

Некоммерческое акционерное общество
«Медицинский университет Караганды»

УДК 615.332:615.454

На правах рукописи

ЖОЛДАСБАЕВ МҰСА ЕРКІНҰЛЫ

**Разработка технологии получения нового лекарственного средства
противовоспалительного и антиоксидантного действия на основе
Prunella vulgaris L.**

8D07201 - Технология фармацевтического производства

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный руководитель:
член-корр. НАН РК, д.х.н., проф.
Г.А.Атажанова

Зарубежные научные консультанты:
доктор PhD, проф. Ева Полезак,
д.фарм.н., проф. С.М. Мусозода

Республика Казахстан
Караганда, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

| | | |
|----------|---|-----------|
| | НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ | 5 |
| | ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ | 6 |
| | ВВЕДЕНИЕ | 8 |
| 1 | СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ | 13 |
| 1.1 | Противовоспалительные и антиоксидантные свойства <i>Prunella vulgaris</i> L. | 13 |
| 1.2 | Современные методы экстракции растений | 14 |
| 1.2.1 | Ускоренная экстракция растений растворителем | 17 |
| 1.2.2 | Микроволновая экстракция растительного сырья | 19 |
| 1.2.3 | Ультразвуковая экстракция растительного сырья | 21 |
| 1.3 | Методы экстракции <i>Prunella vulgaris</i> L. и биологическая активность | 22 |
| 1.3.1 | Противовирусная активность <i>Prunella vulgaris</i> L. | 24 |
| 1.3.2 | Антибактериальная активность <i>Prunella vulgaris</i> L. | 25 |
| 1.3.3 | Противоопухолевая активность <i>Prunella vulgaris</i> L. | 27 |
| 1.4 | Биологически активные вещества <i>Prunella vulgaris</i> L. | 28 |
| 2 | МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 41 |
| 2.1 | Материалы исследования | 41 |
| 2.2 | Методы исследования | 43 |
| 3 | ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ, ФАРМАЦЕВТИКО - ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ <i>PRUNELLA VULGARIS</i> L. | 54 |
| 3.1 | Запасы растительного сырья <i>Prunella vulgaris</i> L. | 54 |
| 3.2 | Технология заготовки травы <i>Prunella vulgaris</i> L. | 55 |
| 3.3 | Макроскопический анализ сырья <i>Prunella vulgaris</i> L. | 57 |
| 3.4 | Микроскопический анализ сырья <i>Prunella vulgaris</i> L. | 59 |
| 3.5 | Гистохимический анализ сырья <i>Prunella vulgaris</i> L. | 65 |
| 3.6 | Изучение фитохимического состава травы <i>Prunella vulgaris</i> L. | 70 |
| 3.7 | Разработка спецификации качества <i>Prunella vulgaris</i> L. | 72 |
| 4 | РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ <i>PRUNELLA VULGARIS</i> L. | 85 |
| 4.1 | Методы получения субстанции «Черноголовка обыкновенная экстракт сухой» | 85 |
| 4.2 | Разработка технологии субстанции «Черноголовка обыкновенная экстракт сухой» | 88 |
| 4.3 | Анализ ВЭЖХ сухих экстрактов <i>Prunella vulgaris</i> L. | 91 |
| 4.4 | Стандартизация сухого экстракта <i>Prunella vulgaris</i> L. и | |

| | | |
|----------|---|------------|
| | определение его стабильности | 93 |
| 5 | ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ, ЦИТОТОКСИЧНОЙ, АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЕЙ И ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБРАЗЦОВ ЭКСТРАКТОВ | 100 |
| 5.1 | Антимикробная активность образцов экстрактов, полученных ультразвуковой кавитацией | 100 |
| 5.2 | Скрининг образцов сухих экстрактов, полученных ультразвуковой кавитацией, на противовоспалительную активность | 101 |
| 5.3 | Скрининг образцов экстрактов <i>Prunella vulgare</i> L. на цитотоксичность | 102 |
| 5.4 | Изучение антиоксидантной активности сухих экстрактов <i>Prunella vulgaris</i> L. методами FRAP и DPPH | 103 |
| 5.5 | Острая токсичность сухих экстрактов <i>Prunella vulgaris</i> L. | 106 |
| 6 | РАЗРАБОТКА СОСТАВА И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА <i>PRUNELLA VULGARIS</i> L. | 110 |
| 6.1 | Обоснование состава и разработка технологии гелевой лекарственной формы на основе Na-КМЦ | 110 |
| 6.2 | Обоснование состава и разработка технологии гелевой лекарственной формы на основе карбопола | 113 |
| 6.3 | Технология получения геля сухого экстракта <i>Prunella vulgaris</i> L. | 118 |
| 6.4 | Изучение высвобождения действующего вещества из гелей методом прямой диффузии в агар | 120 |
| 6.5 | Реологические свойства геля | 122 |
| 6.6 | Биофармацевтическое исследование геля | 125 |
| 6.7 | Определение критериев качества и установление сроков хранения геля | 126 |
| 7 | ТЕХНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО СРЕДСТВА С СУХИМ ЭКСТРАКТОМ <i>PRUNELLA VULGARIS</i> L. | 136 |
| | ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 143 |
| | СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 146 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ А | 157 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ Б | 158 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ В | 159 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ Г | 160 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ Д | 161 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ Е | 162 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ Ж | 163 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ З | 164 |

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В диссертационной работе были использованы ссылки на следующие нормативные документы:

- Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик»

- 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».

- Приказ Министра здравоохранения РК № ҚР ДСМ-71 от 2 августа 2022 года «Об утверждении гигиенических нормативов к обеспечению радиационной безопасности».

- Приказ 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»

- Постановление Правительства Республики Казахстан от 24 ноября 2022 года № 945 «Об утверждении Концепции развития здравоохранения Республики Казахстан до 2026 года»

- 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»

- Решение Коллегии Евразийской экономической Комиссии №113 от 17 июля 2018 г. «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний 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»

- ГОСТ 7.32-2017. Межгосударственные стандарты. Отчет о научноисследовательской работе. Структура и правила оформления.

- ГОСТ 8.417-2002. Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

| | |
|------------|--|
| АОА | Антиоксидантная активнсоть |
| АФК | Активная форма кислорода |
| БАВ | Биологически активные вещества |
| БФ | Британская фармакопея |
| ВР | Вспомогательные работы |
| ВЭЖХ-МС | Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детектором |
| ГОСТ | Государственный отраслевой стандарт |
| ГО-1 | Гемоксигеназа-1 |
| ГФ РК | Государственная Фармакопея Республики Казахстан |
| ГГц | Гигагерц |
| ГХ-МС | Газовая хроматография- масс-спектрометрия |
| ДВ | Действующее вещество |
| ЕД | Единица измерения |
| Ф ЕАЭС | Фармакопея Евразийского экономического совета |
| кГц | Килогерц |
| КОЕ | Колониеобразующие единицы |
| КАТ | Каталаза |
| л | Литр |
| ЛПС | Липополисахарид |
| ЛР | Лабораторный регламент |
| ЛРС | Лекарственное растительное сырье |
| ЛС | Лекарственное средство |
| МБК | Минимальная бактерицидная концентрация |
| МБЧ | Микробиологическая чистота |
| МГц | Мегагерц |
| МЗ РК | Министерство здравоохранения Республики Казахстан |
| МЛФ | Мягкие лекарственные формы |
| мг/кг | Миллиграмм/килограмм |
| мкл | Микролитр |
| мкм | Микрометр |
| мм | Миллиметр |
| МПА | Мясопептонный агар |
| МПК | Минимально-подавляющая концентрация |
| НД | Нормативный документ |
| Натрий КМЦ | Натрий карбоксиметилцеллюлоза |
| ОП | Оптическая плотность |
| ОФС | Общая фармакопейная статья |
| СО | Стандартный образец |
| СВЧ | Сверхвысокочастотное излучение |
| ПОЛ | Перекисное окисление липидов |
| ТП | Технологический процесс |

| | |
|------|---|
| ТЭО | Технико-экономическое обоснование |
| УЗ | Ультразвук |
| УМО | Упаковка, маркировка, отпуск |
| ASE | Ускоренная экстракция растворителем |
| FRAP | Анализ антиоксидантной активности, снижающей содержание железа |
| GPV6 | Гель на основе сухового (70%) экстракта черноловки (образец №6) |
| PV70 | Сухой экстракт черноголовки, полученный при ультразвуковой экстракции 70% спиртом |

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена разработке технологии нового лекарственного средства противовоспалительного и антиоксидантного действия на основе *Prunella vulgaris* L.

Актуальность проблемы.

Актуальность исследуемой проблемы в диссертационной работе заключается в обеспечении населения Республики Казахстан качественными, эффективными и доступными отечественными лекарственными средствами, что является важным приоритетом в фармацевтической отрасли. Для достижения этой цели в сфере технологии лекарств необходимо проводить исследования по оптимальному использованию казахстанского растительного сырья. Согласно Концепции развития здравоохранения Республики Казахстан до 2026 года, утвержденной постановлением Правительства Республики Казахстан от 24 ноября 2022 года представлено, что основными принципами развития фармацевтической отрасли являются государственная поддержка отечественных разработок, развитие конкурентоспособной фармацевтической промышленности и медицинской науки; обеспечение доступности безопасных, качественных и эффективных лекарственных средств, медицинских изделий и их рациональное использование. В связи с этим поиск подходов для более полного использования собственных ресурсов дикорастущего и культивируемого растительного сырья и создание на его основе оригинальных фитопрепаратов, доступных по ценам, в то же время не уступающих по качеству их конкурентным аналогам является актуальным.

Лекарственные средства, основанные на растительных компонентах, могут найти применение во всех областях медицины без исключения. Эффективное использование отечественного растительного сырья для разработки лекарственных средств с высоким содержанием биологически активных веществ, включая сухие экстракты, представляет собой перспективное направление в фармацевтической науке.

Растительные препараты являются основными источниками средств от большинства заболеваний человека. В растениях существует ряд фитохимических веществ, которые взаимодействуют друг с другом, вызывая наблюдаемые фармакологические эффекты. Наиболее характерными веществами с антиоксидантной и противовоспалительной активностью являются алкалоиды, полифенолы, терпеноиды и флавоноиды. Растения, обладающие такими фитохимическими веществами, служат источниками мощных антиоксидантов и противовоспалительных средств. Научное обоснование использования большинства этих растений в традиционной фитотерапии также отсутствует в литературе и требует решения. У людей активные формы кислорода вызывают воспаление вследствие окислительного стресса. Постоянное воспаление генерирует большое количество свободных радикалов, которые в итоге вызывают дополнительное воспаление. Этот

бесконечный порочный круг может нанести вред организму человека.

Большой научный интерес представляют растения семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), которые за счет биологически активных соединений в своем составе обладают широким спектром фармакологической активности. К таким растениям можно отнести черноголовку обыкновенную (*Prunella vulgaris* L.). В *Prunella vulgaris* L. содержится множество классов соединений, таких как моно- и сесквитерпеноиды, ди- и тритерпеноиды, стероиды, фенилпропаноиды, кумарины, флавоноиды, высшие жирные кислоты, витамины, азотсодержащие соединения, дубильные вещества и так далее. Растение, благодаря высокому содержанию витамина С, используется в народной медицине для остановки кровотечений и лечения простуды. Наличие в достаточном количестве фенилпропаноида урсоловой кислоты и сесквитерпеноида кариофиллена оказывает подавляющее воздействие на рост и распространение различных видов рака. Доказано, что фенолпропаноид розмариновая кислота, содержащаяся в спиртовых экстрактах *Prunella vulgaris* L. обладает выраженными противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. У людей активные формы кислорода вызывают воспаление вследствие окислительного стресса. Постоянное воспаление генерирует большое количество свободных радикалов, которые в итоге вызывают дополнительное воспаление. Этот бесконечный порочный круг может нанести вред организму человека.

В связи с этим, разработка технологии гелевой лекарственной формы на основе сухого экстракта *Prunella vulgaris* L., произрастающей территории Казахстана является перспективной и научно обоснованной для фармацевтической индустрии Республики Казахстан.

Цель работы: Разработка технологии получения субстанции и готовой лекарственной формы нового противовоспалительного и антиоксидантного средства на основе *Prunella vulgaris* L. и их стандартизация.

Задачи исследования:

1. Провести фармакогностическое исследование травы *Prunella vulgaris* L. и определить показатели, нормы качества, сроки хранения, запасы и распространенность *Prunella vulgaris* L.

2. Разработать способы получения биологически активных веществ из черноголовки обыкновенной в условиях ультразвуковой активации, провести скрининг на противовоспалительную и антиоксидантную активность и отбор образцов, перспективных для разработки нового лекарственного средства, определить острую токсичность сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.

3. Разработать состав и технологию готовой лекарственной формы противовоспалительного и антиоксидантного средства на основе сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.

4. Разработать методы контроля качества разработанного лекарственного средства на основе черноголовки обыкновенной, определить срок годности и условия хранения геля. Разработать проект НД на получение геля на основе субстанции сухого экстракта черноголовки обыкновенной.

5. Разработать технико-экономическое обоснование получения

противовоспалительного и антиоксидантного средства сухим экстрактом *Prunella vulgaris* L.

Объекты исследования: Сырье чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.), сухой экстракт, гель.

Предмет исследования: Оптимальные условия экстракции чернойголовки обыкновенной для количественного определения розмариновой кислоты, показатели качества сухого экстракта и его биологическая активность, способ и технология получения противовоспалительного и антиоксидантного средства, нормативная документация на гель и на субстанцию.

Научная новизна работы:

- впервые проведено изучение противовоспалительного и антиоксидантного действия опытных образцов сухих экстрактов чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.), полученных в результате ультразвуковой кавитации, где выявлено, что сухой экстракт, полученный при ультразвуковой кавитации 70% этиловым спиртом обладает противовоспалительной и антиоксидантной активностью;
- впервые разработан состав нового лекарственного средства противовоспалительного и антиоксидантного действия на основе сухого экстракта чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) в виде геля;
- впервые разработана технология получения сухого экстракта чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) противовоспалительного и антиоксидантного действия;
- впервые разработаны методы контроля качества разработанного лекарственного средства на основе чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.), определен срок и условия его хранения.

Научная новизна диссертационного исследования подтверждена патентами РК на полезную модель №8611 от 10.11.2023 г. «Применение сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. (чернойголовки обыкновенной) в качестве цитотоксического средства» и №8813 от 02.02.2024 г. «Применение сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. (чернойголовки обыкновенной) в качестве антимикробного средства» (Приложение А,Б).

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

- получение ультразвуковых экстрактов чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.). Поиск перспективного образца из экстрактов, обладающих противовоспалительным и антиоксидантным действием;
- экспериментальные исследования получения субстанции (ультразвукового водно-этанольного и водного экстрактов) из чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.);
- разработка состава лекарственного средства противовоспалительного и антиоксидантного действия на основе сухого экстракта чернойголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) в виде геля;
- нормативные документы на гель в виде проекта НД (Приложение В) и лабораторного регламента на получение (Приложение Г).

Практическая значимость работы:

На основе фармацевтической субстанции сухого экстракта черноголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) разработана гелевая лекарственная форма противовоспалительного и антиоксидантного действия.

По результатам исследования на острую токсичность сухой экстракт не обладает токсическими свойствами и рекомендован как противовоспалительное и антиоксидантное средство (Приложение Д).

Разработаны лабораторные регламенты на получение фармацевтической субстанции и геля (Приложение Е).

Технологический процесс получения экстрактов черноголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.) ультразвуковым методом внедрен в Школе фармации НАО «Карагандинский медицинский университет» (Приложение Ж).

Личный вклад автора

Все приведенные экспериментальные результаты диссертационного исследования получены самим автором, что свидетельствуют о личном вкладе соискателя в технологию лекарств. Автором выполнены исследования по изучению анатомо-морфологических признаков *Prunella vulgaris* L., выделены и наработаны образцы экстрактов, полученных при ультразвуковой кавитации с этиловым спиртом и водой, идентифицированы с помощью анализа ВЭЖХ-МС их составы, разработаны способы получения ультразвуковых экстрактов. Проведен скрининг образцов на противовоспалительную, антиоксидантную, противомикробную активность и цитотоксичность. Разработаны лабораторные регламенты на субстанцию и мягкую лекарственную форму. Проведена статистическая обработка полученных результатов и они оформлены в соответствии с требованиями к оформлению диссертационной работы.

Апробация результатов диссертации

Результаты и основные положения научной работы представлены на: VI Международной научно-практической конференции «Наука и образование в современном мире: вызовы XXI века» (г. Астана, 2020 г.); XI Международной научно-практической конференции «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (г. Алматы, 2022 г.); XI Международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения» (г. Москва, 2023 г.).

Публикации

Основные положения диссертации отражены в 9 опубликованных работах, из них – 2 патента РК на полезную модель, 1 статья в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования; 3 статьи в международном научном издании, входящем в базу данных Scopus.

Связь задач исследований с планом научных программ

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований НАО МУК в рамках научного проекта AP15473381 «Разработка нового ранозаживляющего, противомикробного, антиоксидантного и противовоспалительного средства на основе наземных органов *Prunella vulgaris*

L.» (договор №338/ЖГ-3-22-24 от 11.11.2022).

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 165 страниц машинописного текста, включает 22 рисунка и 47 таблиц; состоит из введения, 7 глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Список литературы включает 135 литературных источников.

1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ

1.1 Противовоспалительные и антиоксидантные свойства *Prunella vulgaris* L.

На сегодняшний день большой интерес представляет удешевление фармацевтического производства наряду с повышением эффективности, качества и безопасности лекарственных средств. Использование отечественных видов природного лекарственного растительного сырья является экономически рентабельным.

Большой научный интерес, наряду с практическим использованием, представляет черноголовка обыкновенная (*Prunella vulgaris* L.).

Prunella vulgaris L. (*Lamiaceae/Labiatae*) — черноголовка обыкновенная многолетнее травянистое растение из семейства Губоцветных, первоначально широко распространенное растение в Европе и Азии с умеренным климатом, в настоящее время имеет обширный ареал и произрастает во всех регионах мира с умеренным климатом, включая Евразию, Африку, Америку и Австралию [1].

В Европе *Prunella vulgaris* L. одобрена в качестве пищевой добавки используется и применяется в качестве заживляющего и антигемморагического средства, также применяется для лечения ангины, кишечных инфекций и диареи. В Азии спектр применения *Prunella vulgaris* L. немного другой, его употребляют в виде травяного чая для избавления от мигрени или лихорадки [2]. Кроме того, *Prunella vulgaris* L. уже более 2000 лет успешно применяется в Китае для лечения дисфункции щитовидной железы и мастита, также используют для лечения туберкулеза легких, инфекционного гепатита и артериальной гипертензии [3]. *Prunella vulgaris* L. применяют у пациентов с зубом, дерматитом и кожной аллергией. Кроме того, он также проявляет антиоксидантную, противовоспалительную, противоаллергическую и антимикробную активность [4,5]. Некоторые исследования также показали его полезность при лечении атопического дерматита [6] и в обеспечении фотозащиты [7].

В литературе имеется много сведений о свойствах надземной части *Prunella vulgaris* L., фитохимическом составе и различных видах биологической активности в связи с популярностью использования данного растения в медицине.

Основными идентифицированными компонентами *Prunella vulgaris* L. являются моно- и сесквитерпеноиды, фенольные кислоты, флавоноиды, полисахариды, пентациклические тритерпены, высшие жирные кислоты, витамины, азотсодержащие соединения, дубильные вещества и так далее [8]. Из класса фенольных кислот кофейная кислота и розмариновая кислоты являются основными биологически активными компонентами *Prunella vulgaris* L., обуславливающими противовоспалительное действие и антиоксидантную

активность [5]. Розмариновая кислота представляет собой сложный эфир кофейной и 3-(3,4-дигидроксифенил) молочной кислоты, принадлежит к числу вторичных метаболитов с широким спектром биологической активности. Розмариновая кислота является одним из эффективных натуральных антиоксидантов [9] и может защищать от свободнорадикальных патологий, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания, лучевая болезнь [10]. Считается, что она связывает свободные радикалы кислорода во внеклеточной среде [11-12].

Противовоспалительная активность спиртового экстракта цветков *Prunella vulgaris* L. была исследована Jun M.S., с соавторами на модели *in vitro*. Ими было сделано заключение, что экстракт индуцирует гемоксигеназу-1, тем самым подавляет высвобождение HMGB1, блокирует синтез цитокинов. Полученные данные, по мнению авторов, позволяют рассматривать экстракт *Prunella vulgaris* L. как перспективное противовоспалительное средство, применяемое при сепсисе [13].

Количество розмариновой кислоты в надземной массе *Prunella vulgaris* L. колеблется от 16,8 до 44,4 мг/г [2]. Широкое применение розмариновой кислоты лимитировано недостаточным ее выпуском в силу в том числе ограниченности сырьевой базы и сложности ее производства.

Таким образом, *Prunella vulgaris* L. является важным лекарственным растением, которое благодаря своей ценности, богатому химическому составу и фармакологическому действию привлекает внимание всех ученых мира. Кроме того, *Prunella vulgaris* L. является ценным источником фенольных соединений, флавоноидов и розмариновой кислоты и может служить в качестве распространенного, постоянно возобновляемого источника сырья, необходимого для нужд фитотерапии [14].

1.2 Современные методы экстракции растений

В настоящее время проявляется увеличенный интерес к использованию растений в лечебных целях, что обусловлено их уникальной способностью содержать ценные биологически активные вещества (БАВ). Эти вещества находят применение как в профилактике, так и в лечении разных заболеваний человека. На сегодняшний день, на рынке фармацевтических продуктов, имеется широкий ассортимент лекарств, основанных на растительных ингредиентах. Извлечение (экстракция) БАВ из растительного сырья остается актуальной задачей. Существует разнообразие методов для этой цели, включая традиционные способы, такие как прессование (горячее и холодное), водно-паровая экстракция, использование различных растворителей, а также более современные методы, включая сверхкритическую экстракцию с использованием сжиженных газов, ультразвуковую экстракцию и другие технологии. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки (таблица 1), которые следует учитывать в зависимости от поставленной задачи.

Выбор метода экстракции имеет решающее значение, поскольку он определяет надежность и качество последующих аналитических действий.

Основной задачей экстракции является достижение экономической целесообразности, экологичности, сокращения времени экстракции и повышения выхода биологически активных соединений без ущерба для биологической активности. Отчеты показывают, что современные методы имеют многочисленные преимущества по сравнению с традиционными методами. Традиционные методы экстракции характеризуются более длительным временем экстракции, большей потребностью в растворителе, риском биологической активности и меньшим выходом. Современные методы предлагают множество преимуществ, таких как сокращение требуемого времени, меньшая потребность в растворителях, лучшее сохранение биологической активности, выход и меньшие затраты энергии.

Таблица 1 – Преимущества и недостатки традиционных методов экстракции растений

| № | Методы экстракции растений | Преимущества | Недостатки | Ссылки |
|---|--------------------------------|--|---|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | Мацерация | Простой метод экстракции. Выбор растворителя позволяет выбрать подходящий растворитель, который будет определять классы фитохимических веществ. Растворитель также может обеспечить экстракцию термолабильных фитохимических веществ | низкая эффективность и длительная продолжительность экстракции, метод мацерации даёт низкий выход экстрактов | 15 |
| 2 | Экстракция в аппарате Сокслета | простая и понятная конструкция; непрерывность процесса; процесс легко контролируется визуально; расходуется небольшой объем растворителя, который можно использовать повторно после отгонки и дистилляции | длительность, неполное извлечение комплекса БАВ, переход в извлечение большого количества балластных веществ из-за длительности настаивания | 16 |
| 3 | Перколяция | Обычно используется водно-спиртовая смесь растворителей, что приводит к более эффективной экстракции, поскольку вода гидратирует стенки растений, а спирт химически подобен экстрактам большинства активных компонентов | длительное время экстракции, использование значительных количеств растворителей и иногда множество | 17 |
| | | из растительного материала. Увеличивается выход БАВ, так как создается максимальная разность концентраций благодаря постепенному вытеснению | стадий экстракции. Кроме того, значительные количества термолабильных | |

Продолжение страницы 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|--------------------------------|---|---|
| | | извлечения чистым экстрагентом | фитохимикатов либо разлагаются, либо деградируют при нагревании | |

Таким образом, традиционные методы экстрагирования являются трудоемкими, энергозатратными и проводимы в течение долгого промежутка времени, что является предпосылкой в поиске в более доступных методов экстрагирования. Некоторые применения традиционных методов экстракции представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Применения традиционных методов экстракции

| Вид растения (ботаническое или общее название) | Основные соединения | Техника экстракции | Оптимальные условия | Ссылки |
|--|------------------------------------|--|--|--------|
| <i>Arbutus unedo</i> L | Силибины (флавонолигнаны) | Жидкостно-жидкостная экстракция, опосредованная мацерацией | Температура при 35 °С и pH 7,0 в течение 2,0 ч экстракции на орбитальном шейкере, установленном на 150 об/мин. | 18 |
| <i>Ficus carica</i> | Флавоноид (катехин) | Мацерация | Температура 79,6 ± 5,2 °С, Время экстракции 93,2 ± 3,7 мин и 23,1 ± 3,7% этанола. | 19 |
| <i>Euphorbia neriifolia</i> | Флавоноиды | Мацерация | Температура 25 °С, этанол с концентрацией 70%, время экстракции 3 дня. | 20 |
| <i>Aronia melanocarpa</i> | Полифенолы, антоцианы | Мацерация | 50% этанол, соотношение твердого вещества и растворителя 1:20 | 21 |
| <i>Hamelia patens</i> | Фенолы (эпикатехин) | Перколяция | 1 л 70% растворителя этилового спирта | 22 |
| <i>Macleaya cordata</i> (Willd) R | Алкалоиды | Перколяция | 500 мл водного раствора соляной кислоты с концентрацией 0,1 моль/л | 23 |
| | | | просачивается через колонку со скоростью 2 мл/мин при 25°С. | |
| <i>Zingiber officinale</i> var <i>roscoe</i> | Антиоксиданты (фенолы, флавоноиды) | Метод экстракции настоем | 4 г порошка имбиря разводили в 100 мл горячей воды с температурой ±100 °С и ждали около 10 минут. | 24 |

Из данных таблицы 2 выявлено, что проведение мацерации характерно для выделения флавоноидов, для которых характерно настаивание, мацерацией можно выделять и флаволигнаны, алкалоиды и фенольные соединения может перколяцией.

1.2.1 Ускоренная экстракция растений растворителем

Ускоренная экстракция растворителем (Accelerated solvent extraction – ASE) приобрел большое значение из-за его преимуществ, таких как низкая потребность в растворителе, высокая производительность и относительно меньшие затраты времени. Более высокие температура и давление растворителя свидетельствуют о благоприятном состоянии операций ASE. Этот метод является более надежным методом экстракции растворителем, чем мацерация или экстракция в Сокслете. Есть примеры, подтверждающие значительную производительность ASE. Например, было обнаружено, что ASE лучше справляется с извлечением липофильных и гидрофильных фитохимических веществ из малиновых выжимок по сравнению со сверхкритической жидкостной экстракцией. В ASE влияние температуры и времени экстракции на выход экстракции было значительно меньше, но было восстановлено 25% липофильных и гидрофильных соединений по сравнению с выходом 15% в сверхкритической жидкостной экстракции [25]. В этом методе экстракционная ячейка из нержавеющей стали заполняется образцом, затем заполняется растворителем и помещается между слоями инертного кремнезема, разделенными целлюлозной фильтровальной бумагой. Система нагревается при повышенной температуре и давлении в течение заданного времени, условия способствуют экстракции за счет повышенного коэффициента диффузии и пониженной вязкости. Экстракт собирают во флаконы и ячейки очищают, закачивая свежий растворитель и азот. Инертный упаковочный материал предотвращает образование агрегатов растительной матрицы, которые могут блокировать систему [26]. Некоторые недавние применения ASE представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Ускоренная экстракция растворителями различных растений

| Вид растения (ботаническое или общее название) | Основные соединения | Оптимальные условия | Ссылки |
|--|---------------------|---|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Малина обыкновенная | Фенолы | Температура 70°C и давление 103 бар. | 25 |
| Кокаиновый куст | Алкалоиды (кокаин) | Температура 80 °C, давление 20 МПа, время экстракции 10 мин. | 27 |

Продолжение таблицы 3

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|--|--|----|
| Апельсин, маракуйя, арбуз, салат-латук. | Фенольные кислоты и флавоноиды | Более высокая температура (200 °С) благоприятствует фенолам, а более низкая температура (63 °С) благоприятствует флавоноидам. | 28 |
| Авокадо | Фенолы | Температура 200°С | 29 |
| Ячмень | Фенолы и углеводы | Температура 160 °С, давление 150 бар, скорость потока 0,005 л/мин и время экстракции 2 мин. | 30 |
| Стевия ребаудиана | Стевиоловые гликозы | Температура 100°С, время экстракции 4 мин и 1 цикл. | 31 |
| Морковь | Каротиноиды | Температура 60°С, время экстракции 15 мин за три цикла. | 32 |
| Восковой ячмень | β-глюканы и фенольные соединения | Температура 151 °С, время экстракции 21 мин, 16% этанол. | 33 |
| Анжелика (китайская, остролобая, гигантская) | Бутилидендигидрофталид, 4-гидрокси-4-метил-2-пентанон и 9,12-октадекановая кислота | Растворитель н-гексан, температура экстракции 80°С, давление 1500 атм, статический цикл 2 мин, статическое время 10 мин. | 34 |
| Виды пассифлоры | Фенольные соединения (в основном флавоноиды) | Температура 80 °С, 64% (мас.) этанола, пять циклов экстракции, 10 минут на цикл, 3 г растительного материала. | 35 |
| Люцерна | Пестициды | Время нагрева 5 минут, время статики 10 минут, промывка растворителем 50%, 3 статических цикла, время продувки 120 с, температура 80 °С и давление 1500 фунтов на квадратный дюйм. | 36 |
| Плоды лимонника | Четыре лигнана (шизандрин, схизандрол В, дезоксисхизандрин, схизандрин В) | 87% этиловый спирт, температура 160 °С, время экстракции 10 минут, давление 1500 фунтов на квадратный дюйм, объем промывки 60%, один цикл экстракции. | 37 |
| Фенхель | Эфирные масла | Температура 125 °С, время экстракции 7 минут, за 3 цикла. | 38 |

Продолжение таблицы 3

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------|----------------------|--|----|
| Микроводоросли | Липиды | Температура 125 °С, время экстракции 3 минуты при трех циклах. | 39 |
| Сорго | Фенольные соединения | Температура 150 °С с использованием смеси 50 и 70% этанола/воды (по объему). | 40 |

Резюмируя данные таблицы 3, можно предположить, что полярные соединения, такие как флавоноиды и их гликозиды, фенольные кислоты, лигнаны экстрагируются этиловым спиртом 70% и выше и экстракция проводится в течение долгого промежутка времени, для выделения неполярных компонентов характерно температура свыше 125 °С и в течении 3-7 минут.

