степного

| № пп | Определяемый компонент | Содержание компонента, мг/кг |
|------|------------------------|------------------------------|
| 1 | Мышьяк (As) | <0,1 |
| 2 | Кадмий (Cd) | <0,5 |
| 3 | Медь (Cu) | 12,7 |
| 4 | Железо (Fe) | 762,6 |
| 5 | Никель (Ni) | 1,6 |
| 6 | Свинец (Pb) | 1,6 |
| 7 | Цинк (Zn) | 37,9 |

Оценка установленных нами основных технологических параметров, фармакопейных показателей и содержания тяжелых металлов позволяет заключить, что образцы листьев шалфея степного, заготовленные в окрестностях Карагандинской области, соответствуют требованиям ГФ РК и СанПин.

С помощью ВЭЖХ-УФ методом внешнего стандарта установлено количественное содержание розмариновой кислоты в растительном сырье шалфея степного – 1,5%, в пересчете на воздушно-сухое сырье.

3.5 Разработка спецификации качества на растительное сырье *Salvia stepposa*

Разработку спецификации качества РС шалфея степного проводили на основании приказа Министерства здравоохранения РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств». В результате в соответствии с требованиями вышеуказанного приказа разработан проект НД (Приложение Б), регламентирующий качество лекарственного растительного сырья шалфея степного. Спецификация качества листьев шалфея степного включает в себя показатели представленные в таблице 9.

Таблица 9 – Спецификация качества листьев *Salvia stepposa*

| Показатели качества | Нормы (допустимые пределы) | Ссылки на методы испытаний |
|---------------------|---|--------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 |
| Описание | Цельные высушенные листья <i>Salvia stepposa</i> Des.-Schost | Визуальный |
| Идентификация | А. Макроскопия. <i>Цельное сырье</i> . Стебли прямостоячие, в верхней части стебель окрашен в зеленый цвет, в нижней – в фиолетовый, поверхность покрыта волосками белого цвета, в диаметре 3-5 мм, четырехгранные длиной до 50 см. | ЕАЭС Ф 2.1.8.17
ГФ РК, т.1, с.565 |

Продолжение таблицы 9

| 1 | 2 | 3 |
|--------------------------------|--|--|
| | <p>Листья супортивные, узко-яйцевидные, с клиновидным основанием, тупой верхушкой и мелко-городчатым краем. Верхняя сторона листа окрашена в темно-зеленый цвет, нижняя в светло-коричнево-зеленый. Поверхность листа с обеих сторон шероховатая, бархатистая, опушена мелкими простыми трихомами. Тип жилкования – сетчато-нервное, кроме того, вдоль жилок листа расположены более удлиненные белые трихомы. Жилки хорошо заметны как с нижней, так и с верхней стороны, но преимущественно выступают с нижней стороны листа. Запах ароматный, приятный. <i>Измельченное сырье</i>. Кусочки стеблей, листьев и отдельных опушенных цветков, проходящие сквозь сито диаметром 8 мм.</p> <p>В. Микроскопия. При рассмотрении под микроскопом наблюдались следующие диагностические признаки: клетки верхнего эпидермиса многоугольные прямыми стенками, над жилками листа - почти-прямоугольные, с ровными и утолщенными стенками, сверху покрыты слоем кутикулы; нижнего – прозенхимные клетки с утолщенными и прямыми стенками, устьица диацитного типа. Вдоль жилок листа многочисленные мелкие железистые трихомы.</p> <p>С. Гистохимические реакции. Появляется желто-коричневое окрашивание (фенольные кислоты), черносинее окрашивание (флавоноиды).</p> <p>Д. ВЭЖХ. На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, время удерживания основного пика должно совпадать с временем удерживания пика розмариновой кислоты на хроматограмме стандартного образца розмариновой кислоты.</p> | <p>ЕАЭС Ф
2.1.8.17
ГФ РК, т.1,
2.8.3.</p> <p>В соответствии с НД
В соответствии с НД</p> |
| Посторонние примеси: | <ul style="list-style-type: none"> - органической примеси не более 1,0 %; - пожелтевших, побуревших и почерневших частей сырья не более 10,0 %; - минеральной примеси не более 1,0 % | <p>ЕАЭС Ф
2.1.8.2
ГФ РК I, т. 1,
2.8.2</p> |
| Потеря в массе при высушивании | не более 10 % | <p>ЕАЭС Ф
2.1.2.31
ГФ РК I, т. 1,
2.2.32</p> |
| Общая зола | не более 12 % | <p>ЕАЭС Ф
2.1.4.16
ГФ РК I, т. 1,
2.4.16</p> |
| Зола, нерастворимая в HCl | не более 3 % | <p>ЕАЭС Ф 2.1.8.1
ГФ РК I, т. 1,
2.8.1</p> |
| Микробиологическая чистота | Категория 4В. | <p>ЕАЭС Ф
2.3.1.4</p> |

Продолжение таблицы 9

| 1 | 2 | 3 |
|--|---|---|
| | <p>В 1.0 г сырья допускается аэробных микроорганизмов не более 10^5 бактерий, не более 10^4 грибов и не более 10^3 энтеробактерий.</p> <p>Не допускается наличие <i>Escherichia coli</i> в 1.0 г и <i>Salmonella</i> в 10.0 г</p> | <p>ГФ РК I, т. 1, 2.16.12
ГФ РК I, т. 1, 2.16.13
ГФ РК, т. I, 5.1.4</p> |
| <p>Количественное определение:</p> <p>- содержание суммы эфирных масел</p> <p>- розмариновая кислота</p> | <p>не менее 0,8 %</p> <p>не менее 0,5 %</p> | <p>ЕАЭС Ф
2.1.8.12
ГФ РК I, т. 1, 2.8.12</p> <p>В соответствии с НД</p> |
| <p>Радионуклиды</p> | <p>не должно превышать по цезию 137 Cs-137, 200 Бк/кг; по стронцию 90 Sr-90, 100 Бк/кг</p> | <p>ГФ РК т.1, с.564</p> |
| <p>Тяжелые металлы</p> | <p>кадмия не более 1.0 мг/кг, свинца – не более 5.0 мг/кг, ртути – не более 0.1 мг/кг, мышьяк – не более 1,0 мг/кг</p> | <p>ЕАЭС Ф
2.1.2.41
ГФ РК т.1, 2.2.23</p> |
| <p>Упаковка</p> | <p>Измельченное сырье упаковывают в мешки бумажные многослойные по ГОСТ 2226-88 по 15-30 кг. На мешки наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или писчей по ГОСТ 18510-87. Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с требованиями ГОСТ 17768-90 Е</p> | <p>ГОСТ 17768-90 Е</p> |
| <p>Маркировка</p> | <p>На этикетке указывают страну, наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак и адрес, название сырья, нетто при максимальной допустимой влажности, номер серии, условия хранения, срок хранения. Маркировка групповой и транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96</p> | <p>ГОСТ 14192-96</p> |
| <p>Хранение</p> | <p>В защищенном от света месте при температуре не выше 25°C</p> | <p>В соответствии с НД</p> |
| <p>Срок хранения</p> | <p>24 месяца</p> | <p>В соответствии с НД</p> |
| <p>Транспортирование</p> | <p>В соответствии с ГОСТ 17768-90Е</p> | <p>ГОСТ 17768-90Е</p> |
| <p>Основное фармакологическое действие</p> | <p>Антимикробное, противовоспалительное</p> | <p>В соответствии с НД</p> |

3.6 Исследования по определению срока хранения листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*)

Исследования по определению срока хранения листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*) проводили методом долгосрочных испытаний на трех сериях сырья в соответствии с требованиями Приказа МЗ РК №ҚР ДСМ-165/2020 от 28 октября 2020 г. «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств».

Образцы сырья подвергались проверке по показателям качества в соответствии с НД на сырье, в следующие сроки: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24. Условия проведения испытаний: температура = 25 ± 2 °С; влажность = $60 \pm 5\%$; период исследования: 05.07.2020 г. - 05.07.2022 г. Результаты испытания стабильности листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*) представлены в таблицах 10-12.

Таблица 10 – Результаты определения сроков хранения листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*), серия 1

| Упаковка: многослойные бумажные мешки
Дата начала испытания: 07.2020 г
Дата окончания испытания: 07.2022 г
Серия: 050620 | | | | | | | | | | |
|---|--|---|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | Температура (25±2)°С,
относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I | Цельные или резаные высушенные листья <i>Salvia stepposa</i> Des.-Schost. Запах специфический, вкус горьковатый. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация
- фенольные кислоты
- флавоноиды | | В соответствии с НД | Желто-коричневое окрашивание
Черно-синее окрашивание | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Посторонние примеси
- органические примеси
- пожелтевшие и побуревшие части сырья
- минеральные примеси | | Не более 10,0%
Не более 1,0%

Не более 1,0% | 4,93
0,6

0,56 | 4,92
0,6

0,57 | 4,93
0,7

0,57 | 4,93
0,6

0,56 | 4,93
0,6

0,57 | 4,94
0,7

0,57 | 4,92
0,6

0,56 | |
| Потеря в массе при высушивании | | EAЭС Ф 2.1.2.31
ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 10% | 6,51 | 6,53 | 6,51 | 6,54 | 6,51 | 6,51 | 6,53 |
| Общая зола | | EAЭС Ф 2.1.4.16
ГФ РК, т.1, 2.4.16 | Не более 12% | 12,0 | 11,94 | 11,99 | 12,0 | 11,96 | 12,0 | 12,0 |
| Зола нерастворимая в 10% HCl | | EAЭС Ф 2.1.8.1
ГФ РК I, т. 1, 2.8.1 | Не более 3% | 1,66 | 1,65 | 1,66 | 1,66 | 1,66 | 1,67 | 1,69 |
| Микробиологическая чистота | | EAЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12
ГФ РК т. I 2.6.13 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , грибов не более 10 ⁴ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение:
- содержание суммы эфирных масел
- розмариновая кислота | | EAЭС Ф 2.1.8.12
ГФ РК т. I, 2.8.12 | Не менее 0,8% | 0,95 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,99 | 0,97 |
| | | В соответствии с НД | Не менее 0,5% | 1,5 | 1,46 | 1,5 | 1,5 | 1,49 | 1,5 | 1,47 |

Таблица 11 – Результаты определения сроков хранения листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*), серия 2

| Упаковка: многослойные бумажные мешки
Дата начала испытания: 07.2020 г
Дата окончания испытания: 07.2022 г
Серия: 130620 | | | | | | | | | | |
|---|--|---|--|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | Температура (25±2)°С,
относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I | Цельные или резаные высушенные листья <i>Salvia stepposa</i> Des.-Schost. Запах специфический, вкус горьковатый. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация
- фенольные кислоты
- флавоноиды | | В соответствии с НД | Желто-коричневое окрашивание
Черно-синее окрашивание | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Посторонние примеси
- органические примеси
- пожелтевшие и побуревшие части сырья
- минеральные примеси | | EAЭС Ф 2.1.8.2
ГФ РК, т.1, 2.8.2. | Не более 10,0%
Не более 1,0% | 4,92
0,6 | 4,93
0,7 | 4,93
0,7 | 4,94
0,6 | 4,93
0,7 | 4,92
0,7 | 4,93
0,68 |
| Потеря в массе при высушивании | | EAЭС Ф 2.1.2.31
ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 10% | 0,58 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,59 |
| Общая зола | | EAЭС Ф 2.1.4.16
ГФ РК, т.1, 2.4.16 | Не более 12% | 6,51 | 6,53 | 6,54 | 6,51 | 6,53 | 6,51 | 6,50 |
| Зола нерастворимая в 10% HCl | | EAЭС Ф 2.1.8.1
ГФ РК I, т. 1, 2.8.1 | Не более 3% | 12,0 | 12,0 | 11,97 | 12,0 | 12,0 | 12,0 | 11,9 |
| Микробиологическая чистота | | EAЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12
ГФ РК т. I 2.6.13 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , грибов не более 10 ⁴ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | 1,67 | 1,65 | 1,68 | 1,66 | 1,67 | 1,67 | 1,67 |
| Количественное определение:
- содержание суммы эфирных масел
- розмариновая кислота | | EAЭС Ф 2.1.8.12
ГФ РК т. I, 2.8.12 | Не менее 0,8% | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| | | В соответствии с НД | Не менее 0,5% | 0,98 | 0,97 | 0,98 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,97 |
| | | | | 1,5 | 1,49 | 1,49 | 1,5 | 1,48 | 1,5 | 1,49 |

Таблица 12 – Результаты определения сроков хранения листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*), серия 3

| Упаковка: многослойные бумажные мешки
Дата начала испытания: 07.2020 г
Дата окончания испытания: 07.2022 г
Серия: 220620 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|--|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Показатели качества | Условия исследования | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I | Цельные или резаные высушенные листья <i>Salvia stepposa</i> Des.-Schost. Запах специфический, вкус горьковатый. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация
-фенольные кислоты
- флавоноиды | | В соответствии с НД | Желто-коричневое окрашивание
Черно-синее окрашивание | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Посторонние примеси
-органические примеси
-пожелтевшие и побуревшие части сырья
-минеральные примеси | | ЕАЭС Ф 2.1.8.2
ГФ РК, т.1, 2.8.2. | Не более 10,0%
Не более 1,0% | 4,94
0,6 | 4,93
0,6 | 4,93
0,7 | 4,92
0,7 | 4,93
0,7 | 4,94
0,6 | 4,94
0,6 |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.2.31
ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 10% | 6,52 | 6,54 | 6,53 | 6,53 | 6,52 | 6,51 | 6,51 |
| Общая зола | | ЕАЭС Ф 2.1.4.16
ГФ РК, т.1, 2.4.16 | Не более 12% | 11,94 | 11,96 | 11,95 | 12,0 | 12,0 | 12,00 | 12,00 |
| Зола нерастворимая в 10% HCl | | ЕАЭС Ф 2.1.8.1
ГФ РК I, т. 1, 2.8.1 | Не более 3% | 1,67 | 1,65 | 1,66 | 1,65 | 1,66 | 1,64 | 1,63 |
| Микробиологическая чистота | | ЕАЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12
ГФ РК т. I 2.6.13 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , грибов не более 10 ⁴ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение:
-содержание суммы эфирных масел
-розмариновая кислота | | ЕАЭС Ф 2.1.8.12
ГФ РК т. I, 2.8.12 | Не менее 0,8% | 0,95 | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,98 | 0,98 | 0,99 |
| | | В соответствии с НД | Не менее 0,5% | 1,5 | 1,47 | 1,49 | 1,5 | 1,49 | 1,5 | 1,3 |

Результаты исследования сроков хранения листьев шалфея степного показали, что в течение 24 месяца параметры качества изменились в пределах нормы. В результате проведенных испытаний по изучению стабильности листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*) методом долгосрочных испытаний установлено, что сырье соответствует требованиям Приказа МЗ РК №ҚР ДСМ-165/2020 от 28 октября 2020 г. «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств».

Таким образом, *Salvia stepposa* является широко распространенным растительным сырьем на территории Карагандинской области. В ходе работы были установлены основные районы его произрастания.

На основании фармакогностического анализа надземной части шалфея степного и некоторых товароведческих показателей, разработана спецификация качества шалфея степного.

Определены макро- и микроскопические признаки.

Макроскопические: растение 30-50 см высотой; стебель прямостоячий в диаметре от 3 до 5 мм на поперечном срезе 4-угольный, в верхней части окрашен в зеленый цвет, в нижней – в фиолетовый. Поверхность стебля густо покрыта многочисленными прямыми и изогнутыми простыми волосками белого цвета.

Микроскопические: клетки верхнего эпидермиса многоугольные прямыми стенками, над жилками листа - почти-прямоугольные, с ровными и утолщенными стенками, сверху покрыты слоем кутикулы; нижнего – прозенхимные клетки с утолщенными и прямыми стенками, устьица диацитного типа. Вдоль жилок листа многочисленные мелкие железистые трихомы. Эфирно-масличные железки немногочисленные, приподнимающиеся над поверхностью.

Рекомендовано сушить сырье на открытом воздухе в тени периодически переворачивая при температуре 23-25 °С. Сырье упаковывают в бумажные крафт-пакеты и наклеивают этикетку с указанием следующих данных: наименование сырья, место заготовки, время сбора и масса нетто. Определен срок хранения шалфея степного – 24 месяца.

Проведены исследования качественного и количественного содержания розмариновой кислоты в РС.

Таким образом, идентификация растительного сырья шалфея степного проведена по совокупности фармакогностических характеристик и фармакопейных показателей, а также качественного и количественного содержания фенольных кислот и флавоноидов.

На основании спецификации качества разработан проект НД на РС «Шалфей степной листья».

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ *SALVIA STEPPOSA* И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ

4.1 Теоретическое обоснование технологии получения сухого экстракта *Salvia stepposa*

Как было отмечено в литературном обзоре шалфей степной является перспективным источником ЛРС. Исходя из этого, нами была поставлена задача разработать технологию получения сухого экстракта листьев шалфея степного (МВШС-40), с последующим использованием в качестве основного фармацевтического ингредиента для производства ЛС.

Разработка технологии лекарственных форм с использованием сухих экстрактов растительного происхождения, способствует существенному увеличению эффективных безопасных и экономически рентабельных методов получения ЛС. Одним из важных этапов разработки ЛРС является выбор растительного сырья, экстрагента и метода получения экстракта. На полноту и скорость экстрагирования БАВ из растительного материала влияют множество взаимосвязанных факторов, которые можно разделить на природные (анатомическое строение, химическая природа БАВ) и фармацевтико-технологические (вид экстрагента, соотношение сырья-экстрагент, размер частиц сырья, температурный режим, способ экстрагирования, механическое перемешивание, ультразвуковая, микроволновая обработка и т.д.). В связи с чем нами был проведен ряд исследований с целью определения наиболее эффективного и рентабельного метода экстракции в современных условиях.

4.2 Подбор оптимального экстрагента

При выборе экстрагента использовали этиловый спирт различной концентрации и воду. Экстрагент подбирали экспериментально с условием, чтобы он максимально растворял действующие и минимально – балластные. Результаты исследований выбора оптимального экстрагента представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Содержание экстрактивных веществ в листьях шалфея степного, извлекаемых различными экстрагентами

| № п/п | Экстрагент | Выход экстрактивных веществ, % | Коэффициент поглощения экстрагента |
|-------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 30% этиловый спирт <i>P</i> | 42,28 | 6,4 |
| 2 | 40% этиловый спирт <i>P</i> | 42,78 | 6,4 |
| 3 | 70% этиловый спирт <i>P</i> | 42,78 | 6,6 |
| 4 | 90% этиловый спирт <i>P</i> | 28,52 | 5,6 |
| 5 | Вода очищенная <i>P</i> | 38,91 | 4,2 |

С целью выбора экстрагента, исследовали коэффициент поглощения экстрагента и выход экстрактивных веществ при экстракции листьев шалфея степного водно-спиртовым раствором разной концентрации (30%, 40%, 70%, 90%) и водой очищенной.

Как видно из таблицы 13, выход извлекаемых веществ равно как и коэффициент поглощения экстрагента из листьев шалфея при экстракции водой и водно-спиртовыми растворами разных концентраций, не находится в прямой зависимости от увеличения концентрации спирта. На основании полученных результатов выхода экстрактивных веществ и коэффициента поглощения экстрагента можно сделать вывод, что оптимальными экстрагентами для *S. stepposa* являются 30%, 40% и 70% этиловый спирт. Последующее возрастание концентрации этанола, приводит к понижению выхода экстрактивных веществ и коэффициента поглощения. Так как 40% и 70% экстракты имеют одинаковый выход экстрактивных веществ и незначительную разницу коэффициента поглощения соответственно экономически рентабельно использовать для производства в качестве экстрагента 40% этиловый спирт.

4.3 Выбор метода экстракции

Из РС получены 30 экстрактов различными методами: микроволновая экстракция, УЗ-экстракция и традиционная (кипячение) экстракция. В каждом эксперименте РС разделено на листья и цветки. На рисунке 32 приведена схема получения экстрактов из шалфея степного.



Рисунок 32 – Схематическое изображение получения сухих экстрактов шалфея степного традиционной, микроволновой и ультразвуковой экстракцией

В качестве экстрагентов использованы вода очищенная, 30%, 40%, 70% и 90% растворы этилового спирта. Масса сырья для листьев в каждом эксперименте составила 20 г., для цветков 5 г. Соотношения сырья к экстрагенту 1:10 соответственно, 4-х кратная экстракция для листьев, для цветков 3-х кратная. После традиционной, микроволновой и ультразвуковой экстракции все экстракты отделялись от сырья фильтрованием и отстаивались в холодном месте при температурах 0°C -2°C для осаждения балластных веществ не менее 2 суток. По истечении 2 суток осадок отделяли фильтрованием, а полученные экстракты сгущали на ротационном испарителе Лабтех ИР-1ЛТ под вакуумом для предотвращения разложения биологически активных веществ, содержащихся в экстракте. Полученные густые экстракты выпаривали на водяной бане до сухих.

Результаты количественного определения выхода сухого экстракта с использованием различных растворителей и методов получения представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Выход сухих экстрактов в зависимости от метода экстракции и используемого растворителя

| Метод экстракции | <i>S. stepposa</i> листья | | <i>S. stepposa</i> цветки | |
|--------------------------|--------------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
| | Экстрагент | Выход, % | Экстрагент | Выход, % |
| Традиционная | 30% C ₂ H ₅ OH | 23,95 | 30% C ₂ H ₅ OH | 15,2 |
| | 40% C ₂ H ₅ OH | 25 | 40% C ₂ H ₅ OH | 20 |
| | 70% C ₂ H ₅ OH | 26,75 | 70% C ₂ H ₅ OH | 22,8 |
| | 90% C ₂ H ₅ OH | 17,1 | 90% C ₂ H ₅ OH | 12,2 |
| | Вода | 28,65 | Вода | 17 |
| УЗ-экстракция | 30% C ₂ H ₅ OH | 24,6 | 30% C ₂ H ₅ OH | 14,6 |
| | 40% C ₂ H ₅ OH | 23,65 | 40% C ₂ H ₅ OH | 15,8 |
| | 70% C ₂ H ₅ OH | 26,8 | 70% C ₂ H ₅ OH | 12,6 |
| | 90% C ₂ H ₅ OH | 13,7 | 90% C ₂ H ₅ OH | 10,6 |
| | Вода | 23,3 | Вода | 16,8 |
| Микроволновая экстракция | 30% C ₂ H ₅ OH | 24,4 | 30% C ₂ H ₅ OH | 21,4 |
| | 40% C ₂ H ₅ OH | 23,7 | 40% C ₂ H ₅ OH | 19 |
| | 70% C ₂ H ₅ OH | 26 | 70% C ₂ H ₅ OH | 19,6 |
| | 90% C ₂ H ₅ OH | 16,5 | 90% C ₂ H ₅ OH | 11 |

На основе полученных результатов таблицы 12 установлено, что 90% экстракт обладает наименьшим выходом конечного продукта в сравнении с остальными. Выбор метода экстракции зависит от множества параметров таких как: время экстракции, простота технологического оборудования, затраты света, воды, использование растворителей, экологичность и так далее. Из всех рассмотренных методов экстрагирования наиболее оптимальным во всех ранее пересмотренных отношениях является микроволновая экстракция. Сравнительная характеристика используемых методов экстрагирования представлена в таблице 15.

Таблица 15 – Сравнительная характеристика методов экстрагирования

| Параметры | Экстрагирование | | |
|---|-----------------|---------------|--------------------------|
| | Традиционный | УЗ-экстракция | Микроволновая экстракция |
| Экстрагент:сырье | 1:10 | 1:10 | 1:10 |
| Температура
(в зависимости от экстрагента),
°С | 80±10 | 40±5 | 70±5 |
| Мощность облучения,Вт. | - | - | 300 |
| Время одного экстрагирования,
мин. | 60 | 30 | 4 |
| Время получения суммарного
экстракта для листьев, мин. | 240 | 120 | 16 |
| Время получения суммарного
экстракта для цветков, мин. | 180 | 90 | 12 |
| Масса сырья для цветков, г. | 5 | 5 | 5 |
| Масса сырья для листьев, г. | 20 | 20 | 20 |
| Объем полученной вытяжки для
листьев, мл. | 600 | 580 | 600 |
| Объем полученной вытяжки
для цветков, мл. | 100 | 90 | 100 |
| Объем густого экстракта для
листьев | 5,00 | 4,73 | 4,74 |
| Объем густого экстракта для
цветков | 1,00 | 0,79 | 0,95 |

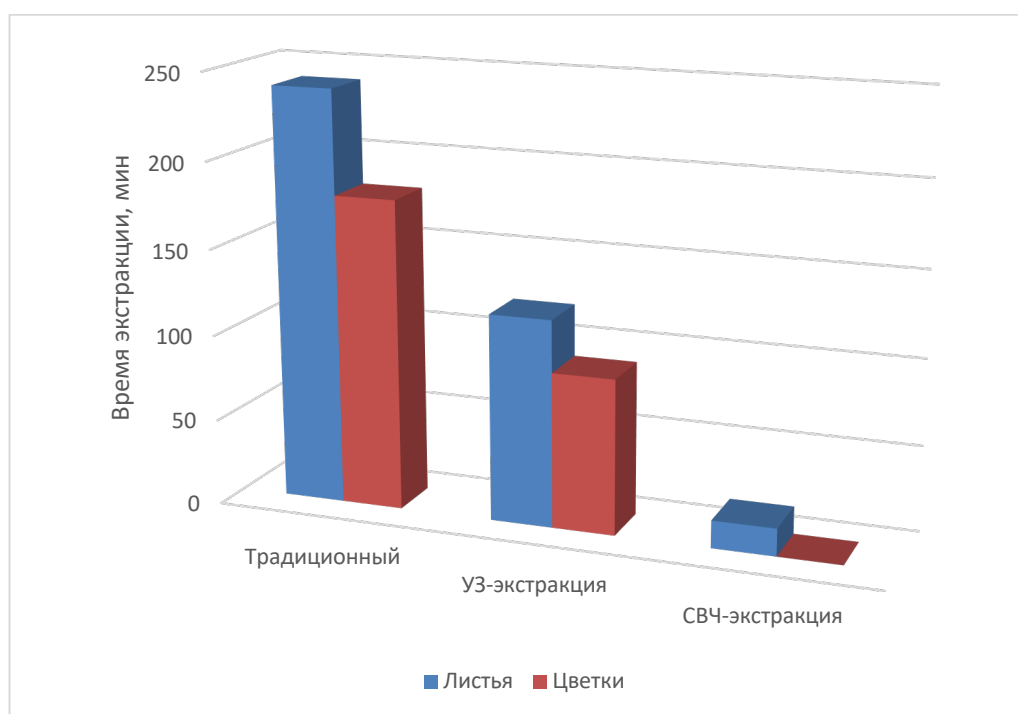


Рисунок 33 – Наглядное сравнение методов экстракции

Исходя из таблицы 15 очевидно, что применение микроволновой экстракции позволяет сократить время экстрагирования в 15 раз в сравнении с традиционным методом экстракции и в 7,5 раз ультразвуковым методом для листьев и цветков. В результате исследования установлено, что из трех методов экстрагирования наиболее оптимальным по технологическим параметрам является микроволновая экстракция.

4.4 Химический состав экстрактов и эфирного масла шалфея степного

Химический состав эфирного масла шалфея степного. Эфирное масло шалфея степного, полученное методом гидродистилляции согласно методике ГФ РК представляет собой желтую подвижную жидкость с приятным запахом. Выход эфирного масла составляет 0,99 %. Химический состав эфирного масла шалфея степного был получен с помощью ГХ-МС и представлен в таблице 16 и на рисунке 34.

Таблица 16 – Химический состав эфирного масла шалфея степного (*Salvia stepposa*)

| № | RT | Наименование соединения | Cas № | % | Качество |
|-----------|----------------|--------------------------------------|--------------------|----------------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 12.5043 | 1-Октен-3-ол | 003391-86-4 | 0.2047 | 86 |
| 2 | 14.2288 | Эвкалиптол | 00470-82-6 | 0.1328 | 98 |
| 3 | 15.1956 | γ -Терпинен | 000099-85-4 | 0.1152 | 97 |
| 4 | 15.4626 | 4-Туйанол | 000546-79-2 | 0.2053 | 95 |
| 5 | 16.4727 | Цис-Туйан-4-ол | 015537-55-0 | 0.2661 | 95 |
| 6 | 16.5593 | Линалол | 000078-70-6 | 0.1446 | 91 |
| 7 | 16.7180 | α -Туйон | 000546-80-5 | 0.5941 | 98 |
| 8 | 17.0716 | β -Туйон | 000471-15-8 | 0.3060 | 98 |
| 9 | 17.9302 | (+)-Камфора | 000464-49-3 | 0.8919 | 98 |
| 10 | 18.6012 | (+)-Борнеол | 000507-70-0 | 0.4504 | 97 |
| 11 | 18.9548 | Терпинен-4-ол | 020126-76-5 | 0.7060 | 97 |
| 12 | 19.3588 | α -Терпинеол | 010482-56-1 | 0.1966 | 97 |
| 13 | 19.5320 | Миртенол | 019894-97-4 | 0.1453 | 94 |
| 14 | 20.9101 | D-Карвон | 002244-16-8 | 0.0411 | 97 |
| 15 | 21.2565 | Линалил ацетат | 000115-95-7 | 0.0763 | 80 |
| 16 | 22.1223 | Боринил ацетат | 005655-61-8 | 0.2240 | 99 |
| 17 | 22.2738 | Тимол | 000089-83-8 | 0.4601 | 93 |
| 18 | 22.5408 | p-Тимол | 003228-02-2 | 0.2231 | 97 |
| 19 | 23.5365 | 1,5,5-триметил-6-метилен-циклогексан | 000514-95-4 | 0.4317 | 94 |
| 20 | 24.0488 | Евгенол | 000097-53-0 | 0.2271 | 98 |
| 21 | 24.7920 | β -Дамасценон | 023726-93-4 | 0.5103 | 97 |
| 22 | 25.0012 | β -Элемен | 000515-13-9 | 0.4543 | 87 |
| 23 | 25.4774 | α -Гурунен | 000489-40-7 | 0.3271 | 99 |
| 24 | 25.8021 | Кариофилен | 000087-44-5 | 13.2125 | 99 |
| 25 | 25.9753 | β -Копаен | 018252-44-3 | 0.0716 | 98 |
| 26 | 26.2278 | Аромандрен | 000489-39-4 | 0.5243 | 99 |

Продолжение таблицы 16

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------|----------------|------------------------------------|---------------------|----------------|-----------|
| 27 | 26.4948 | Е-геранил ацетон | 003796-70-1 | 0.3866 | 93 |
| 28 | 26.6030 | Гумулен | 006753-98-6 | 1.8172 | 97 |
| 29 | 26.7834 | 9-эпи-(Е)-кариофилен | 068832-35-9 | 0.2694 | 99 |
| 30 | 27.2885 | Гермакрен Д | 023986-74-5 | 1.1321 | 96 |
| 31 | 27.3678 | β -Ионон | 000079-77-6 | 0.2144 | 98 |
| 32 | 27.5410 | (Z,E)- α -Фарнесен | 026560-14-5 | 0.1782 | 97 |
| 33 | 27.6997 | Бициклогермакрен | 024703-35-3 | 5.5897 | 91 |
| 34 | 27.8657 | α -Фарнесен | 000502-61-4 | 0.2767 | 91 |
| 35 | 28.0821 | γ -Кадиен | 039029-41-9 | 0.1411 | 99 |
| 36 | 29.7344 | Спатуленол | 006750-60-3 | 10.7506 | 99 |
| 37 | 29.8427 | Оксид кариофилена | 001139-30-6 | 11.1582 | 94 |
| 38 | 29.9870 | γ-Селинен | 000515-17-3 | 2.5992 | 96 |
| 39 | 30.1313 | Гумулен эпоксид | 019888-33-6 | 0.1681 | 99 |
| 40 | 30.2107 | Петилбрен | 442900-37-0 | 0.1369 | 92 |
| 41 | 30.3766 | Гумулен эпоксид II | 019888-34-7 | 1.0697 | 91 |
| 42 | 30.8745 | Гумуленол-II | 019888-00-7 | 0.4312 | 99 |
| 43 | 30.9971 | (-)-Спатуленол | 077171-55-2 | 1.1244 | 99 |
| 44 | 31.3507 | T-Мууролол | 019912-62-0 | 0.2092 | 60 |
| 45 | 31.4301 | Не идентифицировано | - | 0.4380 | - |
| 46 | 31.7331 | Изоаромадендрен эпоксид | 1000159-36-6 | 1.9185 | 58 |
| 47 | 32.7865 | Не идентифицировано | - | 0.2527 | - |
| 48 | 34.3595 | Октадекан | 000593-45-3 | 0.1285 | 96 |
| 49 | 35.3119 | Не идентифицировано | - | 0.7945 | - |
| 50 | 38.3567 | Не идентифицировано | - | 0.2219 | - |
| 51 | 39.5401 | 13-Епиманол | 001438-62-6 | 2.6772 | 93 |
| 52 | 40.4636 | Фитол | 000150-86-7 | 1.8259 | 93 |
| 53 | 41.9067 | Бутил-цитрат | 000077-94-1 | 1.2019 | 91 |
| 54 | 43.3137 | Не идентифицировано | - | 0.1097 | - |
| 55 | 45.3438 | Диоктил адипат | 000103-23-1 | 1.0063 | 95 |
| 56 | 46.6615 | Бутил цитрат | 000077-94-1 | 0.3332 | 72 |

Примечание: жирным шрифтом выделены преобладающие компоненты

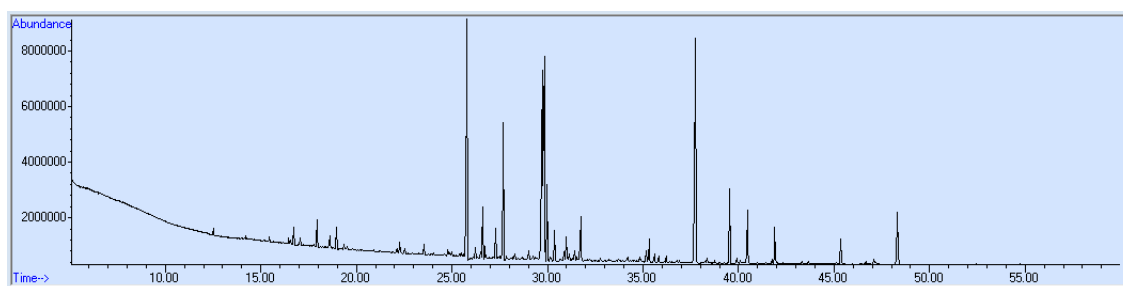


Рисунок 34 – ГХ-МС эфирного масла шалфея степного

Всего в эфирном масле шалфея степного обнаружено 56 компонентов из них идентифицирован 51 компонент. Полученные результаты показывают, что основными компонентами являются сесквитерпены. Отмечено значительное содержание кариофилена и его оксида 13,21% и 11,15% соответственно, а также спатуленола – 10,75% и бициклогермакрена – 5,58%.

Таблица 17 – Сравнительная характеристика составов эфирных масел *Salvia Officinalis* и *Salvia stepposa*

| Название компонента | <i>Salvia stepposa</i> , % | <i>Salvia officinalis</i> , % |
|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 2 | 3 |
| α -Туйон | - | 0.36 |
| α -Пинен | - | 0.84 |
| Камфен | - | 0.78 |
| Сабинен | - | 0.30 |
| β -Пинен | - | 0.85 |
| 1-Октен-3-ол | 0.2047 | - |
| α -Терпинен | - | 0.30 |
| 1.8-Цинеол | - | 14.14 |
| Эвкалиптол | 0.1328 | - |
| γ -Терпинен | 0.1152 | 0.61 |
| 4-Туйанол | 0.2053 | - |
| Цис-Туйан-4-ол | 0.2661 | - |
| Линалол | 0.1446 | 0.39 |
| α -Туйон | 0.5941 | 18.83 |
| β -Туйон | 0.3060 | 4.46 |
| (+)-Камфора | 0.8919 | 25.14 |
| (+)-Борнеол | 0.4504 | 2.81 |
| Терпинен-4-ол | 0.7060 | 0.74 |
| α -Терпинеол | 0.1966 | 1.33 |
| Миртенол | 0.1453 | 0.30 |
| D-Карвон | 0.0411 | - |
| Линалил ацетат | 0.0763 | - |
| Борнил ацетат | 0.2240 | 1.05 |
| Карвакрол | - | 0.18 |
| β -Патчулен | - | 0.42 |
| Тимол | 0.4601 | - |
| p-Тимол | 0.2231 | - |
| 1,5,5-триметил-6-метилен-циклогексан | 0.4317 | - |
| Евгенол | 0.2271 | 0.28 |
| β -Дамасценон | 0.5103 | - |
| β -Элемен | 0.4543 | - |
| α -Гурунен | 0.3271 | 0.17 |
| Кариофилен | 13.2125 | 3.30 |
| α -Копаен | - | 0.07 |
| β -Капаен | 0.0716 | - |
| α -Борбонен | - | 0.12 |
| β -Борбонен | - | 0.29 |
| Синуларен | - | 0.17 |
| Каларен | - | 0.14 |
| Аромандендрен | 0.5243 | 0.08 |
| Е-геранил ацетон | 0.3866 | - |
| Гумулен | 1.8172 | 2.48 |
| Гермакрен D | 1.1321 | 0.17 |
| Валенцен | - | 0.05 |
| β -Гимачален | - | 0.95 |

Продолжение таблицы 17

| 1 | 2 | 3 |
|---------------------------|----------------|-------------|
| β -Ионон | 0.2144 | - |
| (Z,E)- α -Фарнесен | 0.1782 | - |
| Бициклогермакрен | 5.5897 | - |
| α -Фарнесен | 0.2767 | - |
| γ -Кадмен | 0.1411 | 0.12 |
| Спатуленол | 10.7506 | 0.0866 |
| β -Кариофилен оксид | 11.1582 | 0.06 |
| Виридидлорол | - | 7.98 |
| γ -Селинен | 2.5992 | - |
| Гумулен эпоксид I | 0.1681 | - |
| Петилбрен | 0.1369 | - |
| Гумулен эпоксид II | 1.0697 | - |
| Гумуленол-I-II | 0.4312 | - |
| (-)-Спатуленол | 1.1244 | - |
| T-Муурол | 0.2092 | 0.09 |
| Изоаромадендрен эпоксид | 1.9185 | - |
| Октадекан | 0.1285 | - |
| 13-Епиманол | 2.6772 | 1.18 |
| Фитол | 1.8259 | - |
| Бутил цитрат | 1.2019 | - |
| Диоктил адипат | 1.0063 | - |
| β -Мирцен | - | 1.93 |
| D-Лимонен | - | 1.43 |
| α -Терпинолен | - | 0.52 |

Исходя из сравнительной характеристики составов эфирных масел шалфея степного и обыкновенного видно, что несмотря на принадлежность к одному виду данные растения относятся к разному ряду. Так в составе шалфея обыкновенного преобладают камфора (25,14%), α -туйон (18,83%), 1,8-цинеол (14,14%), β -туйон (4,46%), в то время как в шалфее степном совсем отсутствует 1,8-цинеол, а содержание α -туйона, β -туйона и камфоры составляет не более 0,9%.

Химический состав сухих экстрактов листьев шалфея степного.

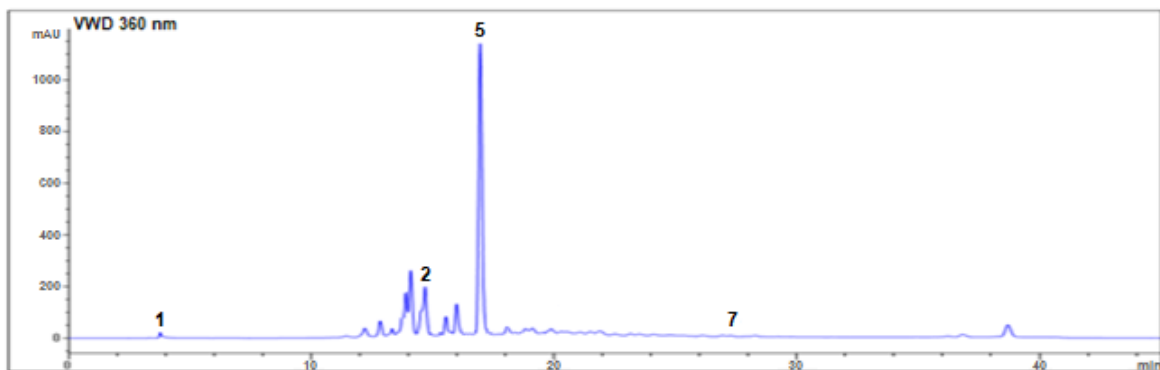
Первично была проведена ТСХ в УФ-свете при длине волны 336 нм, система растворителей (хлороформ-метанол-вода очищенная 26:14:3), в ходе которой обнаружено одно доминирующее ярко-голубое пятно $R_f=0,55$ соответствующее по значению R_f розмариновой кислоте.

При анализе полифенольных соединений экстрактов идентификация каждого соединения выполнялась путем сравнения их времени удерживания с аутентичными стандартами. Количественное определение фенольных соединений в экстрактах рассчитано с применением метода внешнего стандарта.

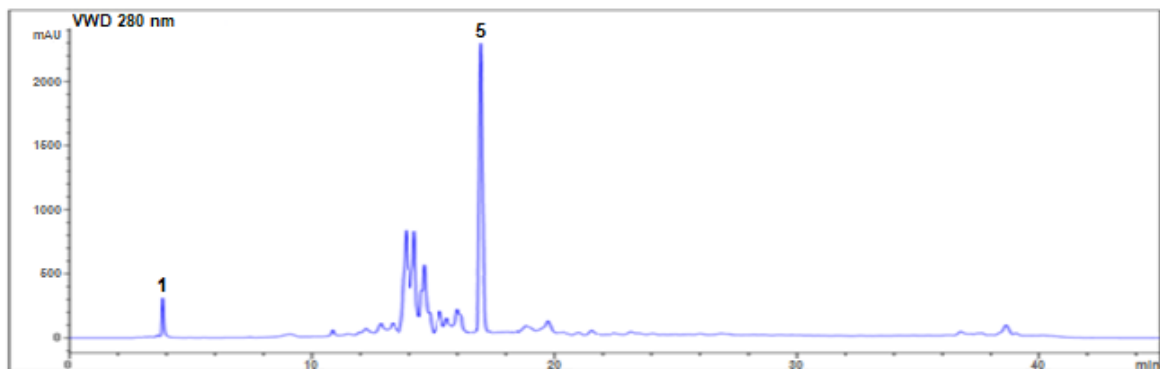
Таблица 18 - Содержание фенольных соединений в экстрактах шалфея степного

| № пика | Время удерживания, мин | M-H ⁻ (m/z) | Фенольные соединения | Количественное содержание, в пересчете на массу экстракта, % | | |
|--------|------------------------|------------------------|----------------------|--|-------------------|-------------------|
| | | | | МВШС (л) 40 | УЗШС (л) 40 | ШС (л) 40 |
| 1 | 3.869 | 179 | Кофейная к-та | 0,183±0,023 | 0,173±0,019 | 0,21±0,025 |
| 2 | 14.580 | 447 | Цинарозид | 0,099±0,008 | 0,091±0,004 | 0,512±0,021 |
| 3 | 15.195 | 579 | Нарингин | - | 0,32±0,016 | 0,0034±0,0009 |
| 4 | 15.792 | 163 | p-Кумаровая к-та | - | 2,22±0,025 | 1,95±0,07 |
| 5 | 17.070 | 359 | Розмариновая к-та | 6,092±0,176 | 5,53±0,089 | 6,14±0,230 |
| 6 | 27.196 | 271 | Нарингенин | - | 0,11±0,016 | 0,12±0,09 |
| 7 | 27.456 | 269 | Апигенин | 0,019±0,003 | 0,016±0,008 | 0,019±0,022 |
| 8 | 28.578 | 285 | Лютеолин | - | - | 0,040±0,032 |

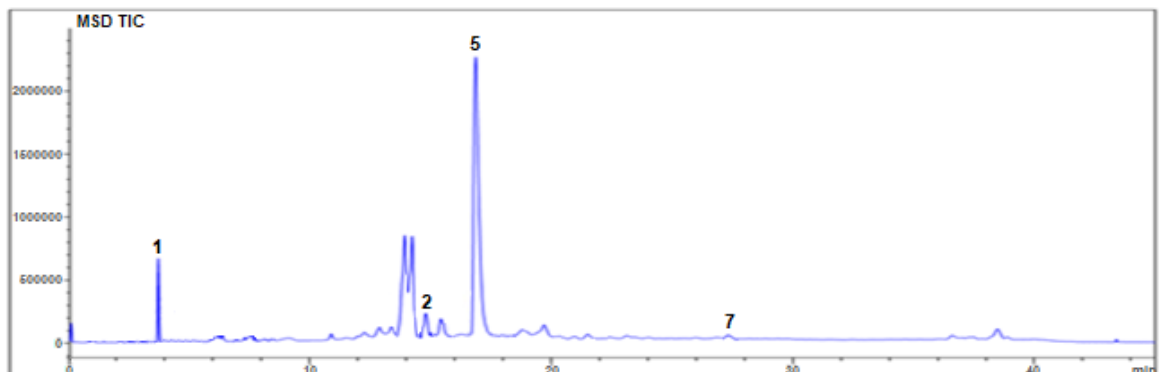
Из 20 образцов полифенольных соединений в МВШС(л)40 удалось идентифицировать 4, из них фенольные кислоты -2, флавоноиды -2 (рисунок 35). Установлено, что розмариновая кислота содержится в экстракте в мажорном количестве, что составляет 6,092 % в пересчете на массу экстракта.



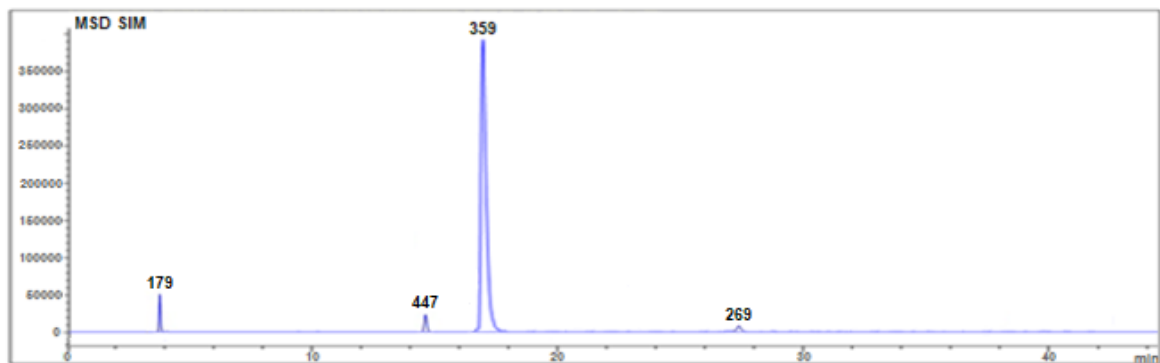
1



2



3

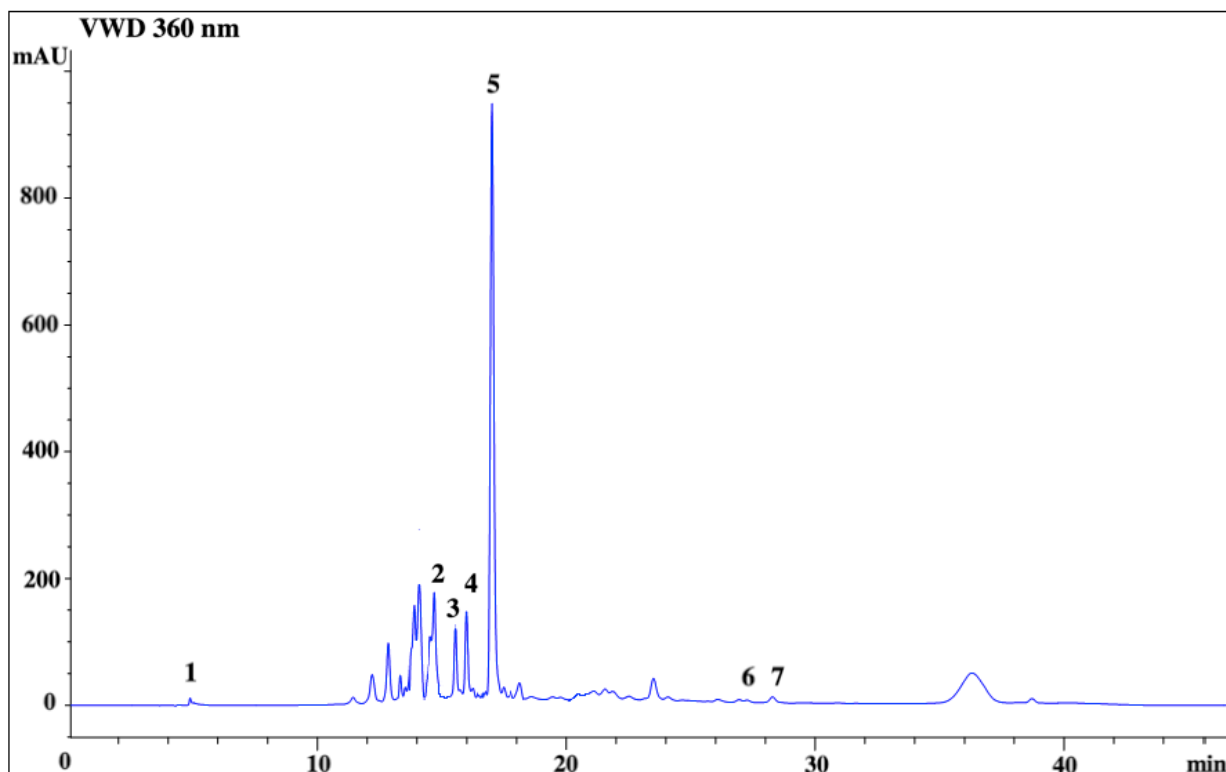


4

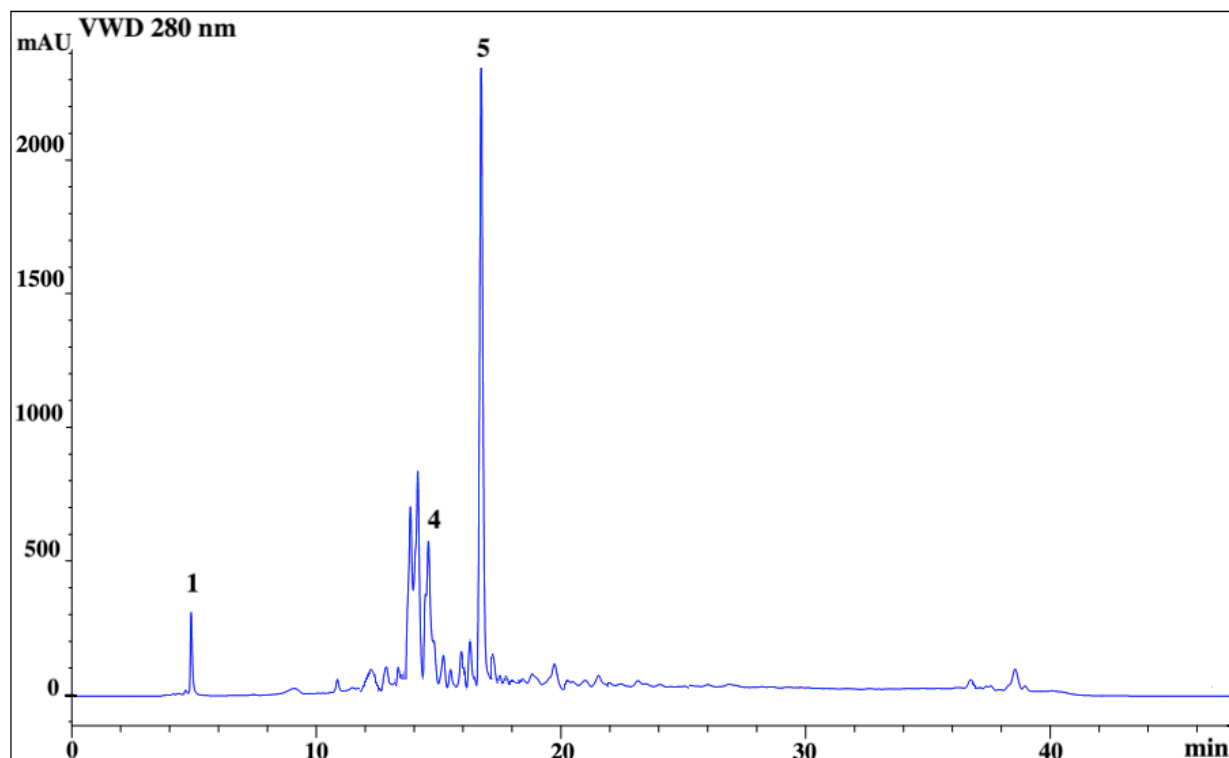
Рисунок 35 - Хроматограммы МВШС(л)40: ВЭЖХ-УФ 1 – 360 нм, 2 – 280 нм.; ВЭЖХ-МС/МС 3 – общая ионная (TIC), 4 – идентификация фенольных соединений в образце (SIM).

При идентификации полифенольных соединений в УЗШС(л)40 удалось идентифицировать 6 соединений: кофейную кислоту, цинарозид, нарингин, р-

кумаровую кислоту, розмариновую кислоту, нарингенин, апигенин. Хроматограммы представлены на рисунке 36.