Эффективность метода ASE также критически зависит от растворимости фитохимикатов в растворителе. Обычно высокая растворимость увеличивает степень экстракции и, таким образом, выход фитохимических веществ. Однако для достижения лучших выходов необходимы характеристики одинаковой полярности растворенного вещества и растворителя, такие как комбинация полярного растворенного вещества и растворителя и неполярные комбинации растворенного вещества и растворителя. Известно, что смесь растворителей показала лучшие выходы. Примечательно, что фенолы извлекаются лучше при экстракции смесью умеренно полярных растворителей из-за умеренно полярной природы фенолов. Фактически, фенолы имеют более кислую природу, чем спирты, из-за полярности связи *O – H*. Полярность фенолов усиливается наличием бензольного кольца, что приводит к слабости связи *O – H*, что облегчает отделение иона водорода. Поэтому при использовании полярных растворителей легко получают фенолы. Этот метод оптимизирует как температуру, так и давление для быстрого завершения экстракции менее чем за час.

Таким образом, этот метод экстракции зависит в основном от таких параметров, как растворители, повышенная температура экстракции и давление, и его легко оптимизировать для быстрой экстракции.

1.2.2 Микроволновая экстракция растительного сырья

Микроволновая экстракция (СВЧ) представляет собой новейший способ извлечения натуральных продуктов, в процессе экстракции которых используются микроволны и растворители. Частота СВЧ находится в диапазоне от 300 МГц до 300 ГГц. В процессе экстракции микроволны нагревают растворитель и растительную ткань, улучшая кинетику экстракции. Микроволны нагревают образец, напрямую воздействуя на полярные молекулы. Преобразование энергии из микроволн в тепло включает дипольное вращение. Нагрев прямо пропорционален диэлектрической

проницаемости растворителей [40]. Вязкость растворителя существенно влияет на процесс экстракции, поскольку более низкая вязкость облегчает дисперсию ионов и, следовательно, сольватацию [41]. Процесс экстракции включает диффузию растворителей в образец, последующее отделение растворенного вещества от функционального центра и, наконец, высвобождение растворенного вещества в растворителе. Этот метод хорош для сохранения биологической активности экстрактов. Например, оптимизация СВЧ в экстракте зеленого чая подтвердила улучшение антиоксидантной активности фитосоединений и улучшило общее содержание фенолов и целевое качество цвета экстрактов [42].

Фитохимические вещества, такие как флавоноиды, полифенолы и сапонины, экстрагированные с помощью СВЧ, являются полярными соединениями, а микроволны напрямую воздействуют на эти соединения, что делает экстракцию весьма эффективной. Доступно несколько прогрессивных и надежных инструментов и методов СВЧ, таких как микроволновая экстракция без растворителя и микроволновая экстракция под давлением [43].

Нагревание высушенного растительного материала воздействует на мельчайшие следы влаги в растительных клетках. Когда микроволны нагревают влагу внутри растительной клетки, происходит испарение. Когда в высушенных растительных клетках происходит испарение, на клеточные стенки создается значительное давление, тем самым расталкивая клеточные стенки изнутри. Таким образом, клеточная стенка удлиняется и в конечном итоге разрывается, выделяя биологически активные компоненты. Этот процесс увеличивает выход веществ.

Замачивание растительного материала в подходящем растворителе перед СВЧ дает дополнительные результаты. Растворитель дополнительно способствует гидролизу гликозидных (эфирных) связей целлюлозы до растворимых фракций. Повышенная температура также увеличивает фитохимический выход, улучшая проникновение растворителя в клеточные стенки.

Мощность микроволнового излучения и время экстракции — это другие параметры, влияющие на эффективность экстракции в СВЧ, помимо температуры. Также было замечено, что полярные растворители, такие как этанол или вода, могут способствовать нагреву смеси растворителя и образца из-за высокой диэлектрической проницаемости. Таким образом, для извлечения термолабильных веществ, требующих относительно более низких температур, целесообразно использовать растворители с более низкой диэлектрической проницаемостью. Растительный материал погружают в прозрачный для микроволнового излучения растворитель, такой как n-гексан, чтобы сохранить термолабильные фитохимические вещества [44].

СВЧ имеет много преимуществ по сравнению с традиционными методами экстракции растворителем. СВЧ является быстрым методом, требует меньшего количества растворителя, экономичен и имеет более высокую скорость экстракции. Однако этот экстракционный метод больше подходит для

относительно небольших фенольных молекул, например, кверцетина, изофлавинов с их особенностями стабильности в диапазоне микроволновых температур.

Следует отметить, что СВЧ наиболее подходит для получения фитосоединений, которые массово теряются при использовании традиционных методов. Например, при переработке пищевых продуктов флавоноиды теряются в значительных количествах. Таким образом, СВЧ полезен для экстракции флавоноидов, добавляемых в качестве пищевых добавок. Кроме того, большинство экстрактов, полученных с использованием традиционных методов, содержат помехи при хроматографическом анализе [45].

1.2.3 Ультразвуковая экстракция растительного сырья

Ультразвук (УЗ) — это электромагнитные волны с более высокими частотами, чем звуковые волны, слышимые человеческим ухом. Диапазон используемых ультразвуков составляет 20-2000 кГц. Он движется через среду, в которой происходят расширения и сжатия, следуя волновой природе. Механический эффект акустической кавитации от ультразвука увеличивает площадь поверхности контакта растворителей с образцами растений и проницаемость клеточных стенок. Образование пузыря, его рост и схлопывание называется кавитацией. Некоторые исследования показали, что используемая частота может изменить и благоприятно повлиять на экстракцию соединений из образца [46].

Интересно, что в работе авторов наблюдался более высокий выход фенольных соединений при более низкой частоте 40 кГц, чем при 120 кГц [47]. Такое наблюдение побуждает исследования одновременно оценивать ультразвуковые параметры для повышения и оптимизации эффективности экстракции. Исследование с использованием УЗ показало, что экстракция фенолов из корневищ *Sparganii* с помощью 75,3% этилового спирта в течение 40 минут дает более высокие выходы по сравнению с экстракцией с растворителем [48]. Метод ультразвуковой экстракции извлекает биологически активные соединения, полагаясь на механическое воздействие ультразвука на стенки растительных клеток. Механическое воздействие ультразвука усиливает поверхностный контакт между молекулами растворителя и матрицей растительного образца. Таким образом, ультразвук модифицирует и разрушает физические и химические характеристики растительного сырья, ускоряет высвобождение фитохимических веществ и еще больше усиливает движение массы системы растворителей в растительные клетки [49].

УЗ являются важнейшим методом выделения биологически активных соединений, о чем свидетельствует его широкое применение. Очень важным свойством УЗ, которое заслуживает особого внимания, является то, что он сохраняет природу соединений, которые разлагаются при повышенных температурах. Например, каротиноиды, фенольные соединения и витамин С были извлечены из таких специй, как имбирь, чеснок и куркума, без изменения их химической структуры.

Кроме того, УЗ использовались в сочетании с другими методами экстракции, чтобы сократить время экстракции. Например, гидротропная экстракция с помощью ультразвука оказалась гораздо более устойчивой альтернативой, чем гидротропная экстракция, благодаря сокращению времени экстракции и снижению концентрации гидротропа. Кроме того, природа используемого растворителя также влияет на УЗ. Использование ионных жидкостей вместо обычных органических растворителей с помощью ультразвуковой экстракции улучшает процесс. Например, выход экстракции каротиноидов из апельсиновых корок увеличился в четыре раза с $7,88 \pm 0,59$ мкг/г при использовании растворителя ацетона до $32,08 \pm 2,05$ мкг/г при использовании ионной жидкости тетрафторбората 1-н-бутил-3-метилимидазолия [50]. Как и в случае с ионными жидкостями, использование эвтектических растворителей в УЗ позволило повысить выход экстракции фитосоединений. Например, глубокоэвтектические растворители в сочетании с УЗ эффективно извлекают более 97% флавоноидов из ростков гречихи [51]. Аналогичным образом, при экстракции антоцианов из винного осадка эвтектические растворители оказались более эффективными и действенными, чем подкисленный этиловый спирт [52].

Сообщения об экстракции показали, что экстракция с помощью ультразвука является экологически чистым и дешевым методом по сравнению с традиционными методами экстракции фитохимических веществ. В УЗ сокращено время экстракции, низкие потребности в энергии, а также используется меньшее количество растворителей. УЗ обладает уникальной особенностью извлечения зеленых экстрактов в концентрированной форме без остаточных растворителей, примесей и дефектов. Потенциал экстракции резко повышается за счет использования ионных жидкостей в качестве растворителей. Минимизация времени и температуры процесса имеют решающее значение для извлечения термолабильных фитохимических веществ, таких как фенольные соединения, что является еще одной привлекательной особенностью этого метода.

1.3 Методы экстракции *Prunella vulgaris* L. и биологическая активность

Химический состав растений рода *Prunella vulgaris* L. очень разнообразный, в основном, низкомолекулярные соединения (монотерпеноиды, флавоноиды, фенилпропаноиды, стероиды, антрахиноны, кумарины, дубильные и другие соединения), для которых применялись различные методы экстракции и растворители.

В таблице 4 представлены традиционные методы дефлегмации, мацерации, перемешивания, а также эффективные методы экстракции, включая ультразвуковую, сверхкритическую флюидную и глубокую эвтектическую экстракцию растворителем, которые ранее не рассматривались. Ультразвуковая экстракция — простая, эффективная и недорогая альтернатива традиционным методам экстракции. Принцип эффективного применения ультразвука связан с

проявлением акустической кавитации, возникающей при создании высокой интенсивности акустических волн в жидкости [53]. Процесс экстракции включает два важных физических механизма: проникновение через клеточные мембраны и удаление содержимого клеток после их разрушения [54]. Авторы Guowen и др. провели ультразвуковую экстракцию плодов чернойголовки для извлечения флавоноидов в ультразвуковой ванне [55]. Параметры экстракции следующие: экстрагент этанольный 20-60% (об/об); соотношение жидкость/твердое от 10:1 до 50:1; время экстракции 10-50 мин, температура экстракции 40-80°C. Результаты показали, что максимальный выход флавоноидов с помощью ультразвуковой экстракции может составлять 3,62% при использовании 41% (по объему) этанола в качестве растворителя и соотношении жидкости и твердого вещества 30:1 (мл/г) в течение 30,5 минут при 79°C. Кроме того, авторы провели ультразвуковую экстракцию мелкоизмельченного *Prunella vulgaris* L. для оценки противовоспалительных [56] и противоопухолевых [57] свойств. Таким образом, Xia и др. представил новый метод экстракции *Prunella vulgaris* L. с использованием глубоких эвтектических растворителей [58]. В этом методе используются природные экстракционные растворители, и он имеет такие преимущества, как более высокая эффективность, экономичность и защита окружающей среды по сравнению с ранее описанными традиционными методами экстракции.

Экстракция с использованием микроволновой активации успешно применяется в мировой практике для получения растительных экстрактов [59–61], однако данные о СВЧ-экстракции чернойголовки обыкновенной в литературе не обнаружены. В связи с этим исследования в этом направлении становятся перспективными и могут иметь высокую новизну.

Таблица 4 – Методы экстракции *Prunella vulgaris* L.

| Метод | Части растения | Растворитель | Соотношение жидкость/твердое вещество | Температура, °C | Время | Ссылка |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------|-------|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Кипячение с обратным холодильником | Воздушно-сухое сырье | деонизированная вода | - | 100 | 2ч | 62 |
| Кипячение с обратным холодильником | Трава | деонизированная вода | - | 70 | 5ч | 63 |
| Кипячение с обратным холодильником | Трава | 70% этанол | 2:19 | - | 1ч | 64 |
| Кипячение с обратным | Трава | 95% этанол | - | 60 | 4ч | 65 |

Продолжение таблицы 4

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|--|-------------------------------------|-----------------|-------|------------|----|
| холодильником | | | | | | |
| Перемешивание | Семена | Метанол | 3:10 | - | 30 мин | 66 |
| Перемешивание | Трава | Метанол гексан этил ацетат | 9:1 | 15-25 | 48ч | 67 |
| Мацерация | Листья, цветки | Метанол деонизированная вода | 2:1 | 15-25 | 16ч 24ч | 68 |
| Мацерация | Воздушно-сухое сырье | 80% метанол | - | 15-25 | - | 69 |
| Мацерация | Целое растение | гексан хлороформ метанол | - | - | - | 70 |
| Настаивание | Листья | деонизированная вода | 1:1 | 80 | 15 мин | 71 |
| СО ₂ -экстракция | Листья | - | - | 30 | 2ч | 72 |
| УЗ | Листья, соцветие-колос | деонизированная вода 70% метанол | 10:1 | 60 | 1ч | 73 |
| УЗ | Трава | - | от 10:1 до 50:1 | 40-80 | 10-50 | 74 |
| Глубокая эвтектическая экстракция растворителем | Вода-глубокий эвтектический растворитель | - | 15 мл | 83 | 42 мин | 75 |

Таким образом, для экстракции биологически активных соединений из *Prunella vulgaris* L. применяются различные растворители (вода, метанол, гексан, хлороформ, этанол различной концентрации), время экстракции от 30 минут до 48 часов, температура 22 - 83 °С, в основном, для экстракции используется надземная часть растений (листья, соцветия, семена) и соотношение растения к растворителю от 1:10 до 1:50, т.е. условия экстрагирования подбираются для каждого класса соединений.

1.3.1 Противовирусная активность *Prunella vulgaris* L.

В работе [76] изучены статьи, сообщающие о выраженной противовирусной активности против ВИЧ и простого герпеса *Prunella vulgaris* L. В другом обзоре сообщается о потенциальном использовании водных растворов *Prunella vulgaris* L. против ВИЧ и вируса Эбола [77].

В литературе имеются данные об активности *Prunella vulgaris* L. в отношении вирусной инфекции SARS-коронавируса 2 (SCoV-2) [78]. Авторы продемонстрировали [79], что водный экстракт *Prunella vulgaris* L. и соединение сурамин проявляют мощный ингибирующий эффект как на дикую,

так и на мутантную (G614) псевдотипированную SCoV-2-SP-опосредованную инфекцию. IC50 для *Prunella vulgaris* L. и сурамина при этом типе инфекции составляет 30 и 40 мкг/мл соответственно. Результаты исследования показали, что сочетание сурамина с *Prunella vulgaris* L. с нейтрализующим антителом против SARS-CoV-2 опосредует более мощный блокирующий эффект в отношении SCoV-2-SP-PV и поэтому может быть использовано в качестве нового противовирусного средства против SCoV-2-PV инфекции.

Gazanfar и др. провели исследование по оценке гепатопротекторного потенциала метанолового, водного и этанольного экстрактов *Prunella vulgaris* L. *in vivo*. Обработка крыс экстрактами показала очень значительное снижение уровня глутаминовой щавелево-уксусной трансминазы в сыворотке, сывороточной глутамат-пировиноградной трансминазы, щелочной фосфатазы, общего уровня сывороточного прямого билирубина ($P < 0,01$) и очень значительное увеличение общего белка ($P < 0,01$) по сравнению с группой токсического контроля. Это было дополнительно подтверждено гистопатологической оценкой, в которой группы, получавшие экстракты и силимарин, имели почти нормальную структуру печени или очень меньшее повреждение печени по сравнению с группой, получавшей парацетамол. Результаты биохимической и гистопатологической оценки показали, что метанольный экстракт оказался наиболее эффективным среди всех экстрактов [80].

1.3.2 Антибактериальная активность *Prunella vulgaris* L.

В таблице 5 представлены новые данные по антибактериальной активности [81, 82]. По данным литературы, метанольный экстракт *Prunella vulgaris* L. обладает выраженным антибактериальным действием и ингибирующей активностью в отношении грамположительных бактерий *in vitro* [83]. Гросан и др. обнаружили, что метанольный экстракт шипов *Prunella vulgaris* L. оказывает практически одинаковое по интенсивности антибактериальное действие как на стандартные штаммы, так и на клинические изоляты [84]. В дополнение к уже опубликованной литературе это позволяет сделать вывод, что антибактериальный эффект метанольных экстрактов достигается в большей степени за счет самого метанола и в меньшей степени за счет экстрагируемых активных соединений [85].

Комаль и др. показали [83] ингибирование роста 38 резистентных изолятов штаммов *Escherichia coli* к спиртовому и водному экстрактам *Prunella vulgaris* L. по сравнению с ципрофлоксацином, офлоксацином, цефиксимом и тобрамицином методом луночной диффузии. Установлено, что водный и спиртовой экстракты оказывают положительное влияние на мультирезистентный штамм *Escherichia coli* отдельно и в сочетании друг с другом. В связи с этим существует вероятность использования *Prunella vulgaris* L. в качестве поддерживающей терапии параллельно со стандартными антибиотиками, применяемыми для лечения инфекций мочевыводящих путей.

Patel и др. [86] в своем исследовании протестировали *in vitro* метаноловые

и петролейные эфирные экстракты *Prunella vulgaris* L. на активность против *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhi*. Аналогичным образом, исследования *in vivo* проводились с использованием перитонита, вызванного *Escherichia coli*, на лабораторных крысах, которым давали аллопатический антибиотик офлоксацин. Результаты сравнивали с теми крысами, которым давали экстракты трав в контролируемых условиях. В результате исследования установлено, что экстракты петролейного эфира проявляют наименьшую антибактериальную активность по сравнению с экстрактами метанола. Метанольные экстракты *Prunella vulgaris* L. эффективно ограничивают рост *Escherichia coli* при 100 мкг/мл, *Bacillus subtilis* при 50 мкг/мл, *Staphylococcus aureus* при 100 мкг/мл, в то время как *Salmonella typhi* продемонстрировала полную устойчивость.

В недавнем исследовании [67] авторы оценили антибактериальную активность метаноловых, этилацетатных и гексановых экстрактов *Prunella vulgaris* L. в отношении *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas aeruginosa*. Метаноловый экстракт проявлял наибольшую антибактериальную активность в отношении *Bacillus cereus*, тогда как гексан в отношении *Salmonella typhimurium*, а этилацетат в отношении *Streptococcus pyogenes*. Можно сделать вывод, что эти экстракты могут быть использованы в будущем в качестве антибактериальных средств для профилактики заболеваний, связанных с этими микробными инфекциями.

Таблица 5 – Антибактериальная активность экстрактов *Prunella vulgaris* L.

| Растворитель | Части растения | Название бактерии | MIC | MBC |
|---------------|----------------|--------------------------------|------------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Орг. часть PV | Трава | <i>S. aureus</i> ATCC3953 | 256 мг/мл | - |
| | | <i>S. aureus</i> ATCC4223 | 128 мг/мл | - |
| метанольная | Листья | <i>K. pneumoniae</i> ATCC13883 | 25 мг/мл | 50 мг/мл |
| | | <i>E. coli</i> ATCC25922 | 50 мг/мл | 50 мг/мл |
| | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 | 12.5 мг/мл | 50 мг/мл |
| | | MRSA ATCC 43300 | 25 мг/мл | 25 мг/мл |
| | цветы | <i>K. pneumoniae</i> ATCC13883 | 25 мг/мл | 25 мг/мл |
| | | <i>E. coli</i> ATCC25922 | 25 мг/мл | 25 мг/мл |
| | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 | 6.25 мг/мл | 25 мг/мл |
| | | MRSA ATCC 43300 | 25 мг/мл | 25 мг/мл |
| водная | Листья | <i>K. pneumoniae</i> ATCC13883 | >50 мг/мл | >50 мг/мл |
| | | <i>E. coli</i> ATCC25922 | >50 мг/мл | >50 мг/мл |
| | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 | >50 мг/мл | >50 мг/мл |
| | | MRSA ATCC 43300 | >50 мг/мл | >50 мг/мл |
| | Цветы | <i>K. pneumoniae</i> ATCC13883 | 50 мг/мл | >50 мг/мл |
| | | <i>E. coli</i> ATCC25922 | >50 мг/мл | >50 мг/мл |
| | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 | 25 мг/мл | >50 мг/мл |
| | | | | |

Продолжение таблицы 5

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------|----------------|--------------------------|-------------|-----------|
| | | MRSA ATCC 43300 | >50 мг/мл | >50 мг/мл |
| водная | Целое растение | <i>E. coli</i> ATCC25922 | 2 мг/мл | - |
| этанольная | Целое растение | <i>E. coli</i> ATCC25922 | 1.33 мг/мл | - |
| этилацетатная | Целое растение | <i>C. perfringens</i> | 1.56 мг/мл | - |
| | | <i>S. aureus</i> | 6.25 мг/мл | - |
| | | <i>E. coli</i> | 0.195 мг/мл | - |
| | | <i>S. marcescens</i> | 6.25 мг/мл | - |
| | | <i>K. pneumoniae</i> | 0.78 мг/мл | - |
| | | <i>P. aeruginosa</i> | 1.56 мг/мл | - |
| гексановая | Целое растение | <i>C. perfringens</i> | 6.25 мг/мл | - |
| | | <i>S. pyogenes</i> | 3.12 мг/мл | - |
| | | <i>S. typhimurium</i> | 1.56 мг/мл | - |
| | | <i>E. coli</i> | 6.25 мг/мл | - |
| | | <i>P. vulgaris</i> | 3.12 мг/мл | - |
| | | <i>P. aeruginosa</i> | 6.25 мг/мл | - |
| метанольная | Целое растение | <i>B. cereus</i> | 1.56 мг/мл | - |
| | | <i>C. perfringens</i> | 6.25 мг/мл | - |
| | | <i>S. marcescens</i> | 6.25 мг/мл | - |

Таким образом, из данных таблицы 5 выявлено, что исследуемые экстракты (водный, этанольный, метанольный, гексановый) из разных частей растения черноголовки обыкновенной обладают выраженной антимикробной активностью, но сравнительно высокой активностью обладают неполярные экстракты, а именно гексановый экстракт.

1.3.3 Противоопухолевая активность *Prunella vulgaris* L.

Для оценки противоопухолевого эффекта дистиллята *Prunella vulgaris* L. использовали набор для подсчета клеток-8 (ССК-8) на раковых клетках из линии клеток плоскоклеточной карциномы полости рта SCC154. Было обнаружено, что водный экстракт *Prunella vulgaris* L. цитотоксичен для раковых клеток SSC154 в зависимости от дозировки [56].

По данным исследования [87], основными компонентами, определяющими противоопухолевые свойства *Prunella vulgaris* L., являются кофейная и розмариновая кислоты. В этом исследовании химиотерапия проводилась в сочетании с таксаном для лечения пациентов с раком молочной железы. Среднее время наблюдения составило 41 месяц. Лечение с *Prunella vulgaris* L. улучшило показатель полного ответа и общее время выживаемости по сравнению с таковыми в контрольной группе ($P < 0,05$). Трехлетняя общая выживаемость среди пациентов экспериментальной и контрольной групп составила 86,5 и 77,2% соответственно ($p < 0,05$). Кроме того, лечение *Prunella vulgaris* L. предотвращает побочные эффекты, а именно нейтрофильную лихорадку и анемию, вызванную химиотерапией. Таким образом, *Prunella vulgaris* L. может быть потенциальным вспомогательным средством при

лечении рака молочной железы.

В исследовании авторов выявлено, что экстракт (концентрированный водный раствор после первоначальной экстракции метанолом) из шипов *Prunella vulgaris* L. обладает зависимым от дозы и времени цитотоксическим и антимиграционным потенциалом у людей на тестируемой клеточной линии аденокарциномы молочной железы, а именно MDA-MB-231, и в то же время в меньшей степени поражая неопухолевые эпителиальные клетки молочной железы [56].

Противоопухолевая активность также была протестирована Hwang и др. с использованием линий раковых клеток HepG2, HT29, A549, MKN45 и HeLa. Этаноловый экстракт *Prunella vulgaris* L. (при 50 и 100 мкг/мл), гексановая фракция (при 100 мкг/мл) и фракция хлороформа (при 50 и 100 мкг/мл) ингибировали пролиферацию клеток, но не при 10 мкг/мл. Напротив, в группах, получавших 10 мкг/мл этанольного экстракта или бутаноловой фракции, или 10, 50 и 100 мкг/мл водной фракции, пролиферативный эффект превышал 10%. Результаты показали, что этаноловый экстракт *Prunella vulgaris* L. оказывает значительное цитотоксическое действие на различные линии раковых клеток [82].

Feng и др. обнаружили, что 60% этанольный экстракт *Prunella vulgaris* L. ингибирует рост опухоли у мышей C57BL/6, увеличивает активность супероксиддисмутазы и снижает уровень малонового диальдегида в сыворотке мышей с опухолями. Эти результаты свидетельствуют о том, что 60%-ный этанольный экстракт *Prunella vulgaris* L. обладает высокой антиоксидантной активностью как *in vitro*, так и *in vivo*. Этот экстракт может играть важную роль в профилактике и лечении опухолей и быть полезным в качестве пищевой добавки или противоопухолевого средства [88].

In vitro экстракт *Prunella vulgaris* L. обладает активностью против клеток миомы матки (ММ) человека. Он не проявляет лекарственной токсичности и способствует апоптозу клеток ММ человека, а также ингибирует переход клеток ММ из стадии G0/G1 в стадию G2, где происходит репликация ДНК. *In vivo* *Prunella vulgaris* L. обладает активностью против ММ, снижает концентрацию эстрогена и прогестерона, подавляет уровни экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона через сигнальный путь эстрогена, а также способствует апоптозу клеток ММ за счет снижения уровней экспрессии белка сурвивина и Bcl-2 и повышение уровня экспрессии каспазы-3 и Bax посредством митохондриально-опосредованного пути апоптоза [82].

1.4 Биологически активные вещества *Prunella vulgaris* L.

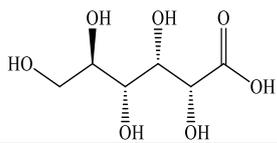
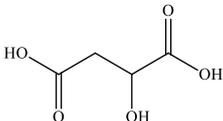
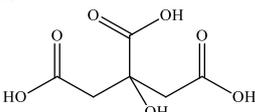
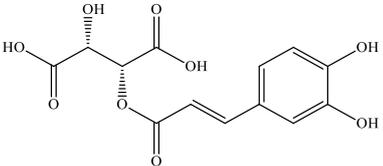
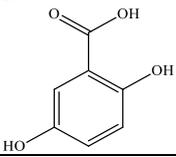
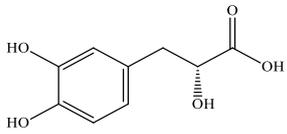
Химический состав черноголовки обыкновенной весьма разнообразен и богат различными классами соединений: моно- и сесквитерпеноидами, фенольными кислотами, флавоноидами, полисахаридами, пентациклическими тритерпенами, высшими жирными кислотами, витаминами, азотсодержащими соединениями, дубильными веществами.