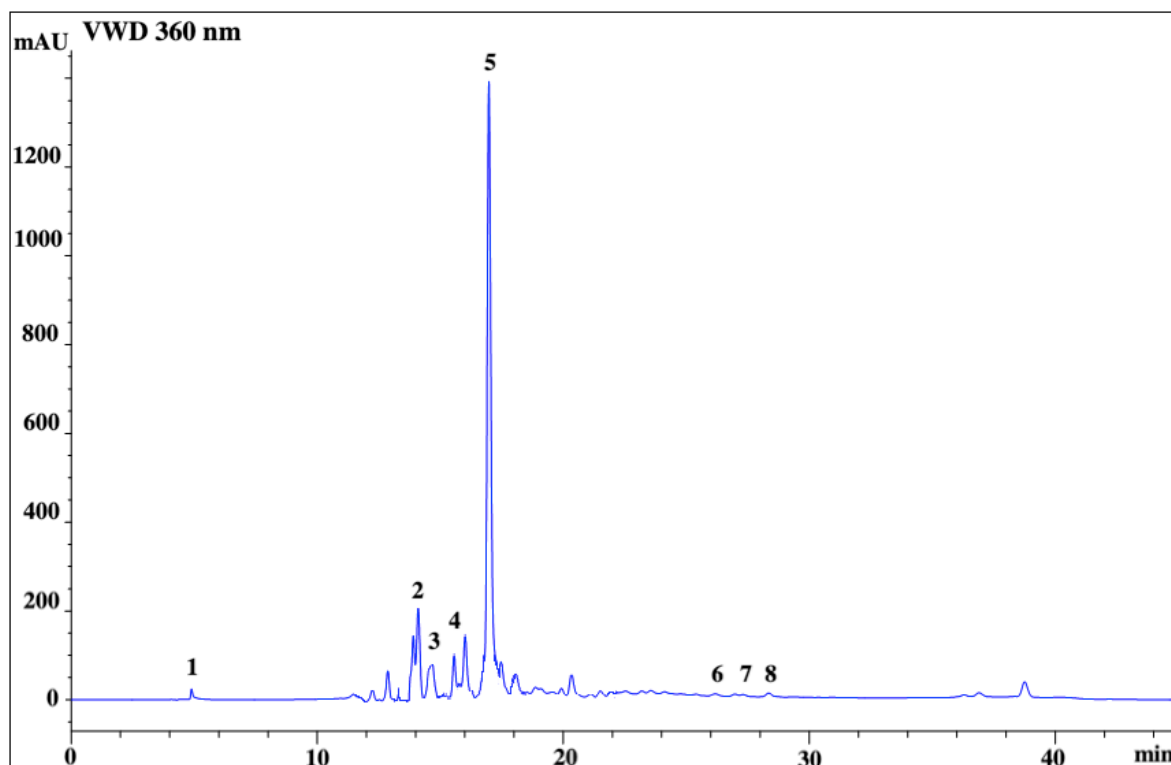
1



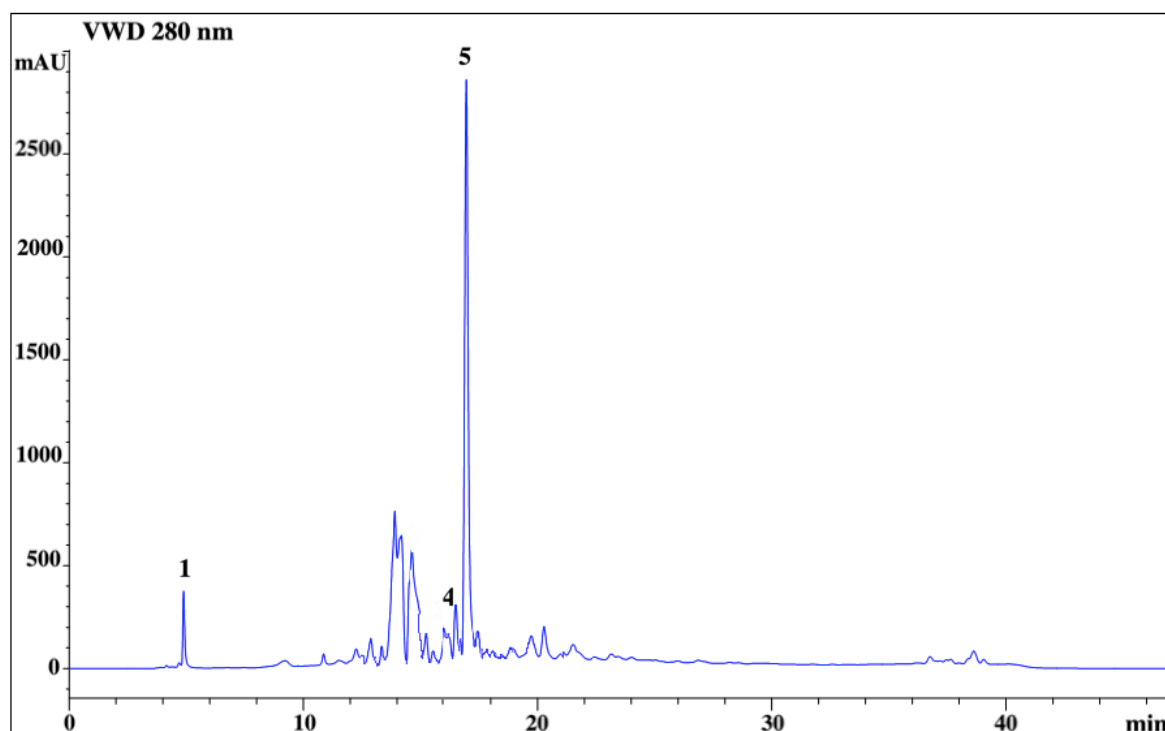
2

Рисунок 36 - Хроматограммы УЗШС(Л)40: ВЭЖХ-УФ 1 – 360 нм, 2 – 280 нм.

При идентификации полифенольных соединений в ШС(л)40 идентифицировано 7 соединений: кофейная кислота, цинарозид, нарингин, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, нарингенин, апигенин и лютеолин.



1



2

Рисунок 37 - Хроматограммы ШС(л)40: ВЭЖХ-УФ 1 – 360 нм, 2 – 280 нм.

Установлено, что содержание кофейной кислоты, цинарозида и апигенина в образце УЗШС(л)40 меньше в сравнении с МВШС(л)40. Количественное содержание практически всех компонентов в экстракте ШС(л)40 больше чем в МВШС(л)40 и УЗШС(л)40. Данный факт можно связать с выбранным методом экстракции. При экстракции кипячением происходит экстрагирование всех фракций за счет особенностей нагрева, в то время как экстракцию микроволнами и ультразвуком можно использовать в том случае, когда необходимо целенаправленно получить те или иные вещества минимизируя содержание посторонних соединений.

4.5 Разработка технологии производства сухого экстракта листьев МВШС-40

На основе вышеизложенных результатов исследования нами разработана технология получения сухого экстракта МВШС-40 методом микроволновой экстракции (рисунок 38).

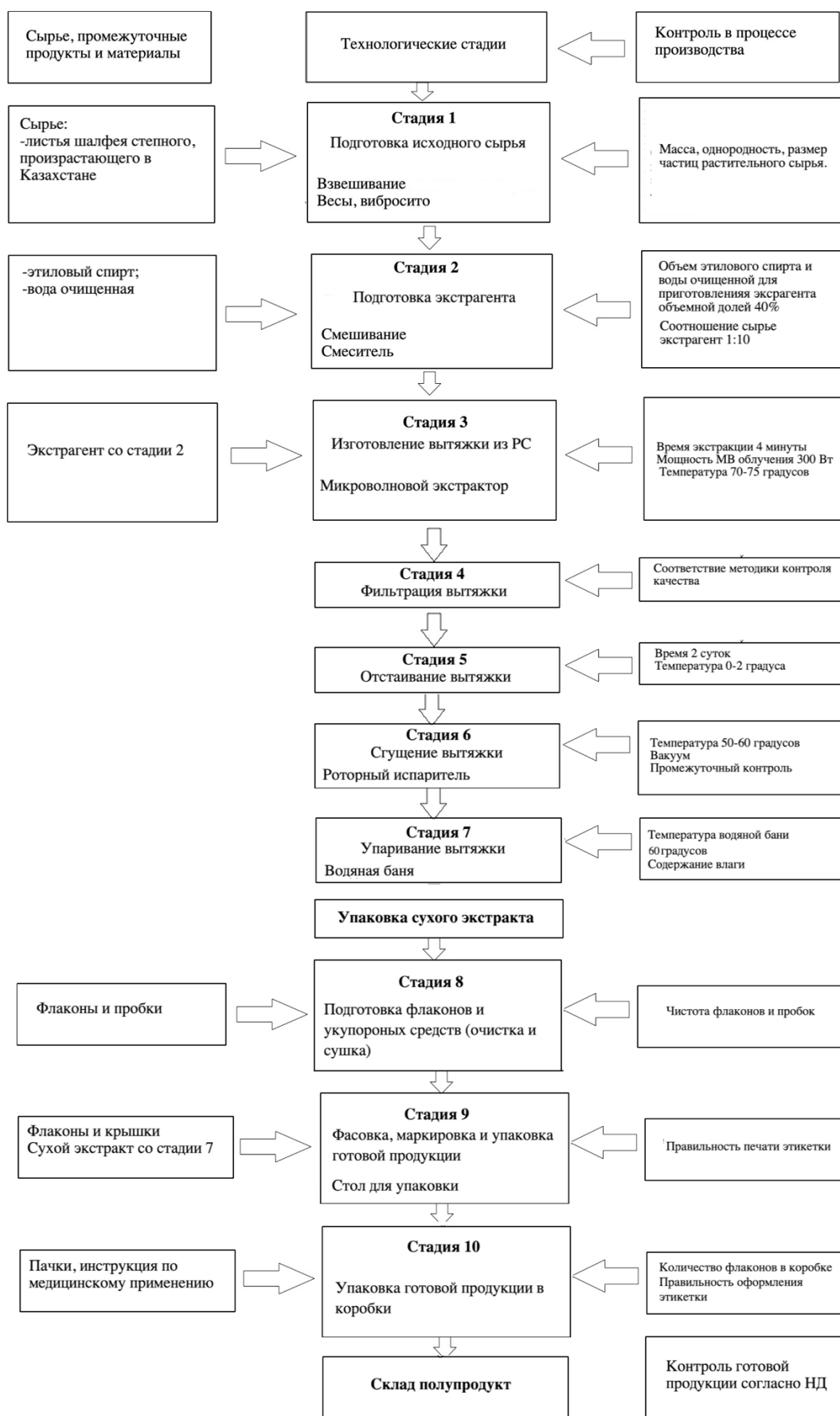


Рисунок 38– Технологическая схема получения сухого экстракта МВШС-40

Подготовка производства

Подготовку производства проводят в соответствии со стандартными операционными процедурами по GMP и технологическими инструкциями. В производстве экстракта используют сырье, прошедшее отдел контроля качества и отвечающее всем показателям качества. Технологическая схема из 10 стадий:

Стадия 1. Подготовка исходного сырья. Технологическую стадию измельчения листьев шалфея степного осуществляли вручную, при помощи сит для ручного просева проверяли размер измельченных частиц. После чего измельченное РС собирали в чистые полиэтиленовые мешки, взвешивали и маркировали этикеткой «Промежуточная продукция».

Стадия 2. Подготовка экстрагента. В качестве экстрагента использовали: - для экстракта листьев шалфея степного – 40 % (об/об) водный раствор этилового спирта, полученный путем смешивания спирта этилового 96% с водой очищенной.

Стадия 3. Изготовление вытяжки из РС. Для экстрагирования сырья использовали водный раствор этанола 40% со стадии 2. Экстрагирование сырья проводили в бытовой СВЧ-печи, с частотой излучения 2,45 ГГц рассчитанным объемом экстрагента. Полученную водно-спиртовую вытяжку передают на стадию 4.

Стадия 4. Фильтрация вытяжки. Вытяжку фильтруют под вакуумом на фильтрационной установке.

Стадия 5. Отстаивание вытяжки. Отфильтрованную вытяжку помещали в холодное место при температуре 0°C-2°C для осаждения балластных веществ на 2 суток. По истечении 2 суток осадок снова отделяли фильтрованием.

Стадия 6. Сгущение на роторном испарителе. Упаривание водно-спиртовой вытяжки проводили на ротационном испарителе Лабтех ИР-1ЛТ под вакуумом для предотвращения разложения биологически активных веществ, содержащихся в экстракте при температуре в пределах 50-60 °С. Полученный концентрат передают на стадию 7. Полученный отгонный спирт использовали повторно на стадии 3.

Стадия 7. Упаривание вытяжки. Полученные концентрированные экстракты шалфея степного помещали в выпарные чаши и довели до состояния сухого экстракта на водяной бане при температуре не выше 60 °С. Выход сухого экстракта составляет 23,7 % в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Стадия 8. Упаковка сухого экстракта. Подготовка флаконов и укупорочных средств (очистка, сушка).

Стадия 9. Фасовка, маркировка и упаковка готовой продукции. Правильность оформления этикетки название и количество каждого вспомогательного вещества, какое сырье использовано, название и концентрацию этанола в процентах (об/об) в растворителе, используемом для приготовления экстракта.

Стадия 10. Упаковка готовой продукции в коробки. Количество флаконов в коробке, правильность оформления этикетки.

4.6 Разработка спецификации качества сухого экстракта листьев шалфея степного МВШС-40

Разработку спецификации качества сухого экстракта листьев МВШС-40, полученного в условиях лаборатории Школы фармации НАО «МУК» проводили согласно приказа Министра здравоохранения РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств». В результате нами разработаны спецификация качества и лабораторный регламент (Приложение В) на производство субстанции экстракта листьев шалфея степного МВШС-40.

В спецификацию качества включены следующие показатели, представленные в таблице 1.

Таблица 19 – Спецификация качества сухого экстракта МВШС-40 из листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*)

| Показатели качества | Нормы (допустимые пределы) | Ссылки на методы испытаний |
|--------------------------------|---|--|
| 1 | 2 | 3 |
| Описание | Экстракт концентрированный, сухой, порошковой консистенции, полученный с использованием 40 % этилового спирта. Темно-зеленого цвета, горького вкуса, со своеобразным ароматным запахом. | ГФ РК, т.1, 2.8.8
ГФ РК, т.1, с. 556-558 |
| Растворимость | Растворим в воде при температуре 30°C, растворим в спирте этиловом 90%. | ГФ РК I, т.1, 1.4, с. 25 |
| Идентификация: | А. Качественная реакция. Реакция с бихроматом калия появляется желто-коричневое окрашивание (фенольные кислоты). Реакция с хлоридом железа появляется черно-синее окрашивание (флавоноиды).
В. ТСХ. R _f розмариновой кислоты 0,5.

С.ВЭЖХ. На хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, время удерживания основного пика должно совпадать с временем удерживания пика розмариновой кислоты на хроматограмме стандартного образца розмариновой кислоты. | В соответствии с НД.

ЕАЭС Ф
2.1.2.26
ГФ РК I, т. 1, 2.2.27

В соответствии с НД |
| Потеря в массе при высушивании | не более 6,5 % | ЕАЭС Ф
2.1.8.16
ГФ РК I, т. 1, 2.8.17 |

Продолжение таблицы 19

| 1 | 2 | 3 |
|-------------------------------------|---|--|
| Тяжелые металлы | Не более 0,01% | ЕАЭС Ф
2.1.2.41
ГФ РК, т.1,
2.2.23, |
| Микробиологическая чистота | Категория 4 В.
В 1.0 г сырья допускается общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не более 10^5 бактерий, не более 10^4 грибов и не более 10^3 энтеробактерий. Не допускается наличие <i>Escherichia coli</i> в 1.0 г и <i>Salmonella</i> в 10.0 г | ЕАЭС Ф
2.3.1.4
ГФ РК I, т. 1,
2.16.12
ГФ РК I, т. 1,
2.16.13
ГФ РК, т. I,
5.1.4 |
| Количественное определение | Розмариновая кислота не менее 0,5% | В соответствии с НД |
| Упаковка | По 10 г в стеклянные флаконы из темного стекла (ГФ РК, т.1, 3.2.1). Флаконы укупоривают пластмассовыми крышками (ГФ РК, т.1, 3.2.2). | ГФ РК т. 1, 3.2.1
ГФ РК т. 1, 3.2.2 |
| Маркировка | На этикетке указывают название и количество каждого вспомогательного вещества, какое сырье использовано, название и концентрацию этанола в процентах (об/об) в растворителе, используемом для приготовления экстракта, содержание действующих веществ.
Маркировка групповой и транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96 | ГОСТ 14192-96 |
| Транспортирование | В соответствии с ГОСТ 17768-90Е | ГОСТ 17768-90Е |
| Хранение | В воздухонепроницаемых контейнерах, в защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C | В соответствии с НД |
| Срок хранения | 24 месяца | В соответствии с НД |
| Основное фармакологическое действие | Противовоспалительное, антимикробное | В соответствии с НД |

4.7 Изучение стабильности сухого экстракта МВШС-40

Изучение стабильности сухого экстракта МВШС-40 из листьев шалфея степного (*Salvia stepposa*) проводили методом долгосрочных испытаний в соответствии с требованиями Приказа МЗ РК №ҚР ДСМ-165/2020 от 28 октября 2020 г. «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств» на трех сериях: начало исследования: 07.08.2020 г., конец исследования: 11.08.2022 г. Условия проведения испытаний: $T=25\pm 2$ °С при влажности $60\pm 5\%$. По результатам исследования установлен срок хранения сухого экстракта МВШС-40 24 месяца.

Результаты испытания стабильности сухого экстракта МВШС-40 из листьев *Salvia stepposa* представлены в таблицах 20-22. Периодичность контроля серии составляла по основным показателям качества: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 мес. Значительных изменений контролируемых параметров качества не наблюдалось.

Таблица 20 – Результаты определения сроков хранения сухого экстракта МВШС-40 из листьев (*Salvia stepposa*), серия 1

| Упаковка: стеклянные флаконы из темного стекла с пластиковыми крышками
Дата начала испытания: 08.2020 г
Дата окончания испытания: 08.2022 г
Серия: 070720 | | | | | | | | | | |
|--|--|---|--|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | Температура (25±2)°С,
относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I, 2.8.8 | Экстракт концентрированный, сухой ,порошковой консистенции, полученный с использованием 40 % этилового спирта. Темно-зеленого цвета, горького вкуса, со своеобразным ароматным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация
- фенольные кислоты

- флавоноиды | | В соответствии с НД | При добавлении бихромата калия появляется желто-коричневое окрашивание
При добавлении хлорида железа появляется черно-синее окрашивание | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.8.16
ГФ РК, т.1, 2.2.17 | Не более 6,5% | 6,35 | 6,36 | 6,36 | 6,35 | 6,37 | 6,35 | 6,36 |
| Микробиологическая чистота | | ЕАЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12,
ГФ РК т. I, 2.6.13 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , грибов не более 10 ⁴ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение:
-розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Не менее 0,5% | 0,67 | 0,69 | 0,69 | 0,68 | 0,69 | 0,69 | 0,68 |

Таблица 21 – Результаты определения сроков хранения сухого экстракта МВШС-40 из листьев (*Salvia stepposa*), серия 2

| Упаковка: стеклянные флаконы из темного стекла с пластиковыми крышками
Дата начала испытания: 12.2020 г
Дата окончания испытания: 12.2022 г
Серия: 291120 | | | | | | | | | | |
|--|--|---|--|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | Температура (25±2)°С,
относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I, 2.8.8 | Экстракт концентрированный, сухой ,порошковой консистенции, полученный с использованием 40 % этилового спирта. Темно-зеленого цвета, горького вкуса, со своеобразным ароматным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация
- фенольные кислоты

- флавоноиды | | В соответствии с НД | При добавлении бихромата калия появляется желто-коричневое окрашивание
При добавлении хлорида железа появляется черно-синее окрашивание | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.8.16
ГФ РК, т.1, 2.2.17 | Не более 6,5% | 6,36 | 6,36 | 6,35 | 6,37 | 6,35 | 6,35 | 6,33 |
| Микробиологическая чистота | | ЕАЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12,
ГФ РК т. I, 2.6.13 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , грибов не более 10 ⁴ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение:
-розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Не менее 0,5% | 0,68 | 0,69 | 0,68 | 0,67 | 0,68 | 0,69 | 0,7 |

Таблица 22 – Результаты определения сроков хранения сухого экстракта МВШС-40 из листьев (*Salvia stepposa*), серия 3

| Упаковка: стеклянные флаконы из темного стекла с пластиковыми крышками
Дата начала испытания: 02.2021 г
Дата окончания испытания: 02.2023 г
Серия: 110121 | | | | | | | | | | |
|--|---|---|--|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I, 2.8.8 | Экстракт концентрированный, сухой, порошковой консистенции, полученный с использованием 40 % этилового спирта. Темно-зеленого цвета, горького вкуса, со своеобразным ароматным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация
- фенольные кислоты

- флавоноиды | | В соответствии с НД | При добавлении бихромата калия появляется желто-коричневое окрашивание
При добавлении хлорида железа появляется черно-синее окрашивание | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.8.16
ГФ РК, т. I, 2.2.17 | Не более 6,5% | 6,36 | 6,36 | 6,37 | 6,36 | 6,37 | 6,37 | 6,36 |
| Микробиологическая чистота | | ЕАЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12,
ГФ РК т. I, 2.6.13 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , грибов не более 10 ⁴ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение:
- розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Не менее 0,5% | 0,68 | 0,68 | 0,7 | 0,68 | 0,69 | 0,69 | 0,68 |

Результаты испытаний позволяют определить не только наиболее эффективный и экономически рентабельный способ получения экстрактов, а также выбрать оптимальный экстрагент.

Установлено, что применение микроволновой экстракции позволяет сократить время экстрагирования в 15 раз в сравнении с традиционным методом экстракции и в 7,5 раз ультразвуковым методом для листьев и цветков.

На основании данных эксперимента по выходу извлекаемых веществ из листьев шалфея при экстракции водно-спиртовыми растворами разных концентраций, в качестве наиболее эффективного экстрагента 40% этиловый спирт. Кроме того установлено, что выход извлекаемых веществ из листьев шалфея степного не находится в прямой зависимости от увеличения концентрации спирта. Более того, последующее возрастание концентрации этанола, приводит к понижению выхода экстрактивных веществ.

На основании спецификации качества разработан проект НД на субстанцию «Сухой экстракт листьев шалфея степного (МВШС-40)».

Полученные данные являются важными для дальнейшей разработки лекарственной формы на их основе.

5 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА МВШС-40 ИЗ ЛИСТЬЕВ *SALVIA STEPPOSA*

5.1 Исследование антимикробной активности экстрактов из травы *Salvia stepposa*

В связи с формированием штаммов микроорганизмов с множественной антибиотикорезистентностью все больший интерес вызывают новые лекарственные средства на основе растительных биологически активных соединений, обладающих антимикробной активностью. Согласно литературным данным, экстракты трав становятся все более популярными, так как они сочетают низкую токсичность и способность эффективно действовать на патогенную и условно патогенную микрофлору, а также являются безопасными в сравнении с продуктами, полученными химическим путем.

В повседневной жизни люди часто заражаются такими микроорганизмами, как бактерии, плесень, вирусы и т. д. Для обеспечения стерильности (например, больничных лотков) и предотвращения распространения инфекции (например, перевязки ран) важно использование противомикробных агентов. В связи с этим на данный момент интенсивно проводится поиск новых источников растительного сырья, которые могут быть потенциально использованы в качестве высоко эффективных антибактериальных лекарств. Результаты выявленной задержки роста тест - штаммов *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. Aeruginosa* и *C. albicans* на средах показаны в таблицах 23-27 (Приложение Г).

Таблица 23 – Диаметры задержки роста тест-штаммов (в мм). Растворитель – вода очищенная *P*

| № | Исследуемые вещества | Вид экстракции | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|---|--|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| При дозе: 0,025 г навески на 0,25 мл растворителя | | | | | | | |
| 1 | Водный экстракт шалфея степного листья | Ультразвук | 8±1 | 8±1 | 10±1 | 7±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 10±1 | 11±1 | 7±1 | 7±1 | 7±1 |
| 2 | Водный экстракт шалфея степного цветки | Ультразвук | 7±1 | 13±1 | 7±1 | 6±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 24±1 | 15±1 | 10±1 | 10±1 | 8±1 |
| При дозе: 0,0375 г навески на 0,375 мл растворителя | | | | | | | |
| 3 | Водный экстракт шалфея степного листья | Ультразвук | 9±1 | 7,5±1 | 12±1 | 7±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 10±1 | 12±1 | 8±1 | 7±1 | 8±1 |
| 4 | Водный экстракт шалфея степного цветки | Ультразвук | 10±1 | 13±1 | 9±1 | 7±1 | 9±1 |
| | | Традиц. | 26±1 | 20±1 | 10±1 | 10±1 | 9±1 |
| При дозе: 0,05 г навески на 0,5 мл растворителя | | | | | | | |

Продолжение таблицы 23

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------------------------|--|------------|------|------|------|------|------|
| 5 | Водный экстракт шалфея степного листья | Ультразвук | 19±1 | 27±1 | 15±1 | 7±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 26±1 | 37±1 | 11±1 | 8±1 | 10±1 |
| 6 | Водный экстракт шалфея степного цветки | Ультразвук | 23±1 | 28±1 | 14±1 | 9±1 | 10±1 |
| | | Традиц. | 32±1 | 40±1 | 12±1 | 10±1 | 11±1 |
| Контрольные (стандарты сравнения) | | | | | | | |
| 7 | Вода дистиллированная (стерильная) | | 6±1 | 6±1 | 6±1 | 6±1 | 6±1 |
| 8 | Бензилпенициллина натриевая соль | | 16±1 | 14±1 | 21±1 | - | - |
| 9 | Цефтриаксон | | - | - | - | 22±1 | - |
| 10 | Нистатин | | - | - | - | - | 23±1 |

Таблица 24 – Диаметры задержки роста тест-штаммов (в мм). Растворитель – 30% этиловый спирт

| № | Исследуемые вещества | Вид экстракции | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|---|--|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| При дозе: 0,025 г навески на 0,25 мл растворителя | | | | | | | |
| 1 | 30% этанольный экстракт шалфея степного листья | СВЧ | 8±1 | 7±1 | 8±1 | 7±1 | 7±1 |
| | | Ультразвук | 22±1 | 10±1 | 8±1 | 7±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 7±1 | 9±1 | 8±1 | 8±1 | 7±1 |
| 2 | 30% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 14±1 | 23±1 | 7±1 | 9±1 | 7±1 |
| | | Ультразвук | 20±1 | 31±1 | 8±1 | 8±1 | 9±1 |
| | | Традиц. | 9±1 | 11±1 | 7±1 | 7±1 | 8±1 |
| При дозе: 0,0375 г навески на 0,375 мл растворителя | | | | | | | |
| 3 | 30% этанольный экстракт шалфея степного листья | СВЧ | 19±1 | 8±1 | 8±1 | 7±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 24±1 | 14±1 | 8±1 | 8±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 8,5±1 | 17±1 | 9±1 | 9±1 | 9±1 |
| 4 | 30% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 24±1 | 29±1 | 9±1 | 10±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 21±1 | 32±1 | 10±1 | 9±1 | 10±1 |
| | | Т Традиц. | 23±1 | 13±1 | 8±1 | 8±1 | 9±1 |
| При дозе: 0,05 г навески на 0,5 мл растворителя | | | | | | | |
| 5 | 30% этанольный экстракт шалфея степного листья | СВЧ | 23±1 | 23±1 | 13±1 | 12±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 28±1 | 32±1 | 9±1 | 10±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 26±1 | 31±1 | 12±1 | 10±1 | 8±1 |

Продолжение таблицы 24

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------------------------|--|------------|-------------|-------------|------|------|------|
| 6 | 30% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 25±1 | 41±1 | 11±1 | 10±1 | 12±1 |
| | | Ультразвук | 35±1 | 44±1 | 12±1 | 10±1 | 12±1 |
| | | Традиц. | 24±1 | 43±1 | 12±1 | 9±1 | 9±1 |
| Контрольные (стандарты сравнения) | | | | | | | |
| 7 | 30% этиловый спирт | 6±1 | 7±1 | 6±1 | 6±1 | 6±1 | 7±1 |
| 8 | Бензилпенициллин натрия соль | 33±1 | 35±1 | 10±1 | - | - | |
| 9 | Цефтриаксон | - | - | - | 23±1 | - | |
| 10 | Нистатин | - | - | - | - | 15±1 | 21±1 |

Таблица 25 – Диаметры задержки роста тест-штаммов (в мм). Растворитель – 40% этиловый спирт

| № | Исследуемые вещества | Вид экстракции | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|---|--|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| При дозе: 0,025 г навески на 0,25 мл растворителя | | | | | | | |
| 1 | 40% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 20±1 | 29±1 | 10±1 | 7±1 | 7±1 |
| | | Ультразвук | 12±1 | 10±1 | 9±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 13±1 | 20±1 | 11±1 | 7±1 | 8±1 |
| 2 | 40% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 8±1 | 18±1 | 8±1 | 9±1 | 7±1 |
| | | Ультразвук | 8±1 | 14±1 | 9±1 | 7±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 15±1 | 10±1 | 7±1 | 7±1 | 8±1 |
| При дозе: 0,0375 г навески на 0,375 мл растворителя | | | | | | | |
| 3 | 40% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 21±1 | 36±1 | 11±1 | 8±1 | 16±1 |
| | | Ультразвук | 19±1 | 15±1 | 10±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 9±1 | 21±1 | 11±1 | 8±1 | 9±1 |
| 4 | 40% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 24±1 | 29±1 | 10±1 | 9±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 10±1 | 14±1 | 9±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 18±1 | 12±1 | 8±1 | 8±1 | 9±1 |
| При дозе: 0,05 г навески на 0,5 мл растворителя | | | | | | | |
| 5 | 40% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 24±1 | 38±1 | 17±1 | 12±1 | 16±1 |
| | | Ультразвук | 33 ±1 | 49±1 | 16±1 | 11±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 21±1 | 43±1 | 13±1 | 11±1 | 9±1 |