Исследовано, что надземная часть черноголовки обыкновенной содержит

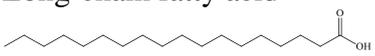
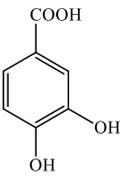
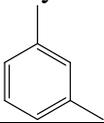
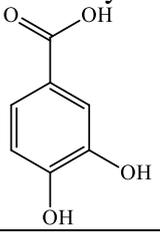
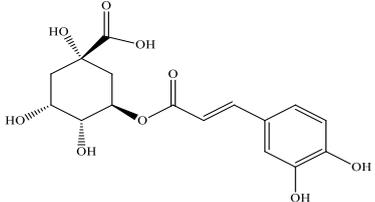
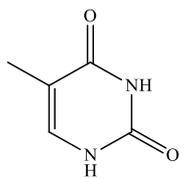
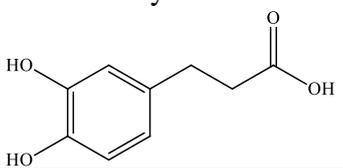
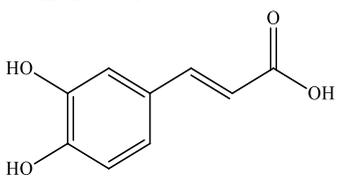
достаточно большое количество флавоноидов в гликозидной форме (гиперозид, рутозид), а также выявлено меньшее количество агликонов (кверцетол, кемпферол, апигенин) [56]. Одним из важных флавоноидов является гиперозид, который смягчает окислительное повреждение, вызванное выработкой АФК. Среди тритерпенов черноголовки наиболее распространены урсоловая и олеаноловая кислоты, обладающие антиоксидантной, противоаллергической, противовоспалительной и противоопухолевой активностью. Известно, что полисахариды черноголовки являются потенциальными антиоксидантными и иммуномодулирующими агентами для дополнительной медицины. Сообщалось, что *Prunella vulgaris* L подавляет иммунный ответ посредством регуляции иммунных клеток.

Сравнительный состав *Prunella vulgaris* L в зависимости от экстрагируемой части растения и выбранного растворителя, описанный в литературе представлен в таблице 6.

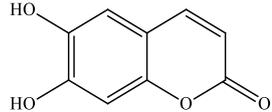
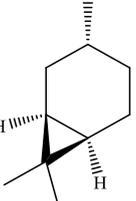
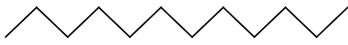
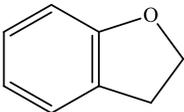
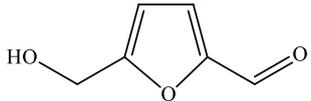
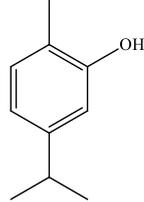
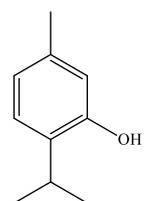
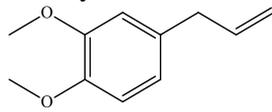
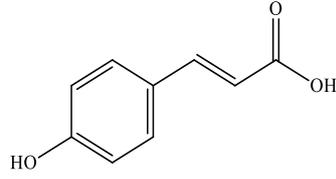
Таблица 6 - Химический состав *Prunella vulgaris* L.

| № | Химическое название | RT | Метод | Растворитель |
|---|--|--------------|---------------------------|---------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | Gluconic acid  | 0.88 | UPLC-ESI-MS | Вода |
| 2 | Malic acid  | 1.05 | UPLC-ESI-MS | Вода |
| 3 | Citric acid  | 1.26 6.58 | UPLC-ESI-MS UPLC-MS/MS | Вода Этанол/Вода |
| 4 | Caftaric acid  | 2.10 | HPLC-UV/MS | Метанол/Вода |
| 5 | Gentisic acid  | 2.15 | HPLC-UV/MS | Метанол/Вода |
| 6 | Danshensu  | 2.62 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |

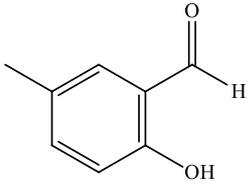
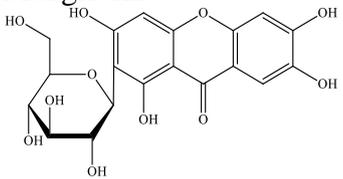
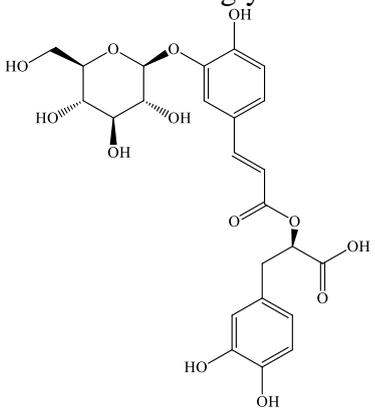
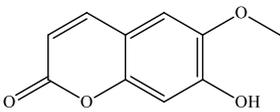
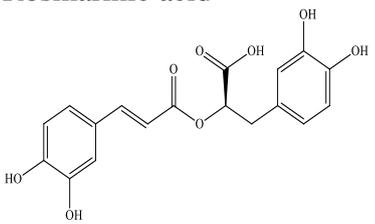
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|--|-------|------------------------------|--------------|
| 7 | Long-chain fatty acid  | 2.65 | UPLC-ESI-MS | Вода |
| 8 | Protocatechuic acid  | 3.25 | UPLC-ESI-MS | Вода |
| | | 5.79 | HPLC-ESI-MS/M | Вода |
| 9 | <i>m</i> - deonized methylbenzene  | 4.76 | GC-MS | этилацетат |
| 10 | Protocatechuic aldehyde  | 5.85 | UPLC-ESI-MS | Вода |
| | | 7.06 | HPLC-ESI-MS/M | Вода |
| 11 | Chlorogenic acid  | 5.01 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| | | 5.6 | HPLC-UV/MS | Метанол/Вода |
| | | 13.01 | HPLC | Этанол/Вода |
| 12 | Thymine  | 5.39 | GC-MS | Метанол |
| 13 | Deonized hydrocaffeic acid  | 5.65 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 14 | Caffeic acid  | 5.6 | HPLC-UV/MS | Метанол/Вода |
| | | 6.67 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| | | 8.46 | HPLC-ESI-MS/M UPLC-ESI-MS | Вода |
| | | 9.17 | | Вода |
| | | 14.08 | HPLC | Этанол/Вода |
| | | 20.99 | HPLC | Метанол |

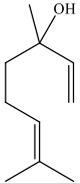
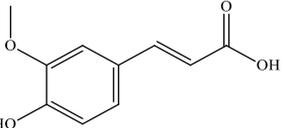
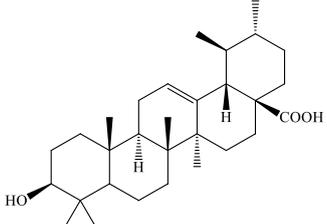
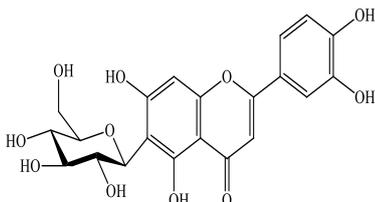
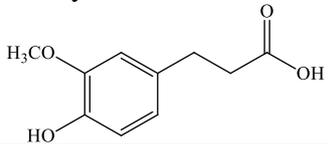
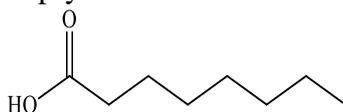
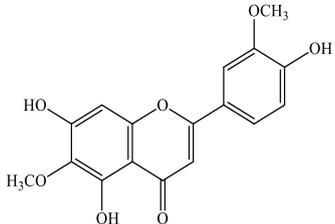
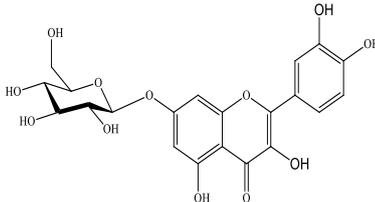
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|---|------|------------|--------------|
| 15 | <p>Esculetin</p>  | 5.85 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 16 | <p>Trans-caran</p>  | 6.13 | GC-MS | гексан |
| 17 | <p>dodecane</p>  | 6.2 | GC-MS | Этилацетат |
| 18 | <p>Coumaran</p>  | 6.43 | GC-MS | Метанол |
| 19 | <p>5-hydroxymethylfurfural</p>  | 6.53 | GC-MS | Метанол |
| 20 | <p>Carvacrol</p>  | 7.05 | GC-MS | Гексан |
| | | 7.14 | GC-MS | Этилацетат |
| 21 | <p>Thymol</p>  | 7.05 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 7.14 | GC-MS | Гексан |
| 22 | <p>Eugenol methylether</p>  | 8.25 | GC-MS | Метанол |
| 23 | <p>P-Coumaric acid</p>  | 8.7 | HPLC-UV/MS | Метанол/Вода |

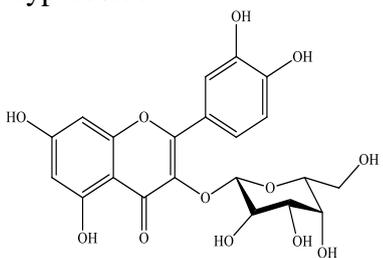
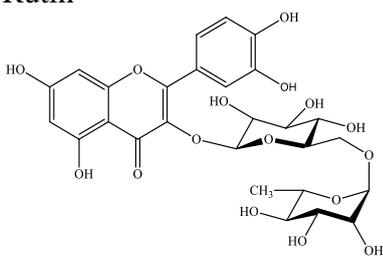
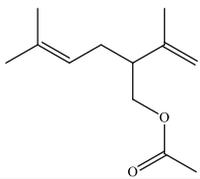
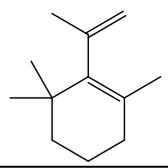
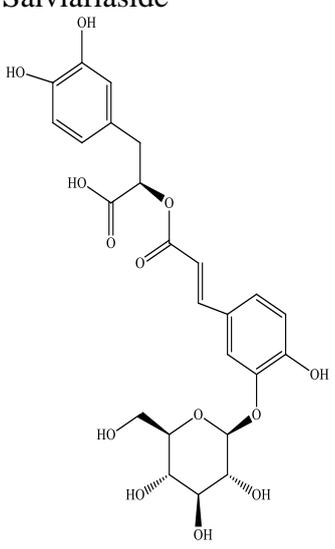
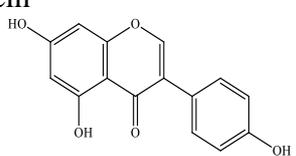
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|---|--|--|---|
| 24 | 2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde  | 8.7 | GC-MS | Метанол |
| 25 | D-Limonene  | 8.5 9.61 | GC-MS GC-MS | Вода Этилацетат |
| 26 | Mangiferin  | 9.96 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 27 | Rosmarinic acid glycoside  | 10.05 | UPLC-ESI-MS | Вода |
| 28 | Scopoletin  | 10.78 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 29 | Rosmarinic acid  | 10.88 12.08 20.51 21.09 33.1 | UPLC-ESI-MS HPLC-ESI-MS/M HPLC UPLC-MS/MS HPLC | Вода Вода Этанол/Вода Этанол/Вода Метанол |

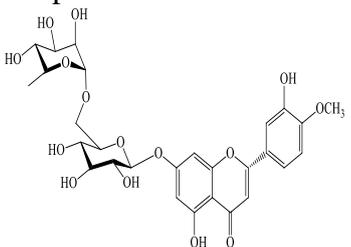
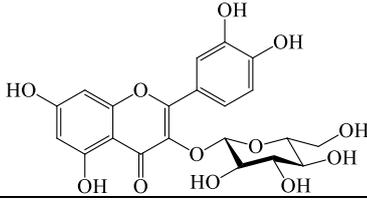
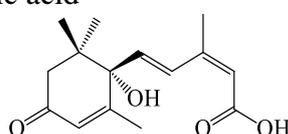
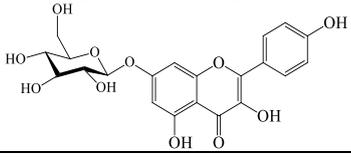
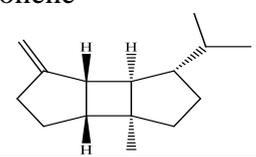
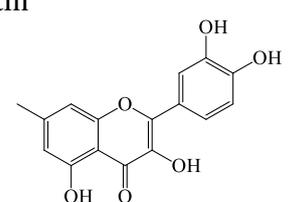
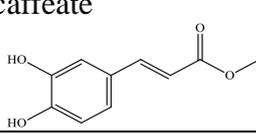
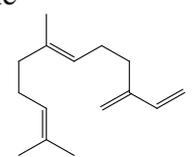
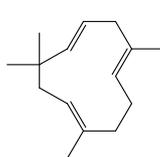
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|---|---------------|--------------------------|-----------------------------|
| 30 | Linalool  | 11.48 | GC-MS | Этилацетат |
| 31 | Ferulic acid  | 12.10 12.2 | UPLC-MS/MS HPLC-UV/MS | Этанол/Вода Метанол/Вода |
| 32 | Ursolic acid  | 12.10 | UPLC-ESI-MS | Вода |
| 33 | Isoorientin  | 12.47 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 34 | Deonized hydroferulic acid  | 14.05 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 35 | Caprylic acid  | 14.13 | GC-MS | Этилацетат |
| 36 | Jacoesin deonized  | 14.58 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 37 | Cynaroside  | 15.88 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |

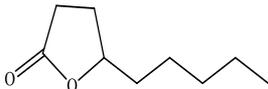
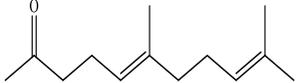
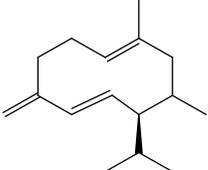
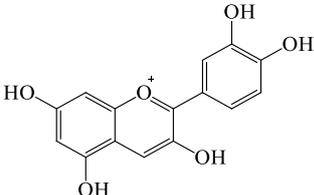
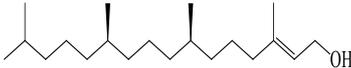
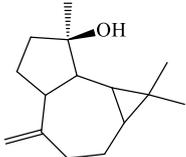
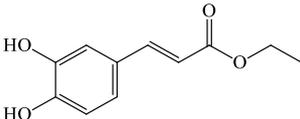
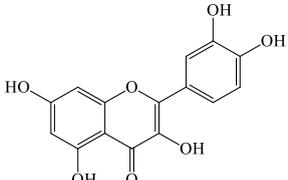
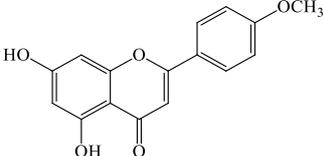
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|---|---------------------------------------|---|---|
| 38 | <p>Hyperoside</p>  | <p>16.26</p> <p>18.6</p> | <p>UPLC-MS/MS</p> <p>HPLC-UV/MS</p> | <p>Этанол/Вода</p> <p>Метанол/Вода</p> |
| 39 | <p>Rutin</p>  | <p>16.92</p> <p>19.76</p> <p>20.2</p> | <p>UPLC-MS/MS</p> <p>HPLC</p> <p>HPLC-UV/MS</p> | <p>Этанол/Вода</p> <p>Этанол/Вода</p> <p>Метанол/Вода</p> |
| 40 | <p>Lavandulol acetate</p>  | <p>17.26</p> | <p>GC-MS</p> | <p>Этилацетат</p> |
| 41 | <p>β-Cyclocitral</p>  | <p>17.31</p> | <p>GC-MS</p> | <p>Этилацетат</p> |
| 42 | <p>Salviaflaside</p>  | <p>17.76</p> <p>29.2</p> | <p>UPLC-MS/MS</p> <p>HPLC</p> | <p>Этанол/Вода</p> <p>Метанол</p> |
| 43 | <p>Genistein</p>  | <p>18.5</p> | <p>UPLC-MS/MS</p> | <p>Этанол/Вода</p> |

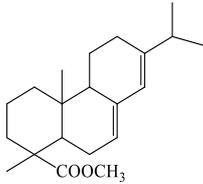
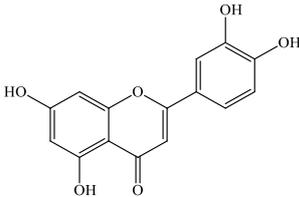
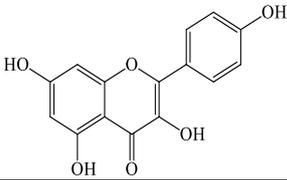
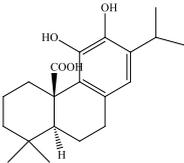
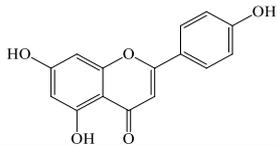
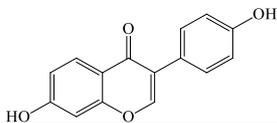
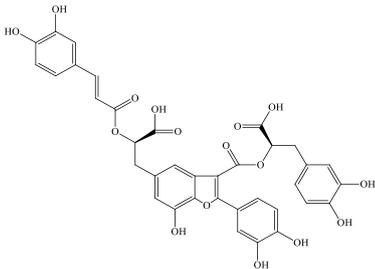
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|--|---------------|--------------------|-----------------------------|
| 44 | <p>Hesperin deonized</p>  | 19.08 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 45 | <p>Isoquercitrin</p>  | 19.6 | HPLC-UV/MS | Метанол/Вода |
| 46 | <p>Abscisic acid</p>  | 19.19 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 47 | <p>Kaempferol-7-O-glucoside</p>  | 19.56 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 48 | <p>β-Bourbonene</p>  | 19.98 | GC-MS | Этилацетат |
| 49 | <p>Quercetin</p>  | 20.24 23.0 | HPLC HPLC-UV/MS | Этанол/Вода Метанол/Вода |
| 50 | <p>Methyl caffeate</p>  | 21.22 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 51 | <p>β-Farnesene</p>  | 21.56 | GC-MS | Этилацетат |
| 52 | <p>Humulene</p>  | 22.01 | GC-MS | Этилацетат |

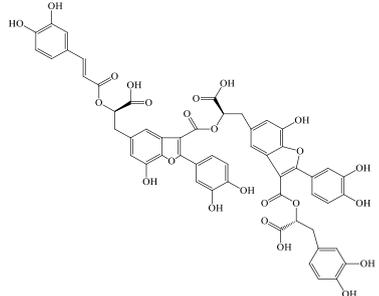
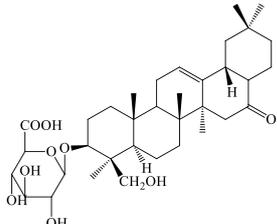
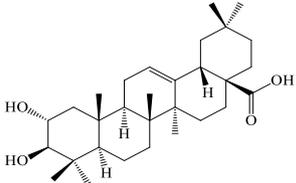
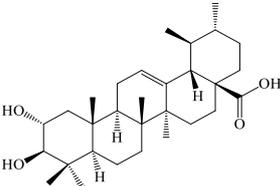
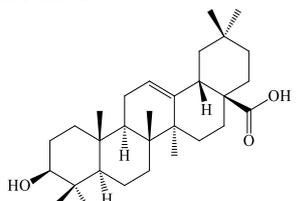
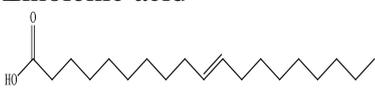
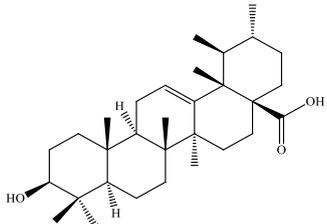
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|--|----------------|----------------|-----------------------|
| 53 | <p>γ-Nonalactone (Prunolide)</p>  | 22.31 | GC-MS | Этилацетат |
| 54 | <p>Geranyl acetone</p>  | 22.53 | GC-MS | Этилацетат |
| 55 | <p>Germacren D</p>  | 22.66 | GC-MS | Этилацетат |
| 56 | <p>Cyanin deonized</p>  | 24.97 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 57 | <p>Phytol</p>  | 25.13 25.15 | GC-MS GC-MS | Этилацетат Метанол |
| 58 | <p>Spathulenol</p>  | 25.23 | GC-MS | Этилацетат |
| 59 | <p>Ethyl caffeate</p>  | 25.34 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 60 | <p>Quercetol</p>  | 26.8 | HPLC-UV/MS | Метанол/Вода |
| 61 | <p>Myristic acid</p>  | 27.15 | GC-MS | Этилацетат |
| 62 | <p>Acacetin</p>  | 27.81 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |

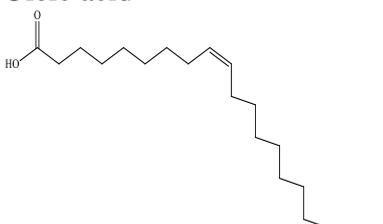
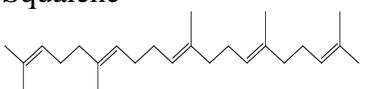
Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|---|----------------|--------------------------|-----------------------------|
| 63 | Methyl rosinate  | 28.44 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 64 | Pentadecane  | 28.80 | GC-MS | Этилацетат |
| 65 | Luteolin  | 29.64 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 66 | Kaempferol  | 31.6 32.79 | HPLC-UV/MS UPLC-MS/MS | Метанол/Вода Этанол/Вода |
| 67 | Ethyl rosemary  | 32.38 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 68 | Hexadecane  | 23.18 32.53 | GC-MS GC-MS | Этилацетат Этилацетат |
| 69 | Apigenin  | 33.1 33.51 | HPLC-UV/MS UPLC-MS/MS | Метанол/Вода Этанол/Вода |
| 70 | Daidzein  | 35.93 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 71 | Heptadecane  | 24.84 32.53 | GC-MS GC-MS | Этилацетат Этилацетат |
| 72 | Amolsamic acid A  | 40.2 | HPLC | Метанол |

Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|--|----------------------------------|---------------------------------------|--|
| 73 | Amolsamic acid B  | 41.6 | HPLC | Метанол |
| 74 | Prunelloside A  | 46.09 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 75 | Maslinic acid  | 46.33 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 76 | Corosolic acid  | 46.74 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 77 | Oleanolic acid  | 46.95 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 78 | Linolenic acid  | 25.90 25.92 25.99 47.02 | GC-MS GC-MS GC-MS UPLC-MS/MS | Метанол Этилацетат Гексан Этанол/Вода |
| 79 | Ursolic acid  | 47.21 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |

Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----|---|-------|------------|-------------|
| 80 | Linoleic acid  | 25.70 | GC-MS | Метанол |
| | | 25.72 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 25.79 | GC-MS | Гексан |
| | | 47.45 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| | | 51.18 | GC-MS | Этилацетат |
| 81 | Palmitic acid  | 20.73 | GC-M | Метанол |
| | | 20.74 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 20.8 | GC-MS | Гексан |
| | | 29.84 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 45.67 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 47.90 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 82 | Oleic acid  | 32.15 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 48.01 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 83 | Stearic acid  | 26.52 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 26.55 | GC-MS | Метанол |
| | | 48.82 | UPLC-MS/MS | Этанол/Вода |
| 84 | Squalene  | 38.7 | GC-MS | Этилацетат |
| | | 67.36 | GC-MS | Этилацетат |

Таким образом, из данных таблицы 6 выявлено, что химический состав *Prunella vulgaris* L зависит от выбранного растворителя при экстракции растения, из неполярного гексанового экстракта выделены монотерпеноиды, из этилацетатного — сесквитерпеноиды, из полярных (этанольный, метанольный, водный) выделяются флавоноиды, полифенольные соединения, жирные кислоты и т.д. [89].

Prunella vulgaris L. имеет богатый химический состав, включающий тритерпеноиды и их гликозиды, флавоноиды, фенольные кислоты и их гликозиды, органические кислоты, стерины, эфирные масла, полисахариды, а

также дубильные вещества. Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять механизмы, а также выявить метаболиты, ответственные за тот или иной тип активности. Согласно современным мировым тенденциям, БАВ необходимо извлекать и очищать с использованием передовых экономичных и «зеленых» технологий. Например, в литературе не обнаружено данных об использовании микроволновой активации для получения экстрактов *Prunella vulgaris* L. Этот метод экологически безопасен в плане сокращения времени экстракции в 5-20 раз по сравнению с традиционными. Использование микроволновой экстракции имеет высокий научный потенциал за счет выделения и получения новых веществ, различного состава, количественного содержания БАВ из растительного сырья, в частности из *Prunella vulgaris* L., что может обуславливать и другие свойства, отличные от уже имеющихся данных.

Несмотря на богатый химический состав и высокую биологическую активность, *Prunella vulgaris* L. не так широко применяется в медицине, что вызывает научный интерес к разработке еще не разработанных лекарственных форм на основе *Prunella vulgaris* L. (например, мазь, гель, крем, сироп, порошки, суппозитории, суспензии и другие).

Таким образом, *Prunella vulgaris* L. является мощным и широко распространенным ресурсом с огромным потенциалом развития. Поэтому возникает необходимость дополнительного изучения всех аспектов выделения, приготовления и идентификации БАВ, методов экстракции, выбора растворителя, условий эксплуатации для получения лекарственных форм максимального высвобождения, а также определения стандартов качества и обеспечения качества продукции.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая работа выполнена в школе фармации Медицинского университета Караганды.

Материалы и методы, использованные для проведения научных исследований, соответствуют требованиям Государственной фармакопеи Республики Казахстан, фармакопеи Евразийского экономического союза, European Pharmacopoeia, The United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, нормативных документов, регламентирующих качество лекарственных средств в Республике Казахстан.

2.1 Материалы исследования

Объекты исследования

Объектом исследования являлись надземные части (листья, соцветия и стебли) *Prunella vulgaris* L. (рисунок 1), собранные в фазу цветения на территории гор Улытау (Улутауская область, Республика Казахстан; GPS-координаты: N 48°65'149"; E 66°98'571"; 365 м над уровнем моря). Дата сбора: 2 декада июля, 2020 г (Приложение 3).

Экстракты, полученные из черноголовки обыкновенной (фармацевтическая субстанция) методами: ультразвуковой экстракцией (сухой порошок коричневого цвета с характерным запахом).

Лекарственная форма - гель (коричневый цвет и характерный аромат)

Растворители:

В экспериментальных исследованиях использованы химические реактивы и растворители квалификации «о.с.ч.», «х.ч.», «ч.д.а.».

Этанол 96%. C₂H₆O. (Mr 46.07). 102500. [64-17-5]. (ГФ РК т. 2, с. 581).

Вода очищенная. H₂O. (Mr 18.02). 1095500. [7732-18-5]. (ГФ РК, т.2, с. 168).

Ацетонитрил. C₂H₃N. (Mr 41.05). 1000700. [75-05]. (ГФ РК т.1, с. 339).

Этилацетат. C₄H₈O₂. (Mr 88.1). 1035300. [141-78-6]. (ГФ РК т.1, с. 448).

Гексан. C₆H₁₄. (Mr 86.2). 1042600. [110-54-3]. (ГФ РК I, Т. 1, с. 348).

Хлороформ. CHCl₃. (Mr 1.49). 1018600. [67-66-3]. (ГФ РК т. 1, с. 440).

Реактивы: 10% раствор тимола (ГФ РК, т. 2, с. 424) в конц. H₂SO₄, метиленовый синий (ГФ РК, т. 2, с. 387), конц. H₂SO₄ (ГФ РК, т. 2, с. 413), реактив Люголя (ГФ РК т.1 с. 370), % спиртовой раствор FeCl₃ (ГФ РК т. 1 с. 364), 10% спиртовой раствор K₂Cr₂O₇ (ГФ РК т. 1, с. 369), 1 реактив Драгендорфа (ГФ РК т.1, с. 370).

Препараты сравнения:

Бензилпенициллин натрия. C₁₆H₁₇N₂NaO₄S. (Mr 356,4). (ГФ РК т.2, с.133). Диски индикаторные с бензилпенициллином.

*Нистатин. C₄₇H₇₅NO₁₇. (Mr 926). (ГФ РК т.3, с.513). Диски индикаторные с нистатином. Только для *in vitro* диагностики.*

Бутилгидроксианизол. C₁₁H₁₆O₂. (Mr 180,3). (ГФ РК т.2 с. 148).

Цефтриаксон натрия. C₁₈H₁₈N₈Na₂O₇S₃ (Mr 662). (ГФ РК т.2, с. 553).

Дактиномицин (Актиномицин D). C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆. (Mr 1255,42). (USP

35, Official Monographs, 2012, p.2803).

Аскорбиновая кислота. $C_6H_8O_6$ (M_r 176,1) (ГФ РК т.2 с. 113).

Диклофенак натрия таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$. (ГФ РК Т. 2, с.625).

Тест-объекты:

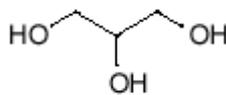
Эвригалинный рачок Artemia salina L. - (Branchiopoda, Crustacea). Односуточные науплии, на этапе перехода ортонауплиуса в метанауплиус. Артемии на этом этапе развития используются как тест-объект в исследовании при разработке предельно допустимой концентрации веществ (ГОСТ 53886 – 2010 (ИСО 14669: 1999)).

Эталонные штаммы микроорганизмов типовых культур (АТСС) Американской коллекции: грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538), *Bacillus subtilis* (АТСС 6633), грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* (АТСС 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 9027) и дрожжевой грибок *Candida albicans* (АТСС 10231).

Экспериментальные животные. При изучении острой токсичности исследуемого экстракта использовались беспородные белые мыши обоих полов массой 18,0-30,0 г и белые крысы обоих полов массой 190-300 г.

Вспомогательные вещества:

Глицерин (Glycerinum, Glycerolum), $C_3H_8O_3$, M_r 92,10.



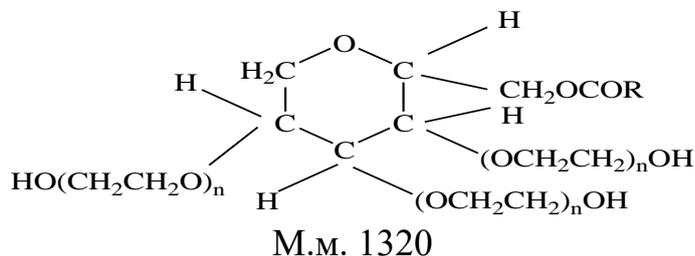
Субстанция содержит не менее 98,0 % и не более 101,0 % $C_3H_8O_3$.

Густая жидкость, бесцветная или почти бесцветная, прозрачная, сиропообразная, сладкого вкуса, без запаха. Гигроскопичен.

Смешивается со спиртом этиловым 95 % и водой очищенной во всех соотношениях, слабо растворим в ацетоне, мало растворим в эфире диэтиловом, практически не растворим в жирных маслах.

Твин-80 (Twinum-80, Polysorbatum 80 полисорбат 80)

Качество регламентируется требованиями: ГФ РК, стр. 407.



$d_4^{20}=1.0815$, $n_D^{20}=1.4720$, $T_{воспл}=110$.

Твин-80 неионогенное поверхностно-активное вещество, применяемое в качестве солюбилизатора, стабилизатора в фармацевтической промышленности при изготовлении суппозиторий, суспензий, растворов, мазей, инъекционных растворов и других лекарственных форм.

Спирт этиловый 96% (ГФ РК, т.2, с.581)

C_2H_5OH

М.м. 46

Вода очищенная (*Aqua purificata*)

H_2O

М.м.-18

Бесцветная прозрачная жидкость без вкуса и запаха. Качество регламентируется требованиями ГФ РК, т.1, с.182; ГФ РК, т.2. с.30

Карбомер (карбопол) высокомолекулярный полимер акриловой кислоты, гигроскопичный порошок белого или почти белого цвета.

2.2 Методы исследования

Физико-химические, биофармацевтические, технологические, микробиологические и фармакологические методы и приборы использовали, описанные в литературе так и новые методики исследования, описанные в соответствующих разделах диссертационной работы.

Для проведения данных исследований использованы следующие приборы:

- ультразвуковая баня (Digital Ultrasonic Cleaner VGT 1200);
- водяная баня WB-4MS;
- вакуумно-роторный испаритель Лабтех ИР-1ЛТ;
- сканирующий микроскоп (Digital Microscope Levenhuk DTX 30);
- ротационный вискозиметр (Laboao NDJ-1F);
- жидкостной хроматограф с УФ-детектором и масс-спектрометром (Agilent 1260 Infinity HPLC system);
- микроскопы Альтами UNCCD03100KPA с цифровой камерой 3,1 Мпикс ув. 16x4 и 16x10;

Фармакогностическое исследование черноголовки обыкновенной

*Метод определения запасов сырья травы *Prunella vulgaris* L.*

Определения сырьевых запасов *Prunella vulgaris* L. и возможных объемов их изъятия устанавливали урожайность (плотность сырьевых запасов) и ее площадь заросли. Площадь заросли определяли, приравнивая ее очертания к какой-либо геометрической фигуре (квадрату, трапеции, прямоугольнику, кругу) и измеряли параметры (диаметр, длину, ширину), необходимые для расчета площади этой фигуры. При неравномерном расположении растений на территории в виде отдельных пятен в пределах растительного сообщества, сначала определяли площадь всего участка, на котором встречается данный вид, а затем – процент площади этой заросли, занятой изучаемым видом. Определение площади заросли черноголовки обыкновенной выполняли при помощи палетки. Площадь каждой клетки палетки составляла 1 см², что при масштабе плана 1:10000 соответствовало 1 га площади на местности. Оценку урожайности (плотность сырьевых запасов) сырья черноголовки обыкновенной проводили путем процентного соотношения количества растительных ресурсов и площади обследуемой территории. При этом для определения урожайности в расчет не брали всходы, ювенильные или поврежденные экземпляры. По

результатам полевых работ осуществлялась обработка материалов при определении запасов сырья, вычисления урожайности, расчета величины площадей конкретных зарослей и определения величины запаса сырья на них. Все исследования, связанные с идентификацией и описанием изученного сырья на макроскопическом и микроскопическом уровнях, а также заготовкой сырья *Prunella vulgaris* L., проводили в соответствии с ГФ РК, Ф ЕАЭС и принципами GACP.

Макроскопический анализ сырья. При анализе морфологических показателей исследовали особенности внешнего вида, формы, структуры поверхности, цвета побегов, листьев, соцветий и цветков [90]. Образцы сырья фотографировали при помощи Digital Microscope Levenhuk DTX 30, сканирующего микроскопа NSZ608T, камера Sony Exmor CMOS Sensor. Полученные фотографии обрабатывали в программе Paint 10.1.

При описании морфологии отдельных органов использовали принципы, изложенные в трудах В.Н. Вехова, Л.И. Лотовой [91-92], а также описанные в Государственной фармакопее Республики Казахстан.

Микроскопический анализ сырья. Собранные в природе образцы сырья (листья, стебли и цветки) фиксировали в смеси глицерин: спирт 96%-ный: вода дистиллированная в соотношении 1:1:1 (смесь Страуса-Флеминга) [93-94]. Поперечные срезы листа, черешка и стебля изготавливали вручную. Для стебля микропрепараты изготавливали из средней части генеративных побегов; для листа – центральная часть фрагмента конечного листочка; для черешка – середина. Также делали поверхностные препараты эпидермисов листьев и венчика цветка. Срезы просветляли при помощи глицерина. Препараты фотографировали на сканирующем микроскопе Альтами с цифровой камерой 3,1 Мпикс, увеличение 16x4 и 16x10. Обработку фотографий и измерения микропрепаратов выполняли в программе Altami Studio с использованием Paint 10.1. При описании анатомического строения использовали принципы, изложенные в трудах Н.А. Анели (1975), Л.И. Лотовой (2007), P.J. Rudall (2007) и других [95-97].

Гистохимическое исследование. Гистохимическое исследование проводили для поперечных срезов листа, черешка и стебля, поверхностных препаратов венчика и чашечки цветка. Гистохимический анализ сырья проводился в соответствии с указаниями в ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Для идентификации отдельных групп БАВ использованы следующие реактивы: метиленовый синий (эфирное масло); 10% раствор тимола и концентрированной H_2SO_4 (полисахариды), реактив Люголя (крахмал); раствор ванилина в концентрированной H_2SO_4 (сесквитерпеновые лактоны); 10% спиртовой раствор $K_2Cr_2O_7$ (фенольные соединения); 1-% спиртовой раствор $FeCl_3$ (флавоноиды), реактив Драгендорфа (алкалоиды) [98-101]. Фотографии с результатами гистохимического исследования выполнены с помощью микроскопа «Биомед-4» с окулярами 10 ×, 20 ×, линзами 4 ×, 10 ×, 20 ×, 40 ×.

Измельченность сырья. ГФ РК, т. I, с. 562. «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.

Определение потери в массе при высушивании осуществляли согласно требованиям ГФ РК, т. I, 2.8.17 и Ф ЕАЭС 2.1.2.31.

Определение золы общей проводили по ГФ РК, т. I, 2.4.16 и фармакопейному методу Ф ЕАЭС 2.1.4.16.

Определение золы нерастворимой в 10 % кислоте хлороводородной. Определение золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте двух видов лабазника осуществляли по ГФ РК, т. I, 2.8.1. и фармакопейному методу Ф ЕАЭС 2.1.8.1 и Ф ЕАЭС 2.3.1.4.

Определение удельной массы, объемной массы, насыпной массы, пористости, порозности, свободного объема слоя сырья проводили в соответствии с методиками, приведенными в учебном пособии Мининой [102].

*Определение содержания основных групп БАВ в надземной части *Prunella vulgaris* L.*

Количественное определение суммы флавоноидов в ЛРС определяли спектрофотометрическим методом по следующей методике [103]:

К 1,0 г (точная навеска) надземной части растительного сырья приливали 70% этиловый спирт 100 мл и на водяной бане экстрагировали, в колбе со шлифом объемом 250 мл, при температуре кипения экстрагента в течение 60 мин. Извлечение отфильтровывали через бумажный фильтр, получив тем самым раствор А.

Вместимостью 25 мл в мерную колбу помещали 2,5 мл раствора А, приливали 5% раствор алюминия хлорида 5 мл в 70% этиловый спирт и через 10 мин - 3% раствор уксусной кислоты 1 мл, объем раствора доводили 70% этиловым спиртом до метки, перемешивали и оставляли на 30 мин (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 396 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя как раствор сравнения 2,5 мл раствора А, 1 мл 3% раствора уксусной кислоты, доведенный до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл 70% этиловым спиртом.

Содержание суммы флавоноидов, в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле (1):

$$X=(A\times 100\times 25\times 100)/(A_1\times a\times 2,5\times (100-W)) \quad (1)$$

где А - оптическая плотность раствора Б; А₁ - удельный показатель

поглощения цинарозида с алюминия хлоридом в спирте 70% при длине волны 396 нм, равный 345; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

Количественное определение суммы фенольных кислот в ЛРС определяли спектрофотометрическим методом по следующей методике [104]:

Около 0,01 г (точная навеска) СО розмариновой кислоты, предварительно выдержанной в эксикаторе не менее 48 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 50 мл спирта этилового 50%-ного, после чего объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл полученного раствора и доводят его объем до метки спиртом этиловым 50%-ным, перемешивают. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту ($X\%$) вычисляют по формуле (2):

$$X\% = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W) \cdot A_0 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 40000}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (2)$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность СО розмариновой кислоты; a – масса навески травы змееголовника молдавского, г; a_0 – масса навески СО розмариновой кислоты, г; W – потеря в массе при высушивании травы змееголовника молдавского, %.

Валидация методики проведена по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность: сходимость и воспроизводимость. Специфичность методики характеризовали совпадением максимумов поглощения спиртового извлечения из травы черноголовки обыкновенной и раствора СО розмариновой кислоты при длине волны 327 ± 2 нм. Определение линейности проводилось на семи уровнях концентраций СО розмариновой кислоты в диапазоне 2,3–10,5 мгк/мл (рис. 3). По результатам проведенных исследований установлено, что зависимость носит линейный характер, коэффициент корреляции составил 0,999, что близко к единице и соответствует критерию приемлемости (не ниже 0,995).

Количественное определение эфирного масла в ЛРС осуществляли, в массо-объемных процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье или препарат. [105]:

Колбу соединяют с паропроводной трубкой, заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резинового шланга, оканчивающегося воронкой (приемник Клевенджера), нагревают до кипения и выдерживают при слабом кипении в течение времени, указанного в соответствующей ФС. После окончания перегонки и охлаждения колбы с сырьем измеряют объем слоя эфирного масла, рассчитывают его содержание в анализируемом объекте. Содержание эфирного масла в абсолютно сухом сырье

в массо-объемных процентах (X) вычисляют по формуле 3:

$$X = \frac{V \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot (100 - W)} \quad (3)$$

где: V - объем эфирного масла, мл;

a - навеска лекарственного растительного сырья/препарата, г;

W - влажность лекарственного растительного сырья/препарата, %.

Количество полисахаридов в ЛРС определяли гравиметрическим методом [103]:

Навеску массой около 10,0 г (точная навеска) растительного сырья помещали в колбу вместимостью 500 мл, прибавляли 200 мл воды очищенной, нагревали на кипящей водяной бане и экстрагировали в течение 1 часа. После извлечения фильтровали через тканевый фильтр и экстракцию повторяли ещё 1 раз. Извлечения объединяли и фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» под вакуумом. Фильтрат упаривали на роторном испарителе до 1/5 исходного объема, после чего прибавляли трехкратный объем 96 % этилового спирта и выдерживали в течение 12 часов в холодильнике для полного осаждения полисахаридного комплекса. Затем осадок отфильтровывали через предварительно доведенный до постоянной массы бумажный фильтр, осадок на фильтре промывали горячим 96 % этиловым спиртом, затем ацетоном. Фильтр с осадком высушивали до постоянной массы и взвешивали.

Определение количественного содержания минерального состава. Анализ на содержание тяжелых металлов в растительном сырье происходил на базе аккредитованной химико-аналитической лаборатории ТОО «Азимут Геология», атомно-эмиссионным приближенно-количественным с индуктивно-связанным плазменным методом определения. Условия проведения испытаний: температура - 21 °С; влажность - 72%; давление - 713 мм рт.ст. Нормативный документ на метод определения: МВИ КЗ.07.00.01378-2016.

Содержание радионуклидов согласно ГФ РК т. I, с. 566. Лекарственное растительное сырье и экстракты должны выдерживать требования, которые регламентируются Приказом Министра здравоохранения РК № ҚР ДСМ-71 от 2 августа 2022 года «Об утверждении гигиенических нормативов к обеспечению радиационной безопасности». Содержание радионуклидов в лекарственных растениях составляет по Cs-137 – 400 Бк/кг и менее, Sr-90 – 200 Бк/кг и менее, в БАД-ах на растительной основе (в том числе экстрактах) по Cs-137 – 200 Бк/кг и менее, Sr-90 – 100 Бк/кг и менее.

Определение радионуклидов проводилось радиохимическим методом без озоления в бета-спектре в испытательном центре «ЭкоЭксперт» (г. Караганда, Казахстан).

Экстрактивные вещества в лекарственном растительном сырье. В качестве экстрагента использовали воду и этанол (30%, 50%, 70%, 96%). Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье проводили по ГФ РК т. I, с. 566 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье».

Микробиологическая чистота. Определение микробиологической чистоты лекарственного растительного сырья черноголовки обыкновенной проводили 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.

Описание сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. в соответствии с ГФ РК т. I, с. 556-558. Общая статья «Экстракты» и ГФ РК т. I, 2.8.8.

Растворимость сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. в соответствии с ГФ РК т. I, 1.4, с.25.

Идентификация фенольных соединений и флаваноидов в сухом экстракте *Prunella vulgaris* L. Качественная реакция в соответствии с НД.

Потеря в массе при высушивании сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. в соответствии с ГФ РК т. I, 2.8.17 и Ф ЕАЭС 2.1.8.16.

Тяжелые металлы сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. в соответствии с ГФ РК т. I, 2.2.23 и Ф ЕАЭС 2.1.2.41.

Микробиологическая чистота сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. 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

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 Р, 26:14:3.

Количественное определение. Количественное определение розмариновой кислоты в сухом экстракте *Prunella vulgaris* L. проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1260 Infinity HPLC system» в соответствии с НД.

Процентное содержание розмариновой кислоты (X) в сухом экстракте листьев *Prunella vulgaris* L. рассчитывали по формуле 4:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 100}{S_n \cdot m_1 \cdot 1.100} \quad (4)$$

где, S_1 -значение площади пика розмариновой кислоты;

m_0 -масса стандартного образца розмариновой кислоты, г.;

m_1 -масса сухого экстракта листьев *Prunella vulgaris* L., 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).

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 [106]. 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°С; 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 [106].

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 [106].

Описание в соответствии с ГФ РК, т.1, Ф ЕАЭС 2.1.6.0.

Однородность определяли микроскопированием в соответствии с ГФ РК, т.1, Ф ЕАЭС 2.1.9.10.

Герметичность определяли согласно требованиям ГФ РК, т.1, с. 529.

pH. Проводили потенциометрическим методом в соответствии с ГФ РК, т. 1, 2.9.7, Ф ЕАЭС 2.1.2.3.

Количественное определение определяли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в соответствии с ГФ РК, т.1, 2.2.28.

Скрининг образцов сухих экстрактов черноголовки обыкновенной на противовоспалительную и антиоксидантную активность.

Определение противовоспалительной активности. Эксперименты проводили на 48 белых крысах массой 240–260 г, которые содержались в виварии при естественном световом режиме, свободном доступе к воде и пище, на стандартном рационе. Предварительно животные прошли карантин в течение 3 дней.

В целях стандартизации перед опытом животных не кормили в течение

суток. Животных содержали при температуре 18-20,5 °С в условиях естественного светового цикла на стандартной диете, при свободном доступе к воде и пище. Для достоверной оценки характера, частоты и степени проявления противовоспалительного действия и проведения статистической обработки экспериментальных данных животные были предварительно рандомизированы, разделены на 8 групп по 6 штук.

Острое воспаление моделировали субплантарной инъекцией в апоневроз задней лапы крыс раствором каррагенина 1% (Carrageenan) в объеме 0,1 мл. Испытуемые объекты вводили в дозе 25 мг/кг внутривентриально через зонд однократно за 1 час до индукции воспаления. В качестве растворителя использовали дистиллированную воду. В качестве препарата сравнения использовали Диклофенак натрия (Меркле, Германия) 10 мг/кг внутривентриально через зонд однократно за 1 час до индукции воспаления.

Степень воспалительной реакции определяли через 4 часа после воспроизведения воспаления по изменению объема лапы с помощью онкометра.

Противовоспалительную активность выражали в процентах угнетения отека на пике воспаления по сравнению с контролем.

Определение железо - восстанавливающего потенциала [FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power assay)]. Оценка железо-восстанавливающей активности анализируемого объекта (FRAP) - метод основан 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 $K_4[Fe^{2+}(CN)_6]$, 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.

Одним из необходимых мероприятий по обеспечению и поддержанию антиоксидантного статуса организма является контроль содержания ионов Fe^{2+} и интенсивности процессов окисления. Этот контроль осуществляется с использованием метода определения железовосстанавливающего 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:



К одному миллилитру исследуемых экстрактов в диапазоне концентраций от 0 до 1 мг/мл добавляют 2,5 миллилитра фосфатного буфера (с концентрацией 0,2М и рН 6,6) и 2,5 миллилитра 1% раствора гексацианоферрата (III) калия. Полученную смесь инкубируют в течение 25 минут при температуре 50°C, после чего реакцию останавливают, добавляя 2,5

миллилитра 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем смесь центрифугируют в течение 3 минут при скорости 1,5 оборотов в минуту. Верхний слой объемом 2,5 миллилитра смешивают с 2,5 миллилитра дистиллированной воды и 0,5 миллилитра 0,1% раствора хлорида железа (III). Оптическая плотность измеряется при длине волны $\lambda = 700$ нм.

Определение АОА методом ингибирования реакции 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилрадикала (DPPH) анализируемыми веществами. (Стандарт – Butylatedhydroxyanisole ВНА). К 0,1 миллилитра спиртового раствора исследуемых растворов в диапазоне концентраций 0,25; 0,5; 0,75 и 1,0 мг/мл добавляли к 3 миллилитрам раствора радикала с концентрацией 6×10^{-5} М. Следует указать на выполнение условия методики: реакция должна протекать в темноте, т.к. при выраженной АОА исследуемых веществ обесцвечивание фиолетового раствора происходит мгновенно, поэтому не имеется возможности зафиксировать время протекания реакции ингибирования. В связи с этим при дневном свете невозможно измерить оптическую плотность растворов на спектрофотометре. С целью пролонгирования времени протекания реакции пробирки для центрифугирования помещаются в штатив, который предварительно заворачивается в черный полиэтилен для создания темноты реакционной смеси. После перемешивания растворы оставляли в темноте на 30 мин., далее измеряли ОП при 520 нм. Значения АОА (%) определяли по формуле: $АРА = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100(\%)$, где A_0 - значение оптической плотности контрольной пробы; A_t - величина оптической плотности при определенной концентрации исследуемого раствора.

*Определение антимикробной активности сухих экстрактов *Prunella vulgaris* L.* Для оценки антимикробной активности применялся диско-диффузионный метод. Исследование включало анализ антимикробной активности указанных образцов в отношении грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538) и *Bacillus subtilis* (АТСС 6633), а также грамотрицательных штаммов, включая *Escherichia coli* (АТСС 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 9027), и дрожжевого грибка *Candida albicans* (АТСС 10231) с использованием диско-диффузионного метода. В качестве контрольных препаратов использовали бензилпенициллин для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка *C. albicans*.

Для проведения исследования, была подготовлена взвесь, содержащая стандартное количество жизнеспособных бактериальных клеток. Эту взвесь засеивали на поверхность питательной среды в чашки Петри. Затем на стерильные диски из фильтровальной бумаги наносили по 0,01 мл образца. Диски с препаратами размещали в равномерном круге на расстоянии 2,5 см от центра каждой чашки (по 6 дисков на одну чашку). Посевы инкубировали в течение 24 часов при температуре 36°C. После инкубации, вокруг дисков образовывались зоны полного и частичного подавления роста бактерий, которые затем измеряли для оценки результатов.

Цитотоксичность образцов оценивали в тесте выживаемости личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach). Эксперименты проводились на личинках

2-х дневного возраста в условиях культивирования *in vitro*. Личинки выращены погружением яиц морских рачков *Artemia salina* (Leach) в искусственную морскую воду и инкубировали 48ч при температуре 37°C. Навеску исследуемого образца растворили в 2 мл этанола, затем из этого раствора брали по 500 мкл (3 параллели), 50 мкл (3 параллели), 5 мкл (3 параллели). После испарения этанола в каждый флакон добавили по 5 мл искусственной морской воды. Таким образом, если начальная масса навески составляла 2 мг, то конечные концентрации образца составили 100 мкг/мл, 10 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно, каждой концентрации в 3 повторениях. В каждый флакон с образцом с помощью пастеровской пипетки сажали по 10 личинок морских рачков *Artemia salina* 2-дневного возраста. После этого все флаконы оставляли при комнатной температуре на свету на 24 часа. По истечении 24 часов пересчитывали выжившие и погибшие личинки.

В качестве препарата сравнения использовали препарат Актиномицин Д. Контроль – этанол в эквивалентных количествах.

Для определения цитотоксической активности рассчитывали процент погибших личинок рачков (А, %) по сравнению с контролем по формуле (5):

$$(X_k - X_o) / X_k * 100\%, \quad (5)$$

где X_k - количество выживших личинок рачков в контроле;

X_o - количество выживших личинок рачков в опыте.

Изучение острой токсичности. Эксперименты поставлены в соответствии с требованиями по изучению новых фармакологических веществ [107]. В экспериментах использованы беспородные белые мыши. Животные находились на обычном рационе вивария. Каждая группа состояла из 16 животных, всего исследовано 64 мышей. Контрольные и опытные животные находились в аналогичных условиях и имели одинаковую исходную среднюю массу, контролируемую еженедельным взвешиванием для коррекции вводимой дозы вещества.

Опыты выполняли, соблюдая необходимые правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Содержание животных соблюдалось в полном соответствии с санитарными нормами, с постоянным доступом к пище и воде. За 24 часа до введения препарата, животных лишали доступа к пище. После введения исследуемого образца животные получали доступ к пище через 6 часов.

Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности составляет 14 суток. В течение первого дня после введения образца животные были постоянно наблюдаемы. Регулярно регистрировались общее состояние животных, их поведение, уровень и характер двигательной активности, а также изменения в массе тела.

Анализ микробиологических методов включал в себя: проведение испытания на микробиологическую чистоту готовых лекарственных форм в соответствии с методикой, описанной в Фармакопее Евразийского

экономического сообщества (Ф ЕАЭС 2.3.1.4) и фармакопее Республики Казахстан (ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13).

После получения результатов была проведена статистическая обработка данных с использованием вариационно-статистического анализа, при котором использовался критерий Стьюдента. Этот анализ проводился в соответствии с требованиями, установленными Государственной фармакопеей Республики Казахстан, European Pharmacopoeia, The United States Pharmacopoeia и British Pharmacopoeia.

Для проведения расчетов использовались электронные программы, такие как Microcal Origin и Excel.

3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ И ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ *PRUNELLA VULGARES L.*

3.1 Запасы растительного сырья *Prunella vulgare L.*

Черноголовка обыкновенная – многолетнее растение из семейства Губоцветные. В Казахстане растет в светлых лесах (чаще всего березовых, осиновых, смешанных сосново-березовых), на лугах, в кустарниковых зарослях, около родников, по берегам рек, по окраинам болот, реже – по обочинам дорог.

Ареал вида (рисунок 1) охватывает такие горные системы, как Улытау, Западный Алтай, Тарбагатай, Курчумский Хребет, Джунгарское Алатау, Терской Алатау, Киргизское Алатау, Каратау, Кокшетауский бор, Семипалатинские ленточные боры, а также долину реки Иртыш в Восточно-Казахстанской и Абайской областях и Костанайские ленточные боры.

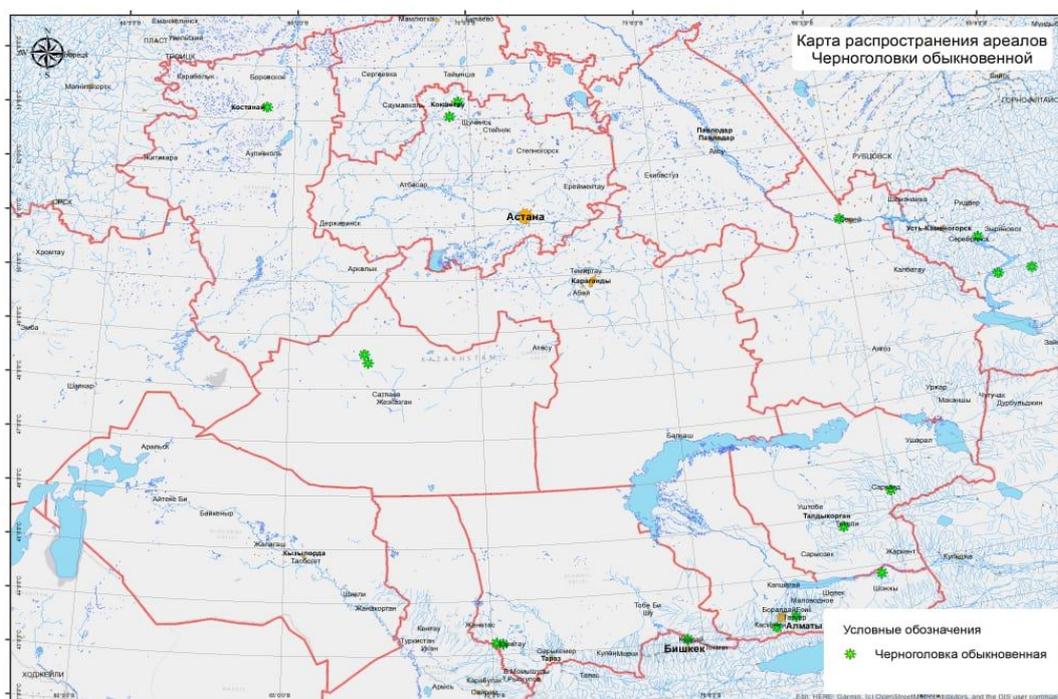


Рисунок 1 - Ареал произрастания черноголовки обыкновенной на территории Казахстана

Вид является гигромезофитом, требователен к плодородию почвы и условиям увлажнения.

В Восточном, Центральном и Северном Казахстане отмечены заросли черноголовки обыкновенной, пригодные для заготовки сырья (таблица 7).

Таблица 7 - Площади зарослей и ресурсы черноголовки обыкновенной на территории Казахстана

| Место произрастания | Площадь, га | Урожайность, кг/га | Эксплуатационный запас, кг | Объем возможного сбора сырья, кг |
|--|-------------|--------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Горы Улытау, Улутауская область | 15,2 | 115±23 | 1748 | 1048 |
| Западный Алтай, окрестности г. Риддер, Восточно-Казахстанская область | 35,6 | 156±31 | 5554 | 3332 |
| Алтай, окрестности г. Усть-Каменогорск, Восточно-Казахстанская область | 41,2 | 140±30 | 5768 | 3461 |
| Кокшетауский бор, Акмолинская область | 12,8 | 105±14 | 1344 | 806 |
| Итого | 104,8 | | 14414 | 8647 |

Таким образом, оценена совокупная площадь зарослей черноголовки обыкновенной на территории Республика Казахстан, которая составила 12,8 - 41,8га, урожайность изменялась 105 - 156 кг/га. Итоговый эксплуатационный запас оценен в 14414 кг, объем возможного сбора – 8647кг.

3.2 Технология заготовки травы *Prunella vulgaris* L.

Сырье *Prunella vulgaris* L. было собрано, высушено, заготовлено и идентифицировано в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Республики Казахстан, Евразийского экономического союза и GACP.

Сбор сырья *Prunella vulgaris* L. (черноголовка обыкновенная) был проведен во второй декаде июля 2020 года в фазе цветения на территории горного массива Улытау (Улутауская область, Республика Казахстан N 48°65'149"; E 66°98'571").

Для идентификации растения использовали сравнение с материалом из гербарного фонда кафедры ботаники НАО «Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова». Гербарный код *Prunella vulgaris* L. (черноголовка обыкновенная) – QAR04149 QAR был использован для подтверждения видовой принадлежности растения с помощью сотрудников кафедры ботаники НАО «Карагандинский университет им. академика Е.А. Букетова» (Приложение И).

Согласно рисунку 2, разработана технологическая схема для заготовки травы *Prunella vulgaris* L.

Краткое изложение технологического процесса.