Продолжение таблицы 25

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------------------------|--|------------|------|------|------|------|------|
| 6 | 40% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 24±1 | 40±1 | 16±1 | 11±1 | 9±1 |
| | | Ультразвук | 30±1 | 29±1 | 11±1 | 10±1 | 9±1 |
| | | Традиц. | 30±1 | 39±1 | 12±1 | 10±1 | 10±1 |
| Контрольные (стандарты сравнения) | | | | | | | |
| 7 | 40% этиловый спирт | 7±1 | 7±1 | 6±1 | 6±1 | 6±1 | 7±1 |
| 8 | Бензилпенициллина натриевая соль | 34±1 | 35±1 | 10±1 | - | - | - |
| 9 | Цефтриаксон | - | - | - | 22±1 | - | - |
| 10 | Нистатин | - | - | - | - | 25±1 | 34±1 |

Таблица 26 – Диаметры задержки роста тест-штаммов (в мм). Растворитель – 70% этиловый спирт

| № | Исследуемые вещества | Вид экстракции | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|---|--|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| При дозе: 0,025 г навески на 0,25 мл растворителя | | | | | | | |
| 1 | 70% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 10±1 | 10±1 | 8±1 | 9±1 | 7±1 |
| | | Ультразвук | 18±1 | 12±1 | 8±1 | 7±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 8±1 | 9±1 | 9±1 | 8±1 | 7±1 |
| 2 | 70% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 9±1 | 20±1 | 7±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 10±1 | 10±1 | 7±1 | 8±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 10±1 | 7±1 | 7±1 | 7±1 | 7±1 |
| При дозе: 0,0375 г навески на 0,375 мл растворителя | | | | | | | |
| 3 | 70% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 10±1 | 15±1 | 10±1 | 9±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 18±1 | 15±1 | 9±1 | 8±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 9±1 | 21±1 | 10±1 | 8±1 | 8±1 |
| 4 | 70% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 11±1 | 21±1 | 7±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 13±1 | 11±1 | 8±1 | 9±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 15±1 | 8±1 | 8±1 | 7±1 | 8±1 |
| При дозе: 0,05 г навески на 0,5 мл растворителя | | | | | | | |
| 5 | 70% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 12±1 | 21±1 | 15±1 | 9±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 20±1 | 29±1 | 24±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 25±1 | 30±1 | 13±1 | 9±1 | 9±1 |
| 6 | 70% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 23±1 | 39±1 | 8±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 25±1 | 32±1 | 11±1 | 9±1 | 7±1 |

Продолжение таблицы 26

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---------|-------------|-------------|------|------|------|
| | | Традиц. | 41±1 | 35±1 | 8±1 | 8±1 | 9±1 |
| Контрольные (стандарты сравнения) | | | | | | | |
| 7 | 70% этиловый спирт | 9±1 | 10±1 | 9±1 | 7±1 | 7±1 | 9±1 |
| 8 | Бензилпеницилли на натриевая соль | 21±1 | 33±1 | 10±1 | - | - | - |
| 9 | Цефтриаксон | - | - | - | 21±1 | - | - |
| 10 | Нистатин | - | - | - | - | 19±1 | 21±1 |

Таблица 27 – Диаметры задержки роста тест-штаммов (в мм). Растворитель – 90% этиловый спирт

| № | Исследуемые вещества | Вид экстракции | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|---|--|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| При дозе: 0,025 г навески на 0,25 мл растворителя | | | | | | | |
| 1 | 90% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 7±1 | 14±1 | 7±1 | 8±1 | 9±1 |
| | | Ультразвук | 15±1 | 15±1 | 8±1 | 8±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 9±1 | 9±1 | 7±1 | 9±1 | 7±1 |
| 2 | 90% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 7±1 | 8±1 | 7±1 | 9±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 10±1 | 11±1 | 8±1 | 8±1 | 7±1 |
| | | Традиц. | 7±1 | 14±1 | 8±1 | 8±1 | 9±1 |
| При дозе: 0,0375 г навески на 0,375 мл растворителя | | | | | | | |
| 3 | 90% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 7±1 | 19±1 | 9±1 | 8±1 | 10±1 |
| | | Ультразвук | 16±1 | 17±1 | 9±1 | 9±1 | 9±1 |
| | | Традиц. | 9±1 | 22±1 | 11±1 | 10±1 | 9±1 |
| 4 | 90% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 10±1 | 12±1 | 8±1 | 9±1 | 8±1 |
| | | Ультразвук | 15±1 | 16±1 | 8±1 | 9±1 | 8±1 |
| | | Традиц. | 7±1 | 18±1 | 10±1 | 8±1 | 9±1 |
| При дозе: 0,05 г навески на 0,5 мл растворителя | | | | | | | |
| 5 | 90% этанольный экстракт шалфея степного листа | СВЧ | 25±1 | 61±1 | 11±1 | 11±1 | 10±1 |
| | | Ультразвук | 26±1 | 28±1 | 10±1 | 11±1 | 11±1 |
| | | Традиц. | 22±1 | 35±1 | 14±1 | 10±1 | 12±1 |
| 6 | 90% этанольный экстракт шалфея степного цветки | СВЧ | 21±1 | 21±1 | 8±1 | 10±1 | 10±1 |
| | | Ультразвук | 26±1 | 30±1 | 21±1 | 9±1 | 12±1 |
| | | Традиц. | 27±1 | 35±1 | 11±1 | 10±1 | 9±1 |
| Контрольные (стандарты сравнения) | | | | | | | |
| 7 | 90% этиловый спирт | 9±1 | 10±1 | 9±1 | 7±1 | 7±1 | 9±1 |

Продолжение таблицы 27

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----|------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| 8 | Бензилпенициллин натрия соль | 34±1 | 14±1 | 10±1 | - | - | - |
| 9 | Цефтриаксон | - | - | - | 23±1 | - | - |
| 10 | Нистатин | - | - | - | - | 25±1 | 34±1 |

Образцы водных экстрактов шалфея степного в большей концентрации имеют высоко выраженную антимикробную активность по отношению к штаммам *S. aureus*, *B. subtilis*, однако проявили слабую активность в отношении *E.coli* и не проявили активность в отношении *C.albicans* и *P.aeruginosa*.

Образцы данного вида сырья 30% этанольных экстрактов цветков, полученных с помощью СВЧ и УЗ в средней и большей концентрации имеют выраженную антимикробную активность по отношению к штаммам *S. aureus*, *B. subtilis* и в большей концентрации слабо выраженную активность в отношении *E. coli*.

Выраженную антимикробную активность показали 40%, 70%, 90% экстракты как листьев, так и цветков, полученных всеми тремя видами экстракции в большей концентрации в отношении *S. aureus*, *B. subtilis*, умеренно выраженную активность по отношению к грамотрицательным микроорганизмам *E. coli* показал только лишь 40 % экстракт листьев шалфея степного, полученные с помощью УЗ и СВЧ. Кроме того, была выявлена умеренно выраженная антимикробная активность 40% микроволнового экстракта листьев в отношении грибов рода *C. albicans* и *P. aeruginosa*, в то время как другие экстракты не проявили активности в отношении этого гриба.

Образцы *Salvia stepposa* 70% и 90% ультразвукового этанольного экстракта листьев в большей концентрации имеют выраженную антимикробную активность по отношению к штаммам *E. coli*

В результате исследования потенциала противогрибковой и антимикробной активности установлено, что практически все исследованные образцы в той или иной степени тормозят рост тестовых культур *in vitro*. Некоторые экстракты имеют очень слабую активность по отношению к *E. coli*, *C.albicans* и *P. aeruginosa*. В связи с этим единственным экстрактом, который обладает антимикробной активностью в отношении всех исследуемых штаммов является 40% микроволновой экстракт листьев шалфея степного.

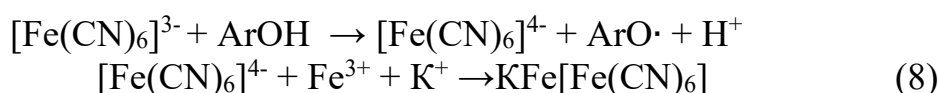
По результатам проведенных исследований можно судить о том, что микроволновая экстракция является интересной альтернативой традиционным методам экстракции растительного сырья, позволяющая сократить время экстракции и уменьшить энергопотребление. Некоторые микроволновые экстракты показали более выраженную антимикробную активность в сравнении с экстрактами, полученными традиционным способом. Это объясняется тем, что прямое взаимодействие микроволн со свободными молекулами воды, присутствующими в сырье, вызывает

огромное повышение внутреннего давления внутри растительной клетки из-за испарения внутренней влаги, которое приводит к последующему разрыву растительной ткани и высвобождению биологически активных веществ в экстрагент. В связи с чем, актуальной задачей и темой будущих исследований может быть разработка технологии получения растительных экстрактов в условиях микроволновой активации и изучение активности, полученных экстрактов с целью дальнейшей разработки лекарственных средств на их основе.

5.2 Исследование антиоксидантной активности сухого экстракта МВШС-40

Изучение антиоксидантной активности проводилось методом железо-восстанавливающего потенциала FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Powerassay) (Приложение Д).

Механизм данного метода можно представить следующим образом:



Измерение оптической плотности производится при $\lambda = 700\text{nm}$. Полученные данные отражены на таблице 28 и рисунке 39, в которой представлены концентрационные зависимости значений оптической плотности для исследуемых растительных экстрактов и вещества – стандарта аскорбиновая кислота (АК).

Таблица 28 – Значения оптической плотности МВШС-40 и АК

| МВШС-40 Шалфей степной | | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0,25 мг/мл | 0,5 мг/мл | 0,75 мг/мл | 1 мг/мл |
| 0,52±0,21 мг/мл | 0,47±0,05 мг/мл | 0,81±0,30 мг/мл | 0,74±0,04 мг/мл |
| Аскорбиновая кислота | | | |
| 0,25 мг/мл | 0,5 мг/мл | 0,75 мг/мл | 1 мг/мл |
| 1,925 мг/мл | 2,284 мг/мл | 2,257 мг/мл | 2,316 мг/мл |

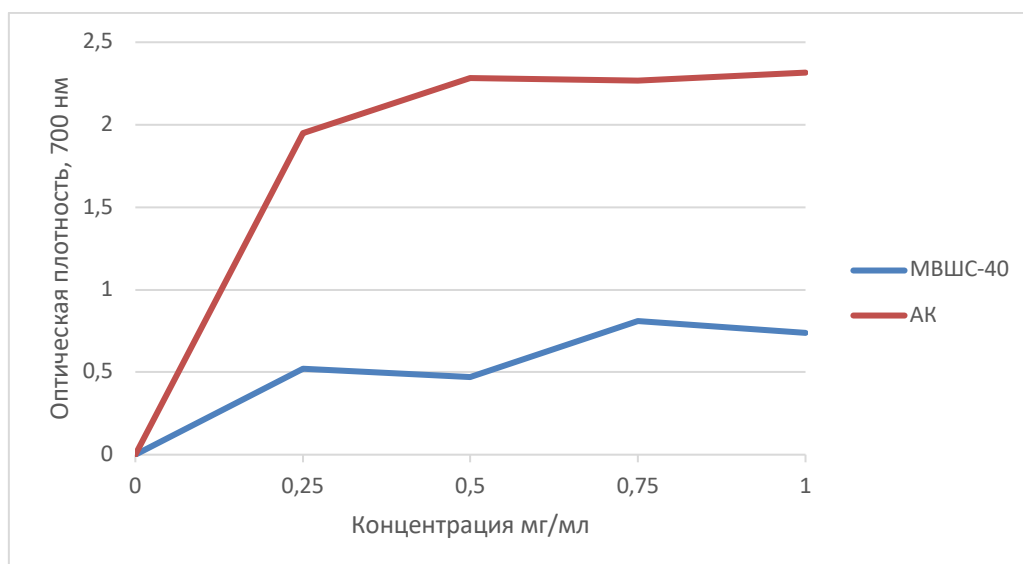


Рисунок 39 – Зависимость оптической плотности от концентрации растительного экстракта МВШС-40

На рисунке 39 и в таблице 28 представлены концентрационные зависимости значений оптической плотности для исследуемого растительного экстракта и вещества – стандарта аскорбиновой кислоты. Нами установлено, что увеличение значения оптической плотности указывает на рост восстановительного потенциала. Как видно из полученной графической зависимости экстракт МВШС-40 Шалфея степного обладает антиоксидантной активностью.

5.3 Исследование антирадикальной активности сухого экстракта МВШС-40

Объектом исследования служили сухой экстракт листьев шалфея степного МВШС-40 на наличие антирадикальной активности в отношении радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (DPPH•) (Приложение Д).

В таблице 29 приведены результаты скрининга на предмет наличия антирадикальной активности.

Таблица 29 – Значения оптической плотности раствора 100 мкм DPPH-радикала после 10-минутной инкубации с экстрактом МВШС-40 в финальной концентрации 100 мг/мл и контроля

| № | Испытуемый раствор | Оптическая плотность, нм |
|---|---|--------------------------|
| 1 | МВШС-40 | 0,124 |
| 2 | Контроль (раствор DPPH без испытуемого образца) | 0,995 |

Из таблицы 29 мы видим, что растительный экстракт МВШС-40 является перспективным для дальнейших исследований, так как снижает оптическую плотность раствора DPPH радикала более чем на 50%.

Во второй серии экспериментов мы изучили способность экстракта МВШС-40 в различных концентрациях (от 5 до 100 мг/мл) взаимодействовать с DPPH-радикалом.

С помощью построенных калибровочных кривых определили $IC_{50}(DPPH)$ (рисунок 40). Значения $IC_{50}(DPPH)$ для экстракта представлены в таблице 26.

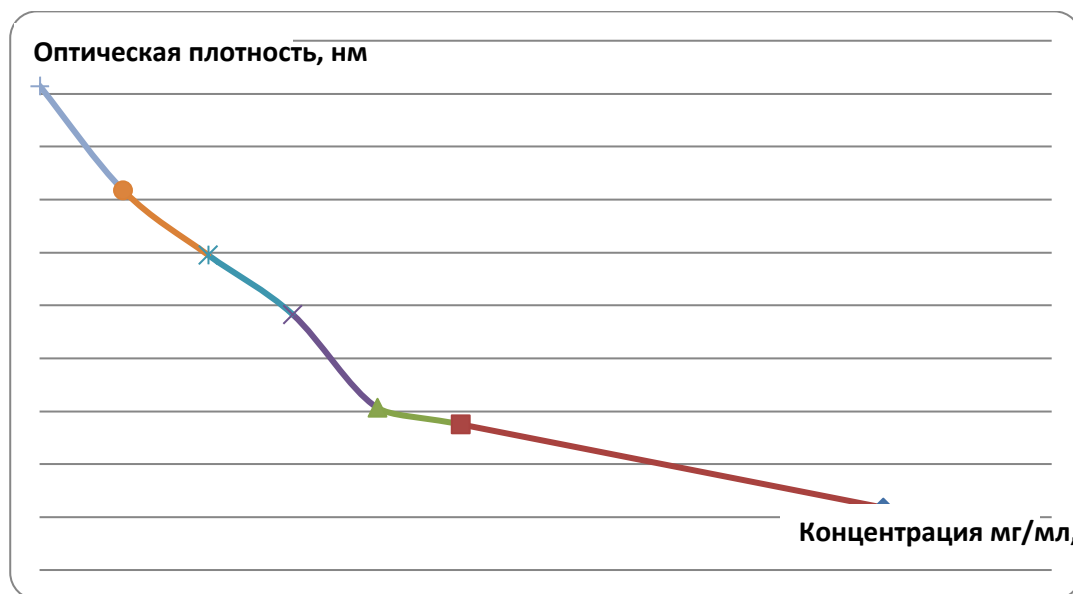


Рисунок 40 – Калибровочная кривая для экстракта МВШС-40

Таблица 30 – Значение $IC_{50}(DPPH)$ для МВШС-40

| № | Испытуемый экстракт | $IC_{50}(DPPH)$, мг/мл |
|---|---------------------|-------------------------|
| 1 | МВШС-40 | 12,5 |

МВШС-40 имеет выраженную антирадикальную активность в условиях данной тест-системы. Для МВШС-40 была определена концентрация, способная на 50% снижать оптическую плотность 100 мкм раствора – 12,5 мг/мл.

5.4 Исследование противовоспалительной активности сухого экстракта МВШС-40

Оценку противовоспалительной активности сухого экстракта листьев шалфея степного МВШС-40 входящего в состав таблеток проводили на модели острой экссудативной реакции (перитонит).

Результаты исследования противовоспалительной активности образца приведены в таблице 31.

Таблица 31 – Противовоспалительная активность МВШС-40

| Исследуемые группы | Доза, мг/кг | Количество экссудата, мл. | % к контролю | Противовоспалительная активность |
|--------------------|-------------|---------------------------|--------------|----------------------------------|
| Контроль | - | 7,0± 0,6 | 100 | - |
| Диклофенак натрия | 8 | 4,4 ± 0,8* | 37,1 | 62,9 |
| МВШС-40 | 25 | 4,3 ± 0,9* | 38,5 | 61,5 |

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В результате проведенного эксперимента выявлено, что МВШС-40 в дозе 25 мг/кг обладает противовоспалительной активностью, что выражалось в достоверном уменьшении на 38,5% количества воспалительного экссудата в брюшной полости у крыс по сравнению с контролем. Противовоспалительная активность МВШС-40 сопоставима с препаратом сравнения диклофенаком натрия.

5.5 Исследование острой токсичности сухого экстракта МВШС-40

Одной из самых главных характеристик таблеток, которые предлагаются наряду с высокой фармакологической активностью, является их безопасность. Поэтому, в первую очередь, была изучена острая токсичность экстракта в эксперименте *in vivo* сухого экстракта листьев шалфея степного МВШС-40, входящего в состав таблеток. Исследования были одобрены Комитетом по биоэтике НАО «Медицинский университет Караганды» протокол №20 от 19.05.2021 г. (Приложение Е). Акт исследования острой токсичности представлен в Приложении И.

Исследования острой токсичности проводили на белых аутбредных мышах и крысах самцах и самках массой 20-37 г. и 150-300 г, соответственно. Все животные были разделены на четыре группы по пять голов в каждой. Животные прошли акклиматизацию в условиях комнаты для проведения испытаний в течение 7 суток.

Острую токсичность определяли в условиях однократного внутрижелудочного введения в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [108] измельченного сухого экстракта МВШС-40 в виде водной суспензии. Одноразово животные получали физиологически допустимый объем препарата. Для исследования острой токсичности была выбрана доза 2000 мг/кг, как рекомендованная к исследованию, и дозы, меньше 2000 мг/кг. Каждую дозу соединения вводили экспериментальным группам по 5 (крыс) и 5 (мышей) животных обоего пола из расчёта на массу тела. Наблюдение за животными проводили в течение 14 суток. Степень токсичности препарата оценивали по изменению общего состояния животных, летальностью и влиянием на динамику массы тела животных.

Таблица 32 – Дизайн исследования острой токсичности соединения МВШС-40 при внутрижелудочном введении на крысах и мышах

| № группы | Пол (М/Ф) | Кол-во животных | Исследуемое ЛС | Доза ЛС мг/кг |
|--------------|-----------|-----------------|----------------|---------------|
| Мыши | | | | |
| A | М | 5 | МВШС-40 | 500 |
| B | М | 5 | | 1000 |
| C | Ф | 5 | | 2000 |
| D (контроль) | Ф | 5 | | - |
| Крысы | | | | |
| A | М | 5 | МВШС-40 | 500 |
| B | Ф | 5 | | 1000 |
| C | М | 5 | | 2000 |
| D (контроль) | Ф | 5 | | - |

При изучении острой токсичности на фоне введения соединения МВШС-40 отмечали проявление и выраженность патологических признаков: наличия аномальных поз, аномальных движений, самотравмирования, тремора, судорог, синдрома Штраубе [114]. При наличии изменений фиксировали сроки их обратимости. Зависимые от доз летальные эффекты исследуемого соединения МВШС-40 представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Летальные эффекты (пало/всего) при внутрижелудочном введении соединения МВШС-40 на мышах и крысах

| Соединение/Доза, мг/кг | 500 | 1000 | 2000 | - |
|------------------------|-----|------|------|-----|
| Мыши | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 |
| Крысы | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

Во время периода исследования животные были аккуратными, активными, имели положительный аппетит, адекватно реагировали на звуковые и световые раздражители, процессы мочеиспускания и дефекации протекали нормально, судорог и нарушений дыхания или каких-либо других проявлений токсического воздействия не наблюдалось. Исследование динамики массы тела животных на протяжении эксперимента свидетельствует об отсутствии токсического влияния препарата на процессы роста животных.

Как следует из таблицы 33, при определении острой токсичности исследуемого соединения МВШС-40 не было выявлено признаков токсичности, летальность отсутствовала, что не позволило установить LD₅₀. Итак, согласно общепринятой классификации токсичности веществ МВШС-40 можно отнести к классу малотоксичных веществ (IV класс токсичности, LD₅₀ > 5000 мг/кг, внутрижелудочного введение), то есть к практически не токсичным соединениям по классификации Е.А.Лужникова [115].

Это дало нам возможность продолжить изучение биологической активности таблеток на основе МВШС-40.

Влияние острого введения соединения МВШС-40 на потребление пищи и воды, массу тела экспериментальных животных. После введения соединения МВШС-40 в диапазоне доз до 2000 мг/кг значительного изменения в потреблении пищи и воды мышами и крысами отмечено не было. Прирост массы тела экспериментальных животных в течение всего срока наблюдения был отмечен как в контрольной группе, так и в группах животных (крыс), получивших соединение МВШС-40 в дозах до 2000 мг/кг.

Таблица 34 – Динамика массы тела мышей при внутрибрюшном введении образца МВШС-40

| Доза, мг/кг | Кол-во | Исходная масса | 1 сутки | 3 сутки | 7 сутки | 14 сутки |
|--|--------|----------------|------------|------------|------------|------------|
| Мыши | | | | | | |
| Контроль | 10 | 33,5±3,06 | 31,3±3,52 | 31,5±4,57 | 31,6±4,55 | 31,72±3,98 |
| 500 | 10 | 34,0±2,65 | 30,1±2,79 | 30,15±3,35 | 30,25±2,01 | 30,96±2,08 |
| 1000 | 10 | 33,8±4,23 | 30,1±2,64 | 30,4±3,39 | 30,65±2,59 | 30,86±2,27 |
| 2000 | 10 | 29,9±3,54 | 30,3±3,36 | 30,75±4,28 | 30,78±3,59 | 30,91±3,98 |
| Крысы | | | | | | |
| Контроль | 10 | 256,5±2,06 | 256,8±3,15 | 257,0±4,26 | 257,3±2,06 | 257,5±3,51 |
| 500 | 10 | 199,0±3,55 | 199,4±3,05 | 199,6±3,48 | 199,8±2,54 | 199,9±1,89 |
| 1000 | 10 | 226,0±1,25 | 226,3±4,21 | 226,4±3,79 | 226,6±2,45 | 226,7±1,34 |
| 2000 | 10 | 217,3±1,48 | 217,3±2,51 | 217,5±3,44 | 217,7±3,62 | 217,9±2,78 |
| Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями у животных контрольной группы. | | | | | | |

Таким образом, анализ полученных данных показал отсутствие влияния соединения МВШС-40 в токсических дозах на массу тела экспериментальных животных. Снижения массы тела, одного из признаков токсического воздействия на организм, не было зафиксировано ни в одной группе, напротив, было отмечено незначительное увеличение массы тела на протяжении всего периода наблюдения.

5.6 Гистоморфологическое исследование МВШС-40

Сравнительная гистоморфометрическая характеристика изменений ткани печени и селезенки самцов и самок мышей в исследуемых группах при введении МВШС-40 в окраске гематоксилином и эозином представлена в таблице 35.

Сравнительная гистоморфометрическая характеристика изменений ткани печени. Исследование срезов печени как самцов, так и самок мышей контрольной группы, получавших внутрижелудочно питьевую воду, показало нормальную гистоархитектонику печени. Во всех случаях наблюдались нормальные, четко очерченные гистологические структуры без каких-либо признаков сосудистых или воспалительных изменений. Срезы печени демонстрировали соответствующий гистологической норме вид центральной вены и печеночных синусоидов, выстланных эндотелиальными клетками и

клетками Купфера. Гепатоциты нормального размера и формы, располагались радиально, образуя тяжи вокруг центральной вены, в их цитоплазме не было отмечено вакуолей.

Таблица 35 – Сравнительная гистоморфометрическая характеристика изменений ткани печени, сердца и селезенки

| Наименование показателя | Контроль (M±SD) | | 500 мг/кг (M±SD) | | 1000 мг/кг (M±SD) | | 2000 мг/кг (M±SD) | | p-value |
|---|-----------------|---------|------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|---------|
| | ♂ (n=5) | ♀ (n=5) | ♂ (n=5) | ♀ (n=5) | ♂ (n=5) | ♀ (n=5) | ♂ (n=5) | ♀ (n=5) | |
| Изменения печени | | | | | | | | | |
| - сосудистые | 0 | 0 | 0.38±
0.74 | 0.25±
0.46 | 0.25±
0.46 | 0.38±
0.74 | 0.63±
1.19 | 0.38±
0.74 | p=0.711 |
| - воспалит.-некрот. | 0 | 0 | 0.25±
0.46 | 0.38±
0.52 | 0.25±
0.46 | 0.38±
0.74 | 0.63±
0.74 | 0.88±
1.25 | p=0.402 |
| Изменения селезенки | | | | | | | | | |
| - сосудистые | 0 | 0 | 0 | 0.38±
0.74 | 0.25±
0.46 | 0.13±
0.35 | 0.25±
0.71 | 0 | p=0.411 |
| - воспалит.-некрот. | 0 | 0 | 0 | 0.25±
0.46 | 0.13±
0.35 | 0.25±
0.71 | 0.13±
0.35 | 0 | p=0.462 |
| Примечание: * – p<0,05 по сравнению со значениями у животных контрольной группы | | | | | | | | | |

Гистопатология печени у животных, получавших МВШС-40 в дозе 500 мг/кг, гистологические исследования срезов печени в 4 (80%) случаях у самцов мышей и 3 (60%) случаях у самок продемонстрировала сохраненную гистоархитектонику печени с нормальным внешним видом центральной вены и печеночных синусоидов. У 1 (20%) самца и 2 (40%) самок наблюдались легкие застойные явления (средний балл сосудистых изменений у самцов и самок составил 0.13±0.35 и 0.25±0.46 соответственно). Гистопатологических признаков некроза, фиброза, гидропической дегенерации, изменений ядер и воспалительного инфильтрата во всех случаях в группе самцов выявлено не было. В группе самок у 1 (20%) животного были выявлены минимальные изменения (очаговая микровезикулярная вакуолизация цитоплазмы) средний балл воспалительно-некротических изменений в группе самок 0.13±0.35.

Гистопатология печени у животных, получавших МВШС-40 в дозе 500 мг/кг, гистологические исследования срезов печени в 4 (80%) случаях у самцов мышей и 3(60%) случаях у самок продемонстрировала сохраненную гистоархитектонику печени с нормальным внешним видом центральной вены и печеночных синусоидов. У 1 (20%) самца и 2 (40%) самок наблюдались легкие застойные явления (средний балл сосудистых изменений у самцов и самок составил 0.13±0.35 и 0.25±0.46 соответственно). Гистопатологических признаков некроза, фиброза, гидропической дегенерации, изменений ядер и воспалительного инфильтрата во всех случаях в группе самцов выявлено не было. В группе самок у 1 (20%) животного были выявлены минимальные изменения (очаговая микровезикулярная вакуолизация цитоплазмы) средний балл воспалительно-некротических изменений в группе самок 0.13±0.35.

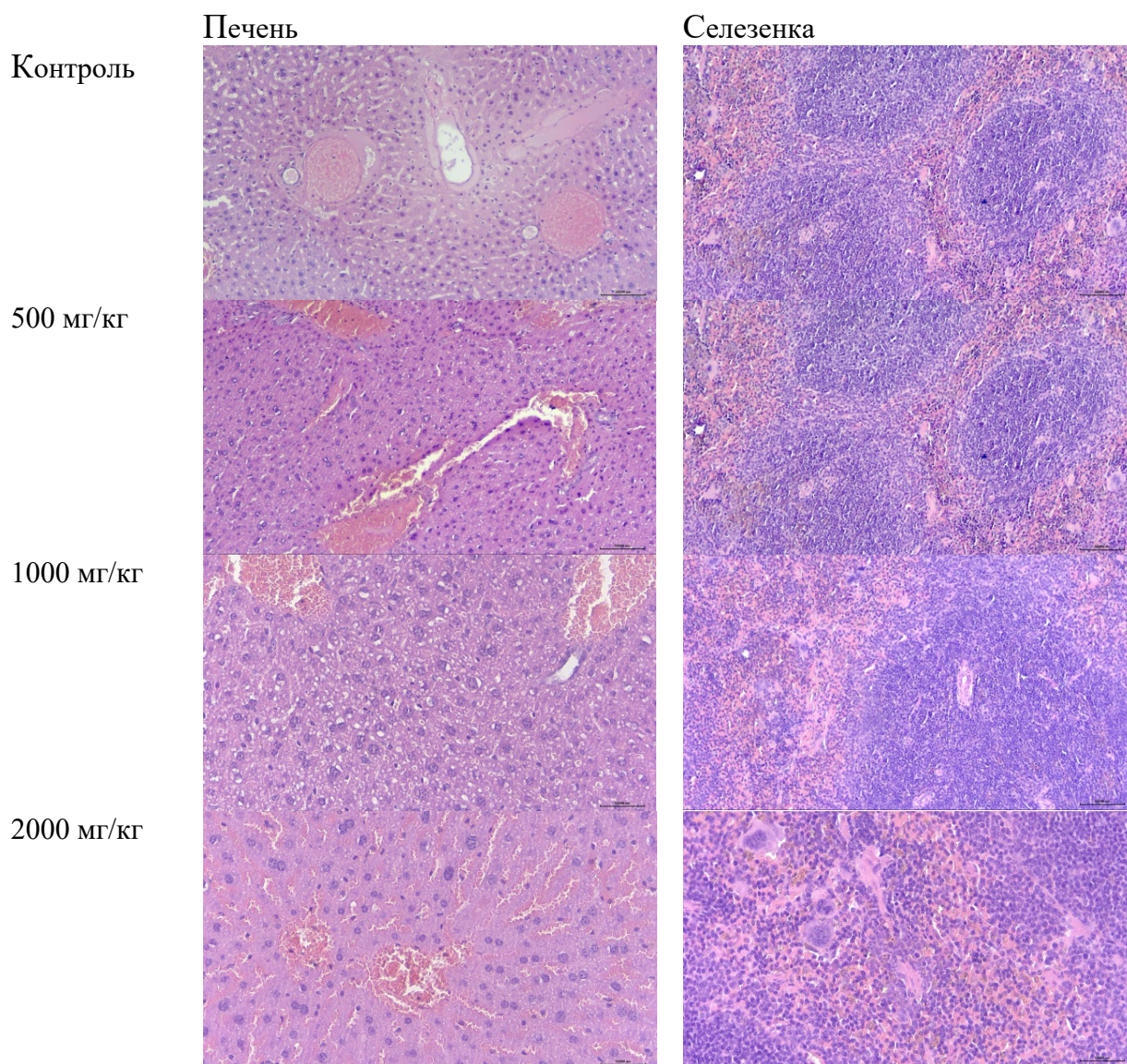


Рисунок 41 – Гистология печени и селезенки мышей, получавших МВШС-40 в дозе 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2000 мг/кг. Окрашивание гематоксилином и эозином показало, что МВШС-40 в исследуемых дозировках не вызывает значительных структурных изменений в печени и селезенке по сравнению с контрольной группой.

В группе мышей, получавших МВШС-40 в дозе 1000 мг/кг, у 3 (60%) самцов и 4 (80%) самок мышей наблюдались нормальные, четко очерченные гистологические структуры без признаков сосудистых изменений. У 2 (40%) самцов и 1 (20%) самок наблюдались очаговые застойные явления (средний балл в группе самцов и самок 0.38 ± 0.52 и 0.25 ± 0.46 соответственно). Изменений в гистоархитектонике, портальных триад, гепатоцитов, синусоидов, воспаления и наличия дистрофии, некроза и жировых изменений у 4 (80%) животных в группе самцов и 3 (60%) самок в исследуемых гистологических срезах не выявлено. У 1 (20%) самцов и 2 (40%) самок наблюдались легкие воспалительно-некротические изменения (очаговая

гидропическая дистрофия, центрлобулярная гепатоцеллюлярная гипертрофия, кариопикноз и микровезикулярная вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов). Средний балл воспалительно-некротических изменений в группе самцов и самок составил 0.38 ± 0.74 и 0.50 ± 0.76 баллов соответственно.

У мышей в группе, получавшей МВШС-40 в дозе 2000 мг/кг, гистопатологический анализ печени у 1 (20%) самцов и 2 (40%) самок выявил очаговый застой сосудов и легкие воспалительные изменения с застойными синусоидами, очаговая гиперемия центральных вен (средний балл сосудистых изменений у самцов 0.50 ± 1.07 и самок 0.50 ± 0.76). У 3 (60%) самцов и 2 (40%) самок нормальная дольковая архитектура печени не была нарушена, гепатоциты и клетки Купфера также оказались нормальными минимальные изменения ядер (средний балл воспалительно-некротических изменений у самцов 0.75 ± 1.16 и самок 0.63 ± 0.74). Кроме того, ни в одном случае не было отмечено изменения диаметра и внешнего вида центральных вен, печеночных синусоидов и портальных вен.

Сравнительная гистоморфометрическая характеристика изменений ткани селезенки. Во всех группах животных белая пульпа состояла из нерегулярной массы лимфоидной ткани вблизи артериол в виде фолликулов селезенки. Фолликулы имели зародышевые центры и узкую мантийную зону на периферии, за которой находилась более широкая маргинальная зона. Кроме пула эритроцитов и лимфоцитов, красная пульпа содержала ряд гемосидеринсодержащих макрофагов и мегакариоцитов, которые являются постоянными нормальными составляющими селезенки нормальных мышей. Во всех группах у животных обоего пола, получавших МВШС-40 во всех исследуемых дозировках, не было выявлено тяжелых и умеренных гистопатологических признаков сосудистых и воспалительно-некротических изменений.

Целью данного исследования было изучение влияния МВШС-40 в дозе 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 2000 мг/кг на гистологическую структуру печени и селезенки у мышей. Окрашивание гематоксилином и эозином показало, что МВШС-40 в исследуемых дозировках не вызывает значительных структурных изменений в печени и селезенке мышей обоего пола по сравнению с мышами контрольной группы.

Для исследования токсичности были исследованы гистопатологические признаки изменений ткани печени и селезенки. Печень является основным органом-мишенью токсичности, поэтому повреждение печени может нарушить целостность гепатоцитов, что приведет повреждению гепатобилиарной системы, нарушит биосинтетическую и метаболическую способность печени и может показать гистопатологические аномалии, такие как микро- и микровезикулярная вакуолизация цитоплазмы, гидропическая дистрофия, некрозы гепатоцитов, фиброз и сосудистые аномалии, такие как гиперемия центральных вен и синусоидов печени, обычно наблюдаемые при гепатотоксичности.

В исследовании токсичности гистологическими изменениями печени были легкая цитоплазматическая вакуолизация в части образцов и сосудистые

изменения, включая застойные и расширенные кровеносные сосуды. Цитоплазматической вакуолизация по сообщениям ряда авторов, бывает обратимой, преходящей или необратимой. Образование вакуолей может быть просто адаптацией к различным изменениям окружающей среды [116]. Его транзиторная форма в большинстве случаев обусловлена слабоосновными аминокислотными липофильными соединениями, способными проходить через клеточные мембраны, повышая осмотическое давление с диффузией воды и развитием вакуолизации. Необратимая вакуолизация возникает вследствие цитотоксического стимула с цитопатологическим повреждением, завершающимся гибелью клеток [117]. Этот паттерн вакуолизации может быть вызван независимыми от каспазы механизмами гибели клеток. В нашем исследовании вакуолизация в гепатоцитах наблюдалась в небольшом количестве срезов ($p > 0.05$). Было ли это просто адаптивной реакцией или инициацией гибели клеток, необходимо выяснить с помощью дополнительных исследований. Наблюдаемые изменения, однако, кажутся адаптивными и обратимыми, поскольку в гепатоцитах не было выявлено признаков некроза даже при высоких дозах препарата.

Выявленный в отдельных случаях легкий уровень гистопатологических изменений необходимо оценить клинически для оценки степени потенциальной печеночной недостаточности; однако при отсутствии других гистопатологических признаков поражения печени, таких как некроз, тяжелая дистрофия и др. данные легкие изменения, по-видимому, имеют относительно меньшее значение.

Проявлений иммунотоксичности МВШС-40, приводящих к изменению гистопатологии лимфоидных органов, таких как селезенка, в исследовании не выявлено. Внутрибрюшное применение МВШС-40 в дозе 500 мг/кг, 1000 мг/кг и 2000 мг/кг не сопровождалось какими-либо гистопатологическими изменениями в селезенке, поскольку микроскопическая оценка срезов селезенки мышей, получавших препарат в различной концентрации, оказалась нормальной по сравнению с таковой у мышей контрольной группы.

Степень гистологических изменений, наблюдаемая при введении различных дозировок МВШС-40, была преимущественно легкой и очаговой в части образцов (менее 25%) ($p > 0.05$).

В части исследования токсичности МВШС-40 при дозах 500 мг/кг, 1000 мг/кг и 2000 мг/кг гепатоциты во всех группах в большинстве случаев оставались неповрежденными, без признаков тяжелых или умеренных гистопатологических повреждений. Волокна ткани селезенки также оставались без тяжелых повреждений во всех случаях. Единственными сопутствующими изменениями были легкие очаговые сосудистые и дистрофические изменения в печени в части случаев ($p > 0.05$). Такие минимальные гистологические изменения свидетельствуют о безопасности в исследованиях на животных и убедительно свидетельствуют о том, что образец МВШС-40 при однократном внутрибрюшном введении *in vivo* относится к малотоксичным веществам (IV класс токсичности).

5.7 Изучение цитотоксичности МВШС-40

Определение цитотоксичности проводилось в 3 этапа на разных тест-объектах (Приложение И).

Определение цитотоксичности на Saccharomyces cerevisiae. Для определения цитотоксичности использовался тест – объект *Saccharomyces cerevisiae* по методу [118] в качестве тест-отклика была использована скорость подъема пены в суспензии дрожжей.

Согласно диаграмме, в сравнении с контролем и антибиотиком МВШС-40 оказывает ингибирующий эффект (рисунок 42).

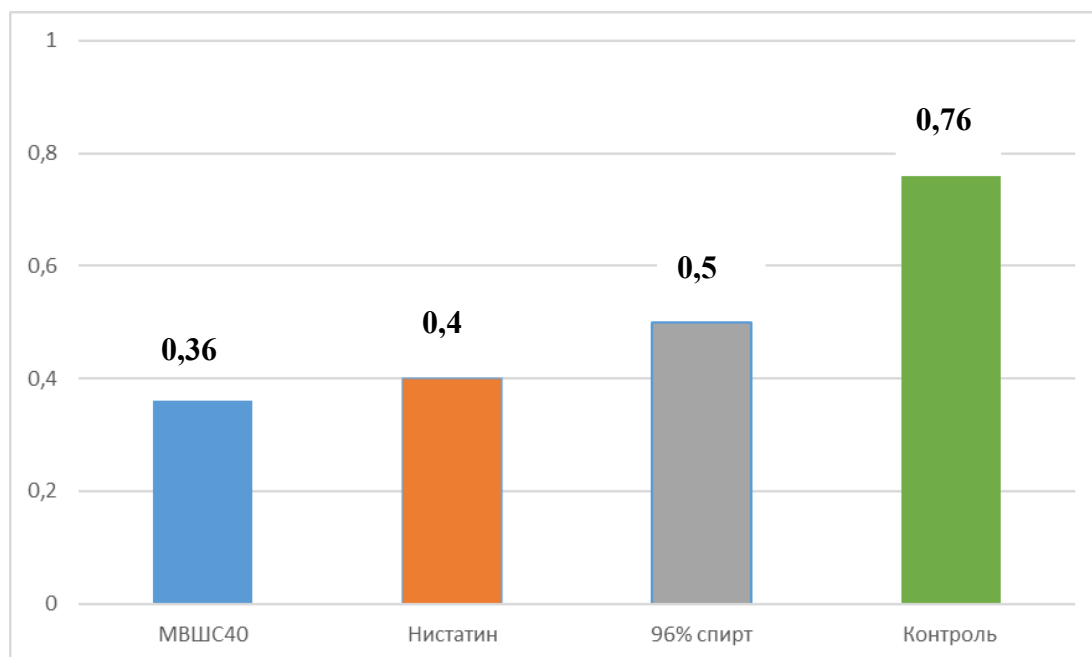


Рисунок 42 – Скорость подъема пены в суспензии дрожжей

При проведении теста на экспресс-исследование по изучению токсичности микроволнового экстракта листьев шалфея степного 40%, выявилось, что экстракт подавляет интенсивность пенообразования по сравнению с контролем. Данное исследование подтверждает присутствие ингибирующего эффекта *Saccharomyces cerevisiae* в отношении скорости подъема пены, что свидетельствует о цитотоксическом воздействии МВШС-40.

Определение цитотоксичности на простейших класса Protozoa вида Ciliphora и Amoebina. В ходе исследования были получены следующие данные:

При добавлении в пробирку раствора МВШС-40 в дозировке 1 мг/мл, тест объекты в виде одноклеточных *Protozoa* погибали в течении 30 минут. Такие данные могут свидетельствовать о токсической дозировке препарата.

При добавлении экстракта в дозировке 0,5 мг/мл в пробирку с заранее содержащимися тест-объектами, были получены следующие данные: Погибших особей в мазках замечено не было, однако отмечалась низкая активность особей. Инфузории в мазке двигались значительно медленнее чем

инфузории в контрольной пробирке, однако нарушения целостности мембран или гибели замечено не было.

На рисунке 43 можно увидеть инфузорий, собравшихся в кучу и можно отметить, что их двигательная активность была незначительной за весь период наблюдения, однако мертвых особей замечено не было. Для того чтобы удостовериться в правильности результата, эксперимент с инфузориями был воспроизведен повторно, в ходе чего были получены аналогичные данные.



Рисунок 43 – Инфузории в мазке, собранные в кучу

В третью пробирку добавляли 0,25 мг/мл раствора МВШС-40. В ходе проведения эксперимента было замечено, что двигательная активность сохраняется на уровне контрольной группы, в которую не была добавлена исследуемая субстанция. Так же, для подтверждения результата эксперимент был повторен несколько раз. Во всех экспериментах были получены аналогичные данные. Смертей среди тест-объектов обнаружено не было, все тест-объекты двигались с такой же интенсивностью, как и контрольные образцы. Нарушения клеточной стенки замечено не было. Живые и подвижные инфузории можно увидеть на рисунках 44 и 45.

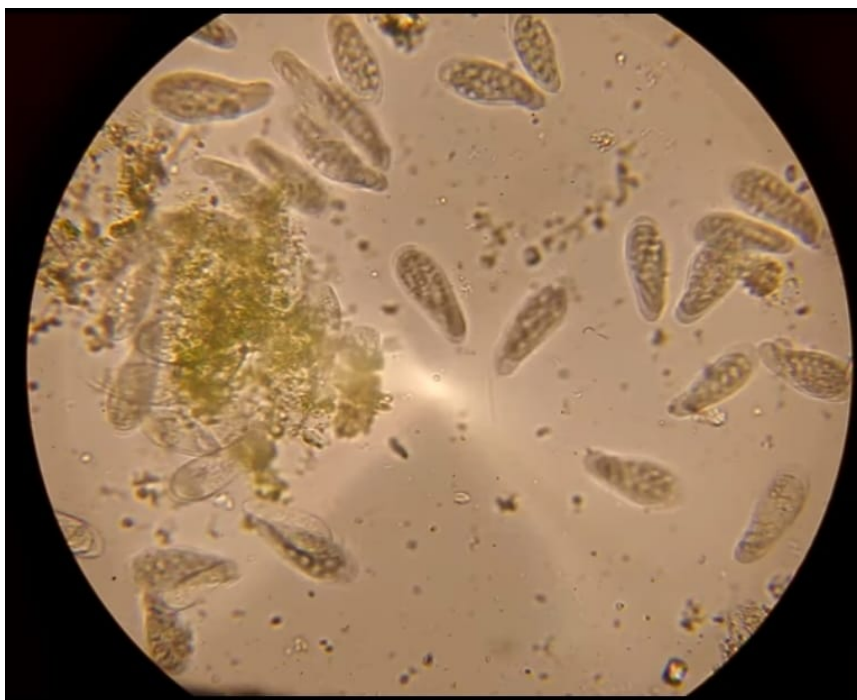


Рисунок 44 – Живые и подвижные инфузории в первом снимке

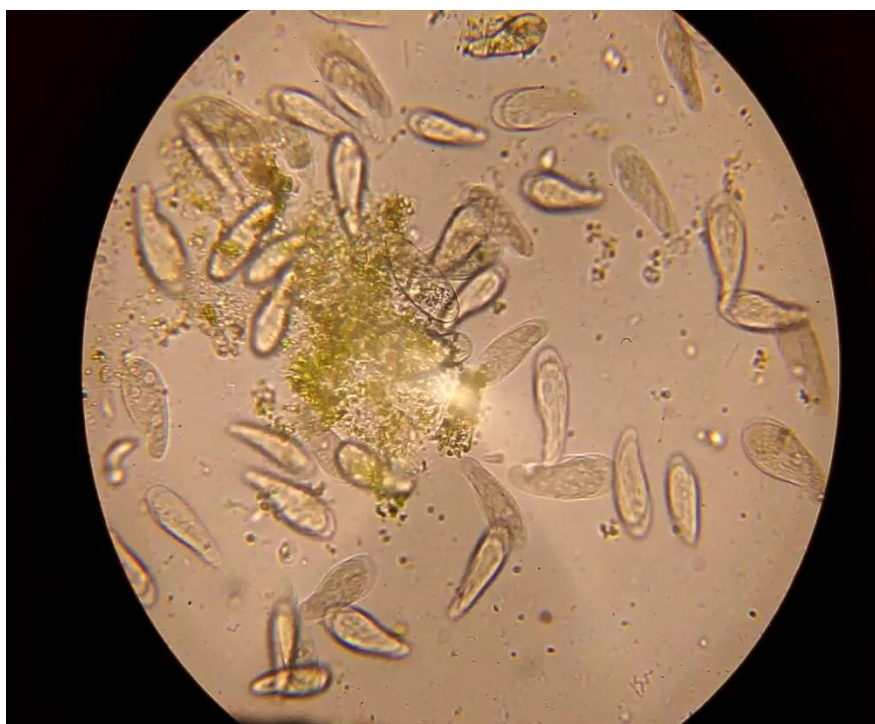


Рисунок 45 – Живые и подвижные инфузории во втором снимке, с разницей в 10 секунд

Определение цитотоксичности на тест объектах Artemia salina. При проведении эксперимента в дозировке 1мг/мл были пучены данные, иллюстрированные в таблице 36.

Таблица 36 – Данные получены в ходе проведения эксперимента с дозировкой МВШС-40 1 мг/мл

| Экспозиция | 10 мин | 20 мин | 30 мин | Контроль |
|-----------------|-----------|------------|-----------|----------|
| Кол-во выживших | 26,0 ±1,0 | 19,0 ±1,0 | 11,0± 1,0 | 30 |
| Кол-во погибших | 4,0 ±1,0 | 11,0 ± 1,0 | 19,0 ±1,0 | 0 |
| Соотношение | 86,7% | 63,3% | 36,7% | 100% |

Как видно из полученных данных, МВШС-40 в дозировке 1 мг/мл оказывает значительное влияние на тест систему в виде рачков артемий. В течении 30 минут, постепенно погибает значительная часть особей, либо по сравнению с контролем, их двигательная активность значительно снижена. Подробная иллюстрация представлена на рисунке 46.



Рисунок 46 – Тест-системы, подвергшиеся воздействию МВШС-40 в дозировке 1 мг/мл, экспозиция -30 минут

Как видно на иллюстрации, погибшие особи оседают на дно пробирки, и перестают двигаться. Это свидетельствует об угнетении препаратом активности животных, что может быть свидетельством токсического действия на клетки.

Проведение тестирования субстанции в дозировке 0,5 мг/мл проводилось параллельно с тестированием субстанции в дозировке 1 мг/мл. Результаты, полученные при проведении эксперимента на цитотоксичность субстанции в дозировке 0,5 мг/мл представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Данные получены в ходе проведения эксперимента с дозировкой МВШС-40 0,5 мг/мл

| Экспозиция | 10 мин | 20 мин | 30 мин | Контроль |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Кол-во выживших | 30,0 ±1,0 | 25,0 ±1,0 | 19,0± 1,0 | 30,0 |
| Кол-во погибших | 0,0 ±1,0 | 5,0 ± 1,0 | 11,0 ±1,0 | 0,0 |
| Соотношение | 99,9% | 83,3% | 63,3% | 100% |

Как видно из результатов проведенных исследований МВШС-40% в дозировке 0,5 мг/мл менее токсичен. При 10-ти минутной экспозиции погибших особей обнаружено не было. Подвижность особей сохранялась на протяжении 10 минут, однако уже через 20, количество погибших особей достигло 16,7% процентов, двигательная активность сохранялась частично, примерно 50% особей сохраняли двигательную активность, такую же, как и в контроле. Через 30 минут количество погибших особей достигло 36,7%, двигательная активность снизилась у всех живых особей. Количество погибших особей иллюстрируется на рисунке 47.



Рисунок 47 – Тест-системы, подвергшиеся воздействию МВШС-40 в дозировке 0,5 мг/мл, экспозиция -30 минут

Данные полученные в ходе проведения 3 эксперимента представлены в таблице 38.

Таблица 38 – Данные получены в ходе проведения эксперимента с дозировкой 0,25 мг/мл

| Экспозиция | 10 мин | 20 мин | 30 мин | Контроль |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Кол-во выживших | 30,0 ±1,0 | 30,0 ±1,0 | 27,0± 1,0 | 30,0 |
| Кол-во погибших | 0,0 ±1,0 | 0,0 ± 1,0 | 3,0 ±1,0 | 0,0 |
| Соотношение | 99,9% | 99,9% | 90,0% | 100% |

Как видно из результатов исследования, дозировка 0,25 мг/мл является не токсичной в отношении *Artemia salina*. Двигательная активность, относительно контроля не изменялась на протяжении всего эксперимента. Количество погибших особей не регистрировалось в течении 20 минутной экспозиции. Через 30 минут после начала эксперимента количество выживших особей составляло 90% от всей исследуемой массы.

Таким образом, была определена не токсичная дозировка 0,25 мг/мл и токсичная – 1 мг/мл МВШС-40 в отношении *Artemia salina*. Данные этого эксперимента позволяют рассматривать МВШС-40 в качестве потенциального противоопухолевого средства.

На основании проведенных экспериментов сухой экстракт листьев шалфея степного в концентрациях 1 мг/мл и 0,5 мг/мл проявляет цитотоксичность, а в концентрации 0,25 мг/мл не токсичен в отношении *Artemia salina*. Сухой экстракт листьев *Salvia stepposa* имеет высокую антимикробную активность по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538) и умеренную антимикробную активность по отношению к штаммам *Bacillus subtilis* (АТСС 6633), *Escherichia coli* (АТСС 25922), *Candida albicans* (АТСС 10231). МВШС-40 обладает наибольшей антиоксидантной активностью в концентрации 0,75 мг/мл, в концентрации 12,5 мг/мл обладает антирадикальной активностью и в дозе 25 мг/кг обладает противовоспалительной активностью.

Все результаты по исследованию биологической активности субстанции МВШС-40 дают основания для дальнейшей разработки лекарственной формы на ее основе.

6 РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ШАЛФЕЯ СТЕПНОГО *SALVIA STEPPOSA* (МВШС-40)

ТЛФ выпускаемые фармацевтической промышленностью имеют множество преимуществ перед другими лекарственными формами и составляют большую часть производства готовых лекарственных средств. Важную роль в производстве ТФЛ играют физико-химические свойства исходных субстанций и вспомогательных веществ. Среди разнообразия ТЛФ наиболее распространенными и удобными в применении, транспортировке и хранении считаются таблетки.

6.1 Обоснование выбора состава и вспомогательных веществ

Вспомогательные вещества являются одним из главных компонентов таблеточной массы, т.к. предназначены для формообразования таблеток, однородности распределения действующих веществ, прочности таблетки, сохранности при хранении и высвобождения веществ из ЛФ.

Важно контролировать содержание влаги в материале в связи с тем, что она оказывает большое влияние на текучесть и прессуемость порошков, а также резко снижает сыпучесть таблеточной массы.

В связи с этим при выборе вспомогательных веществ наши исследования были направлены на использование наполнителей, улучшающих сыпучесть и способных гидратировать воду. В модельном ряду опытных составов было свыше 30, самые оптимальные 5 составов представлены в таблице 39.

Таблица 39 – Оптимальный состав таблеток на основе сухого экстракта МВШС-40 (в расчете на одну таблетку)

| Наименование компонентов | Количество, мг | | | | |
|---|----------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Шалфея степного экстракт сухой (к.о. – 40,0%) | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| МКЦ 105 | 75,0 | 75,0 | 75,0 | 75,0 | 75,0 |
| EMDEX | - | 593 | 589,5 | 589 | 587,5 |
| Лимонная кислота | 28,0 | 28,0 | 28,0 | 28,0 | 28,0 |
| Кальция стеарат | - | 4 | 7,5 | 7,5 | 7,5 |
| Лактозы моногидрат | 589,5 | - | - | - | - |
| Масло мяты перечной | - | - | - | - | 1,5 |
| Масло эвкалиптовое | - | - | - | 0,5 | 0,5 |
| Масса одной таблетки | 750,0 | 750,0 | 750,0 | 750,0 | 750,0 |

В данных составах МВШС-40 используется в качестве основного противовоспалительного, антибактериального вещества, МКЦ 105 в качестве стабилизатора и пролонгатора, кальция стеарат в качестве смазывающего компонента, лимонная кислота в качестве стабилизатора pH, EMDEX и лактозы моногидрат в качестве наполнителя и связующего компонента, в качестве корригирующих веществ масла эвкалипта и мяты перечной.

Использование моногидрата лактозы привело к уменьшению силы сцепления при прессовании в связи с чем был использован EMDEX. Использование в составе №3 стеарата кальция в количестве 4 мг в качестве смазывающего компонента привело к прилипанию таблеточной смеси к оборудованию, в связи с этим концентрация его была увеличена до 7,5 мг. В составы 4 и 5 добавлены коррегирующие вещества для улучшения органолептических характеристик.

Для повышения прессуемости в состав порошковой смеси была введена микрокристаллическая целлюлоза. МКЦ оказывает положительное воздействие на процесс высвобождения благодаря способности поглощать воду. Для улучшения текучести в качестве скользящего компонента был добавлен кальция стеарат, в связи с тем, что большинство лекарственных веществ не способно к самопроизвольному дозированию. EMDEX – безлактозное связующее (микронизированная форма декстрана) для таблеток для прямого прессования, соответствует требованиям монографии USP «Dextrates». Благодаря введению EMDEX в состав таблеток были достигнуты отличная сыпучесть и низкая сила выталкивания во время процесса таблетирования. Эфирные масла были введены в состав таблеток перед стадией опудривания. Таблетки были получены на фармацевтической производственной компании ЗАО «ВИФИТЕХ» (Московская область).