Сбор травы *Prunella vulgaris* L. для исследований проводится вручную. Собирают надземные части растения, отрезая их на 7-10 см от поверхности

почвы. Рекомендуется сушить собранное сырье на открытом воздухе в тени при температуре окружающей среды (23-25 °С), раскладывая на стеллажи с марлей и периодически переворачивая (не реже 2 раз в сутки). Высушенное сырье проверяют на готовность, обращая внимание на треск при изломе стеблей и растирание листьев до получения порошка.

Измельченное сырье упаковывается в многослойные бумажные мешки, на которых наклеивается этикетка с информацией на государственном и русском языках. На этикетке указывается название страны-производителя, предприятия-изготовителя, его товарный знак и адрес, название сырья, масса нетто, условия хранения, дата изготовления и срок годности. Упаковка и транспортная тара соответствуют требованиям стандарта ГОСТ 17768-90 Е.

Сырье хранится в защищенном от света месте при температуре, не превышающей 25°С.



Рисунок 2 - Технологическая схема заготовки травы *Prunella vulgaris* L.

В результате исследования была разработана технология заготовки травы *Prunella vulgaris* L. и установлены необходимые стандарты для ее упаковки и маркировки (рисунок 2).

3.3 Макроскопический анализ сырья *Prunella vulgaris* L.

Для определения особенностей строения сырья на макроскопическом уровне были проанализированы показатели надземных органов. Результаты изложены в таблице 8.

Таблица 8 – Морфологические показатели надземных органов *Prunella vulgaris* L.

| Показатели | Описание |
|---------------------------------|---|
| 1 | 2 |
| Побеги | <p>Ползучие, генеративные побеги - приподнимающиеся и отклоняющиеся, травянистые, прямые. Цвет от светло-зеленого до коричнево-зеленого. Листорасположение супротивное. Поверхность стебля ребристая, образует 4 грани.</p>  |
| Опушение побегов | Голые |
| Форма листа | <p>Широкояйцевидный, верхушка тупая, основание клиновидное, край крупно-городчатый. Жилкование – перистое.</p>  |
| Структура верхней стороны листа | Верхняя сторона листа темно-зеленая, шероховатая, с неясно выраженными жилками, голая. |
| |  |

Продолжение таблицы 8

| 1 | 2 |
|---------------------------------------|---|
| <p>Структура нижней стороны листа</p> | <p>Нижняя сторона светло-зеленая, хорошо выражена центральная и боковые жилки, края листовая пластины у высушенного сырья загибаются внутрь. По поверхности отмечены единичные простые трихомы, белого цвета, расположенные вдоль жилок листа, а также точечные эфирномасличные железки.</p>  |
| <p>Форма соцветия</p> | <p>Соцветия верхушечные, колосовидные, реже головчатое, с многочисленными цветками и обрамленное прицветными листьями. Длина 5 - 15(18) см.</p>  |
| <p>Чашечка</p> | <p>Чашечка узко-колокольчатая, правильной формы, в верхней части надрезана на 5 зубцов, длина которых достигает 1/4-1/3 от общей длины; 3-6 мм длиной и до 2,5 мм шириной. Зубцы чашечки заостренные с небольшим остроконечием. Поверхность опушена длинными бесцветными трихомами, расположенными вдоль ребрышек. Цвет – зеленый.</p>  |
| <p>Венчик</p> | <p>Венчик зигоморфный, фиолетово-лилового цвета, длиннее чашечки, неясно делится на 2 губы, нижняя губа с тремя лопастями, верхняя с небольшим шлемом. Поверхность почти голая. На нижней губе белые трихомы отмечены по краю.</p> |

Продолжение таблицы 8

| 1 | 2 |
|---------------|--|
| |  |
| Местообитание | <p>Растет на лугах, вдоль ручьев, по берегам рек и озер, под пологом лиственных и смешанных лесов, в кустарниковых зарослях. Мезогигрофит.</p> |

На основании анализа морфологических показателей отдельных органов были определены диагностические признаки сырья черной головки обыкновенной:

1. Стебли: форма стебля на поперечном срезе, расположение листьев, отсутствие опушения.

2. Листья: форма и размер листовых пластин, форма края, верхушки и основания, структура поверхности, степень опушения, расположение трихом и железок.

3. Соцветие: форма и размеры, расположение прицветных листьев.

4. Чашечка цветка: форма, цвет, форма зубцов и степень опушения.

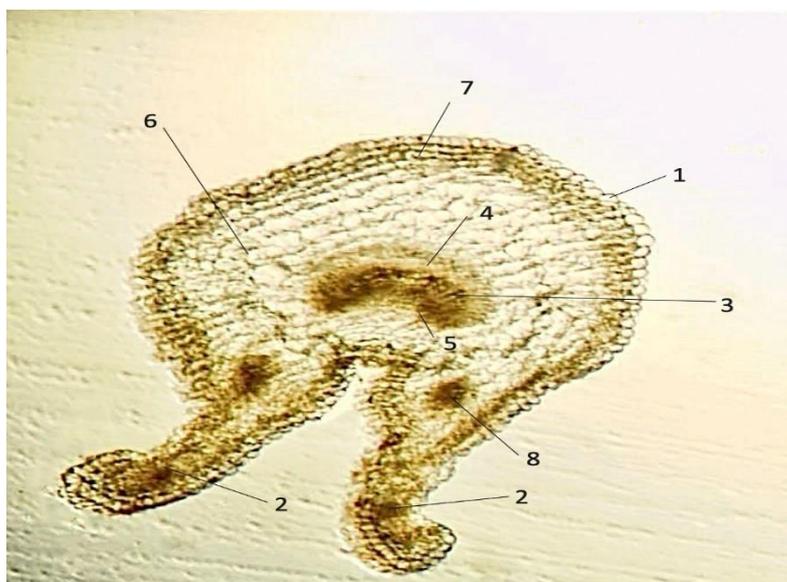
5. Венчик цветка: форма, окраска венчика, окраска и расположение трихом [108].

3.4 Микроскопический анализ сырья *Prunella vulgaris* L.

Черешок листа Prunella vulgaris L. на поперечном срезе

Округлый или овальный с (отогнутыми) ушками в нижней части, по периметру стебель покрыт однослойной эпидермой; клетки ее округло-прямоугольные, четковидно-утолщенные. В верхней части черешка под эпидермой залегает двухслойная хлоренхима, которая состоит из более крупных клеток. В центральной части находится крупный проводящий пучок, бобовидной формы, а также два маленьких проводящих пучка - в области «ушек».

Маленькие проводящие пучки округлые или слегка овальной формы. Каждый пучок состоит из участка флоэмы, который ориентирован к верхней стороне, и участка ксилемы, который ориентирован к нижней стороне. Остальная центральная часть мезофилла заполнена рыхлыми паренхимными клетками. В нижней части черешка, в области «ушек» расположены участки колленхимы (рисунок 3).



1-эпидермис, 2-колленхима, 3 – проводящий пучок, 4 – флоэма, 5 – ксилема, 6 – мезофилл, 7 – хлоренхима, 8 – маленький проводящий пучок

Рисунок 3 - Черешок листа *Prunella vulgaris* L. на поперечном срезе. Ув. 4x16

Поверхностный препарат листа Prunella vulgaris L.

Клетки нижнего и верхнего эпидермиса имеет аналогичный план строения. Клетки нижнего эпидермиса крупные, овальной формы с сильно извилистыми и утолщенные стенками; верхнего эпидермиса – со слабо-извитыми стенками.

В области жилок листа клетки эпидермиса – прозенхимные и почти прямостенные.

По поверхности листа, как с нижней, так и с верхней стороны разбросаны многочисленные устьица. Устьица мелкие, аномоцитного типа (каждое устьице окружено несколькими основными клетками эпидермы одинакового размера).

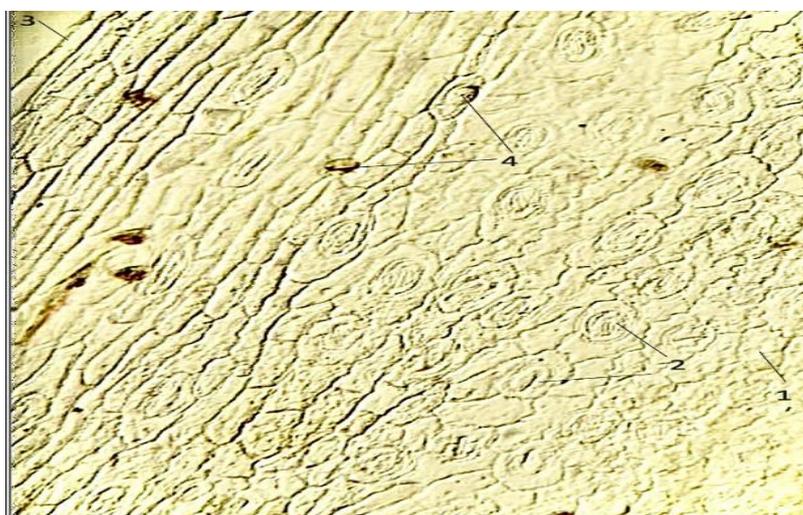
По поверхности листа разбросаны редкие трихомы: простые, одно- и многоклеточные. Трихомы расположены преимущественно в области жилок листа.

Отмечена локализация эфирного масла в виде капель в цитоплазме эпидермальных клеток, а также в виде небольших вместилищ, залегающих под эпидермисом (рисунок 4).



А

1 – основные клетки эпидермиса, 2 – устьица, 3 – пятна эфирного масла, 4 – простая трихома



Б

1 – эпидермис, 2 – устьица, 3 – эпидермис над жилкой листа, 4 – пятна эфирного масла

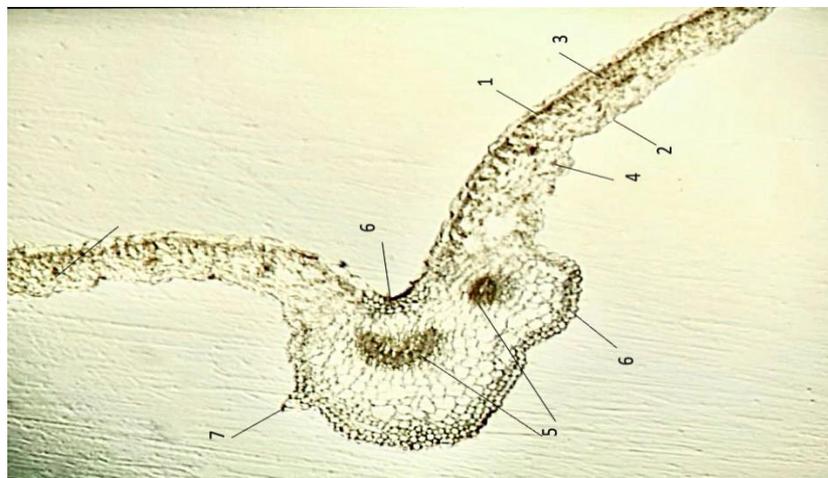
Рисунок 4 – Поверхностный препарат листа *Prunella vulgaris* L. Ув. 10x16:
А – нижний эпидермис, Б – верхний эпидермис

Поперечный срез листа Prunella vulgaris L.

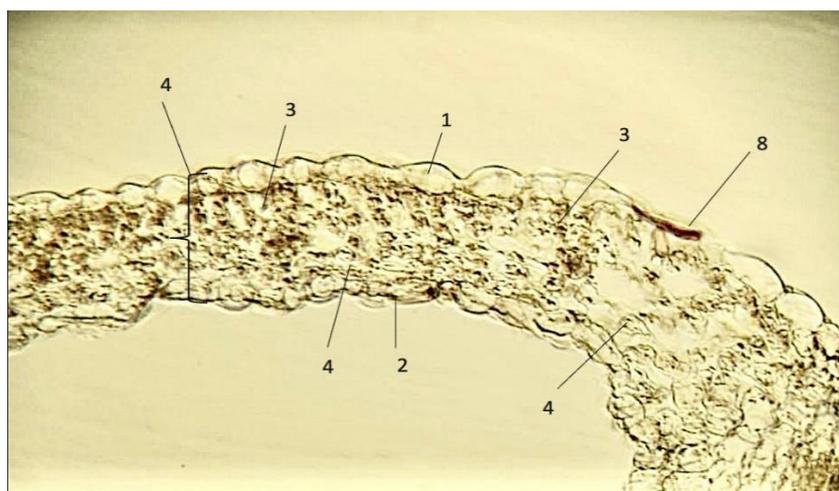
Лист на поперечном срезе плоский, дорзовентрального типа. На верхней стороне клетки эпидермиса в боковых фрагментах овального типа, с утолщенными наружными стенками; вокруг проводящих пучков – округло-прямоугольные, более мелкие по размеру. По поверхности листа разбросаны редкие, простые трихомы, локализация которых преимущественно приурочена к жилкам листа с нижней стороны.

Под верхним эпидермисом залегает однослойный столбчатый мезофилл, под нижним - губчатый мезофилл. В области главной жилки и в боковых

фрагментах расположены проводящие пучки. Проводящие пучки коллатерального типа, закрытые, состоят из тяжа ксилемы, ориентированной к верхней стороне, и тяжа флоэмы, ориентированной к нижней стороне листа. В мезофилле листа залегают отдельные вместилища, схизогенного типа, содержащие более ярко окрашенные эфирные масла (рисунок 5).



А



Б

1 – верхний эпидермис, 2 – нижний эпидермис, 3 – столбчатый мезофилл, 4 – губчатый мезофилл, 5 – проводящий пучок, 6 – колленхима, 7 – простые трихомы, 8 – участки с эфирным маслом

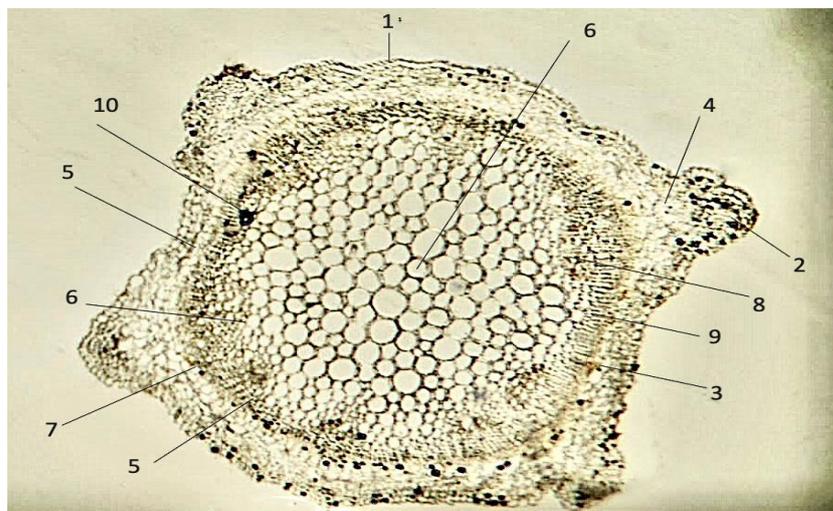
Рисунок 5 - Поперечный срез листа *Prunella vulgaris* L. Ув. 4x16

А – область главной жилки, Б – боковой фрагмент

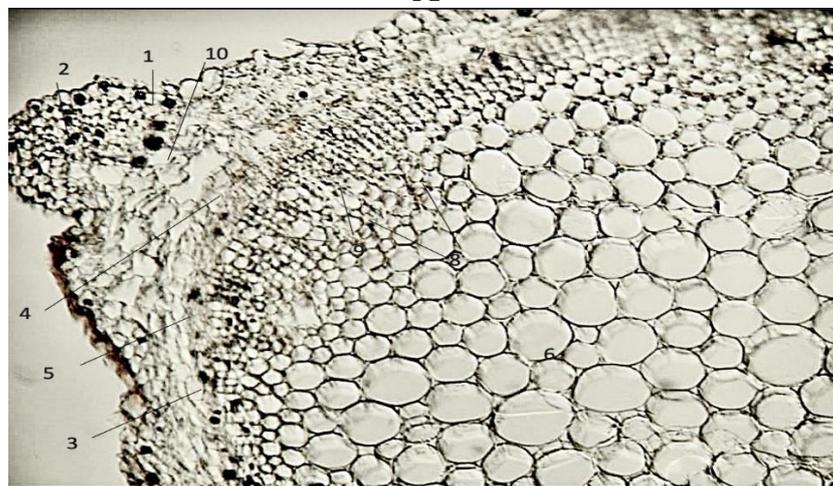
***Стебель Prunella vulgaris* L. на поперечном срезе**

Стебель на поперечном срезе округло-четырёхугольный, с хорошо выраженными ребрами. По периметру располагаются округло-прямоугольные клетки эпидермиса, с утолщенными стенками. Под эпидермисом в углах

залегают обширные участки уголкового колленхима, между углами - двухслойная хлоренхима. Между однослойным эпидермисом и проводящей зоной располагаются рыхлые клетки коровой паренхимы. Эндодерма расположена по кругу, состоит из овальных крупных клеток. Проводящая система переходного типа, при котором коллатеральные открытые пучки сливаются в кольцевую зону. По периметру ближе к эпидермису располагается кольцо флоэмы, потом - тонкий слой камбия, а ближе к центру - сосуды ксилемы. Вся центральная часть стебля заполнена крупными и рыхлыми клетками сердцевидной паренхимы. Стоит отметить, что на поперечном срезе стебля просматриваются не специализированные участки, содержащие эфирные масла (рисунок 6).



А



Б

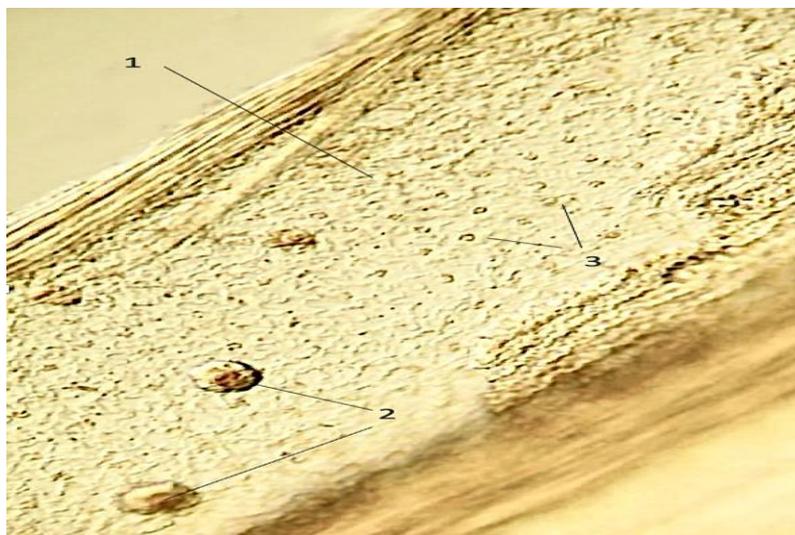
1 – эпидермис, 2 – колленхима, 3 – хлоренхима, 4 – коровая паренхима, 5 – эндодерма, 6 – сердцевинная паренхима, 7 – флоэма, 8 – ксилема, 9 – камбий, 10 – пятна эфирного масла

Рисунок 6 - Стебель *Prunella vulgaris* L. на поперечном срезе. Ув. 4x16, 10x16

А – общий вид стебля, Б – фрагмент среза

Поверхностный препарат венчика цветка *Prunella vulgaris* L.

Эпидермис состоит из округлых или овальных клеток с сильноизвилистыми стенками. По поверхности разбросаны редкие, крупные эфиромасличные железки, округлые, приподнимающиеся над поверхностью. В эпидермисе располагаются более темно окрашенные капли эфирного масла (рисунок 7).

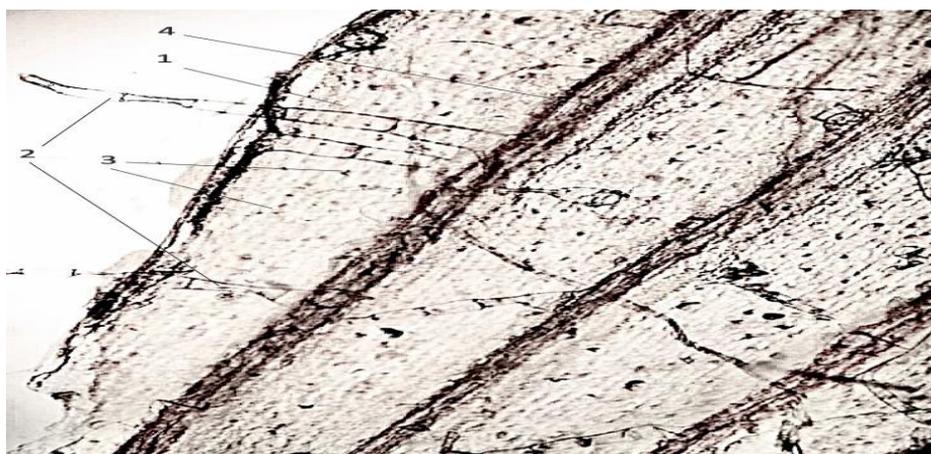


1 – эпидермис, 2 – эфиромасличные железки, 3 – капли эфирного масла

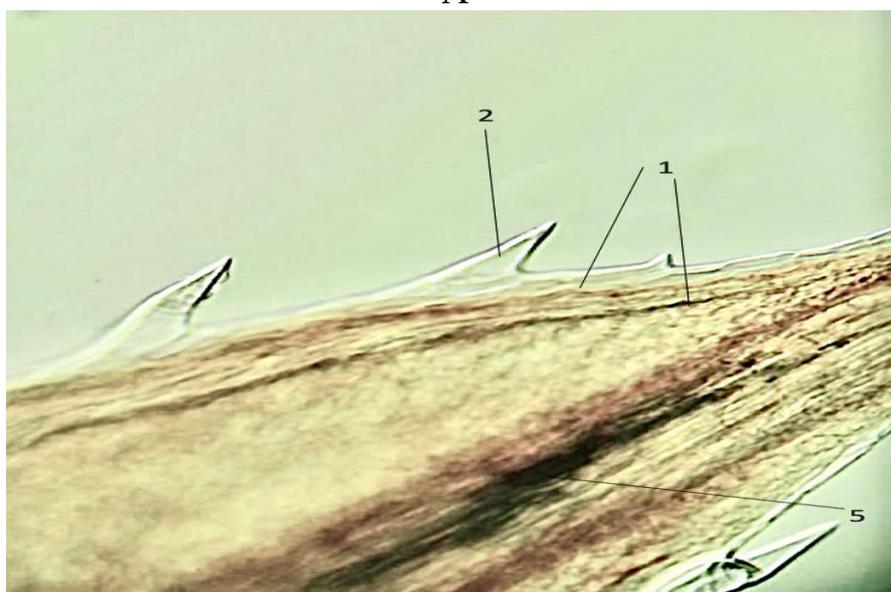
Рисунок 7 - Поверхностный препарат венчика цветка *Prunella vulgaris* L. Ув. 10x16

Поверхностный препарат чашечки цветка *Prunella vulgaris* L.

Поверхность чашечки состоит из однослойного эпидермиса. Клетки его вытянутые, со слабоизвилистыми стенками, местами почти прямые, стенки утолщенные. На поверхностном срезе отмечены многочисленные трихомы; одно- и многоклеточные, простые, локализованы преимущественно либо вдоль жилок чашечки, либо по краю. Трихомы, расположенные вдоль жилок, крупные длинные, могут достигать ширины зубца чашечки. Клетки трихом крупные, бочонковидной формы, тонкостенные. Трихомы, расположенные по краю зубцов чашечки, простые, мелкие, одно- или двухклеточные. По поверхности эпидермиса залегают отдельные капли эфирного масла, локализованные в цитоплазме эпидермальных клеток. Вдоль жилок листа, под эпидермисом находятся удлинённые вместилища с эфирным маслом (рисунок 8).



А



Б

1 – эпидермис, 2 – трихома, 3 – капли эфирного масла, 4 – жилка, 5 –
вместилища с эфирным маслом

Рисунок 8 - Поверхностный препарат чашечки цветка *Prunella vulgaris* L. Ув.
10x16.

А – эпидермис чашечки, Б – зубец

Микроскопический анализ лекарственного сырья позволил выявить диагностические признаки надземных органов растения и установить локализацию некоторых групп биологически активных веществ в тканях растений. Определение диагностических признаков сырья на микроскопическом уровне выявляет – форму основных клеток эпидермиса листа, форму и локализацию трихом и эфирно-сальных желез в структуре стебля, листа, чашечек и венчиков цветка. Полученные данные могут послужить для определения качества этого сырья и разработки НД [108].

3.5 Гистохимический анализ сырья *Prunella vulgaris* L.

В результате гистохимического исследования выявлено характерное окрашивание клеток разных типов, которое характеризуется результатом

взаимодействия реактивов с детектируемыми биологически активными веществами. Результаты гистохимического анализа в надземных органах *Prunella vulgaris* L. представлены в таблице 9 и на рисунке 8.

Таблица 9 - Итоги гистохимического анализа сырья *Prunella vulgaris* L.

| Определяемый компонент | Реактив | Окрашивание | Вид надземных органов | | |
|---|---|---------------------|-----------------------|------|----------------|
| | | | Стебель | Лист | Чашечка цветка |
| Эфирное масло | Метиленовый синий | Синее | + | + | + |
| Сесквитерпеновые лактоны | р-р ванилина в конц. H ₂ SO ₄ | Желтое | + | + | + |
| Флавоноиды | 1-% спиртовой раствор FeCl ₃ | Черно-синее-зеленое | + | + | + |
| Флавоноиды | 3-% спиртовой раствор FeCl ₃ | Жёлтый, красный | + | + | + |
| 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 | - | - | - |
| Алкалоиды | Реактив Драгендорфа | Черное | - | - | - |
| <i>Примечание: – отрицательная реакция; + положительная реакция</i> | | | | | |

Согласно данным таблицы 9, что сырье черноголовки обыкновенной содержит во всех органах растения – эфирное масло, сесквитерпеновые лактоны, флавоноиды, фенольные соединения, полисахариды, но отсутствуют по данным гистохимического анализа крахмал и алкалоиды.

Идентификация эфирного масла

Обработка микропрепаратов листа, черешка и стебля раствором метиленового синего показала, что появляется специфическая окраска. Основным местом локализации эфирного масла являются:

- на поперечном срезе листа: эпидермис, отдельные участки мезофилла листа,
- на поперечном срезе стебля: эпидермис, участки коровой паренхимы,
- на поверхностном препарате черешка: трихомы.

Идентификация флавоноидов

После обработки микропрепаратов исследуемых образцов 1 и 3-% спиртовым раствором FeCl₃ наблюдали интенсивное черно-коричневое окрашивание участков стебля, листа и цветка (рисунок 9 А-Е):

- на поперечном срезе листа: эпидермис листа, столбчатый и губчатый мезофилл, проводящий пучок, колленхима,
- на поперечном срезе стебля: коровая паренхима, проводящие пучки,

меньше –сердцевинная паренхима,

- на поверхностном препарате черешка: проводящие пучки, меньше – эпидермис.

Идентификация фенольных кислот

Для идентификации фенольных кислот в 10-% раствор бихромата калия помещали исследуемый материал. Наличие фенольных кислот подтверждено интенсивным желто-коричневым окрашиванием во всех исследуемых органах *Prunella vulgaris* L., что свидетельствует о присутствии фенольных соединений. 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:

- на поперечном срезе листа: мезофилл, проводящий пучок,

- на поперечном срезе стебля: проводящие пучки, эпидермис, слабее – коровая и сердцевинная паренхима,

- на поверхностном препарате черешка: проводящие пучки, эпидермис.

Идентификация сесквитерпеновых лактонов

Наличие сесквитерпеновых лактонов было подтверждено следами желтого окрашивания на поперечных срезах листьев, стебля и черешка. Следы были обнаружены в следующих участках (рисунок 9 Ж-З):

- на поперечном срезе листа: эпидермис, трихомы,

- на поперечном срезе стебля: коровая и сердцевинная паренхима,

- на поверхностном препарате черешка: клетки эпидермиса.

Идентификация полисахаридов

Присутствие полисахаридов было подтверждено следами оранжево-красного окрашивания на поперечных срезах листьев, стебля и черешка. Следы были обнаружены в следующих участках (рисунок 9 И):

- на поперечном срезе листа: участки мезофилла листа,

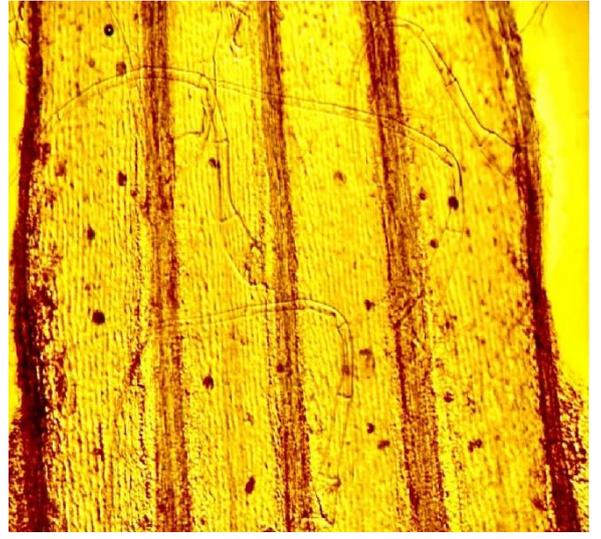
- на поперечном срезе стебля: флоэма, склеренхима, вместилища в сердцевинной паренхиме,

- на поверхностном препарате черешка: проводящие пучки.