Таблетки были изготовлены методом прямого прессования. МВШС-40 и все вспомогательные вещества, входящие в состав таблеток, перед началом технологического процесса взвешивали на весах МК-32.2 и ЕТ-600П-Е и помещали в промежуточные емкости. После чего все компоненты просеивали на вибросите-30” PVS30. Для смешивания компонентов использовали лабораторный смеситель «Airpac». Опудривание таблеточной смеси проводили в смесителе, куда добавляли кальция стеарат и перемешивали в течение 5 мин. Измеряли таблеточную смесь на остаточную влажность при помощи анализатора влажности ЭВЛАС-2М (влажность 5-6%). Таблетирование осуществляли на роторной таблеточной машине РТМ-10 с давлением, достаточным для получения таблетки отвечающей требованию НД. В процессе таблетирования производили контроль геометрических размеров (штангенциркуль), средней массы (весы ЕТ-600П-Е), прочностных показателей таблетки (фриабиллятор для определения истираемости таблеток и тестер для определения прочности таблеток на разлом), описания и внешнего вида. Обеспыливание таблеток проводили на обеспыливателе для таблеток ELEVATING DE DUSTER.

Метод прямого прессования в сравнении с другими методами обладает рядом достоинств: позволяет достичь высокой производительности труда,

сократить время технологического цикла, исключить использование нескольких позиций оборудования, уменьшить производственные площади, снизить энерго- и трудозатраты.

Определение объемно-технологических свойств таблетлируемой массы содержащей сухой экстракт шалфея степного (МВШС-40)

В производстве ТЛФ важно учитывать объемно-технологические свойства таблетлируемой массы: размер частиц, насыпная плотность, прессуемость, сыпучесть и другие, так как они напрямую оказывают влияние на качество будущих таблеток. Вышеуказанные свойства были определены в соответствии с методиками, представленными в трудах Белоусова и Вальтера [119]. В таблице 40 приведены объемно-технологические свойства таблетлируемой массы содержащей сухой экстракт шалфея степного (МВШС-40).

Таблица 40 – Объемно-технологические свойства таблетлируемой массы содержащей сухой экстракт шалфея степного (МВШС-40)

| Характеристики | Таблетлируемая масса |
|---|----------------------|
| Насыпная плотность, г/см ³ | 0,53±0,01 |
| Объемная плотность, г/см ³ | 0,75±0,02 |
| Сыпучесть, г/с | 3,1±0,1 |
| Прессуемость, кг | 8,5±0,21 |
| Степень сжатия | 3,97 |
| Выталкивающее усилие, кг/ см ³ | 270,0±8,0 |

Таблетлируемая масса, состоящая из сухого экстракта шалфея степного и вспомогательных веществ, представляет собой мелкодисперсный порошок, поверхность частиц гладкая, плотная. Порошок имеет удовлетворительные объемно-технологические показатели, которые были учтены при разработке лекарственной формы и технологической схемы производства.

6.2 Исследование критериев качества разработанных таблеток

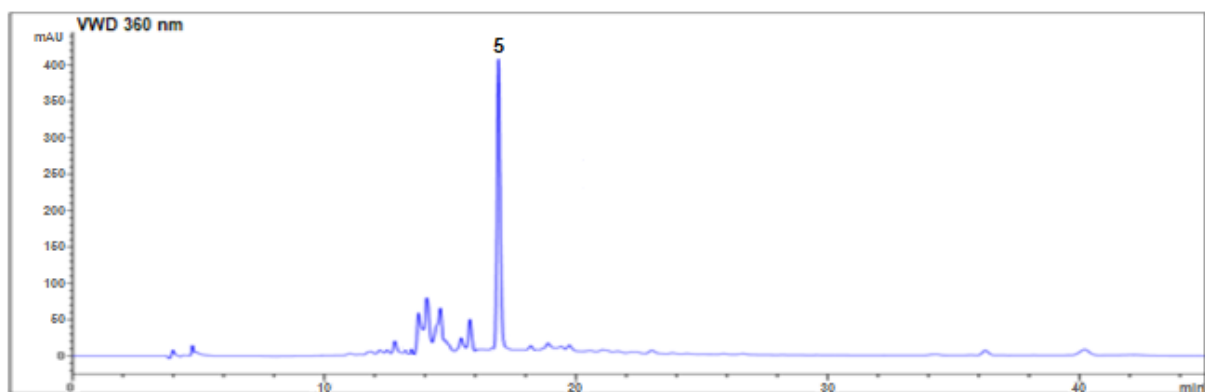
Были проведены исследования с целью определения показателей качества таблеток МВШС-40 и установлены стандартные характеристики: средняя масса таблеток, однородность массы, внешний вид, распадаемость, устойчивость к раздавливанию, истираемость. Анализ полученных данных показал, что качество таблеток соответствует требованиям ГФ РК. Исходя из результатов оценки качества таблеток наиболее оптимальными по органолептическим показателям и другим испытаниям являются таблетки с модельным составом № 5.

Результаты оценки качества разработанных таблеток с МВШС-40 приведены в таблице 41.

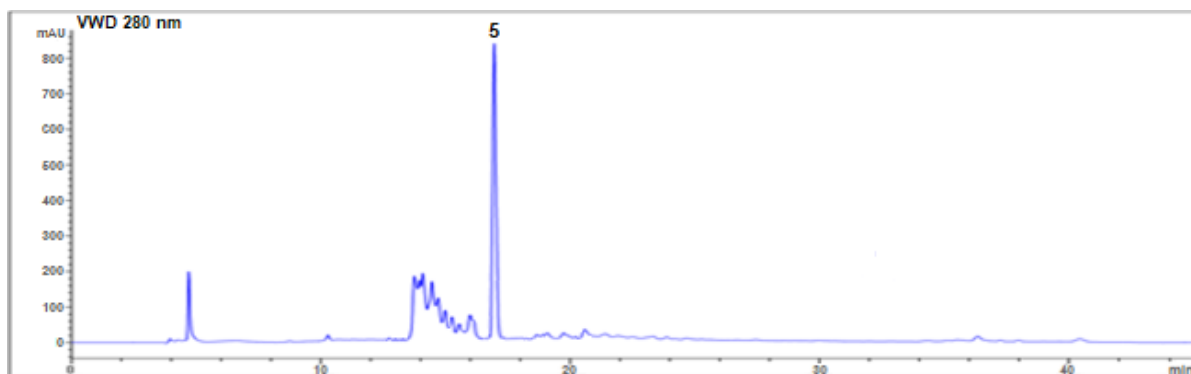
Таблица 41 – Результаты оценки качества таблеток с МВШС-40

| Свойства | Норма | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Описание | Таблетки светло серого цвета, поверхность однородная | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. |
| Средняя масса таблеток | $\pm 5\%$ | 0,002 | 0,004 | 0,002 | 0,003 | 0,003 |
| Однородность массы | $\pm 10\%$ | 3 | 4 | 4 | 2 | 5 |
| Распадаемость | Не больше 15 мин. | 13 мин
00 сек | 12 мин
35 сек | 12 мин
55 сек | 12 мин
45 сек | 11 мин
47 сек |
| Растворение | Не меньше 75% за 45 мин. | 72 | 81 | 80 | 79 | 79 |
| Прочность на разрушение | Не менее 50 Н | 151,8 | 139,5 | 142,1 | 135,4 | 107,2 |
| Прочность на истирание | Не менее 97% | 99,994 | 99,995 | 99,993 | 99,994 | 99,991 |

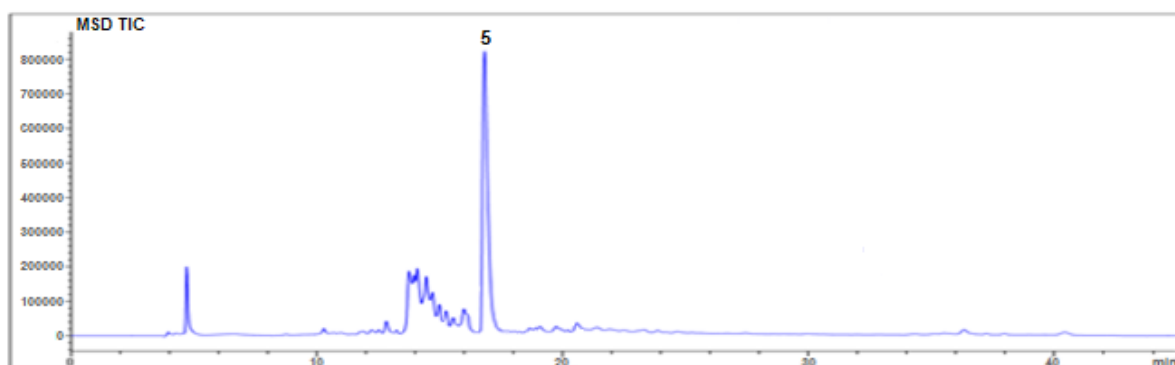
ВЭЖХ-УФ анализ таблеток, содержащих сухой экстракт МВШС-40 показал наличие розмариновой кислоты. Методом внешнего стандарта проведено количественное содержания розмариновой кислоты в таблетке с МВШС-40 – 0,41% в пересчете на массу таблетки. Хроматограммы представлены на рисунке 48.



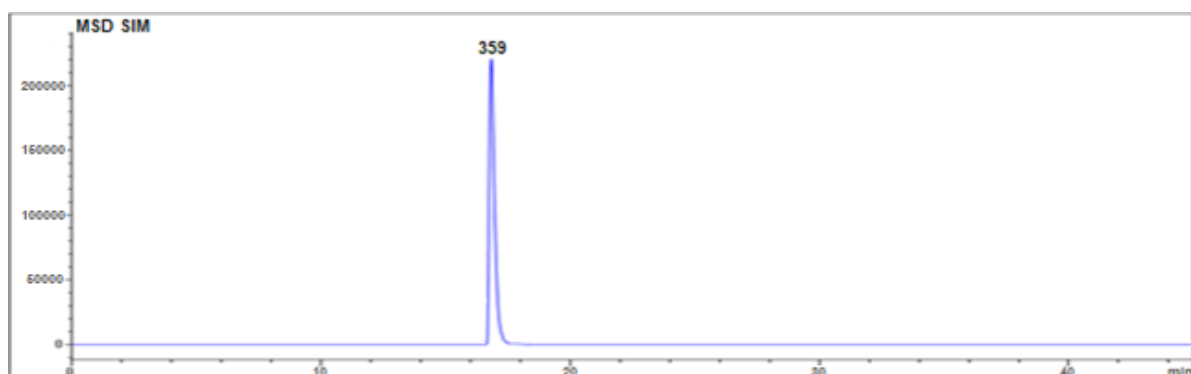
1



2



3



4

Рисунок 48 - Хроматограммы ВЭЖХ-УФ: 1-360 нм., 2-280 нм., ВЭЖХ-МС/МС: 3 -общая ионная (TIC) и 4 -идентификация розмариновой кислоты в таблетке с экстрактом шалфея степного (SIM)

В качестве объекта сравнения нами были выбраны таблетки для рассасывания на основе шалфея лекарственного (*Salvia officinalis*).

Таблица 42 – Сравнительная характеристика таблеток на основе сухого экстракта шалфея степного и шалфея лекарственного

| Наименование компонентов | Шалфей, таблетки для рассасывания. Натур Продукт Европа Б.В., Нидерланды | Шалфей степной таблетки для рассасывания |
|------------------------------------|--|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Активные вещества | Шалфей лекарственный
Масло шалфея эссенциальное | Шалфей степной. Масло эвкалиптовое и мяты перечной |
| Вид экстракта | Сухой | Сухой |
| Масса сухого экстракта | 12,5 мг | 50 мг |
| Лекарственная форма | Таблетки для рассасывания | Таблетки для рассасывания |
| Область применения | При воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей | При воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей |
| Фармакологическое действие | Противовоспалительное, противомикробное и отхаркивающее действие за счет комплексного состава | Противовоспалительное, противомикробное действие |
| Описание | Таблетки плоские круглые со скошенным краем, голубовато-зеленого цвета с более светлыми и более темными вкраплениями | Таблетки цельные правильные, светло серого цвета с более светлыми вкраплениями, поверхность однородная, горького привкуса, со своеобразным ароматным запахом. |
| Идентификация | Туйон
1,8-цинеол
Розмариновая кислота | Розмариновая кислота |
| Средняя масса, мг | 1144,0 | 750,0 |
| Количественное определение, мг/таб | Розмариновая кислота 0,55 | Розмариновая кислота 3,046 |

Исходя из таблицы 42 видно, что таблетки шалфея лекарственного могут иметь ограниченное применение внутрь в связи с высоким содержанием туйона, что также может сказаться на относительно не высокой концентрации экстракта в таблетке. Кроме того, содержание розмариновой кислоты в таблетках шалфея степного в 5,5 раз больше, чем в таблетках шалфея

лекарственного, что вероятно обуславливает их высокую биологическую активность.

6.3 Разработка технологической схемы, спецификации качества и установление сроков хранения таблеток для рассасывания на основе МВШС-40

На основе вышеизложенных результатов исследования нами разработана оптимальная технология получения таблеток для рассасывания на основе сухого экстракта МВШС-40 методом прямого прессования (Приложение К). Нами была составлена технологическая блок-схема получения таблеток, которая представлена на рисунке 49.

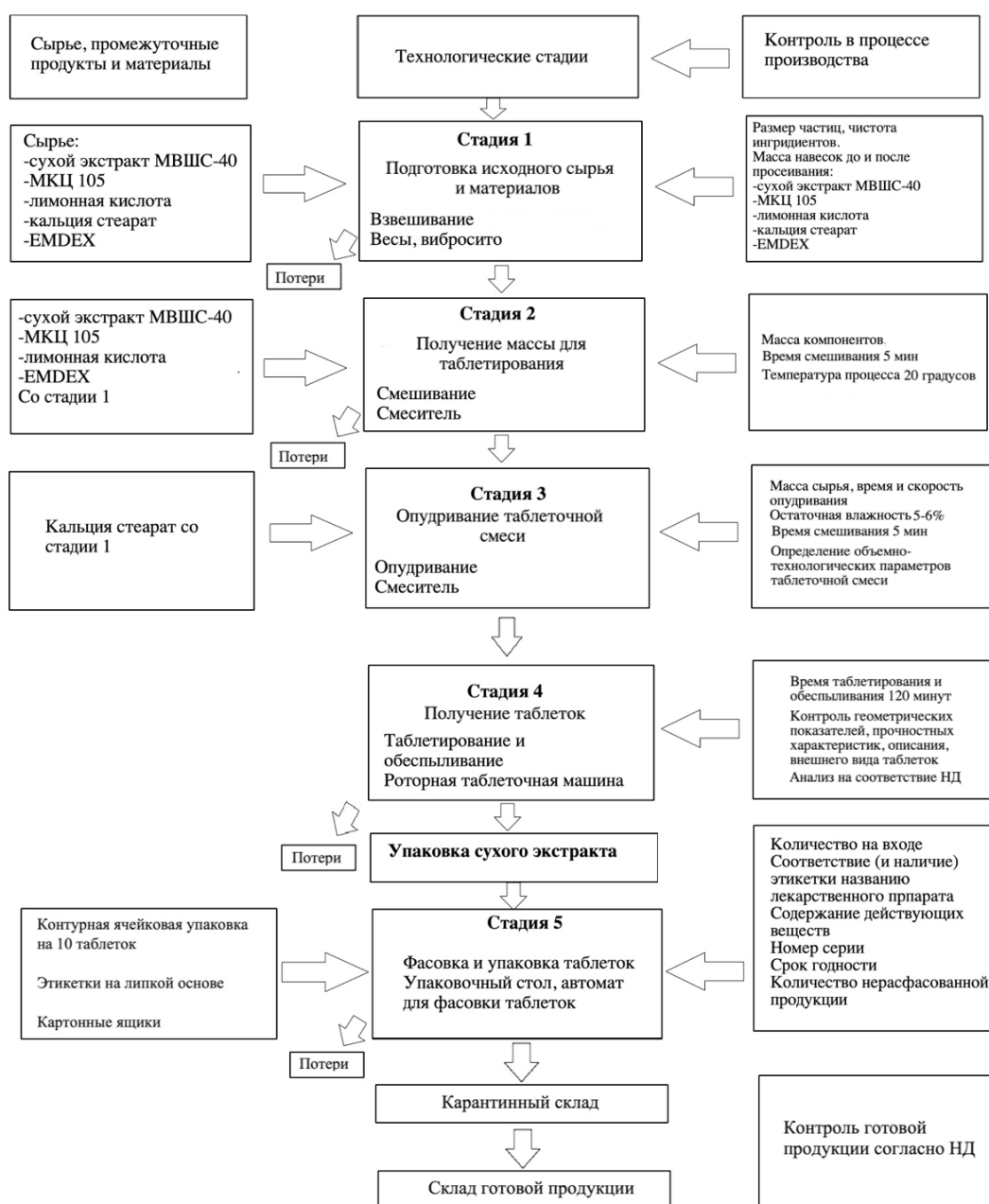


Рисунок 49 – Технологическая схема получения таблеток для рассасывания с МВШС-40 методом прямого прессования

Согласно требованиям надлежащей производственной практики (GMP) производственный процесс начинается с санитарной обработки помещения, оборудования и технологической одежды в целях предупреждения микробной контаминации производства. Технологический процесс производства таблеток для рассасывания включает в себя следующие стадии:

Стадия 1. Подготовка исходного сырья и реактивов. Подготовка исходных материалов к таблетированию сводится к их взвешиванию. Взвешивание сухого экстракта МВШС-40 и вспомогательных веществ осуществляется в вытяжных шкафах с аспирацией на весах МК-32.2 и ЕТ-600-П-Е. После взвешивания сырье поступает на просеивание с помощью просеивателей вибрационного типа действия на лабораторном сите с диаметром ячейки 0,5 мм (или вибросите PVS30). Просеянные компоненты в количестве, необходимом для получения массы для таблетирования, взвешивают на весах и передают на стадию 2.

Стадия 2. Получение массы для таблетирования. Для смешивания компонентов используют промежуточную ёмкость (или лабораторный смеситель Airpac). Загружают МВШС-40, МКЦ, лимонную кислоту и ЕМДЕХ, контролируя по часам время смешивания (около 5 мин) и по весам электронным массу для таблетирования (кг), при комнатной температуре (20 ± 2) °С. Определяют объемно-технологические параметры (насыпная плотность, объемная плотность, сыпучесть, прессуемость, степень сжатия, выталкивающее усилие) таблеточной смеси и передают на стадию 3. Добавление эфирных масел осуществляется перед стадией опудривания.

Стадия 3. Опудривание таблеточной смеси. Опудривание проводят в промежуточной ёмкости (или смесителе), куда добавляют кальция стеарат и перемешивают в течении 5 мин. Таблеточная смесь проверяется на остаточную влажность при помощи анализатора влажности ЭВЛАС-2М (влажность 5-6%), после чего подается на стадию 4.

Стадия 4. Получение таблеток. Опудренная таблеточная масса загружается в роторную таблеточную машину РТМ-10. В процессе таблетирования производят контроль геометрических размеров (штангенциркуль), средней массы (весы ЕТП-600П-Е), прочностных показателей таблетки, описания и внешнего вида. Обеспыливание таблеток проводят при помощи ручного сита или на обеспыливателе для таблеток. Время, затраченное на таблетирование и обеспыливание таблеток составляет два часа. Масса одной таблетки $750 \pm 0,03$ мг Отбраковку таблеток производят вручную. Обеспыленные таблетки анализируют на соответствие НД.

Стадия 5. Упаковка и маркировка. Готовые таблетки загружаются в автомат для фасовки таблеток, затем расфасовываются в контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой печатной лакированной или бумаги упаковочной термосвариваемой по 10 таблеток. 2,3 или 5 контурных ячейковых упаковок помещают в пачку из картона. На пачку наклеивают этикетку на липкой основе. Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90. Упакованную

продукцию предъявляют в отдел контроля качества для полного анализа по НД и при ее соответствии отправляют на склад готовой продукции. Технологический процесс производства таблеток для рассасывания на основе МВШС-40 состоит из 5 стадий.

Разработку спецификации качества таблеток для рассасывания на основе сухого экстракта МВШС-40 проводили согласно приказа Министра здравоохранения РК от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств». В результате в соответствии с требованиями разработан проект НД, регламентирующий качество таблеток для рассасывания на основе сухого экстракта МВШС-40 (Приложение Л).

Таблица 43 – Спецификация качества на таблетки для рассасывания на основе МВШС-40

| Показатели качества | Нормы (допустимые пределы) | Ссылки на методы испытаний |
|--|---|--|
| 1 | 2 | 3 |
| Описание | Таблетки цельные правильные, светло-серого цвета со светло-коричневыми вкраплениями, поверхность однородная, горького привкуса, со своеобразным ароматным запахом. | ЕАЭС Ф 2.1.6.0., ГФ РК I, т.1, с.550 |
| Идентификация: | На хроматограмме испытуемого раствора, полученного при количественном определении, время удерживания основного пика должно совпадать с временем удерживания пика розмариновой кислоты на хроматограмме стандартного образца розмариновой кислоты. | В соответствии с НД |
| Средняя масса | ± 5% | ЕАЭС Ф 2.1.9.5
ГФ РК I, т. 1, 2.9.5 |
| Однородность массы | ± 10% | |
| Распадаемость | Не больше 15 мин. | ЕАЭС Ф 2.1.9.1
ГФ РК I, т. 1, 2.9.1 |
| Растворение | Не меньше 75% за 45 мин. | ЕАЭС Ф 2.1.9.3
ГФ РК I, т. 1, 2.9.3 |
| Родственные примеси:
идентифицированные примеси | Кофейная кислота, циннарозид, р-кумаровая кислота, апигенин | В соответствии с НД |
| Истираемость | Не менее 97% | ЕАЭС Ф 2.1.9.6
ГФ РК I, т. 1, 2.9.7 |
| Устойчивость таблеток к раздавливанию | Не менее 50 Н | ЕАЭС Ф 2.1.9.7
ГФ РК I, т. 1, 2.9.8 |

Продолжение таблицы 43

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|--|
| Микробиологическая чистота | Категория 3В.
В 1.0 г сырья общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не более 10^4 бактерий, не более 10^2 грибов и не более 10^2 энтеробактерий. Не допускается наличие <i>Escherichia coli</i> в 1.0 г., <i>Salmonella</i> в 10.0 г., <i>Staphylococcus aureus</i> в 1.0 г. | ЕАЭС 2.3.1.4
ГФ РК I, т. 1, 2.16.12
ГФ РК I, т. 1, 2.16.13
ГФ РК, т. I, 5.1.4 |
| Потеря в массе при высушивании или вода | Не более 6,5% | ЕАЭС Ф 2.1.2.31
ГФ РК I, т. 1, 2.2.32 |
| Количественное определение | Не менее 1,5 мг/таб | В соответствии с НД |
| Упаковка | Контурная ячейковая упаковка из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой печатной лакированной или бумаги упаковочной термосвариваемой по 10 таблеток. 2,3 или 5 контурных ячейковых упаковок помещают в пачку из картона. | В соответствии с НД |
| Маркировка | На этикетке указывают название и содержание действующих веществ, срок годности, условия хранения, способ применения | В соответствии с НД |
| Транспортирование | В соответствии с ГОСТ 17768-90Е | ГОСТ 17768-90Е |
| Хранение | В защищенном от света места, при температуре не выше 25°C | В соответствии с НД |
| Срок хранения | 18 месяцев (срок наблюдения) | В соответствии с НД |
| Основное фармакологическое действие | Противовоспалительное, антимикробное | В соответствии с НД |

6.4 Изучение стабильности таблеток для рассасывания на основе МВШС-40

Изучение стабильности таблеток на основе МВШС-40 проводили методом долгосрочных испытаний в соответствии с требованиями Приказа Министерства здравоохранения РК №ҚР ДСМ-165/2020 от 28 октября 2020г «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств». Условия испытания: $T=25\pm 2$ °С при влажности $60\pm 5\%$. Результаты испытания стабильности таблеток представлены в таблицах 44-46. Периодичность контроля серии по основным показателям: 0, 3, 6, 9, 12, 18 мес. Значительных изменений параметров качества не наблюдалось.

Таблица 44 – Результаты определения сроков хранения таблеток для рассасывания на основе МВШС-40, серия 1

| Упаковка: контурная ячейковая упаковка
Дата начала испытания: 01.2021 г
Дата окончания испытания: 07.2022 г
Серия: 01Т-0121 | | | | | | | | | |
|--|--|---|---|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 |
| Описание | Температура (25±2)°С,
относительная влажность: (60±5) % | ЕАЭС Ф 2.1.6.0
ГФ РК, т.1, с.550 | Таблетки цельные правильные, светло-серого цвета со светло-коричневыми вкраплениями, поверхность однородная, горького привкуса, со своеобразным ароматным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация -розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Пик на хроматограмме образца совпадает со стандартным образцом розмариновой кислоты | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Средняя масса | | ЕАЭС Ф 2.1.9.5
ГФ РК, т.1, 2.9.5 | ± 5% | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,002 |
| Однородность массы | | ЕАЭС Ф 2.1.9.5
ГФ РК, т.1, 2.9.5 | ± 10% | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| Распадаемость | | ЕАЭС Ф 2.1.9.1
ГФ РК, т.1, 2.9.1 | Не больше 15 мин. | 11 мин
45 сек | 11 мин
30 сек | 11 мин
33 сек | 11 мин
46 сек | 11 мин
37 сек | 11 мин
44 сек |
| Растворение | | ЕАЭС Ф 2.1.9.3
ГФ РК, т.1, 2.9.3 | Не меньше 75% за 45 мин. | 79 | 79 | 79 | 78 | 78 | 79 |
| Истираемость | | ЕАЭС Ф 2.1.9.6
ГФ РК, т.1, 2.9.7 | Не менее 97% | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 |
| Устойчивость таблеток к раздавливанию | | ЕАЭС Ф 2.1.9.7
ГФ РК, т.1, 2.9.8 | Не менее 50 Н | 107,4 | 107,0 | 107,3 | 107,4 | 107,5 | 107,4 |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.2.31
ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 6,5% | 6,45 | 6,46 | 6,46 | 6,45 | 6,47 | 6,45 |
| Микробиологическая чистота | | ЕАЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12,
ГФ РК т. I, 2.6.13 | В 1 г. аэробных микроорганизмов не более 10 ⁴ , грибов не более 10 ² , энтеробактерий не более 10 ² , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и <i>S. aureus</i> , в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение: розмариновая кислота | В соответствии с НД | Не менее 1,5 мг/таб | 3,0 | 3,04 | 3,01 | 3,0 | 3,01 | 3,0 | |

Таблица 45 – Результаты определения сроков хранения таблеток для рассасывания на основе МВШС-40, серия 2

| Упаковка: контурная ячейковая упаковка
Дата начала испытания: 01.2021 г
Дата окончания испытания: 07.2022 г
Серия: 02Т-0121 | | | | | | | | | |
|--|--|---|---|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 |
| Описание | Температура (25±2)°С,
относительная влажность: (60±5) % | ЕАЭС Ф 2.1.6.0
ГФ РК, т.1, с.550 | Таблетки цельные правильные, светло-серого цвета со светло-коричневыми вкраплениями, поверхность однородная, горького привкуса, со своеобразным ароматным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация -розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Пик на хроматограмме образца совпадает со стандартным образцом розмариновой кислоты | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Средняя масса | | ЕАЭС Ф 2.1.9.5
ГФ РК, т.1, 2.9.5 | ± 5% | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,002 |
| Однородность массы | | ЕАЭС Ф 2.1.9.5
ГФ РК, т.1, 2.9.5 | ± 10% | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| Распадаемость | | ЕАЭС Ф 2.1.9.1
ГФ РК, т.1, 2.9.1 | Не больше 15 мин. | 11 мин
34 сек | 11 мин
45 сек | 11 мин
35 сек | 11 мин
47 сек | 11 мин
45 сек | 11 мин
38 сек |
| Растворение | | ЕАЭС Ф 2.1.9.3
ГФ РК, т.1, 2.9.3 | Не меньше 75% за 45 мин. | 78 | 78 | 79 | 79 | 78 | 79 |
| Истираемость | | ЕАЭС Ф 2.1.9.6
ГФ РК, т.1, 2.9.7 | Не менее 97% | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 |
| Устойчивость таблеток к раздавливанию | | ЕАЭС Ф 2.1.9.7
ГФ РК, т.1, 2.9.8 | Не менее 50 Н | 107,0 | 107,1 | 107,2 | 107,4 | 107,4 | 107,3 |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.2.31
ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 6,5% | 6,48 | 6,44 | 6,45 | 6,45 | 6,48 | 6,45 |
| Микробиологическая чистота | | ЕАЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12,
ГФ РК т. I, 2.6.13 | В 1 г. аэробных микроорганизмов не более 10 ⁴ , грибов не более 10 ² , энтеробактерий не более 10 ² , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и <i>S. aureus</i> , в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение: розмариновая кислота | В соответствии с НД | Не менее 1,5 мг/таб | 3,03 | 3,01 | 3,0 | 3,03 | 3,02 | 3,0 | |

Таблица 46 – Результаты определения сроков хранения таблеток для рассасывания на основе МВШС-40, серия 3

| Упаковка: контурная ячейковая упаковка
Дата начала испытания: 01.2021 г
Дата окончания испытания: 07.2022 г
Серия: 03Т-0121 | | | | | | | | | |
|--|--|---|---|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 |
| Описание | Температура (25±2)°С,
относительная влажность: (60±5) % | ЕАЭС Ф 2.1.6.0
ГФ РК, т.1, с.550 | Таблетки цельные правильные, светло-серого цвета со светло-коричневыми вкраплениями, поверхность однородная, горького привкуса, со своеобразным ароматным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация -розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Пик на хроматограмме образца совпадает со стандартным образцом розмариновой кислоты | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Средняя масса | | ЕАЭС Ф 2.1.9.5
ГФ РК, т.1, 2.9.5 | ± 5% | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| Однородность массы | | ЕАЭС Ф 2.1.9.5
ГФ РК, т.1, 2.9.5 | ± 10% | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 |
| Распадаемость | | ЕАЭС Ф 2.1.9.1
ГФ РК, т.1, 2.9.1 | Не больше 15 мин. | 11 мин
30 сек | 11 мин
33 сек | 11 мин
31 сек | 11 мин
48 сек | 11 мин
34 сек | 11 мин
45 сек |
| Растворение | | ЕАЭС Ф 2.1.9.3
ГФ РК, т.1, 2.9.3 | Не меньше 75% за 45 мин. | 78 | 77 | 79 | 78 | 79 | 79 |
| Истираемость | | ЕАЭС Ф 2.1.9.6
ГФ РК, т.1, 2.9.7 | Не менее 97% | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 | 99,99 |
| Устойчивость таблеток к раздавливанию | | ЕАЭС Ф 2.1.9.7
ГФ РК, т.1, 2.9.8 | Не менее 50 Н | 107,3 | 107,0 | 107,0 | 107,4 | 107,0 | 107,2 |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.2.31
ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 6,5% | 6,46 | 6,43 | 6,48 | 6,44 | 6,45 | 6,47 |
| Микробиологическая чистота | | ЕАЭС Ф 2.3.1.4
ГФ РК т. I, 2.6.12,
ГФ РК т. I, 2.6.13 | В 1 г. аэробных микроорганизмов не более 10 ⁴ , грибов не более 10 ² , энтеробактерий не более 10 ² , отсутствие в 1,0 г. <i>E.coli</i> и <i>S. aureus</i> , в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Количественное определение: розмариновая кислота | В соответствии с НД | Не менее 1,5 мг/таб | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,03 | 3,03 | 3,01 | |

В результате срока наблюдения (18 месяцев) не произошло нарушение характеристик, указанных в НД.

В ходе работы были разработаны таблетки для рассасывания на основе сухого экстракта листьев шалфея степного.

Проведены эксперименты по оценке качества разработанных таблеток и установлено, что качество таблеток соответствует требованиям ГФ РК.

На основе проведенных испытаний разработана технологическая схема получения и спецификация качества таблеток с МВШС-40.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1) Впервые проведено фармакогностическое исследование растительного сырья шалфея степного (*Salvia stepposa*) и определены нормы качества, сроки хранения.

Макроскопические особенности: растение 30-50 см высотой, стебель в диаметре от 3 до 5 мм, в верхней части окрашен в зеленый цвет, в нижней – в фиолетовый, прямостоячий на поперечном срезе 4-угольный, поверхность покрыта прямыми и изогнутыми многочисленными простыми волосками белого цвета.

Микроскопические особенности: клетки верхнего эпидермиса многоугольные прямыми стенками, над жилками листа - почти-прямоугольные, с ровными и утолщенными стенками, сверху покрыты слоем кутикулы; нижнего – прозенхимные клетки с утолщенными и прямыми стенками, устьица диацитного типа. Вдоль жилок листа многочисленные мелкие железистые трихомы. Эфирно-масличные железки немногочисленные, приподнимающиеся над поверхностью.

По результатам проведенных исследований по определению параметров качества растительного сырья, полученные данные включены в проекты. Результаты определения тяжелых металлов показали, что в изучаемом растительном сырье содержание тяжелых металлов не превышает пределы допустимых значений. Разработан проект НД: «Шалфей степной листья». Установлен срок хранения 24 месяца.

2) Впервые экстракты шалфея степного получены в условиях микроволновой активации. Установлено, что микроволновой экстракцией удалось сократить время экстрагирования в 15 раз в сравнении с традиционными методами. Установлены параметры получения сухого экстракта из листьев шалфея степного методом микроволновой активации: соотношение сырье экстрагент 1:10, мощность облучения – 300 Вт, время экстракции 16 минут. Выход сухого экстракта составил 23,7% в пересчете на воздушно сухое сырье.

Определен компонентный состав сухих экстрактов из листьев шалфея степного. Мажорным компонентом является розмариновая кислота.

Проведены испытания по биологической активности сухого экстракта листьев шалфея степного (МВШС-40). На основании проведенных экспериментов сухой экстракт листьев шалфея степного в концентрациях 1 мг/мл и 0,5 мг/мл проявляет цитотоксичность, а в концентрации 0,25 мг/мл не токсичен. Сухой экстракт листьев *Salvia stepposa* имеет высокую антимикробную активность по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538) и умеренную антимикробную активность по отношению к штаммам *Bacillus subtilis* (АТСС 6633), *Escherichia coli* (АТСС 25922), *Candida albicans* (АТСС 10231). МВШС-40 обладает наибольшей антиоксидантной активностью в концентрации 0,75 мг/мл, в концентрации 12,5 мг/мл обладает

антирадикальной активностью и в дозе 25 мг/кг обладает противовоспалительной активностью.

3) Впервые разработана технология получения сухого экстракта из листьев *Salvia stepposa*. Предложена технологическая схема производства. Разработан лабораторный регламент на производство субстанции сухого экстракта листьев шалфея степного МВШС-40. Установлены показатели и нормы качества сухого экстракта листьев шалфея степного. Определен срок хранения сухого экстракта листьев шалфея степного – 24 месяца.

4) Разработана технология получения таблеток для рассасывания на основе сухого экстракта листьев шалфея степного (МВШС-40). Установлено, что таблетки на основе шалфея степного содержат в 5,5 раз больше розмариновой кислоты в сравнении с таблетками на основе шалфея лекарственного. Разработан оптимальный состав таблеток массой 750 мг: сухой экстракт шалфея степного МВШС-40 – 50 мг., МКЦ 105 – 75 мг., ЕМДЕХ – 587,5 мг., лимонная кислота – 28 мг., кальция стеарат – 7,5 мг., масло мяты перечной – 1,5 мг., масло эвкалиптовое – 0,5 мг. Определен срок хранения таблеток для рассасывания на основе сухого экстракта листьев шалфея степного – 18 месяцев (время наблюдения). Разработан проект НД: «Таблетки для рассасывания Шалфей степной» и лабораторный регламент на производство таблеток для рассасывания Шалфей степной.

Оценка полноты решения поставленных задач.

Поставленные задачи по фармакогностическому исследованию травы *Salvia stepposa*; определению показателей и норм качества, сроков хранения растительного сырья *Salvia stepposa*; исследований по выбору оптимального способа получения сухого экстракта из листьев шалфея степного; сравнительного исследования химического состава, технологических свойств, биологической активности веществ, выделенных из шалфея степного, полученных традиционными способами и методом активации; разработки технологии получения субстанции с выраженным биологическим действием из листьев *Salvia stepposa*; определению показателей и нормы качества, сроков хранения сухого экстракта, полученного из листьев *Salvia stepposa*; исследования биологической активности сухого экстракта листьев шалфея степного; разработки оптимального состава твердой лекарственной формы, содержащей биологически активные вещества шалфея степного на основании физико-химических свойств и биологического действия; разработки технологии получения таблеток на основе биологически активных веществ шалфея степного; разработки проектов нормативной и технической документации, необходимых для внедрения разработок в промышленное производство, выполнены полностью.

Рекомендации и исходные данные по конкретному использованию результатов. Разработана технология производства сухого экстракта, полученного из листьев *Salvia stepposa*. Полученный экстракт может быть использован как субстанция, так и готовое лекарственное средство. Разработана технология производства таблеток для рассасывания на основе сухого экстракта листьев шалфея степного. Результаты данной

диссертационной работы могут быть использованы в фармации и технологии лекарств.

Оценка технико-экономической эффективности внедрения.

Полученные результаты имеют высокую технико-экономическую эффективность, поскольку, разработана технология получения сухого экстракта из листьев *Salvia stepposa*, полученного микроволновым способом, что позволяет существенно снизить энергозатраты. Внедрение в производство лекарственных средств из листьев шалфея степного, обладающего различными видами биологической активности, позволит расширить номенклатуру лекарственных средств на основе отечественного сырья растительного происхождения.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области. На основании полученных результатов опубликованы 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, 2 статьи в зарубежных научных изданиях входящих в международную базу данных Web of Science Core Collection (Clarivate Analytics) и Scopus, 4 статьи в материалах международных конференций, в том числе 3 в материалах зарубежных конференций.

В целом, научно-методический уровень представленной диссертационной работы соответствует современным аналогам, опубликованным в открытой научной печати.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Hu GH., Takano A, Drew B.T., Liu E.D., Soltis E.D., Soltis P.S., Peng H., Xiang CL. Phylogeny and staminal evolution of *Salvia* (Lamiaceae, Nepetoideae) in East Asia // *Annals of Botany*. – 2018. – Vol. 122 (4). P. 649–668.
- 2 Флора Казахстана.– Алма-Ата: Наука, 1964. Т. VII. с. 429.
- 3 Velamuri R., Sharma Y., Fagan J., Schaefer J. Application of UHPLC-ESI-QTOF-MS in Phytochemical Profiling of Sage (*Salvia officinalis*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) // *Planta Med Int Open*. - 2020. – 7: e133–e144.
- 4 Öztekin N., Başkan S, Кеpekçi S.E., Erim F.B., Topçu G. Isolation and analysis of bioactive diterpenoids in *Salvia* species (*Salvia chionantha* and *Salvia kronenburgii*) by micellar electrokinetic capillary chromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 51. P. 439–442.
- 5 Lemle K. L. *Salvia officinalis* used in pharmaceuticals // *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* – 2018. – Vol. – 294. P. 012037.
- 6 Ghorbani A., Esmailizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components // *J Tradit Complement Med.* – 2017. – Vol. 7(4). P. 433-440.
- 7 Lopresti A L. *Salvia* (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects // *Drugs R D.* – 2017. – Vol. 17(1). P. 53-64.
- 8 Levaya Ya. K., Zholdasbaev M. E., Atazhanova G. A., Akhmetova S. B. Evaluation of Antibacterial Activity of *Salvia stepposa* Extracts Isolated Using Microwave Extraction, Growing Wild in Kazakhstan // *TRENDS IN SCIENCES.* – 2022. – Vol. 19(7). P. 3217.
- 9 [Эл.источник] <http://redbook21.ru/6512-salvia-verticillata.html>
- 10 Gülçin İ., Tel A.Z., Gören A.C. Sage (*Salvia pilifera*): determination of its polyphenol contents, anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities // *Food Measure.* – 2019. – Vol. 13. P. 2062–2074.
- 11 Harborne J. B, Baxter H, Moss G .P. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 2nd ed. London // Taylor & Francis. – 1999. P. 976.
- 12 Randhir R., Lin Y.T., Shetty K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors // *Process Biochem.* – 2004. – Vol. 39. P. 637–646.
- 13 Albuquerque B. R., Heleno S. A., Oliveira MBPP, Barros L., Ferreira ICFR. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges // *Food Funct.* – 2021. – Vol. 12(1). Vol. 14-29.
- 14 Mot M. D., Gavrilăş S., Lupitu A. I., Moisa C., Chambre D., Tit D. M., Bogdan M. A, Bodescu A. M, Copolovici L., Copolovici D. M, Bungau S. G. *Salvia officinalis* L. Essential Oil: Characterization, Antioxidant Properties and the Effects of Aromatherapy in Adult Patients // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11(5). P. 808.
- 15 Hade A. S, Hassan B. S. The effect of the alcoholic extract of *Salvia officinalis* on some toxic fungi isolated from dairy product // *AIP Conference Proceedings.* – 2023. – Vol. 2414. P. 020024.

- 16 Loizzo M. R., Abouali M., Salehi P., Sonbolic A., Kananic M., Menichinia F. // *Nat Prod Res.* – 2014. – Vol. 28. P. 2278-2285.
- 17 Medjahed F., Merouane A., Saadi A., Bader A., Cioni P. L., Flamini G. Antioxidant Phenolic Compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. // *Chilean J Agric Res.* – 2016. – Vol. 76. P. 195-200.
- 18 Medrad H. H., dos Santos E. O., Ribeiro E. M.O., David J. M., David J. P., Araújo J. F., do Vale A. E., Bellintani M. C., Brandão H. N., Meira P. R. Rosmarinic and Cinnamic Acid Derivatives of in vitro Tissue Culture of *Plectranthus ornatus*: Overproduction and Correlation with Antioxidant Activities // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2017. – Vol. 28 (03).
- 19 Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A., Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview // *Medicines (Basel)*. – 2018. – Vol. 5(3). P. 93.
- 20 Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview // *J Nutr Sci.* – 2016. – Vol. 5. P.47.
- 21 Chagas M. D. S. S, Behrens M. D., Moragas-Tellis C. J., Penedo G. X. M, Silva A. R, Gonçalves-de-Albuquerque C. F. Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds // *Oxid Med Cell Longev.* – 2022. - Vol.2022 (9966750).
- 22 Georgiev V., Pavlov A. (eds.) // Springer International Publishing AG, part of Springer Nature / *Salvia Biotechnology.* – 2017.
- 23 Noor S., Mohammad T., Rub M. A., Raza A., Azum N., Yadav D. K., Hassan M. I., Asiri A. M. Biomedical features and therapeutic potential of rosmarinic acid // *Arch Pharm Res.* – 2022. – Vol. 45(4). P. 205-228.
- 24 Guan H., Luo W., Bao B., Cao Y., Cheng F., Yu S., Fan Q., Zhang L., Wu Q., Shan M. A Comprehensive Review of Rosmarinic Acid: From Phytochemistry to Pharmacology and Its New Insight // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27(10). P. 3292.
- 25 Nadeem M., Imran M., Aslam Gondal T., Imran A., Shahbaz M., Muhammad Amir R., Wasim Sajid M., Batool Qaisrani T., Atif M., Hussain G., Salehi B., Adrian Ostrander E., Martorell M., Sharifi-Rad J., C. Cho W., Martins N. Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid: A Comprehensive Review // *Applied Sciences.* – 2019. – Vol. 9(15).P. 3139.
- 26 Бадеева К.Ж., Левая Я.К., Атажанова Г.А., Жолдасбаев М.Е. Биологические свойства розмариновой кислоты // *Фармация Казахстана – Алматы.* – 2020. – № 7-8. С. 29-34.
- 27 Birtić S., Dussort P., Pierre F. X., Bily A.C., Roller M. Carnosic acid // *Phytochemistry.* – 2015. – Vol. 115. P. 9-19.
- 28 Chen Y., Wang Y., Qin Q., Zhang Y., Xie L., Xiao J., Cao Y., Su Z., Chen Y. Carnosic acid ameliorated A β -mediated (amyloid- β peptide) toxicity, cholinergic dysfunction and mitochondrial defect in *Caenorhabditis elegans* of Alzheimer's // *Model. Food & Function.* - 2022. – Vol. 13 (8). P. 4624-4640.
- 29 Luis J. C., Johnson C. B. Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity // *Span J Agric Res.* – 2015. – Vol. 3. P. 106-112.

- 30 Mazaud A., Lebeuf R., Laguerre M., Nardello-Rataj V. Improved Hydrotropic Extraction of Carnosic Acid from Rosemary and Sage with Short-Chain Monoalkyl Glycerol Ethers // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2022. – Vol. 10(11). P. 3673-3681.
- 31 Reguigui A., Ott P. G., Darcsi A., Bakonyi J., Romdhane M., Móricz A.M. Nine-dimensional bioprofiles of Tunisian sages (*Salvia officinalis*, *S. aegyptiaca* and *S. verbenaca*) by high-performance thin-layer chromatography – effect-directed analyses // Journal of Chromatography A. - 2023. - Vol. 1688. P. 463704.
- 32 Bahri S., Jameleddine S., Shlyonsky V. Relevance of carnosic acid to the treatment of several health disorders: Molecular targets and mechanisms // Biomed Pharmacother. – 2016. – Vol. 84. P. 569-582.
- 33 Pavić V., Jakovljević M., Molnar M., Jokić S. Extraction of Carnosic Acid and Carnosol from Sage (*Salvia officinalis* L.) Leaves by Supercritical Fluid Extraction and Their Antioxidant and Antibacterial Activity // Plants. – 2019. – Vol. 8(1). P. 16.
- 34 Loussouarn M., Krieger-Liszkay A., Svilar L., Bily A., Birtić S., Havaux M. Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms // Plant physiology. – 2017. – Vol. 175(3). P. 1381–1394.
- 35 Elebeedy D., Elkhatib W. F., Kandeil A., Ghanem A., Kutkat O., Alnajjar R., Saleh M.A., Maksoud A. I. A. E., Badawy I., Al-Karmalawy A.A. Anti-SARS-CoV-2 activities of tanshinone IIA, carnosic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid, baicalein, and glycyrrhetic acid between computational and *in vitro* insights // RSC Adv. – 2021. – Vol. 11. P. 29267-29286.
- 36 Hagiwara H., Basnet R., Wiyasihati S. I., Nakata K., Hagiwara K., Miyazaki H., Yoshida K. Carnosic acid inhibits the formation of osteoclasts through attenuation of expression of RANKL // PharmaNutrition. – 2015. – Vol. 3(1). P. 1-6.
- 37 Sun Q., He M., Zhang M., Zeng S., Chen L., Zhou L., Xu H. Ursolic acid: A systematic review of its pharmacology, toxicity and rethink on its pharmacokinetics based on PK-PD model // Fitoterapia. – 2020. -Vol. 147. P. 104735.
- 38 Gudoityte E., Arandarcikaite O., Mazeikiene I., Bendokas V., Liobikas J. Ursolic and Oleanolic Acids: Plant Metabolites with Neuroprotective Potential // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. - 22(9). P. 4599.
- 39 Jesus J. A., Lago J. H., Laurenti M. D., Yamamoto E. S., Passero L.F. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update // Evid Based Complement Alternat Med. – 2015. – Vol. 2015. P. 620472.
- 40 Silva G. N. S. D., Primon-Barros M., Macedo A.J., Gnoatto S. C. B. Triterpene Derivatives as Relevant Scaffold for New Antibiofilm Drugs // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9(2). P. 58.
- 41 Vega-Granados K., Medina-O'Donnell M., Rivas F., Reyes-Zurita F. J., Martinez A., Alvarez de Cienfuegos L., Lupiañez J. A., Parra A. Synthesis and Biological Activity of Triterpene-Coumarin Conjugates // J Nat Prod. – 2021. – Vol. 84(5). P. 1587-1597.
- 42 R Sanchez S.E., Omsland A. Critical Role for Molecular Iron in *Coxiella burnetii* Replication and Viability // mSphere. – 2020. – Vol. 5(4). P.00458-20.

- 43 Dale M. P, Moses T., Johnston E. J., Rosser S.J. A systematic comparison of triterpenoid biosynthetic enzymes for the production of oleanolic acid in *Saccharomyces cerevisiae* // PLoS ONE. – 2020. – Vol. 15(5). P. e0231980.
- 44 Gudoityte E., Arandarcikaite O., Mazeikiene I., Bendokas V., Liobikas J. Ursolic and Oleanolic Acids: Plant Metabolites with Neuroprotective Potential // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. P. 4599.
- 45 Ding H., Hu X., Xu X., Zhang G., Gong D. Inhibitory mechanism of two allosteric inhibitors, oleanolic acid and ursolic acid on α -glucosidase // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 107. P. 1844-1855.
- 46 Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. In Vitro Antioxidant Activities of Phenols and Oleanolic Acid from Mango Peel and Their Cytotoxic Effect on A549 Cell Line // Molecules. – 2018. – Vol. 23(6). P. 1395.
- 47 Lu Y. H., Hong Y., Zhang T. Y., Chen Y. X., Wei Z. J., Gao C. Y. Rosmarinic acid exerts anti-inflammatory effect and relieves oxidative stress via Nrf2 activation in carbon tetrachloride-induced liver damage // Food Nutr Res. – 2022. – Vol. 66.
- 48 Woźniak Ł., Skąpska S., Marszałek K. Ursolic Acid--A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities // Molecules. – 2015. – Vol. 20(11). P. 20614-41.
- 49 Wrońska N., Szlaur M., Zawadzka K., Lisowska K. The Synergistic Effect of Triterpenoids and Flavonoids-New Approaches for Treating Bacterial Infections // Molecules. – 2022. – Vol. 27(3). P. 847.
- 50 Tian M., Zhao P., Li G., Zhang K. In Depth Natural Product Discovery from the Basidiomycetes *Stereum* Species // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8(7). P. 1049.
- 51 Huang W., Wang Y., Tian W., Cui X., Tu P., Li J., Shi S., Liu X. Biosynthesis Investigations of Terpenoid, Alkaloid, and Flavonoid Antimicrobial Agents Derived from Medicinal Plants // Antibiotics (Basel). – 2022. – Vol. 11(10). P. 1380.
- 52 Lombrea A., Semenescu A. D., Magyari-Pavel I. Z., Turks M., Lugiņina J., Peipiņš U., Muntean D., Dehelean C. A., Dinu S., Danciu C. Comparison of In Vitro Antimelanoma and Antimicrobial Activity of 2,3-Indolo-betulinic Acid and Its Glycine Conjugates // Plants (Basel). – 2023. – Vol. 12(6). P. 1253.
- 53 Mahizan N. A., Yang S. K., Moo C. L., Song A. A., Chong C. M., Chong C. W., Abushelaibi A., Lim S. E., Lai K. S. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens // Molecules. – 2019. – Vol. 24(14). P. 2631.
- 54 Shanmugam M. K., Dai X., Kumar A. P., Tan B. K., Sethi G., Bishayee A. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence // Cancer Lett. – 2014. – Vol. 346(2). P. 206-16.
- 55 Zhang Q. W., Lin L. G., Ye W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review // Chin Med – 2018. – Vol. 13(20).
- 56 Abubakar A. R., Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes // J Pharm Bioallied Sci. – 2020. – Vol. 12(1). P. 1-10.
- 57 Pandey A., Tripathi S. Concept of standardization, extraction, and pre-phytochemical screening strategies for herbal drug // J Pharmacogn Phytochem. – 2014. – Vol. 2. P. 115-9.

- 58 Majekodunmi S. O. Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research // MRJMMS. – 2015. – Vol. 3.P. 521-7.
- 59 Hossain M. A., Al-Hdhrami S. S., Weli A. M., Al-Riyami Q., Al-Sabahi J. N. Isolation, fractionation and identification of chemical constituents from the leaves crude extracts of *Mentha piperita* L grown in sultanate of Oman // Asian Pac J Trop Biomed. – 2014. -Vol. 4(S368). P. 72.
- 60 Sharanya C. S., Sabu A., Haridas M. Chapter Plant Metabolomics: Current Status and Prospects // Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects. - 2020. ISBN : 978-981-15-5135-2.
- 61 Cavalloro V., Martino E., Linciano P., Collina S. Microwave-Assisted Solid Extraction from Natural Matrices / Microwave Heating - Electromagnetic Fields Causing Thermal and Non-Thermal Effects/ IntechOpen. – 2021.
- 62 Burger P., Plainfossé H., Brochet X., Chemat F., Fernandez X. Extraction of Natural Fragrance Ingredients: History Overview and Future Trends // Chem Biodivers. – 2019. – Vol. 16(10). P.1900424.
- 63 Yao H., Li X., Liu Y., Wu Q., Jin Y. An optimized microwave-assisted extraction method for increasing yields of rare ginsenosides from *Panax quinquefolius* L. // J Ginseng Res. – 2016. – Vol. 40(4). P. 415-422.
- 64 Ingle K. P., Deshmukh A. G., Padole D. A., Dudhare M. S., Moharil M. P., Khelurkar V. C. Phytochemicals: Extraction methods, identification, and detection of bioactive compounds from plant extracts // J Pharmacogn Phytochem. – 2017. – Vol. 6(32). P.6.
- 65 Koina I. M., Sarigiannis Y., Hapeshi E. Green Extraction Techniques for the Determination of Active Ingredients in Tea: Current State, Challenges, and Future Perspectives // Separations. – 2023. - Vol. 10(2). P. 121.
- 66 Şahin S., Samli R., Tan A. S. B, Barba F. J., Chemat F., Cravotto G., Lorenzo J. M. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties // Molecules. – 2017. – Vol. 22(7). P. 1056.
- 67 Akyüz A., Tekin İ., Ersus S. Comparison of Different Methods in the Extraction of Phenolic Compounds from Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.) // Journal of Apitherapy and Nature. – 2022. - Vol. 5. P. 27-34
- 68 Raynie D. E. Extraction. In: Wilson I. D., Adlard E. R., Cooke M., Poolie C. F. (eds) Encyclopedia of separation science. Academic Press, San Diego. 1st Edition – 2000.
- 69 Dragović-Uzelac V., Garofulić I., Jukic M., Penić M., Dent M. The Influence of Microwave-Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis* L.) Polyphenols // Food Technology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 50. P. 377-383.
- 70 Wei Z. F., Zhao R. N., Dong L. J., Zhao X. Y., Su J. X., Zhao M., Li L., Bian Y. J., Zhang L. J. Dual-cooled solvent-free microwave extraction of *Salvia officinalis* L. essential oil and evaluation of its antimicrobial activity // Industrial Crops and Products. – 2018. – Vol. 120. P. 71-76.
- 71 Kawakami D., Yoshida T., Kanemaru Y., Huarhua Zaquinaula M. H., Mizukami T., Arimoto M., Shibata T., Goto A., Enami Y., Amano H., Teraoka T., Komatsu K., Arie T. Induction of resistance to diseases in plant by aerial ultrasound irradiation // J Pestic Sci. – 2019. – Vol. 44(1). P. 41-47.