По результатам гистохимического анализа не было обнаружено присутствие алкалоидов (рисунок 9 К) и крахмала в тканях надземных органов *P. vulgaris*.



А



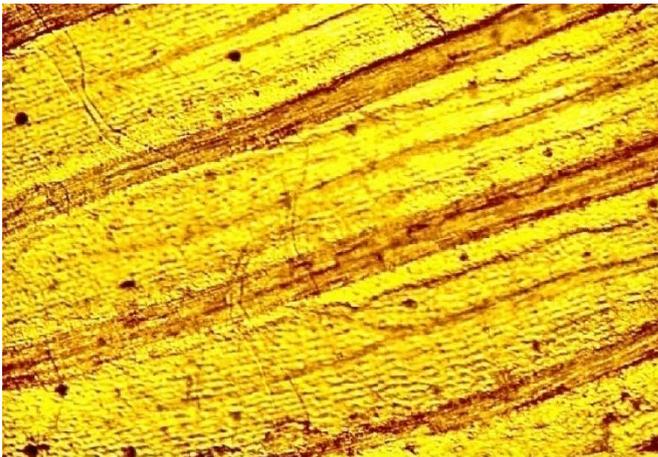
Б



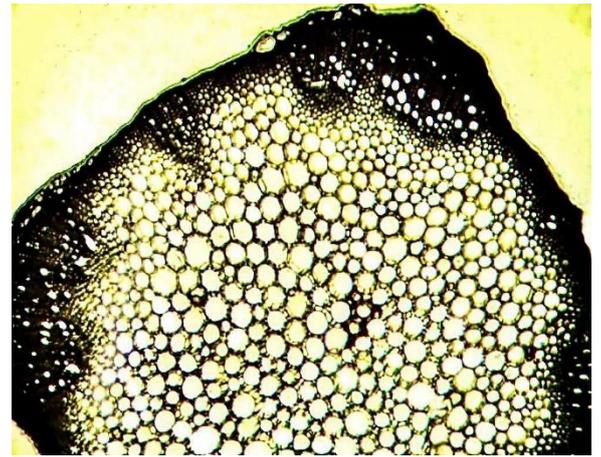
В



Г



Д



Е

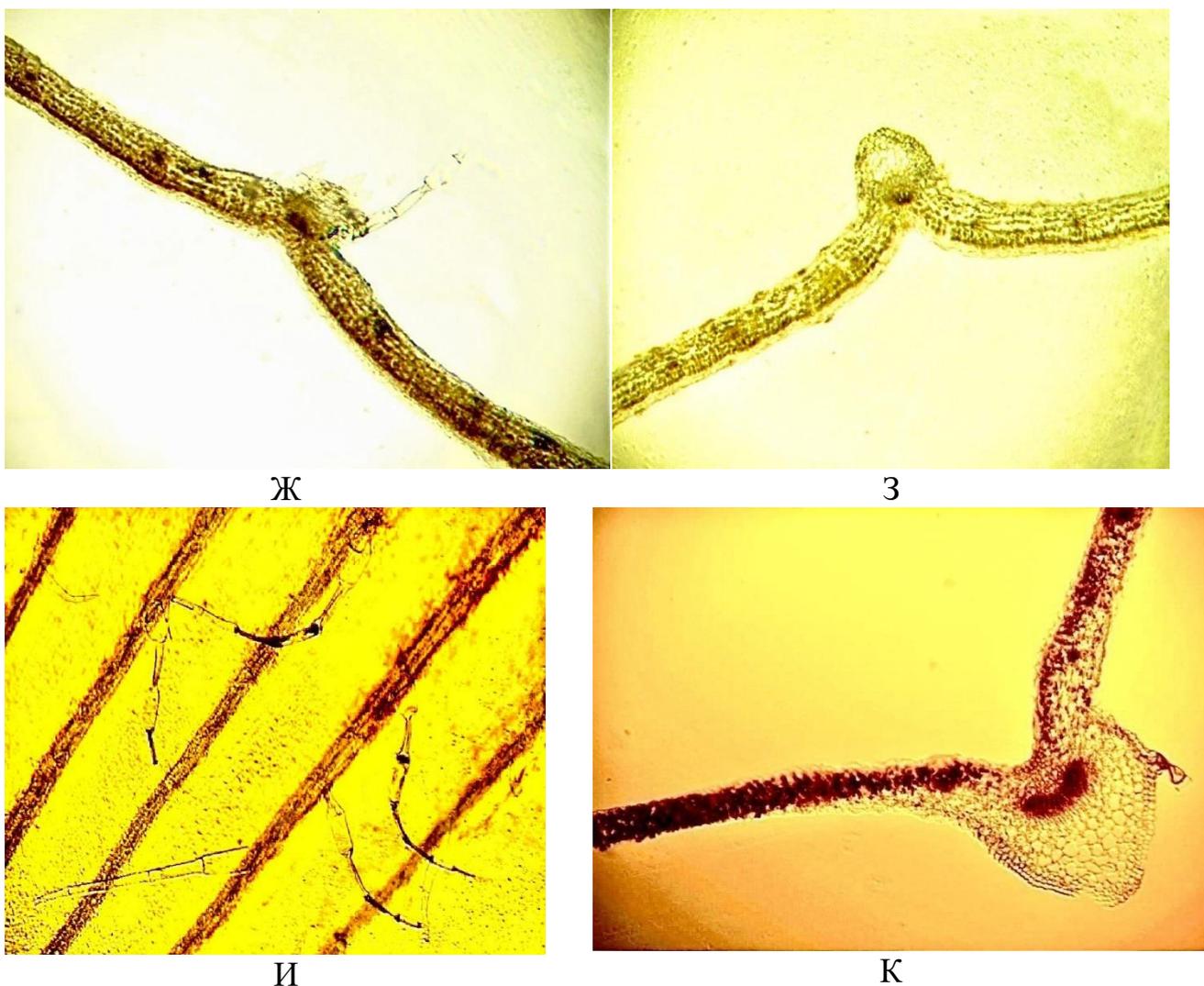


Рисунок 9 - Фотографии некоторых гистохимических реакций надземных органов *Prunella vulgaris* L. Ув. 4×10, 10x16

А – поперечный срез листа в 3-% спиртовом растворе FeCl_3 , Б – поверхностный препарат чашечки цветков 3-% спиртовом растворе FeCl_3 , В – поперечный срез стебля в 3-% спиртовом растворе FeCl_3 , Г – поперечный срез листа в 1-% спиртовом растворе FeCl_3 , Д – поверхностный препарат чашечки цветка в 1-% спиртовом растворе FeCl_3 , Е – поперечный срез стебля в 1-% спиртовом растворе FeCl_3 , Ж – поперечный срез листа в ванилине в конц. H_2SO_4 , З – поперечный срез листа в ванилине в конц. H_2SO_4 , И – поверхностный препарат чашечки цветка в 10% растворе тимола, конц. H_2SO_4 , К - поперечный срез листа в реактиве Драгендорфа

Результаты гистохимического анализа позволили установить локализацию эфирных масел, флавоноидов, фенольных соединений, сесквитерпеновых лактонов и полисахаридов. Полученные данные могут послужить основой для разработки проекта НД на лекарственное растительное сырье [109].

3.6 Изучение фитохимического состава травы *Prunella vulgaris* L.

В качестве перспективного источника биологически активных веществ природного происхождения привлекает внимание представитель флоры Республики Казахстан *Prunella vulgaris* L., как потенциальный источник сырья для получения фитопрепаратов ранозаживляющего, противомикробного, антиоксидантного и противовоспалительного действия.

Исследование минерального состава растительного сырья *Prunella vulgaris* L. проводилось с использованием метода испарения и атомно-эмиссионного спектрального анализа с индуктивно-связанной плазмой в химико-аналитической лаборатории ТОО «Азимут Геология» в г. Караганда, Казахстан. Полученные данные приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Количественное содержание элементов в минеральном составе сырья *Prunella vulgaris* L.

| Определяемые элементы | | | Содержание, мг/кг |
|-----------------------|----------|-----------|-------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | Серебро | Ag | <0,1 |
| 2 | Алюминий | Al | 3655 |
| 3 | Мышьяк | As | <0,1 |
| 4 | Бор | B | <1 |
| 5 | Барий | Ba | 906 |
| 6 | Бериллий | Be | <0,05 |
| 7 | Висмут | Bi | <0,1 |
| 8 | Кадмий | Cd | <0,05 |
| 9 | Церий | Ce | 2.27 |
| 10 | Кобальт | Co | 1,2 |
| 11 | Хром | Cr | 11,9 |
| 12 | Медь | Cu | 18,4 |
| 13 | Железо | Fe | 1244 |
| 14 | Галий | GA | 3,0 |
| 15 | Германий | Ge | <0,1 |
| 16 | Гафний | Hf | <0,1 |
| 17 | Индий | In | <0,1 |
| 18 | Лантан | La | 5,25 |
| 19 | Литий | Li | 5,2 |
| 20 | Марганец | Mn | 157,1 |
| 21 | Молибден | Mo | 2,9 |
| 22 | Ниобий | Nb | <0,1 |
| 23 | Никель | Ni | 8,0 |
| 24 | Фосфор | P | 2572 |
| 25 | Свинец | Pb | 5,0 |
| 26 | Сурьма | Sb | <0,1 |
| 27 | Скандий | Sc | <0,1 |
| 28 | Селен | Se | <0,1 |
| 29 | Олово | Sn | <0,1 |
| 30 | Стронций | Sr | 73,2 |

Продолжение таблицы 10

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|----|----------|-----------|-------|
| 31 | Теллур | Te | <0,1 |
| 32 | Торий | Th | <0,05 |
| 33 | Титан | Ti | 81 |
| 34 | Таллий | Tl | <0,1 |
| 35 | Уран | U | <0,05 |
| 36 | Ванадий | V | <0,1 |
| 37 | Вольфрам | W | <0,1 |
| 38 | Иттрий | Y | 0,7 |
| 39 | Иттербий | Yb | <0,1 |
| 40 | Цинк | Zn | 973 |
| 41 | Цирконий | Zr | 5,8 |

В исследовании минерального состава *Prunella vulgaris* L., собранного в Центральном Казахстане, было обнаружено присутствие 41 элемента. В растении *Prunella vulgaris* L., растущем на этой территории, были выявлены высокие концентрации железа (1244 мг/кг), фосфора (2572 мг/кг) и алюминия (3655 мг/кг).

Согласно нормативной документации, в лекарственно-растительном сырье (ЛРС) обязательному нормированию подлежат четыре основных потенциально токсичных элемента: свинец, кадмий, ртуть и мышьяк. Согласно допустимым нормам, содержание кадмия не должно превышать 1,0 мг/кг, свинца - 5,0 мг/кг, ртути - 0,1 мг/кг, а мышьяка - 1,0 мг/кг. Анализ показал, что содержание кадмия, свинца и мышьяка в траве *Prunella vulgaris* L. не превышает установленные нормы, а ртуть не обнаружена.

Идентификация радионуклидов (Cs-137, Sr-90) в *Prunella vulgaris* L. была проведена путем радиохимического анализа без изоляции в бета-спектре в испытательном центре "ЭкоЭксперт" в городе Караганда, Казахстан (таблица 11).

Таблица 11 - Результаты определения радионуклидов в траве *Prunella vulgaris* L.

| Наименование растительного сырья | Содержание Cs-137, Бк/кг | | Содержание Sr-90, Бк/кг | |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | Норма по НД | Фактические данные | Норма по НД | Фактические данные |
| Трава <i>Prunella vulgaris</i> L. | 400 Бк/кг | <6 Бк/кг | 200 Бк/кг | <7 Бк/кг |

Из результатов анализа радионуклидов в *Prunella vulgaris* L. следует, что содержание Cs и Sr соответствует нормам безопасности, установленным в Приказе МЗ РК № ҚР ДСМ-71 от 2 августа 2022 года. Согласно этим нормам, содержание Cs-137 должно быть не более 400 Бк/кг, а Sr-90 - не более 200 Бк/кг в лекарственных растениях (таблица 11).

Содержание флавоноидов, фенольных кислот, водорастворимых полисахаридов и эфирных масел в образцах травы *Prunella vulgaris* L.,

определяли с использованием методик, описанных в подразделе 2.2.

Установлено, что трава *Prunella vulgaris* L. отличается сравнительно большим содержанием флавоноидов, фенольных кислот, эфирных масел, полисахаридов (таблица 12).

Таблица 12 – Содержание основных групп БАВ в надземной части *Prunella vulgaris* L.

| Класс БАВ | Растительное сырье |
|----------------------|-----------------------------|
| | <i>Prunella vulgaris</i> L. |
| Эфирные масла, % | 0,12±0,07 |
| Флавоноиды, % | 5,27±0,26 |
| Фенольные кислоты, % | 13,33±0,14 |
| Полисахарады, % | 0,78±0,23 |

Исходя из данных таблицы 12, трава *Prunella vulgaris* L. характеризуется высоким содержанием флавоноидов, фенольных кислот, эфирных масел и полисахаридов. Эти биологически активные вещества могут иметь потенциальные положительные эффекты на здоровье человека, такие как антиоксидантные, противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства. Дальнейшие исследования могут помочь раскрыть более подробные механизмы действия этих компонентов и их потенциальное применение в медицине и фармацевтики.

3.7 Разработка спецификации качества *Prunella vulgaris* L.

Для оценки качественных характеристик растительного сырья *Prunella vulgaris* L. были проведены измерения числовых показателей в трех сериях травы *Prunella vulgaris* L. по следующим параметрам: наличие посторонних примесей, потеря массы при высушивании, содержание общей золы, содержание золы, нерастворимой в хлороводородной кислоте, а также определение микробиологической чистоты в соответствии с требованиями ГФ РК и Ф ЕАЭС (таблицы 13-14).

Таблица 13 – Результаты определения фармакопейных показателей качества растительного сырья *Prunella vulgaris* L.

| Серия | Посторонние примеси, % | Потеря в массе при высушивании, % | Общая зола, % | Зола, нерастворимая в кислотехлороводородной, % |
|-------|------------------------|-----------------------------------|---------------|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| PV01 | 1,67±0,10 | 7,62±0,31 | 7,04±0,13 | 0,80±0,17 |
| PV02 | 1,64±0,14 | 7,32±0,28 | 7,25±0,15 | 0,72±0,12 |
| PV03 | 1,70±0,09 | 7,65±0,47 | 7,35±0,11 | 0,67±0,13 |

Таблица 14 - Показатели микробиологической чистоты растительного сырья *Prunella vulgaris* L.

| Наименование микроорганизмов | Требование НД | Результаты | | |
|--------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Проба №1 | Проба №1 | Проба №1 |
| Общее число аэробных бактерий, КОЕ/г | Не более 10^7 | $5,7 \times 10^2$ | $5,3 \times 10^2$ | $4,9 \times 10^2$ |
| Общее число грибов, КОЕ/г | Не более 10^5 | 29 | 23 | 31 |
| <i>E. Coli</i> в 1 г | Отсутствие | Отсутствует | Отсутствует | Отсутствует |

Из таблиц 13-14 можно сделать следующие выводы: Влажность ЛРС не превышает 10%, что указывает на хорошее качество сырья. Общая зола не превышает 8%, а нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной – не превышает 1%, также другие показатели свидетельствует о хорошем качестве сырья. Таким образом, по результатам анализа числовых показателей можно сделать вывод о доброкачественности лекарственного растения и его соответствии требованиям Государственной Фармакопеи Республики Казахстан.

Определение основных технологических параметров качества сырья черноголовки обыкновенной (таблица 15) проводили в соответствии с методиками, приведенными в учебном пособии Мининой и Кауховой и в соответствии с ГФ РК т.І.

Таблица 15– Технологические параметры травы *Prunella vulgaris* L.

| Технологические параметры | Установленные значения, г/см ³ |
|----------------------------|---|
| Удельная масса | $0,56 \pm 0,01$ |
| Объемная масса | $0,1 \pm 0,02$ |
| Насыпная масса | $0,05 \pm 0,02$ |
| Пористость | $0,82 \pm 0,01$ |
| Порозность | $1 \pm 0,01$ |
| Свободный объем слоя сырья | $0,91 \pm 0,01$ |

Исследование основных технологических параметров качества сырья черноголовки обыкновенной показало следующие результаты:

1. Удельная масса: среднее значение составило $0,56 \pm 0,01$ г/см³, что соответствует стандартам качества для данного вида сырья.
2. Объемная масса: среднее значение составило $0,1 \pm 0,02$ г/см³, что также находится в пределах допустимых значений.
3. Насыпная масса: среднее значение составило $0,05 \pm 0,02$ г/см³, что указывает на хорошую способность сырья к укладке и хранению.
4. Пористость: среднее значение составило $0,82 \pm 0,01$ г/см³, что говорит о наличии определенного количества пор в структуре сырья.

5. Порозность: среднее значение составило $1 \pm 0,01$ г/см³, что также свидетельствует о наличии пор в структуре сырья.
6. Свободный объем слоя сырья: среднее значение составило $0,91 \pm 0,01$ г/см³, что указывает на хорошую текучесть и укладываемость сырья.

Таким образом, проведенное исследование показало, что качество сырья черноголовки обыкновенной соответствует установленным стандартам и обладает необходимыми технологическими параметрами для дальнейшего изучения. Спецификация качества для ЛРС *Prunella vulgaris* L. была разработана в соответствии с Правилами разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств, утвержденными Приказом МЗ РК № ҚР ДСМ-20 от 16 февраля 2021 года.

На основе данных из трех серий опытного сырья был разработан документ, устанавливающий требования качества для ЛРС *Prunella vulgaris* L. в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан и Фармакопеи Евразийского экономического союза.

Данные по изучению спецификации качества растительного сырья надземной части черноголовки обыкновенной представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Спецификация качества растительного сырья надземной части травы черноголовки обыкновенной

| Показатели качества | Нормы отклонений | Методы испытаний |
|---------------------|--|--------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 |
| Описание | Трава <i>Prunella vulgaris</i> L., представляющая собой кусочки стеблей, листьев, соцветий и цветков размером до 3 см. | Визуальный |
| Идентификация А. | Макроскопия. Побеги ползучие, генеративные побеги - приподнимающиеся и отклоняющиеся, травянистые, прямые. Листорасположение супротивное. Поверхность стебля ребристая, образует 4 грани. Форма листа широкояйцевидная, верхушка тупая, основание клиновидное, край крупно-городчатый. По поверхности отмечены единичные простые трихомы, белого цвета, расположенные вдоль жилок листа, а также точечные эфирномасличные железки. Соцветия верхушечные, колосовидные, реже головчатое, с многочисленными цветками и обрамленное прицветными листьями. Длина 5 - 15(18) см. Чашечка узко-колокольчатая, правильной формы, в верхней части надрезана на 5 зубцов, длина которых достигает 1/4-1/3 от общей длины; 3-6 мм длиной и до 2,5 мм шириной. Зубцы чашечки заостренные с небольшим остроконечием. Венчик зигморфный, фиолетово-лилового цвета, длиннее чашечки, неясно делится на | ЕАЭС Ф 2.1.8.17 ГФ РК, т.1, с.565 |

Продолжение таблицы 16

| 1 | 2 | 3 |
|--|---|--|
| | 2 губы, нижняя губа с тремя лопастями, верхняя с небольшим шлемом. Поверхность почти голая. | |
| В. | Микроскопия. При рассмотрении под микроскопом наблюдались следующие диагностические признаки: форма и размеры побегов, листьев, соцветий, структура поверхности, цвет частей растения и тип опушения. На микроскопическом уровне диагностическими признаками определены - форма основных клеток эпидермиса листа, форма и локализация трихом и эфирномасличных железок в строении стебля, листа, чашелистников и венчиков цветка. | ЕАЭС Ф 2.1.8.17 ГФ РК, т.1, 2.8.3. |
| С. | Гистохимические реакции. Появляется желтое окрашивание -сесквитерпеновые лактоны, черно-сине-зеленое и желто-красное окрашивание - флавоноиды, коричневое окрашивание - фенольные соединения, оранжево-красное - полисахариды. | В соответствии с НД |
| D. | 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 |
| Посторонние примеси | органической примеси не более 1,0 %; пожелтевших, побуревших и почерневших частей сырья не более 10,0 %; минеральной примеси не более 1,0 % | ЕАЭС Ф 2.1.8.2 ГФ РК, т.1, 2.8.2. |
| Потеря в массе при высушивании | Не более 10,0 % | ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32 |
| Общая зола | Не более 8,0 % | ЕАЭС Ф 2.1.4.16 ГФ РК, т.1, 2.4.16 |
| Зола, нерастворимая в 10 % кислоте хлороводородной | Не более 1 % | ЕАЭС Ф 2.1.8.1 ГФ РК, т.1, 2.8.1. |
| Микробиологическая чистота | Лекарственное растительное сырье должен соответствовать ГФ РК, т.1, 5.1.4, категория 4 А -Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов: не более 10^7 бактерий и не более 10^5 грибов в 1 г -Не допускается наличие <i>Escherichia coli</i> . | ЕАЭС Ф 2.3.1.4 ГФ РК т. I, 2.6.12, 2.6.13 |
| Количественное определение: -розмариновая кислота | не менее 0,836 % | В соответствии с НД |

Продолжение таблицы 16

| 1 | 2 | 3 |
|-------------------------------------|--|--------------------------------------|
| Радионуклиды | не должно превышать по цезию 137 Cs-137, 200 Бк/кг; по стронцию 90 Sr-90, 100 Бк/кг | ГФ РК т.1, с.564 |
| Тяжёлые металлы | 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 | ЕАЭС Ф 2.1.2.41 ГФ РК т.1, 2.2.23 |
| Упаковка | 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 | ГОСТ 17768-90 Е |
| Маркировка | В соответствии с утвержденными требованиями к маркировке. | В соответствии НД |
| Хранение | В защищенном от света месте при температуре не выше 25 С ⁰ | В соответствии НД РК |
| Срок хранения | 2 года | В соответствии НД РК |
| Транспортирование | В соответствии с ГОСТ 17768-90Е | В соответствии НД |
| Основное фармакологическое действие | Противовоспалительное, антиоксидантное | В соответствии НД РК |

Исследования по определению срока хранения травы Prunella vulgaris L.

Исследования по определению срока хранения травы *Prunella vulgaris L.* были проведены с использованием метода долгосрочных испытаний на трех сериях сырья в соответствии с требованиями Приказа МЗ РК №ҚР ДСМ - 165/2020 от 28 октября 2020 года "Об утверждении Правил проведения исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств", а также Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии № 169 от 07 декабря 2021 года «Об утверждении Требований к исследованию стабильности растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственных растительных препаратов».

Образцы сырья были проверены на качество в соответствии с нормативными документами на сырье в указанные сроки: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяца. Испытания проводились при температуре 25±2°С и влажности 60±5%. Исследование травы *Prunella vulgaris L.* проводилось с 01.07.2020 по 04.07.2022 год. Результаты стабильности травы *Prunella vulgaris L.* представлены в таблицах 17-19.

В ходе исследования было установлено, что параметры качества сырья травы *Prunella vulgaris* L. оставались стабильными в течение 24 месяцев наблюдения.

Таким образом, определен срок хранения травы *Prunella vulgaris* L.– 24 месяца (время наблюдения).

Таблица 17 - Изучение стабильности растительного сырья надземной части травы черноголовки обыкновенной, 1 серия

| Упаковка: многослойные бумажные мешки Дата начала испытания: 07.2020 г Дата окончания спытания: 07.2022 г Серия: 1 PV01 | | | | | | | | | | |
|--|--|---|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Период контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Описание | Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I | Надземная часть высушенного лекарственного растительного сырья черноголовки обыкновенной запах резкий, специфический, вкус горьковатый. | соотв. |
| Идентификация - фенольные кислоты - флавоноиды | | В соответствии с НД | Желто-коричневое окрашивание Черно-синее окрашивание | соотв. |
| Посторонние примеси: - потемневшие и побуревшие части сырья органические примеси минеральные примеси | | ГФ РК, т. 1, 2.8.2, Ф ЕАЭС 2.1.8.2 | Не более 10,0% Не более 1,0% Не более 1,0% | 6,25 0,87 0,86 | 6,25 0,87 0,83 | 6,25 0,88 0,82 | 6,26 0,87 0,83 | 6,26 0,90 0,82 | 6,25 0,89 0,83 | 6,25 0,90 0,82 |
| Потеря в массе при Высушивании | | ГФ РК, т. 1, 2.2.32, Ф ЕАЭС 2.1.2.31 | Не более 10,0 % | 7,62 | 7,61 | 7,63 | 7,62 | 7,62 | 7,63 | 7,61 |

Продолжение таблицы 17

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--|---|--|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Общая зола | | ГФ РК, т. 1, 2.4.16, Ф ЕАЭС 2.1.4.16 | не более 8,0 % | 7,03 | 7,05 | 7,03 | 7,04 | 7,04 | 7,05 | 7,03 |
| Зола, нерастворимая в HCl | | ГФ РК, т. 1, 2.8.1, Ф ЕАЭС 2.1.8.1 | не более 1,0 % | 0,82 | 0,79 | 0,81 | 0,82 | 0,82 | 0,80 | 0,81 |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК, т. 1, 5.1.4, 2.6.12 и 2.6.13 Ф ЕАЭС 2.3.1.4 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , грибов не энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. |
| Количественное определение - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | не менее 0,836 % | 0,877 | 0,876 | 0,876 | 0,875 | 0,876 | 0,874 | 0,875 |

Таблица 18 - Изучение стабильности растительного сырья надземной части травы черноголовки обыкновенной, 2 серия

| Упаковка: многослойные бумажные мешки Дата начала испытания: 07.2020 г Дата окончания испытания: 07.2022 г Серия: 2 PV02 | | | | | | | | | | |
|---|---|---------------------------------------|---|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Период контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Описание | Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I | Надземная часть высушенного лекарственного растительного сырья черноголовки обыкновенной запах резкий, 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: - потемневшие и побуревшие части сырья органические примеси минеральные примеси | | ГФ РК, т. 1, 2.8.2, Ф ЕАЭС 2.1.8.2 | Не более 10,0% | 6,55 | 6,57 | 6,56 | 6,57 | 6,58 | 6,59 | 6,59 |
| | | | Не более 1,0% | 0,77 | 0,78 | 0,78 | 0,79 | 0,78 | 0,79 | 0,80 |
| | | | Не более 1,0% | 0,84 | 0,81 | 0,81 | 0,82 | 0,83 | 0,82 | 0,83 |
| Потеря в массе при высушивании | ГФ РК, т. 1, 2.2.32, Ф ЕАЭС 2.1.2.31 | Не более 10,0 % | 7,32 | 7,31 | 7,33 | 7,32 | 7,32 | 7,33 | 7,31 | |

Продолжение таблицы 18

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|--|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Общая зола | | ГФ РК, т. 1, 2.4.16, Ф ЕАЭС 2.1.4.16 | не более 8,0 % | 7,24 | 7,26 | 7,24 | 7,25 | 7,25 | 7,26 | 7,24 |
| Зола, нерастворимая в HCl | | ГФ РК, т. 1, 2.8.1, Ф ЕАЭС 2.1.8.1 | не более 1,0 % | 0,73 | 0,71 | 0,72 | 0,73 | 0,72 | 0,71 | 0,72 |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК, т. 1, 5.1.4, 2.6.12 и 2.6.13 Ф ЕАЭС 2.3.1.4 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. |
| Количественное определение - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | не менее 0,836 % | 0,872 | 0,873 | 0,872 | 0,871 | 0,871 | 0,870 | 0,869 |

Таблица 19 - Изучение стабильности растительного сырья надземной части травы черноголовки обыкновенной, 3 серия

| Упаковка: многослойные бумажные мешки Дата начала испытания: 07.2020 г Дата окончания испытания: 07.2022 г Серия: 3 PV03 | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели качества | Условия исследований | Методы исследований | Нормы | Период контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Описание | Температура (25±2)°С, относительная влажность: (60±5) % | ГФ РК, т. I | Надземная часть высушенного лекарственного растительного сырья черноголовки обыкновенной запах резкий, 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: - потемневшие и побуревшие части сырья | | ГФ РК, т. 1, 2.8.2, Ф ЕАЭС 2.1.8.2 | Не более 10,0% | 6,87 | 6,87 | 6,86 | 6,88 | 6,87 | 6,87 | 6,88 |
| органические примеси | | | Не более 1,0% | 0,75 | 0,74 | 0,73 | 0,72 | 0,73 | 0,72 | 0,73 |
| минеральные примеси | | | Не более 1,0% | 0,79 | 0,80 | 0,79 | 0,78 | 0,78 | 0,77 | 0,78 |
| Потеря в массе при высушивании | | ГФ РК, т. 1, 2.2.32, Ф ЕАЭС 2.1.2.31 | Не более 10,0 % | 7,65 | 7,66 | 7,65 | 7,64 | 7,64 | 7,65 | 7,65 |

Продолжение таблицы 19

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--|---|--|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Общая зола | | ГФ РК, т. 1, 2.4.16, Ф ЕАЭС 2.1.4.16 | не более 8,0 % | 7,35 | 7,36 | 7,35 | 7,35 | 7,34 | 7,35 | 7,34 |
| Зола, нерастворимая в HCl | | ГФ РК, т. 1, 2.8.1, Ф ЕАЭС 2.1.8.1 | не более 1,0 % | 0,67 | 0,68 | 0,67 | 0,66 | 0,66 | 0,67 | 0,66 |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК, т. 1, 5.1.4, 2.6.12 и 2.6.13 Ф ЕАЭС 2.3.1.4 | В 1 г. сырья аэробных микроорганизмов не более 10 ⁵ , энтеробактерий не более 10 ³ , отсутствие в 1,0г. <i>E.coli</i> и в 10 г. <i>Salmonella</i> | соотв. |
| Количественное определение - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | не менее 0,836 % | 0,871 | 0,871 | 0,870 | 0,871 | 0,870 | 0,869 | 0,868 |

Сбор и заготовка растительного сырья чернойголовки обыкновенной были осуществлены согласно надлежащей практике сбора лекарственных растений в окрестностях Улутауской области.

В связи с тем, что эксплуатационные запасы чернойголовки обыкновенной находятся в пределах 12.8 – 41.2 тонн, то рекомендовано ежегодно собирать сырье в окрестности г. Риддер Восточно – Казахстанской области.

Заготовку сырья чернойголовки обыкновенной рекомендуется проводить процесс сушки сырья на открытом воздухе без прямого воздействия солнечных лучей, размещая его на специальных сушильных рамах в слоях толщиной от 10 до 15 см при температуре не превышающей 23-25°C.

При анализе морфологических показателей определены характерные особенности внешнего вида, формы, структуры поверхности листьев, побегов, соцветий и цветков. При микроскопическом анализе надземной части *Prunella vulgaris* L. были определены диагностические признаки сырья на микроскопическом уровне, включающие форму стебля на поперечном срезе, структуру эпидермисов листа, наличие трихом и эфирномасличных железок. Гистохимический анализ листьев, соцветий и стеблей *Prunella vulgaris* L. позволит установить локализацию в тканях таких биологически активных веществ, как эфирное масло, сесквитерпеновые лактоны, флавоноиды, фенольные соединения, полисахариды. По итогам исследований количественных показателей растительного сырья была определена влажность сырья, зола общая и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, а также было установлено количественное содержание примесей, тяжелых металлов, радионуклидов. Полученные результаты могут служить основой для разработки проекта НД на лекарственное растительное сырье. Исследованы фармацевтико-технологические параметры сырья чернойголовки обыкновенной для оптимальной технологии экстрагирования: удельная масса ($0,56 \pm 0,01$ г/см³), объемная масса ($0,1 \pm 0,02$ г/см³), насыпная масса ($0,05 \pm 0,02$ г/см³), порозность ($1,00 \pm 0,01$ г/см³), пористость ($0,82 \pm 0,01$ г/см³), свободный объем слоя сырья ($0,91 \pm 0,01$ г/см³).

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ *PRUNELLA VULGARIS* L.

4.1 Методы получения субстанции «Черноголовка обыкновенная экстракт сухой»

На сегодняшний день существует множество способов получения экстрактов растений и у каждого метода есть свои преимущества и недостатки. В последние годы для извлечения стали использовать различные новые методы экстракции. Традиционными методами, такими как мацерация, перколяция получают водные [110-112], метанольные [113-116], этанольные [117-119], гексановые и этилацетатные [120] экстракты *Prunella vulgaris* L. Однако, недостатком данных методов является потеря флавоноидов из-за гидролиза, окисления и ионизации во время экстракции, а также длительное время экстракции. В настоящее время существует множество альтернативных современных способов получения экстрактов лекарственных растений, позволяющих решить данные проблемы. К таким способам получения относятся сверхкритическая экстракция [121], ультразвуковая [122] и микроволновая [123] экстракция.

Экстракция с помощью ультразвука является простой, эффективной и недорогой альтернативой традиционным методам экстракции. Принцип мощного ультразвука был связан с явлением акустической кавитации, которое возникает, когда в жидкости генерируются акустические волны высокой интенсивности [124]. Механизм экстракции включает два типа физических явлений: диффузию через клеточные стенки и вымывание содержимого клетки после разрушения стенок [125]. Авторами [126] была проведена ультразвуковая экстракция плодов *Prunella vulgaris* L. с целью извлечения флавоноидов в ультразвуковой бане. Параметры экстракции: экстрагент этанол 20 - 60% по объему, соотношение жидкость/твердое вещество от 10:1 до 50:1, время экстракции 10 - 50 мин, температура экстракции 40 - 80 °С. Результаты показали, что максимальный выход экстракции флавоноидов с помощью экстракции с помощью ультразвука может составить 3,62% при использовании этанола с концентрацией 41% (об./об.) в качестве растворителя и соотношении жидкости и твердого вещества 30:1 (мл/г) для 30,5 мин при температуре 79 °С. Также, авторами была проведена экстракция ультразвуком мелкоизмельченного *Prunella vulgaris* L. для оценки противоязвенных [127] и противоопухолевых [128] свойств.

Фитохимические исследования показывают, что наземные части *Prunella vulgaris* L. богаты фенольными веществами, такими, как розмариновая, эллаговая, урсоловая и кофейная кислоты, присутствуют флавоноиды (кверцетин), сапонины и тритерпены [129].

Биологически активные вещества и полезные свойства показывают перспективность введения данного вида в Фармакопею РК в качестве лекарственного сырья, что требует комплекса фитохимических исследований.

Выход экстрактивных веществ из надземной части *Prunella vulgaris* L. при различных параметрах экстрагирования представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты изучения выхода экстрактивных веществ при различных параметрах УЗ экстракции надземной части *Prunella vulgaris* L.

| Параметры УЗ экстракции | | Выход экстрактивных веществ, г |
|---|-------------------------|--------------------------------|
| | | <i>Prunella vulgaris</i> L. |
| Степень измельченности, мм | 20 | 1,11 ± 0,12 |
| | 10 | 1,39 ± 0,11 |
| | 5 | 1,97 ± 0,04 |
| | 3 | 1,94 ± 0,12 |
| | 1 | 1,94 ± 0,14 |
| Вид экстрагента | Вода очищенная | 1,37 ± 0,18 |
| | 30% этанол | 1,39 ± 0,05 |
| | 50% этанол | 1,45 ± 0,04 |
| | 70% этанол | 1,87 ± 0,05 |
| | 96% этанол | 0,79 ± 0,07 |
| Соотношение сырья и экстрагента, г/мл | 1:5 | 1,22 ± 0,01 |
| | 1:10 | 1,49 ± 0,13 |
| | 1:20 | 1,87 ± 0,04 |
| Частота ультразвукового излучения, кГц | 28 | 1,93 ± 0,13 |
| | 40 | 1,95 ± 0,22 |
| Продолжительность и кратность УЗ обработки | <i>По 15 мин</i> | |
| | 1 раз | 1,21 ± 0,05 |
| | 2 раза | 1,23 ± 0,01 |
| | 3 раза | 1,23 ± 0,07 |
| | <i>По 30 мин</i> | |
| | 1 раз | 1,81 ± 0,18 |
| | 2 раза | 1,87 ± 0,21 |
| | 3 раза | 1,86 ± 0,09 |
| | <i>По 60 мин</i> | |
| 1 раз | 1,67 ± 0,14 | |
| 2 раза | 1,69 ± 0,18 | |
| 3 раза | 1,68 ± 0,11 | |
| Примечание: Оптимальные параметры выделены жирным шрифтом | | |

Таким образом, нами определены оптимальные параметры УЗ экстракции

надземной части *Prunella vulgaris* L. обеспечивающие наибольший выход экстрактивных веществ.

Испытания по определению выхода экстрактивных веществ водно-спиртовыми растворами различной концентрации (30%, 50%, 70%, 96%) и водой очищенной, а также коэффициента поглощения в траве *Prunella vulgaris* L. проводили с целью выбора наиболее эффективного экстрагента (таблица 21).

Таблица 21 – Содержание экстрактивных веществ в траве *Prunella vulgaris* L., извлекаемых различными экстрагентами

| п/п | Экстрагент | Выход экстрактивных веществ, % | Коэффициент поглощения экстрагента |
|-----|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 30% этиловый спирт | 28,69 | 5,4 |
| 2 | 50% этиловый спирт | 21,5 | 5,5 |
| 3 | 70% этиловый спирт | 30,74 | 5,6 |
| 4 | 96% этиловый спирт | 7,17 | 2,8 |
| 5 | Вода очищенная | 21,5 | 4,4 |

На основании полученных результатов выхода экстрактивных веществ и коэффициента поглощения экстрагента можно сделать вывод, что оптимальными экстрагентами для экстракции травы *Prunella vulgaris* L. является 70% раствор этилового спирта, в связи с наибольшим коэффициентом поглощения и выходом экстрактивных веществ в сравнении с другими экстрагентами.

Нами получен сухой экстракт, полученный в результате ультразвуковой кавитации в качестве растворителя, использовали водно-спиртовой раствор 70 % концентрации. Для проведения экстракции использовали надземную часть данного вида сырья. Воздушно-сухое сырье *Prunella vulgaris* L. (черноголовки обыкновенной), массой 10г и степенью измельченности 5 мм погружали в плоскодонную колбу на 250 мл и добавляли 200 мл растворителя. Соотношение массы сырья к объему растворителя составило 1:20 соответственно. Колбу с сырьем и растворителем погружали в ультразвуковую ванну Digital Ultrasonic Cleaner VGT 1200, с ультразвуковой частотой 40 кГц. Экстракция каждой навески сырья проводилась 2 раза до получения почти прозрачного раствора. Время УЗ-облучения составило по 30 минут двукратно. Также, были наработаны экстракты на основе 30%, 50%, 96% этилового спирта и воды очищенной, и обозначались следующими шифрами PV96, PV70, PV50, PV30, PV(в). Полученные экстракты упаривались на роторном испарителе, далее сушились в лиофильной (сублимационная) сушилке. Получены сухие ультразвуковые экстракты *Prunella vulgaris* L., представляющие собой сухую

массу коричневого цвета со специфическим запахом. Выходы сухих экстрактов составили 11-12%.

4.2 Разработка технологии субстанции «Черноголовка обыкновенная экстракт сухой»

Разработана технология получения сухих экстрактов *Prunella vulgaris* L. методом ультразвуковой кавитации.

Для производства сухого экстракта применяли высушенное растительное сырье *Prunella vulgaris* L. Экстрагентом служил 70% этанол. Применялся метод ультразвуковой экстракции.

На всех этапах производства осуществляется контроль соответствия вспомогательных веществ и материалов, промежуточных продуктов, упаковочных материалов, инструкций по применению, коробок и этикеток требованиям нормативных документов Республики Казахстан.

Технологическая схема производства сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. представлена на рисунке 10.

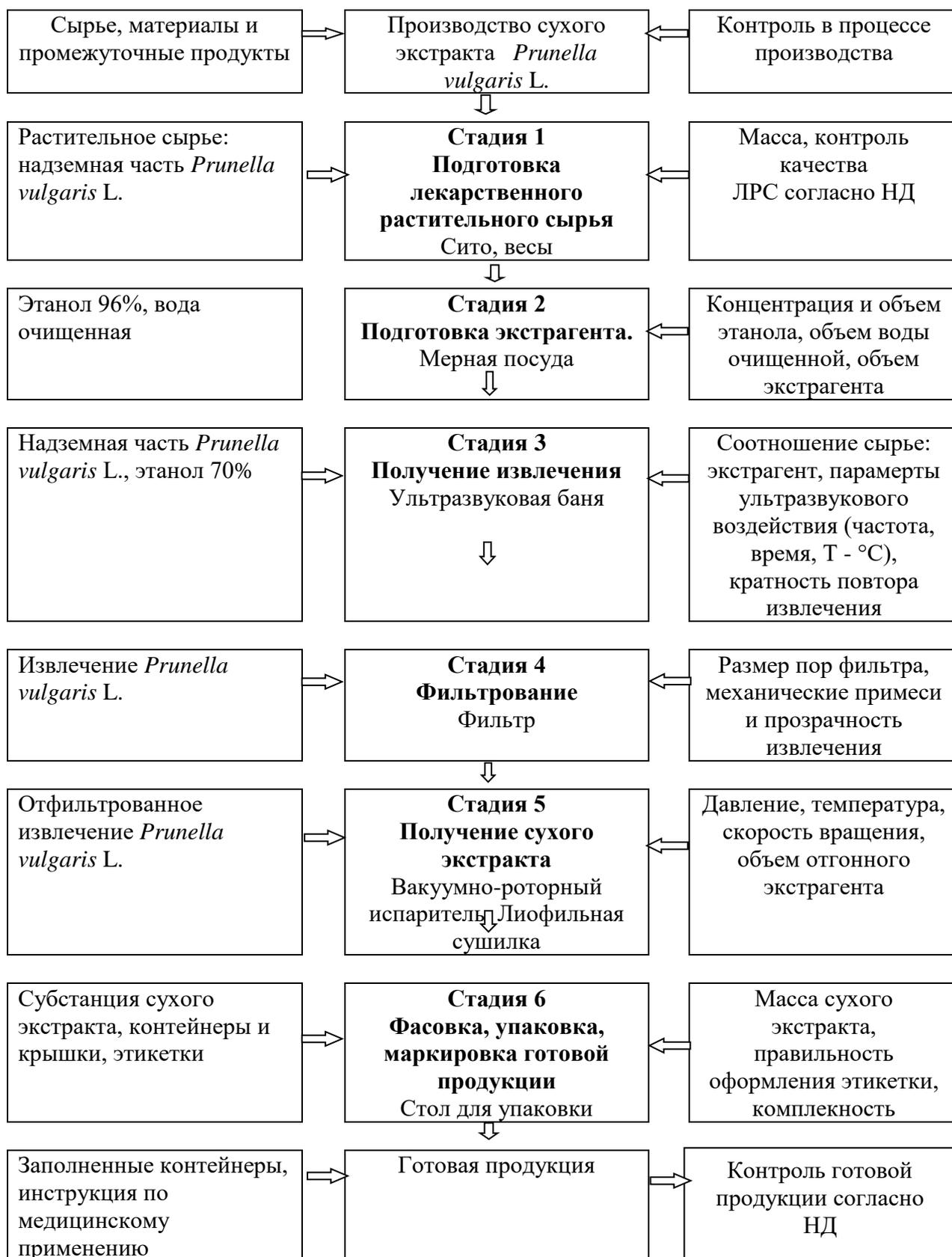


Рисунок 10 - Технологическая схема производства сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.

Описание: Сухой экстракт из надземной части чернойголовки обыкновенной был получен путем ультразвуковой экстракции с использованием 70% этанола. Этот экстракт представляет собой сухой порошок коричневого цвета с характерным запахом.

Изложение технологического процесса.

Экстракция надземной части чернойголовки обыкновенной методом ультразвуковой обработки включает в себя шесть этапов:

Стадия 1. Подготовка исходного сырья. Измельчение сырья чернойголовки обыкновенной выполняется вручную или с использованием ножевой мельницы, после чего производится проверка размера измельченных частиц с помощью сит и их соответствия нормативным документам. Затем измельченное сырье упаковывается в чистые полиэтиленовые мешки, взвешивается и маркируется этикеткой «Промежуточная продукция».

Стадия 2. Приготовление экстрагента. Для извлечения используется 70% (об/об) водный раствор этилового спирта, который получается путем смешивания 96% этилового спирта с очищенной водой. Контролируется концентрация и точность объема экстрагента.

Стадия 3. Получение извлечения. Для экстрагирования сырья надземной части чернойголовки обыкновенной используется 70% водный раствор этанола со второй стадии процесса. Сырье загружают в емкость и заливают экстрагентом – этанолом 70%, при соотношении массы сырья к массе экстрагента 1:20. Экстракцию проводят дважды без предварительного замачивания на ультразвуковой бане с частотой излучения 40 кГц, при комнатной температуре (20-22°C) в течение 30 минут. Полученное извлечение направляется на четвертую стадию процесса.

Стадия 4. Фильтрация. Извлечение чернойголовки обыкновенной фильтруют через бумажный фильтр, после чего фильтрат передается на следующий этап процесса. Контролируется диаметр пор фильтра, объем и прозрачность полученного извлечения.

Стадия 5. Получение сухого экстракта. Фильтрат извлечения, полученный после извлечения, подвергается упариванию в вакуумно-ротационном испарителе при температуре 50°C с использованием ротационного испарителя Лабтех ИР-1ЛТ под вакуумом для предотвращения деградации биологически активных веществ (БАВ). Процесс контролируется по температуре (50°C) и скорости вращения колбы на роторе (100 об/мин). Полученный отгонный экстрагент повторно используется, возвращаясь на стадию извлечения. Остаточный экстрагент сублимируют в лиофильной сушилке до полного удаления влаги. Полученный сухой экстракт растения *Prunella vulgaris* L. передается на следующий этап процесса (стадию 6).

Стадия 6. Фасовка, маркировка и упаковка готовой продукции. После завершения процесса производства, продукцию упаковывают в соответствующие контейнеры и плотно закрывают крышками. Осуществляется контроль массы сухого экстракта в каждом контейнере. Затем приступают к нанесению этикеток на контейнеры, на которых указывается название

продукции, количество сырья и вспомогательных веществ, концентрация этанола (об/об), а также масса готовой продукции. После этого продукцию упаковывают в коробки, соблюдая необходимое количество контейнеров в каждой коробке и соответствие этикеток требованиям НД Республики Казахстан.

После завершения производства сухих экстрактов *Prunella vulgaris* L. проводится комплексная оценка качества в соответствии с нормативной документацией.

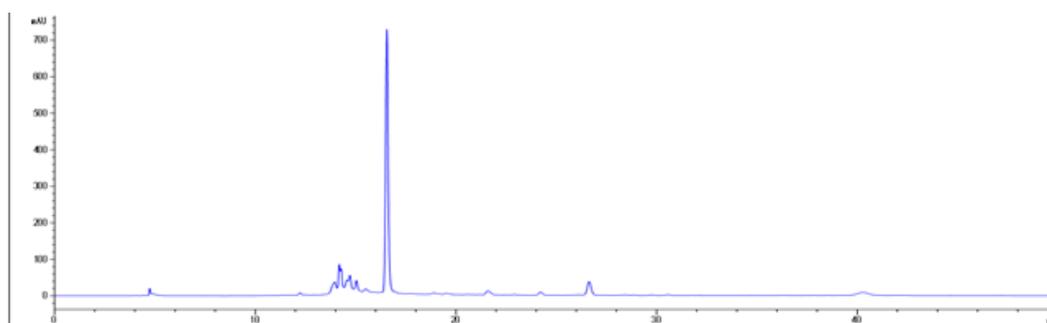
Готовую продукцию необходимо хранить в карантине согласно установленным правилам хранения и транспортировки лекарственных средств и медицинских изделий, соблюдая требования приказа Министерства Здравоохранения Республики Казахстан от 16 февраля 2021 года, ДСМ ҚР-19 «Об утверждении Правил хранения лекарственных средств и изделий медицинского назначения».

4.3 Анализ ВЭЖХ сухих экстрактов *Prunella vulgaris* L.

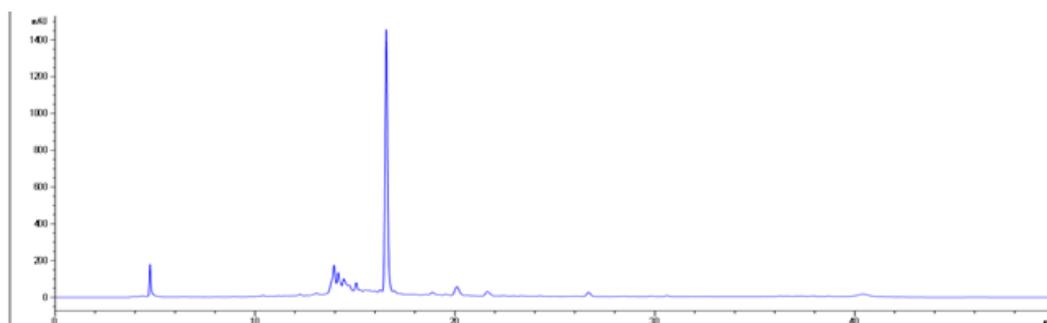
Для анализа полифенольных соединений экстрактов была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с ультрафиолетовым детектором (УФ) и тандемной масс-спектрометрией в реальном времени (ESI-MS/MS) в соответствии с применяемой методикой [106].

В исследовании использовались следующие реагенты: ацетонитрил (ACN) для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Франция), муравьиная кислота (99-100%, AnalaR NORMAPUR®, VWR Chemicals, Франция), вода высокой степени очистки. Готовили с помощью системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция). 20 избранных фенольных соединений и стандартов (галловая кислота, кофейная кислота, хлорогеновая кислота, феруловая кислота, р-кумаровая кислота, розмариновая кислота, коричная кислота, катехин, эпикатехин, нарингин, рутин, лютеолин-7-О-глюкозид, кверцетин-3, бетта-глюкозид, дигидрокверцетин, мирицетин, кверцетин, нарингенин, апигенин, лютеолин, кемпферол) приобретены у фирмы Sigma-Aldrich (США).

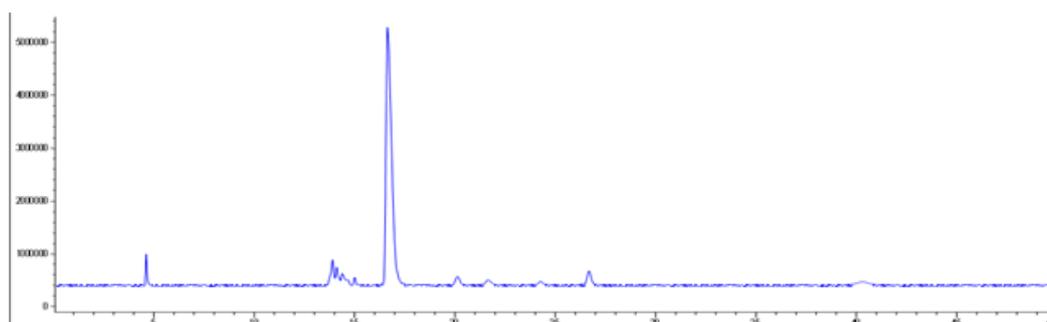
Фенольные профили полученных ультразвуковых экстрактов черноголовки обыкновенной и масс-спектры идентифицированных соединений в режиме отрицательной ионизации приведены в таблице 22. Хроматограммы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ESI-МС/МС экстракта и идентифицированных фенольных соединений показаны на рисунке 11.



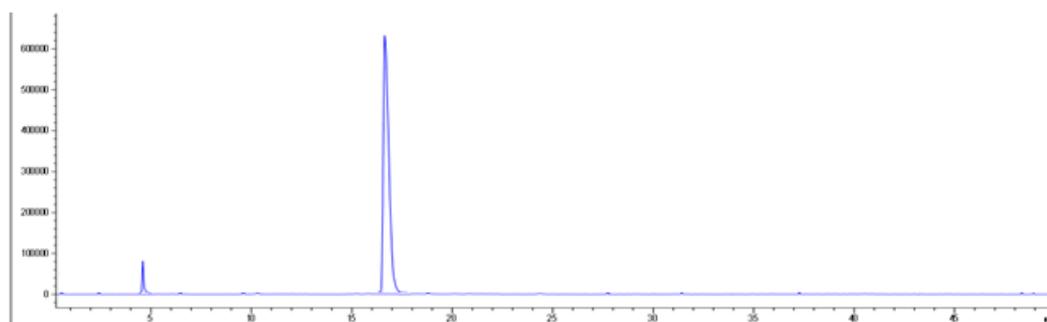
А)



Б)



В)



Г)

Рисунок 11 - А) ВЭЖХ-УФ 360 нм, Б) ВЭЖХ-УФ 280 нм, В) Общая ионная хроматограмма (TIC), Г) идентифицированные фенольные соединения в PV70

Таблица 22 – Идентификация сухого экстракта черноголовки обыкновенной (70% этанол)

| Пик | Время удерживания (мин) | M–H ⁺ (m/z) | Идентифицированный пик | Выход (мг/г ⁻¹ сухой экстракт) |
|-----|-------------------------|------------------------|------------------------|---|
| 1 | 4.832 | 169 | Галловая кислота | 9.96±0.1 |
| 2 | 16.786 | 359 | Розмариновая кислота | 76.00±0.9 |

Анализ ВЭЖХ, показал, что именно 70%-этанольный экстракт с ультразвуковой поддержкой содержит в своем составе мажорное содержание розмариновой кислоты до 7,6%, которое и обуславливает высокий противовоспалительный эффект. При этом наблюдается, что все экстракты в достаточном количестве содержат розмариновую кислоту 0,949% - 7,6% и увеличение количества воды в смеси этиловый спирт-вода может уменьшить концентрацию действующего вещества в результате процесса экстрагирования и при этом уменьшается и противовоспалительная активность экстрактов.

Аналогичная зависимость прослеживается и при изучении скрининга образцов экстрактов *Prunella vulgaris* L. на цитотоксическую активность, которая снижается при увеличении содержания воды в смеси этанола и воды в процессе экстрагирования. Например, PV50 - 11.1%, PV70 - 22.2%, PV96 - 22.2%

4.4 Стандартизация сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. и определение его стабильности

На основе проведенных исследований был разработан проект нормативной документации для контроля качества сухого экстракта из *Prunella vulgaris* L. в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан и Фармакопеи Евразийского экономического союза. В разработанный НД РК включены такие разделы как описание, идентификация, спецификации качества, микробиологическая чистота, количественное определение, потеря в массе при высушивании, тяжелые металлы. Показатели качества сухого экстракта из *Prunella vulgaris* L. представлены в таблице 23.

Таблица 23 - Спецификация качества экстракта сухого черноголовки обыкновенной

| Показатели качества | Нормы (допустимые пределы) | Ссылки на методы испытаний |
|---------------------|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Описание | Концентрированный экстракт, который является сухим порошком, сделанным с использованием 70% этанола коричневого цвета, имеет характерный вкус и запах | ГФ РК, т.1, 2.8.8 ГФ РК, т.1, с. 556-558 |

Продолжение таблицы 23

| 1 | 2 | 3 |
|--|--|---|
| Растворимость | Растворим в воде при температуре 30°C, растворим в спирте этиловом 90%. | ГФ РК I, т.1, 1.4, с. 25 |
| Идентификация: А. фенольные кислоты В. розмариновая кислота С. розмариновая кислота | Качественная реакция. Реакция с бихроматом калия появляется желто-коричневое окрашивание (фенольные кислоты). ТСХ. R _f розмариновой кислоты 0,5. 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 5,0 % | ЕАЭС Ф 2.1.8.16 ГФ РК I, т. 1, 2.8.17 |
| 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 6% | В соответствии с НД |
| Упаковка | По 5 г в стеклянные флаконы из темного стекла (ГФ РК, т.1, 3.2.1). Флаконы укупоривают резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками. (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 |

Продолжение таблицы 23

| 1 | 2 | 3 |
|-------------------------------------|---|---------------------|
| 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, антиоксидантное. | В соответствии с НД |

Для изучения стабильности субстанции проведены долгосрочные испытания, температура $(20\pm 5)^\circ\text{C}$, относительная влажность $60\pm 5\%$, данные условия испытаний в большей мере соответствуют условиям хранения, которые предполагаем.

В течение 24 месяцев хранилась субстанция в первичной упаковке при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$, количественные и качественные характеристики в пределах регламентируемых норм, состав не изменился. Таким образом согласно результатам успешно проведенных исследований, срок хранения субстанции установлен – 24 месяцев при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $60\pm 5\%$ (таблицы 24-26).