- 72 Pisoschi A. M, Pop A., Cimpeanu C., Predoi G. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review // *Oxid Med Cell Longev.* -2016. – Vol. 2016. P. 9130976.
- 73 Zhang Q. A., Zheng H., Lin J., Nie G., Fan X., García-Martín G. F. The state-of-the-art research of the application of ultrasound to winemaking: A critical review // *Ultrasonics Sonochemistry.* – 2023. – Vol. 95. P, 106384.
- 74 Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D. G., Lightfoot D. A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts // *Plants.* – 2017. - Vol.(6) P. 42.
- 75 Dent M., Verica D-U., Garofulic I. E., Bosiljkov B., Jezek D., Brncic M. Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction // *Chem. Biochem. Eng. Q.* – 2015. – Vol. 29 (3). P. 475–484.
- 76 Verma N. H. Chapter 15 - Extraction of phenolic compounds by conventional and green innovative techniques, Editor(s): Dr. Inamuddin, Tariq Altalhi, *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* // Elsevier. – 2023. P. 355-394.
- 77 Levaya Ya.K. EXTRACTION OF SALVIA: A GREEN APPROACH. Материалы международной научной конференции студентов и молодых ученых «Фараби Әлемі». Алматы, Казахстан, 6-9 апреля 2020 г. – Алматы: Қазақ университеті, 2020. 413 стр.
- 78 Послание Президента Республики Казахстан Н. Назарбаева народу Казахстана. 31 января 2017 г.
- 79 Абдулина С.А. Список сосудистых растений Казахстана. Алматы, 1999.187 с.
- 80 Levaya Ya.K., Atazhanova G.A. Marketing analysis of the Kazakhstani pharmaceutical market of drugs containing sage // *Научно-практический журнал вестник КазНМУ им С.Д. Асфендиярова.* №1, 2020. 717 с.
- 81 Future Market Insights, “Oral Solid Dosage Formulation Market,” *futuremarketinsights.com*, Market Report, July 18, 2017.
- 82 Ищенко В.И. Промышленная технология лекарственных средств. 2-е издание: учеб. пособие / УО «Витебский государственный медицинский университет». Витебск. – 2012. 567 с.
- 83 Gaikwad S. S., Kshirsagar S.J. Review on Tablet in Tablet techniques // *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci.* – 2020. Vol. 9(1).
- 84 Промышленная технология лекарств [Электронный ресурс] : электронный учебник / В. И. Чуешов [и др.] ; под ред. Е. А. Рубан. Электрон. текстовые дан. Харьков : Национальный фармацевтический университет. – 2010. URL: https://ztl.nuph.edu.ua/medication/chapter14_11.html
- 85 Kalliantas D., Kassalia M. E., Karagianni C. H. S. Trituration and Fractal Dimension in Homeopathic Pharmacopoeia // *Pharm Anal Acta.* – 2017. Vol. 8. P. 554.
- 86 Abebe A., Akseli I., Sprockel O., Kottala N., Cuitiño A. M. Review of bilayer tablet technology // *Int J Pharm.* – 2014. – Vol. 461(1-2). P. 549-58.
- 87 Osamura T., Takeuchi Y., Onodera R., Kitamura M., Takahashi Y., Tahara K., Takeuchi H. Prediction of effects of punch shapes on tableting failure by using a multi-functional single-punch tablet press // *Asian J Pharm Sci.* – 2017. – Vol. 12(5). P. 412-417.

- 88 Lura A., Tardy G., Kleinebudde P., Breitzkreutz J. Tableting of mini-tablets in comparison with conventionally sized tablets: A comparison of tableting properties and tablet dimensions // *Int J Pharm X.* – 2020. – Vol. 2. P. 100061.
- 89 Dai S., Xu B., Shi G., Liu J., Zhang Z., Shi X., Qiao Y., SeDeM expert system for directly compressed tablet formulation: A review and new perspectives // *Powder Technology.* – 2019. – Vol. 342. P. 517-527.
- 90 Chen H., Aburub A., Sun C. C. Direct Compression Tablet Containing 99% Active Ingredient-A Tale of Spherical Crystallization // *J Pharm Sci.* – 2019. – 108(4). P. 1396-1400.
- 91 Sulaiman T., Sulaiman S. Review: excipients for tablet manufacturing with direct compression method // *Journal of Pharmaceutical And Sciences.* – 2020. – Vol. 3(2). P. 64-76.
- 92 GMP [Электронный ресурс] : <https://gmpua.com/Process/Tablet/Compression/index.html>
- 93 Compression Vehicle: A Technical Review
- 94 Shanmugam S. Granulation techniques and technologies: recent progresses // *Bioimpacts.* – 2015. – Vol. 5(1). P. 55-63.
- 95 Wang B., Sun X., Xiang J., Guo X., Cheng Z., Liu W., Tan S. A critical review on granulation of pharmaceuticals and excipients: Principle, analysis and typical applications // *Powder Technology.* – 2022. – Vol. 401. P. 117329.
- 96 Sridevi G., Korangi V., Madhavi Latha S. Review on a novel approach in Recent Advances of granulation techniques and technologies // *Research J. Pharm. and Tech.* – 2017. – Vol. 10(2). P. 607-617.
- 97 Chen P., Javed Ansari M., Bokov D., Suksatan W., Rahman M. D. L, Sarjadi M. S. A review on key aspects of wet granulation process for continuous pharmaceutical manufacturing of solid dosage oral formulations // *Arabian Journal of Chemistry.* – 2022. – Vol. 15(2). P. 103598.
- 98 Sharma D. M., Kosalge S. B., Lade S. N. Review on Moisture activated Dry Granulation Process // *PharmaTutor.* – 2017. – Vol. 5(12). P. 58-67.
- 99 Shabana Md. A Review on the Quality Control Analysis of Oral Dosage Form: Tablets // *RRJPPS.* – 2016. – Vol. 5(2).
- 100 Ivasenko S., Orazbayeva P., Skalicka-Wozniak K., Ludwiczuk A., Marchenko A., Ishmuratova M., Poleszak E., Korona-Glowniak I., Akhmetova S., Karilkhan I., Loseva I. Antimicrobial activity of ultrasonic extracts of two chemotypes of *Thymus serpyllum* L. of Central Kazakhstan and their polyphenolic profiles // *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences.* – 2021. - 9(A). – P. 61-67.
- 101 Лотова, Л. И. Ботаника. Морфология и анатомия высших растений. Учебник для вузов / Л. И. Лотова. - 3-е изд., испр. - М. : Комкнига, 2007. - 512 с.
- 102 Федосеева Л.М., Кнауб Н.Н., Селигеева Т.Г. Гистохимический анализ листьев и корней лопуха большого (*Arctium lappa* L.), произрастающего на территории Алтайского края // *Химия растительного сырья.* – 2004, №1. – С. 61–64.

- 103 Федосеева Г.М. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды. Методическое пособие по фармакогнозии. Иркутск. – 2009. 67 с.
- 104 Разаренова К.Н., Бабушкина Е.В., Смирнов П.Д., Костина О.В., Муравник Л.Е. Гистохимия трихом официальных представителей семейства Lamiaceae // Медицинский альманах. – 2017, № 3. – С. 193–198. <http://dx.doi.org/10.21145/2499-9954-2017-3-193-198>.
- 105 Фармакопея ЕАЭС №100 от 11 августа 2020 года
- 106 Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. Учебное пособие для ВУЗов. — М.: ГЭОТАР-Мед, 2004. — 560 с.: ил.
- 107 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. — 2-е издание, перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005 — 832 с.
- 108 W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C.Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // LWT Food Science and Technology. — 1995. — Vol. 28(1). P. 25-30.
- 109 Morawietz G., Ruehl-Fehlert C., Kittel B., Bube A., Keane K., Halm S., Heuser A., Hellmann J. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups // Exp Toxicol Pathol. — 2004. — Vol.55(6). P. 433-49.
- 110 Ramachandran R., Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease // J. Clin. Pathol. — 2009. — Vol. 62. P. 481–492.
- 111 Lee K. H., Chen Y. S., Judson J. P., Chakravarthi S., Sim Y. M., Er H. M. The effect of water extracts of *Euphorbia hirta* on cartilage degeneration in arthritic rats // Malays J Pathol. — 2008. — Vol. 30(95). P. 102.
- 112 [Интернет-ресурс]: Плантариум <https://www.plantarium.ru/page/find.html>
- 113 Белозерцева, И. Вызванная морфином реакция Штрауба как модель спастичности у мышей: эффекты серотонинергических соединений / И. Белозерцева, О.А. Драволина, Э.Э. Звартау // Журнал неврологии и психиатрии. — 2015. - №4, Вып. 2. — С. 73-79.
- 114 Лужников Е.А. Клиническая токсикология. 2-е изд. перераб. и дополнен. — М.: Медицина, 1994. — 256 с.: илл. — (Учеб. лит. для студ. мед. ин-тов.). — ISBN 5-225-00902-6.
- 115 Henics T., Wheatley D.N. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: A view on new perspectives and features // Biol. Cell. — 1999. — Vol. 91. P. 485–498
- 116 Aki T., Nara A., Uemura K. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances // Cell. Biol. Toxicol. — 2012. — Vol. 28. P. 125–131.
- 117 Shubin A.V., Demidyuk I.V., Komissarov A.A., Rafieva L.M., Kostrov S.V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival // Oncotarget. - 2016. — Vol. 7. P. 55863–55889.
- 118 Жданова Г.О., Вятчина О.Ф., Бабин В.А., Стом Д.И., Федосеева Г.М. Использование *Saccharomyces cerevisiae* для оценки биологической

активности лекарственных препаратов // Сиб. мед. журн. – 2013. – № 4. – С. 104-106.

119 Белоусов В.А., Вальтер М.Б. Основы дозирования и таблетирования лекарственных порошков. - М., 1980. - 210 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А


Заключение о видовой принадлежности растительного сырья

ЗАКЛЮЧЕНИЕ о видовой принадлежности растительного сырья

На основании анализа представленного Левой Я.К. образцов сырья лекарственных растений подтверждаем:


1 Образцы сырья, собранные в июне-июле 2020 года в окрестностях г. Караганды (Октябрьский район Карагандинской области, координаты: N 49,88898; E 73,15569) в фазе бутонизации и цветения, действительно являются шалфеем степным (*Salvia stepposa* Des.-Shost., сем. *Lamiaceae*).

Зав.кафедрой ботаники
НАО «Карагандинский университет
имени академика Е.А. Букетова»,
к.б.н.


 А.К. Ауельбекова

Профессор кафедры ботаники
НАО «Карагандинский университет
имени академика Е.А. Букетова»,
к.б.н., ассоциированный профессор



 М.Ю. Ишмуратова

Доцент кафедры ботаники
НАО «Карагандинский университет
имени академика Е.А. Букетова»,
к.б.н.

 С.У. Тлеукунова

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
Проект НД «Шалфей степной листья»

УТВЕРЖДЕН

Проректор по стратегическому развитию и науке

НАО «Медицинский университет Караганды»

А.А. Турмухамбетова

от «14» апреля 2022 г.

М.П.



НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного растительного сырья

Salvia Stepposa Des.-Schost Folia

Дала шалфейның жапырақтары

Шалфей степной листья

Семейство Яснотковые/Губоцветные (*Lamiaceae/Labiatae*).

Сбор сырья в фазу цветения май-июль.

Наименование и страна организации-производителя

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Наименование и страна организации-упаковщика

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Область применения - сырье для получения таблеток для рассасывания на основе шалфея степного

НД РК 42-

Срок введения установлен с

“ ” 20 г.

Вводится впервые

Срок действия до

“ ” 20 г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ ПЕРЕПЕЧАТКА НЕ РАЗРЕШАЕТСЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ В
Лабораторный регламент на производство субстанции сухого экстракта
листьев шалфея степного МВШС-40

Для служебного пользования. Экз. № ____

УТВЕРЖДЕН

Проректор по стратегическому
развитию и науке
НАО «Медицинский университет
Караганды»

А.А. Турмухамбетова
А.А. Турмухамбетова
от «13» апреля 2024 г.



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство субстанции сухого экстракта листьев шалфея степного
МВШС-40

Срок действия регламента до «13» апреля 2024 г.

Караганда - 2022

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Акт изучения антимикробной активности экстрактов шалфея степного



«УТВЕРЖДАЮ»
Турмухамбетова А.А.
«15» сентября 2020 г.

АКТ

Результатов выполненных работ в учебной микробиологической лаборатории по испытанию на антибактериальную, противогрибковую активности на базе кафедры биомедицины НАО «МУК»

Объекты исследования: водные, водно-спиртовые экстракты традиционной, ультразвуковой и микроволновой экстракции растительного сырья *Salvia Stepposa* Des.-Schost (шалфей степной).

Цель работы: изучить антибактериальную и противогрибковую активности водных, водно-спиртовых экстрактов традиционной, ультразвуковой и микроволновой экстракции растительного сырья *Salvia Stepposa* Des.-Schost.

Материалы и методы исследований:

Определение антибактериальной и противогрибковой активности испытуемых образцов проводилось с использованием метода диффузии в агар с тест-культурами: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Candida albicans* ATCC 10231 и *Pseudomonas aeruginosa* 9027.

Стандартами антибактериальной активности выбраны антибиотики бензилпенициллина натриевая соль, цефтриаксон, противогрибковой активности – нистатин.


Водные, водно-спиртовые экстракты шалфея степного были растворены в стерильной дистиллированной воде, 30%, 40%, 70%, 90% этиловом спирте. Концентрации растворов, содержащие малую, среднюю и большую дозы, находились между собой в кратном соотношении (1:1,5:2) – 0,025; 0,375; 0,05 г навески (экстракта) на 0,25 мл, 0,375 мл и 0,5 мл растворителя. Концентрация препаратов сравнения составляла 1 мг/мл.

Антимикробную активность образцов оценивали по диаметру зон задержки роста тест-штаммов (мм). Диаметры зон меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антимикробной активности, 10-15 мм – слабая активность, 15-20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная. Каждый образец испытывали в трех параллельных опытах.

Определяли чувствительность микроорганизмов к данным препаратам диффузионным методом с помощью дисков. Использовали 5 видов микроорганизмов согласно требованиям Государственной Фармакопеи Республики Казахстан: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans* и *P. aeruginosa*. Высевали данные культуры методом газона на следующих питательных средах: среда Чистовича (желточно-солевой агар), питательный агар, среда

ПРИЛОЖЕНИЕ Д
Акт изучения антиоксидантной и антрадикальной активности
экстрактов шалфея степного

«Утверждаю»
Проректор по научной работе
НАО «Медицинский университет
Астана»
Койков В.В.
2022 г.


« 14 » 04

Акт
изучения антиоксидантной и антрадикальной активности in vitro
растительных экстрактов

Цель работы – изучение антиоксидантной (АОА) и антрадикальной активности (АРА) *in vitro* экстрактов шалфея степного.

Эксперимент *in vitro* был проведен по следующим методикам.

I. Определение железа - восстанавливающего потенциала [FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power assay)]. Оценка железо-восстанавливающей активности анализируемого объекта (FRAP) - метод основана на восстановлении ионов Fe^{3+} в Fe^{2+} . Оценка восстанавливающей активности в реакции восстановления калия феррицианида. Калия гексаферроцианид $K_3[Fe^3(CN)_6]$ в присутствии вещества, обладающего восстанавливающими свойствами, восстанавливается до $K_3[Fe^{2+}(CN)_6]$, взаимодействие которого с окисленной формой Fe^{2+} приводит к образованию окрашенного в синий цвет соединения $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$. Контроль содержания ионов Fe^{2+} и интенсивности процессов окисления является одной из необходимых мер по обеспечению и поддержанию антиоксидантного статуса организма.

Контроль содержания ионов Fe^{2+} и интенсивности процессов окисления, которая является одной из необходимых мер по обеспечению и поддержанию антиоксидантного статуса организма определяли методом определения железо-восстанавливающего потенциала FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power assay) *in vitro*.

В основу FRAP метода положено использование индикаторной системы $Fe^{3+}/[Fe(CN)_6]^{4-}$.

Механизм данного метода можно представить следующим образом:
 $[Fe(CN)_6]^{3-} + ArOH \rightarrow [Fe(CN)_6]^{4-} + ArO + H^+$
 $[Fe(CN)_6]^{4-} + Fe^{3+} + K^+ \rightarrow K_4Fe[Fe(CN)_6] \quad \lambda = 700nm [16].$

ХОД РАБОТЫ:

К 1 мл исследуемых экстрактов в диапазоне концентраций 0-1мг/мл добавляется 2,5мл фосфатного буфера (0,2М, рН 6,6) и 2,5 мл 1% раствора гексацианоферрата (III) калия. Реакционная смесь инкубируется в течение 25 минут при температуре 50⁰С, реакция останавливается добавлением 2,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Смесь центрифугируют 3 минуты (1,5 оборотов/мин). Верхний слой объемом 2,5 мл смешивается с 2,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 0,1 % $FeCl_3$. Измерение оптической плотности производится при $\lambda = 700nm$. Полученные данные отражены на таблице 1 и рисунке 1, в которой представлены концентрационные зависимости значений оптической

1

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Решение Комитета биоэтики

Решение Комитета по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды»

Заседание № 20 _____
Протокол № 20 _____

Дата (Д/М/Г) 19.05.2021 г.
Присвоенный номер 69 _____

| Название протокола: «Фармацевтическая разработка готовой лекарственной формы на основе биологически активных веществ шалфея степного». | | | | | |
|--|------------------------|--|-----|----|----|
| Основной исследователь: | | Левая Яна Константиновна | | | |
| Институт: | | НАО МУК | | | |
| Рассмотренные элементы: | | <input checked="" type="checkbox"/> Приложены <input type="checkbox"/> Не приложены | | | |
| Повторное рассмотрение
<input type="checkbox"/> да <input checked="" type="checkbox"/> Нет | | Дата предыдущего рассмотрения: | | | |
| Решение: | | <input checked="" type="checkbox"/> Разрешено (Р) <input type="checkbox"/> Разрешено с рекомендациями (Рек)
<input type="checkbox"/> Повторная заявка (ПЗ) <input type="checkbox"/> Не разрешено (НР) | | | |
| №. | Голосование членов КБЭ | решение | | | |
| | | Р | Рек | ПЗ | НР |
| 1. | Вистерничан О.А. | ✓ | | | |
| 2. | Мацневская Л.Л. | ✓ | | | |
| 3. | Куаныш Ж.М. | ✓ | | | |
| 4. | Агеев Д.В. | | | | |
| 5. | Ахмадьярова Б.С. | ✓ | | | |
| 6. | Бакирова Р.Е. | ✓ | | | |
| 7. | Блок О.Г. | ✓ | | | |
| 8. | Жолдаспаева Е.С. | ✓ | | | |
| 9. | Калиева Ш.С. | ✓ | | | |
| 10. | Касапиди Д.И. | ✓ | | | |
| 11. | Молотов-Лучанский В.Б. | ✓ | | | |
| 12. | Никифорова С.А. | ✓ | | | |
| 13. | Омаркулов Б.К. | ✓ | | | |
| 14. | Понамарева О.А. | ✓ | | | |
| 15. | Сорокина М.А. | ✓ | | | |
| 16. | Тулеутаева С.Т. | ✓ | | | |

Примечание: Р - Разрешено; Рек – Разрешено с рекомендациями;
ПЗ – Повторная заявка; НР – Не разрешено

Подпись: м

Председатель: PhD, ассоциированный профессор Вистерничан О.А.

Дата: 19.05.2021 г.



Ответственный секретарь
Куаныш Ж.М.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Акт по изучению острой токсичности

«УТВЕРЖДАЮ»

Айгуль Турмухамбетова А. А.

«23» *декабрь* 2020 г.



АКТ

Результатов выполненных работ по изучению острой токсичности на базе
Вивария НАО «МУК»

Объекты исследования: водно-спиртовой экстракт растительного сырья *Salvia Stepposa* Des.-Schost (шалфей степной), полученный микроволновой экстракцией (МВШС-40).

Цель работы: изучить острую токсичность образца МВШС-40.

Материалы и методы исследования:

Эксперименты поставлены в соответствии с требованиями по изучению новых фармакологических веществ [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва, 2000 .

В экспериментах использованы белые аутбредные мыши и крысы самцы и самки массой 20-37 г. и 150-300 г, соответственно. Животные находились на обычном рационе вивария. Все животные были разделены на четыре группы по пять голов в каждой, всего исследовано 40 мышей и 40 крыс. Контрольные и опытные животные находились в аналогичных условиях и имели одинаковую исходную среднюю массу, контролируемую еженедельным взвешиванием для коррекции вводимой дозы вещества. Животные прошли акклиматизацию в условиях комнаты для проведения испытаний в течение 7 суток. Содержание животных соблюдалось в полном соответствии с санитарными нормами, с постоянным доступом к пище и воде.

Опыты выполняли, соблюдая необходимые правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Образец МВШС-40 вводили животным внутрижелудочно однократно в дозе 500 мг/кг, 1000 мг/кг и 2000 мг/кг. Каждую дозу соединения вводили экспериментальным группам по 5 (крыс) и 5 (мышей) животных обоего пола из расчёта на массу тела. Дизайн исследования представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Дизайн исследования острой токсичности соединения МВШС-40 при внутрижелудочном введении на крысах и мышах

| № группы | Пол (М/Ф) | Кол-во животных | Исследуемое ЛС | Доза ЛС мг/кг |
|--------------|-----------|-----------------|----------------|---------------|
| Мыши | | | | |
| A | M | 5 | МВШС-40 | 500 |
| B | M | 5 | | 1000 |
| C | F | 5 | | 2000 |
| D (контроль) | F | 5 | | - |
| Крысы | | | | |
| A | M | 5 | МВШС-40 | 500 |
| B | F | 5 | | 1000 |
| C | M | 5 | | 2000 |
| D (контроль) | F | 5 | | - |

Одноразово животные получали физиологически допустимый объем

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Акт изучения цитотоксичности

«УТВЕРЖДАЮ»

Аппенд Турмухамбетова А.А.
«17» *сентября* 2020 г.



АКТ

Результатов выполненных работ в учебной микробиологической лаборатории
по изучению цитотоксичности на базе кафедры биомедицины ИАО «МФУ»

Объекты исследования: водно-спиртовой экстракт растительного сырья *Salvia Stepposa* Des.-Schost (шалфей степной), полученный микроволновой экстракцией (МВШС-40).

Цель работы: изучить цитотоксичность образца МВШС-40.

Материалы и методы исследования:

Тест-объектом в первой части эксперимента являлись дрожжи *S. cerevisiae* (препарат сушеных пекарских дрожжей "GRAND"). Из МВШС-40 (96% этиловый спирт) приготовили разведение 1:30. Антибиотик нистатин растирали в ступке до получения однородной массы и готовили раствор с концентрацией 0,3 мг/мл. В 20 мл исследуемой пробы были внесены 1,36 г дрожжей, полученная смесь суспензировалась, было добавлено 0,4 г глюкозы. Полученную смесь разлили по 7 мл в мерные пробирки и инкубировали в течение 15 минут, при 30 °С. По истечении 15 минут определяли объем образовавшейся пены и вычисляли скорость ее подъема по следующей формуле:

$$V = v/t$$

где v — скорость подъема пены (мл/мин), V — объем пены, мл, t — время, мин.

Ингибирующим эффектом являлось снижение скорости подъема пены, а стимулирующим – повышение скорости подъема пены. Контролем служила суспензия дрожжей, приготовленная на основе физиологического раствора. Эксперименты проводили в 3-х независимых опытах, с 3 параллельными измерениями.

В качестве тест-систем во второй части эксперимента были выбраны простейшие класса *Protozoa*. ГОСТ 53886 – 2010 (ИСО 146669:1999). Вода. Методы определения токсичности по выживаемости морских ракообразных.

Для получения инфузорий была набрана вода из аквариума в стерильную банку. После чего в течении 3-х дней в сухом и хорошо освещенном месте была высушена кожура от бананов. После почернения кожура была помещена в сосуд с аквариумной водой. Далее в течении 5-6 суток на поверхности сосуда образовалась прозрачно-белая пенка, напоминающая пелену. Это свидетельствовало о наличии простейших класса *Protozoa* в воде. Далее сосуд с инфузориями был помещен в термостат для обеспечения дальнейшего интенсивного роста.

Для начала была проведена прижизненная микроскопия. Для этого необходимо капнуть на предметное стекло 1-2 мкл жидкости, накрыть покровным стеклом и провести световую микроскопию. Для микроскопии использовался световой коммерческой компании micros Austria на увеличении $\times 40$. В ходе микроскопии в одном препарате были обнаружены клеточные структуры, напоминающие животных класса protozoa вида *Ciliphora* и *Amoeba*. При прижизненной микроскопии были отмечены незначительные движения структур, что свидетельствует о жизнеспособности клеточных структур. В мазке,

ПРИЛОЖЕНИЕ К
Лабораторный регламент на производство таблеток Шалфей степной

Для служебного пользования. Экз. № _____

УТВЕРЖДЕН

Проректор по стратегическому
развитию и науке

НАО «Медицинский университет
Караганды»

А. А. Муромбабетова
от «13» *августа* 2022 г.



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство таблеток для рассасывания Шалфей степной

Срок действия регламента до «13» *августа* 2022 г.

Караганда - 2022

ПРИЛОЖЕНИЕ Л
Проект НД «Таблетки для рассасывания Шалфей степной»

УТВЕРЖДЕН

Проректор по стратегическому развитию и науке

НАО «Медицинский университет Караганды»

А.А. Турмухамбетова



2022 г.

М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Торговое наименование лекарственного препарата:

Дала шалфейінің резорбциясына арналған таблеткалар

Таблетки для рассасывания Шалфей степной

Международное непатентованое наименование:

Шалфей степной листья (*Salvia stepposa* Des.-Schost Folia)

Лекарственная форма: таблетки для рассасывания

Дозировка: 50 мг

Наименование и страна организации-производителя

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

Наименование и страна организации-упаковщика

НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан.

НД РК 42-

Срок введения установлен с

“ _____ ” _____ 20 г.

Вводится впервые

Срок действия до

“ _____ ” _____ 20 г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА НЕ РАЗРЕШАЕТСЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Справка о наличии публикаций в базе данных Scopus

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТЕРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ
«ҰЛТТЫҚ МЕМЛЕКЕТТІК ҒЫЛЫМИ-
ТЕХНИКАЛЫҚ САРАПТАМА ОРТАЛЫҒЫ»
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫНЫҢ
НҰР-СУЛТАН ҚАЛАСЫНДАҒЫ ФИЛИАЛЫ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ
ФИЛИАЛ АКЦИОНЕРНОГО ОБЩЕСТВА
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГОСУДАРСТВЕННОЙ
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
В ГОРОДЕ НУР-СУЛТАН

010000, Казакстан Республикасы
Нур-Султан қаласы, Пушкин көшесі, 15
тел.: 8 (7172) 27-42-13
E-mail: ncenti_astana@mail.ru

010000, Республика Казахстан
город Нур-Султан, ул. Пушкина, 15
тел.: 8 (7172) 27-42-13
E-mail: ncenti_astana@mail.ru

Исх. №: 03-04/450
« 20 » 10 2022 г.

Левой Яне Константиновне

На письмо
от 11.10.2022 г.

Филиал АО «Национальный центр государственной научно-технической экспертизы» в городе Астана предоставляет информацию о наличии публикации докторанта НАО «Медицинского университета Караганды» **Левой Яны Константиновны** в научных изданиях, входящий в международную базу данных **Scopus** (Elsevier).

1. «**Research Journal of Pharmacy and Technology**» (India), ISSN: 0974-3618, входящем в базу **Scopus** с 2011 года по настоящее время. Предметная область – **фармакология, токсикология и фармацевтика: фармакология, токсикология и фармацевтика (разное); медицина: фармакология (медицинская).**

2. «**Trends in Sciences**», E-ISSN: 2774-0226, входящем в базу **Scopus** с 2021 года по настоящее время. Предметная область – **междисциплинарный.**

Статья **Левой Я.К.:**

1. **Levaya Ya.K., Ishmuratova M.Yu., Atazhanova G.A., Zilfikarov I.N., Loseva I.V.** Microscopic evaluation of salvia stepposa des.-schost above-ground part widespread in Kazakhstan. // **Research Journal of Pharmacy and Technology.** – 2021. – V. 14. – Iss. 9. – P. 4773 - 4776.

Статья выявлена в базе **Scopus**. В момент ее опубликования в 2021 году журнал «**Research Journal of Pharmacy and Technology**» имел **CiteScore** за 2020 год равный **1,3**, процентиль по **фармакологии, токсикологии и фармацевтике (разное) – 58**; процентиль по **фармакологии (медицинской) – 32.**

2. **Levaya Yana Konstantinovna, Erkenuly Zholdasbaev Musa, Abdulkhakimovna Atazhanova Gayane, Boltabaevna Akhmetova Saule**

000792