Таблица 24 - Изучение стабильности сухого экстракта черноголовки обыкновенной, полученного в результате ультразвуковой кавитации, серия 1

| Дата начала испытания: 09.2021 г. Дата окончания испытания: 09.2023 г. Серия: 01PV | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Показатели | | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | | ГФ РК, т.1 | Сыпучий порошок коричневого цвета с приятным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация А. фенольные кислоты В. розмариновая кислота С. розмариновая кислота | Условия испытания: температура: (25 ± 2)°С, относительная влажность: (60±5) %; | В соответствии с НД ЕАЭС Ф 2.1.2.26 ГФ РК I, т. 1, 2.2.27 В соответствии с НД | А. Качественная реакция. Реакция с бихроматом калия появляется желто-коричневое окрашивание (фенольные кислоты). 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. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 25,0 % | 23,15% | 23,20% | 23,26% | 23,15% | 23,18% | 23,20% | 23,15% |
| Тяжелые металлы | | ЕАЭС Ф 2.1.4.21 ГФ РК, т.1, 2.4., метод А | Не более 0,01% | соответ ст | соответ ст | соответ ст | соотв етст | соотве тст | соотве тст | соответ ст |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК т. 1, 2.6.12, 2.6.13 и 5.1.4, Ф ЕАЭС 2.3.1.4 | Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов (2.6.12): -не более 10 ⁵ бактерий и не более 10 ⁴ грибов в грамме или миллилитре; -не более 10 ³ энтеробактерии и некоторых других грамотрицательных бактерий в грамме или миллилитре (2.6.13); -отсутствие Escherichia coli (1 г или 1 мл) (2.6.13); -отсутствие Salmonella (10 г или 10 мл) (2.6.13). | соответ ст | соответс т | соответ ст | соотв етст | соответ ст | соответ ст | соответ ст |
| Количественное определение: - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Не менее 6 % | 6,57 | 6,53 | 6,52 | 6,51 | 6,51 | 6,50 | 6,48 |

Таблица 25 - Изучение стабильности сухого экстракта черноголовки обыкновенной, полученного в результате ультразвуковой кавитации, серия 2

| Дата начала испытания: 09.2021 г. Дата окончания испытания: 09.2023 г. Серия: 02PV | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---|-----------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Показатели | | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 | |
| Описание | | ГФ РК, т.1 | Сыпучий порошок коричневого цвета с приятным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| Идентификация А. фенольные кислоты В. розмариновая кислота С. розмариновая кислота | Условия испытания: температура: (25 ± 2)°С, относительная влажность: (60±5) %; | В соответствии с НД ЕАЭС Ф 2.1.2.26 ГФ РК I, т. 1, 2.2.27 В соответствии с НД | А. Качественная реакция. Реакция с бихроматом калия появляется желто-коричневое окрашивание (фенольные кислоты). 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. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 25,0 % | 23,25% | 23,30% | 23,36% | 23,25% | 23,28% | 23,30% | 23,25% | |
| Тяжелые металлы | | ЕАЭС Ф 2.1.4.21 ГФ РК, т.1, 2.4., метод А | Не более 0,01% | соответ ст | соответ ст | соответ ст | соотв ет ст | соотв ет ст | соотв ет ст | соответ ст | соответ ст |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК т. 1, 2.6.12, 2.6.13 и 5.1.4, Ф ЕАЭС 2.3.1.4 | Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов (2.6.12): -не более 10 ⁵ бактерий и не более 10 ⁴ грибов в грамме или миллилитре; -не более 10 ³ энтеробактерии и некоторых других грамотрицательных бактерий в грамме или миллилитре (2.6.13); -отсутствие Escherichia coli (1 г или 1 мл) (2.6.13); -отсутствие Salmonella (10 г или 10 мл) (2.6.13). | соответ ст | соответ ст | соответ ст | соотв ет ст | соответ ст | соответ ст | соответ ст | соответ ст |
| Количественное определение: - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Не менее 6 % | 6,68 | 6,64 | 6,63 | 6,62 | 6,62 | 6,61 | 6,59 | |

Таблица 26 - Изучение стабильности сухого экстракта черноголовки обыкновенной, полученного в результате ультразвуковой кавитации, серия 3

| Дата начала испытания: 09.2021 г. Дата окончания испытания: 09.2023 г. Серия: 03PV | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---|-----------------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Показатели | | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | 24 |
| Описание | | ГФ РК, т.1 | Сыпучий порошок коричневого цвета с приятным запахом. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Идентификация А. фенольные кислоты В. розмариновая кислота С. розмариновая кислота | Условия испытания: температура: (25 ± 2)°С, относительная влажность: (60±5) %; | В соответствии с НД | А. Качественная реакция. Реакция с бихроматом калия появляется желто-коричневое окрашивание (фенольные кислоты). 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. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Потеря в массе при высушивании | | ЕАЭС Ф 2.1.2.31 ГФ РК, т.1, 2.2.32 | Не более 25,0 % | 23,21% | 23,27% | 23,31% | 23,21% | 23,22% | 23,26% | 23,21% |
| Тяжелые металлы | | ЕАЭС Ф 2.1.4.21 ГФ РК, т.1, 2.4., метод А | Не более 0,01% | соответ ст | соответ ст | соответ ст | соотв ет ст | соотве т ст | соответ ст | соответ ст |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК т. 1, 2.6.12, 2.6.13 и 5.1.4, Ф ЕАЭС 2.3.1.4 | Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов (2.6.12): -не более 10 ⁵ бактерий и не более 10 ⁴ грибов в грамме или миллилитре; -не более 10 ³ энтеробактерии и некоторых других грамотрицательных бактерий в грамме или миллилитре (2.6.13); -отсутствие Escherichia coli (1 г или 1 мл) (2.6.13); -отсутствие Salmonella (10 г или 10 мл) (2.6.13). | соответ ст | соответ ст | соответ ст | соотв ет ст | соответ ст | соответ ст | соответ ст |
| Количественное определение: - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | Не менее 6 % | 6,49 | 6,45 | 6,44 | 6,43 | 6,43 | 6,42 | 6,41 |

Для разработки технологии получения экстракта черноголовки обыкновенной подобраны экстрагент, метод и условия экстракции.

Сухой экстракт получали по технологии: ультразвуковая экстракция (получение), очистка, сгущение и сушка. Для последующей наработки и получения субстанции «Черноголовка обыкновенная экстракт сухой» необходимо использовать ультразвуковой метод и для экстракции использовать 70% этиловый спирт для получения максимального выхода биологически активных веществ. При изучении технологических характеристик надземной части черноголовки установлено, что оптимальная степень измельчения сырья составляет 5 мм, соотношение сырье – экстрагент – 1:20.

По результатам исследования химического состава травы растений рода черноголовки, представленных в литературе, установлено наличие розмариновой и галловой кислоты.

Готовый продукт представлял собой сухой порошок, коричневого цвета с характерным запахом. Присутствие фенольных кислот в полученном экстракте идентифицировали путем проведения качественных реакций и хроматографического анализа, характерных для данной группы биологически активных веществ (розмариновой, галловой кислоты и т.д.).

Разработан новый способ получения сухого экстракта черноголовки обыкновенной, который за счет применения ультразвуковой экстракции, характеризуется высокой производительностью технологического процесса, низким расходом экстрагента, исключением трудоемких и времязатратных процедур, что делает его доступным, рациональным и экономичным.

Разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции «Черноголовка обыкновенная экстракт сухой», в соответствии с которым производится наработка опытных партий для дальнейших фармацевтических и фармакологических работ.

5 ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ, ЦИТОТОКСИЧНОЙ, АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЕЙ И ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБРАЗЦОВ ЭКСТРАКТОВ

5.1 Антимикробная активность образцов экстрактов, полученных ультразвуковой кавитацией

Для оценки антимикробной активности проб использовался метод диффузии в агар, описанный в разделе 2.2. Исследование проводили на базе кафедры биомедицины НАО «Медицинский университет Караганды» (г. Караганда, Казахстан).

Изучение антимикробной активности 5 образцов проводилось по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и к дрожжевому грибку *Candida albicans* диско-диффузионным методом. Препараты сравнения – бензилпенициллин для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка *Candida albicans* (таблица 27).

Статистическую обработку проводили методами параметрической статистики с вычислением средней арифметической и стандартной ошибки.

Таблица 27 – Антимикробная активность ультразвуковых экстрактов *Prunella vulgaris* L.

| Шифр образца | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |
|---------------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| PVВ | 9,0 ± 1,0 | 10,0 ± 1,0 | - | - | 9,0 ± 1,0 |
| PV30 | 12,0 ± 1,0 | 11,0 ± 1,0 | - | - | 10,0 ± 1,0 |
| PV50 | 11,0 ± 1,0 | 12,0 ± 1,0 | - | - | 11,0 ± 1,0 |
| PV70 | 23,0 ± 1,0 | 21,0 ± 1,0 | - | - | 14,0 ± 1,0 |
| PV96 | 15,0 ± 1,0 | 13,0 ± 1,0 | - | - | 11,0 ± 1,0 |
| Бензилпенициллин натриевая соль | 15,0 ± 1,0 | 16,0 ± 1,0 | - | - | - |
| Спирт этиловый (96%) | 9,0 ± 1,0 | 9,0 ± 1,0 | - | - | 9,0 ± 1,0 |
| Нистатин | - | - | - | - | 22,0 ± 1,0 |

В результате исследования на антимикробную активность установлено, что образец PV70 проявляет выраженную антимикробную активность по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis, и отсутствие активности в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и слабую противогрибковую активность к дрожжевому грибку *Candida albicans*.

Образец PV96 проявляет слабую антимикробную активность по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и слабую противогрибковую активность к дрожжевому грибку *Candida albicans*, и отсутствие активности в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Образцы PVв, PV30, PV50, показывают слабую антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, и слабую противогрибковую активность к дрожжевому грибку *Candida albicans*, и отсутствие активности в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

96 % этиловый спирт проявляет слабую антимикробную активность по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и отсутствие активности в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и слабую противогрибковую активность к дрожжевому грибку *Candida albicans*.

5.2 Скрининг образцов сухих экстрактов, полученных ультразвуковой кавитацией, на противовоспалительную активность

В данном исследовании оценена противовоспалительная активность сухих ультразвуковых экстрактов *Prunella vulgaris* L. с использованием каррагинин-индуцированного отека лапы крысы. В результате эксперимента PV70 показал достоверное угнетение отека на 76,8% в дозе 25 мг/кг по сравнению со стандартным препаратом диклофенаком в дозе 10 мг/кг. В то же время при сравнении эффекта PV70 и диклофенака при расчете ингибирующего эффекта выявлена значительная разница между его выраженностью, так угнетающий эффект PV70 составил 76,8%, тогда как воспалительно-подавляющий эффект диклофенака составил 66,6%.

Можно отметить, что PV70 обладает выраженной противовоспалительной активностью и превосходит стандартный препарат диклофенак, препарат с наибольшей противовоспалительной активностью из группы нестероидных противовоспалительных средств.

При введении флогогена под апоневроз отечной лапки крыс, у всех подопытных животных развился выраженный отек. Полученные данные представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Противовоспалительная активность ультразвуковых экстрактов на модели каррагинин-индуцированного отека лапы крысы

| Образцы | Масса лапы без отека, г | Масса отечной лапы, г | Прибавка веса, г | Прибавка в весе, % | Ингибирующий эффект, % |
|---|-------------------------|-----------------------|------------------|--------------------|------------------------|
| Контроль | 113.4±2.6 | 180.7±5.7 | 67.3±3.5 | 59.3 ±2.2 | - |
| PV96 | 115.3±3.7 | 161.6±4.8 | 46.3±4.0 | 40.1 ±3.5 | 31.2 |
| PV30 | 118.6±2.4 | 154.4±3.5 | 35.8±1.9 | 30.2 ±3.8 | 46.8 |
| PV50 | 119.0±2.2 | 156.7±4.3 | 37.7±4.0 | 31.2 ±2.0 | 44.0 |
| PVВ | 117.1±1.9 | 148.4±2.6 | 31.3±2.6* | 26.7 ±4.2 | 53.5 |
| PV70 | 116.6±1.3 | 132.2±2.0* | 15.6±1.5* | 13.4 ±3.5* | 76.8 |
| Диклофенак | 120.2±3.2 | 142.7±3.4* | 22.5±1.3* | 18.7 ±1.6* | 66.6 |
| Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем | | | | | |

Из таблицы 28 видно, что однократное внутрижелудочное введение PV96, PV30, PV50 и PVВ не оказывает статистически значимого влияния на экссудативную фазу воспаления, то есть практически не уменьшает выраженность отека лап у крыс после введения 1% раствора каррагинина

5.3 Скрининг образцов экстрактов *Prunella vulgaris* L. на цитотоксичность

Биоанализ на летальность артемии (*Artemia salina*) использовали для определения цитотоксической активности ультразвуковых экстрактов *Prunella vulgaris* L. Данные, полученные в ходе биоанализа, представлены на рисунке 6.

Чтобы лучше оценить переносимость выбранных потенциально биологически активных образцов, *Artemia salina* обычно используется в качестве модели в исследованиях смертности. BSLA, по-видимому, является самым быстрым, простым в использовании и недорогим методом среди других [130]. Этот метод обеспечивает удобную отправную точку для исследований цитотоксичности, а также для общего скрининга токсичности синтетических, полусинтетических и натуральных продуктов.

В настоящем исследовании наблюдалась цитотоксическая активность 5 экстрактов *Prunella vulgaris* L. По результатам эксперимента установлено, что PV50, PV70, PV96 в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл проявляют слабую цитотоксическую активность, поэтому смертность личинок при использовании PV50 составляет 11,1%, 11,1. % и 33,3% соответственно; PV70 - 22,2%, 22,2% и 33,3% соответственно; PV96 - 22,2%, 33,3% и 33,3% соответственно (рисунок 12).

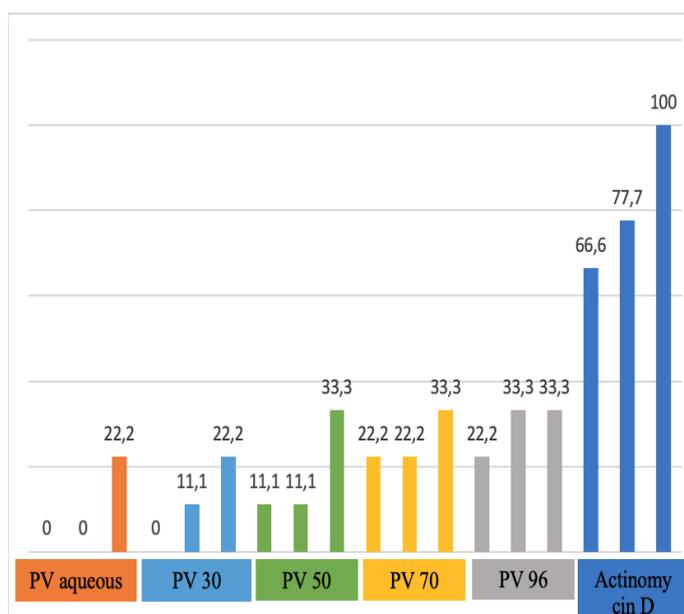


Рисунок 12 – Цитотоксичность образцов сухих экстрактов *Prunella vulgaris* L.

PV в проявляет цитотоксичность в концентрации 100 мкг/мл - 22,2%. PV30 проявляет цитотоксичность в концентрациях 10 и 100 мкг/мл – 11,1% и 22,2% соответственно.

Так, PV50, PV70, PV96 в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл, PV30 в концентрации 10 и 100 мкг/мл и PV в концентрации 100 мкг/мл демонстрируют слабую цитотоксическую активность.

В результате изучения цитотоксической активности выявлено, что во всех испытанных экстрактах смертность *A. salina* (Leach) не превышает 10-33% от общего числа организмов, что свидетельствует о низком уровне токсичности и при этом безопасность препаратов на основе представленных экстрактов *Prunella vulgaris* L.

Можно сделать вывод, что все протестированные экстракты, не проявляющие общей токсичности, могут рассматриваться как кандидаты для дальнейших исследований активности и токсичности *in vitro* на выбранных клеточных линиях и *in vivo* на лабораторных животных. Если на различных моделях будет продемонстрировано отсутствие токсичности, появится возможность разработки новых биологически активных веществ и углубленного изучения фармакологических свойств.

5.4 Изучение антиоксидантной активности сухих экстрактов *Prunella vulgaris* L. методами FRAP и DPPH

Для сравнительного анализа и повышения достоверности определения исследовали возможную связь между значениями оптической плотности (ОП) и концентрацией спирта и водных растворов всех исследованных растительных экстрактов. На рисунке 13 и в таблице 29 представлена зависимость концентрации от значений ОП для исследованных растительных экстрактов и

эталонного вещества — аскорбиновой кислоты.

Антиоксидантную активность измеряли с помощью анализов DPPH и FRAP. PV96 и PV70 в концентрации 1 мг/мл демонстрировали высокий уровень DPPH 80,48% и 76,51% соответственно, а PV70 в концентрации 1 мг/мл демонстрировал высокий уровень FRAP $2,51 \pm 0,15\%$. В другой работе наблюдались разные результаты в зависимости от значений DPPH [131]. Установлено, что значения *Prunella vulgaris* L., экстрагированных 60%-ным этанолом, выше, чем у тех, которые экстрагировались водой, 95%-ным и 30%-ным этанолом. Однако в нашей работе PV96 показал самые высокие значения DPPH среди всех экстрактов. Предыдущие эксперименты в литературе выявили ингибирующую активность DPPH на метанольном экстракте *Prunella vulgaris* L. 35,4% в концентрации $100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ [132], водно-спиртовом экстракте от 38,26754% до 50,21930% [133], хлороформном экстракте 33,77193% до 42,32456% [133]. Потенциал FRAP метанольного экстракта *Prunella vulgaris* L. составил $31,209 \pm 0,150$ мг эквивалента аскорбиновой кислоты (ЭАК)/г сухого веса [134]. Различия в наших результатах и результатах, полученных из литературы, обусловлены разными факторами: тестировались разные части растений, разные географические источники происхождения травы, разные методы экстракции и приготовления.

Таким образом, из приведенных выше результатов видно, что фотоэлектрические системы имеют большой потенциал в качестве перспективного природного источника БАВ и могут быть использованы в фармацевтическом производстве.

Таблица 29 – Связь между оптической плотностью и концентрацией ультразвуковых экстрактов

| № | Образцы Экстракты | Среднее значение и стандартное отклонение | | | |
|---|-------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1.0 |
| 1 | PV96 | 1.56 ± 0.21 | 1.50 ± 0.12 | 1.21 ± 0.25 | 0.96 ± 0.11 |
| 2 | PV70 | 1.95 ± 0.18 | 2.4 ± 0.11 | 2.41 ± 0.11 | 2.51 ± 0.15 |
| 3 | PV50 | 1.00 ± 0.44 | 1.49 ± 0.92 | 1.04 ± 0.65 | 0.77 ± 0.06 |
| 4 | PV30 | 0.12 ± 0.02 | 0.12 ± 0.01 | 0.14 ± 0.01 | 0.15 ± 0.01 |
| 5 | PVв | 1.62 ± 0.60 | 0.97 ± 0.96 | 1.41 ± 1.64 | 0.16 ± 0.01 |
| 6 | Аскорбиновая кислота | 1.925 | 2.284 | 2.257 | 2.316 |

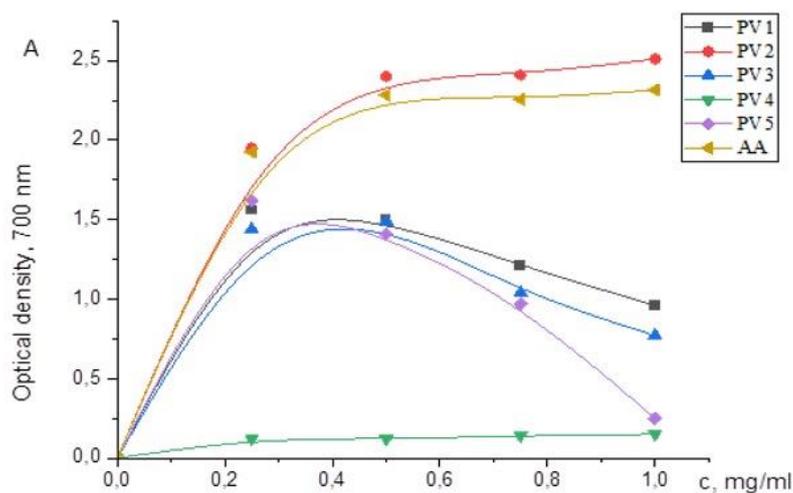


Рисунок 13 – Зависимость оптической плотности растительного экстракта от концентрации

Обнаружено, что увеличение оптической плотности указывает на увеличение потенциала восстановления. Как видно из полученных диаграмм зависимостей, наибольшие значения восстановительного потенциала по методу FRAP наблюдаются у PV70 в пересчете на эквивалент аскорбиновой кислоты. Если сравнить экстракты между собой, то наибольшим потенциалом обладает PV70, а наименьшим значением восстановительного потенциала обладает PV30. Из рисунка 13 видно, что при средних значениях концентраций 0,2 - 0,6 мг/мл наблюдается повышение антиоксидантной активности экстрактов PV96, PV50, PV. Дальнейшее снижение АОА для указанных выше образцов может быть связано с увеличением концентрации веществ, не проявляющих антиоксидантной активности (таблица 30, рисунок 14).

Таблица 30 – Зависимость антиоксидантной активности (%) от концентрации растительных экстрактов

| № | Образцы Экстракты | Средние значения | | | |
|---|----------------------|------------------|-------|-------|-------|
| | | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1.0 |
| 1 | PV96 | 72.35 | 75.43 | 78.28 | 80.48 |
| 2 | PV70 | 54.24 | 65.70 | 71.86 | 76.51 |
| 3 | PV50 | 68.79 | 62.88 | 67.52 | 63.53 |
| 4 | PV30 | 51.85 | 53.21 | 60.44 | 62.36 |
| 5 | PVВ | 45.98 | 48.23 | 49.11 | 51.87 |
| 6 | ВНА acid | 80.7 | 80.3 | 80.5 | 80.7 |

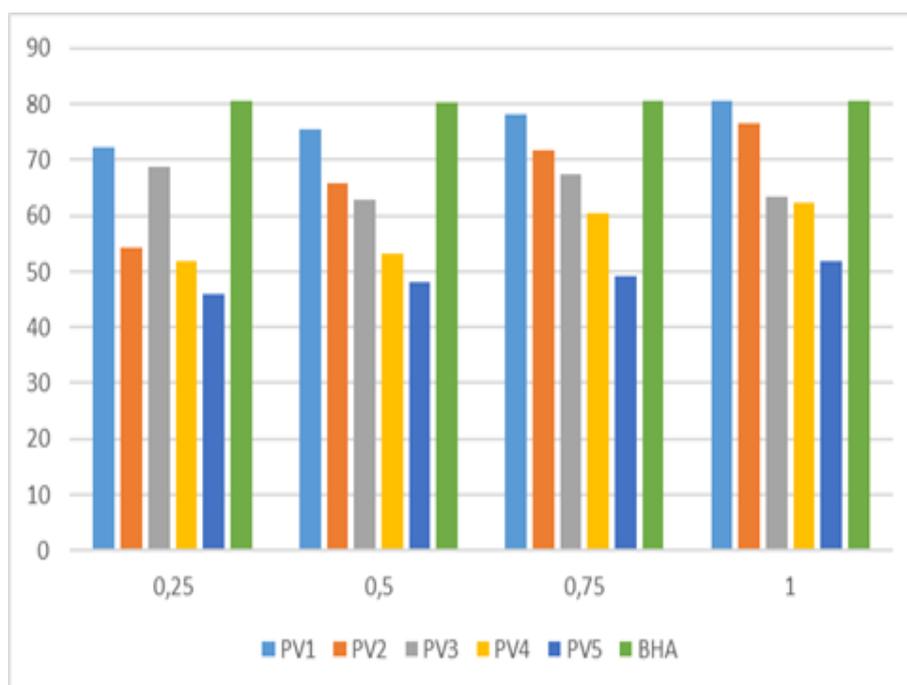


Рисунок 14 – Диаграмма зависимости антиоксидантной активности растительных экстрактов от концентрации

Как видно из наблюдений, представленных в таблице 30 и на рисунке 14, все ультразвуковые экстракты *Prunella vulgaris* L. проявляют достаточно высокую антиоксидантную активность, измеренную по радикалу DPPH, за исключением PV5

5.5 Острая токсичность сухих экстрактов *Prunella vulgaris* L.

В ходе изучения безопасности на мышах образца PV70 в интервале доз 500- 2000мг/кг установлено, что при однократном введении экстракта во всех исследованных дозах отмечено отсутствие патологических изменений в поведении животных.

Состояние и поведение обследованных животных не отличались от нормы и соответствовали наблюдаемым у особей контрольной группы. Не наблюдалось изменений в их двигательной активности и реакциях на различные виды раздражителей, такие как тактильные, болевые, звуковые и световые стимулы.

За период проведения исследования гибели животных не наблюдалось. Результаты исследования острой токсичности при однократном внутрижелудочном введении тестируемых доз образца PV70 представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Результаты измерения токсичности образца PV70 для мышей при однократном внутрижелудочном введении

| Доза образца (мг/кг) | Число животных | | Число погибших | | Доля погибших животных |
|-------------------------|----------------|-------|----------------|-------|---------------------------|
| | Самцы | самки | самцы | самки | |
| 500 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| | 16 | | 0 | | |
| 1000 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| | 16 | | 0 | | |
| 1500 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| | 16 | | 0 | | |
| 2000 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| | 16 | | 0 | | |

В ходе проведенного исследования отмечается незначительное снижение прироста массы тела животных, которые получали испытуемые дозы экстракта на протяжении всего периода наблюдения. Аналогичная тенденция к небольшому снижению прироста массы тела также наблюдалась в контрольной группе (таблица 32).

Массу тела животных определяли взвешиванием до введения испытуемых доз и на 1, 3, 7, 14 сутки эксперимента.

Таблица 32 – Динамика массы тела мышей при внутрижелудочном введении образца PV70

| Доза, мг/кг | Кол-во | Исходная масса | 1 сутки | 3 сутки | 7 сутки | 14 сутки |
|-------------|--------|-------------------|-----------|------------|------------|------------|
| Контроль | 16 | 32,5±3,16 | 31,3±3,52 | 30,5±4,57 | 27,93±4,55 | 27,72±3,98 |
| 500 | 16 | 32,0±2,85 | 30,1±2,79 | 29,15±3,35 | 26,35±2,01 | 27,96±2,08 |
| 1000 | 16 | 31,8±4,23 | 30,1±2,64 | 27,7±3,39 | 26,65±2,59 | 27,38±2,27 |
| 1500 | 16 | 32,2±2,61 | 31,9±2,4 | 31,8±4,1 | 30,09±2,06 | 30,75±2,68 |
| 2000 | 16 | 31,9±3,54 | 30,3±3,36 | 28,75±4,28 | 25,67±3,59 | 27,72±3,98 |

Примечание: *– $p < 0,05$ по сравнению со значениями у животных контрольной группы.

Все животные опытных групп были обычного размера, их рост и вес соответствовал возрасту. Волосной покров равномерно покрывал тело, подкожная клетчатка влажная, ее сосуды умеренного наполнения.

Обнаружено, что масса тела мышей в каждой из групп оставалась в пределах исходных значений, и значительных изменений в приросте массы тела у животных всех групп не наблюдалось.

Результаты биохимических анализов сыворотки крови представлены в таблицах 33,34.

Таблица 33 – Влияние образца PV70 на показатели крови

| Указатель | Пол | Контроль | | 500 | | 1000 | |
|------------------|-----|----------|-----------|-----|-----------|------|-----------|
| | | n | | n | | n | |
| общий белок, г/л | ♂ | 8 | 66,6±2,0 | 8 | 73,6±6,0 | 8 | 62,9±3,1 |
| | ♀ | 8 | 68,3±2,1 | 8 | 68,4±1,7 | 8 | 69,4±2,1 |
| альбумин, г/л | ♂ | 8 | 33,8±1,0 | 8 | 33,8±1,2 | 8 | 36,0±1,3 |
| | ♀ | 8 | 37,4±1,1 | 8 | 38,4±1,5* | 8 | 37,1±1,5 |
| глюкоза, ммоль/л | ♂ | 8 | 6,32±0,22 | 8 | 6,29±0,16 | 8 | 6,36±0,20 |
| | ♀ | 8 | 6,03±0,61 | 8 | 6,04±0,56 | 8 | 6,51±0,71 |
| ОЛ, г/л | ♂ | 8 | 3,52±0,40 | 8 | 3,00±0,74 | 8 | 2,90±0,33 |
| | ♀ | 8 | 2,62±0,49 | 8 | 3,65±0,39 | 8 | 2,81±0,31 |
| ТГ, ммоль/л | ♂ | 8 | 1,17±0,12 | 8 | 1,6±0,18 | 8 | 1,17±0,12 |
| | ♀ | 8 | 1,42±0,08 | 8 | 1,5±0,14 | 8 | 1,14±0,08 |
| ХС, ммоль/л | ♂ | 8 | 1,82±0,39 | 8 | 1,88±0,17 | 8 | 1,72±0,39 |
| | ♀ | 8 | 1,98±0,47 | 8 | 1,82±0,17 | 8 | 1,97±0,41 |

Примечание: * — различие в сравнении с контролем значимо по t-критерию Стьюдента

Таблица 34 – Влияние образца PV70 на показатели крови

| Показатель | Пол | Контроль | | 1500 | | 2000 | |
|------------------|-----|----------|-----------|------|-----------|------|-----------|
| | | n | | n | | n | |
| общий белок, г/л | ♂ | 8 | 66,6±2,0 | 8 | 69,5±5,2 | 8 | 69,4±3,5 |
| | ♀ | 8 | 68,3±2,1 | 8 | 69,5±3,9 | 8 | 69,7±4,1 |
| альбумин, г/л | ♂ | 8 | 33,8±1,0 | 8 | 34,7±4,8 | 8 | 35,1±2,5 |
| | ♀ | 8 | 37,4±1,1 | 8 | 39,9±1,0 | 8 | 35,5±1,9 |
| глюкоза, ммоль/л | ♂ | 8 | 6,32±0,22 | 8 | 7,6±0,5 | 8 | 6,81±0,18 |
| | ♀ | 8 | 6,03±0,61 | 8 | 6,7±0,2 | 8 | 7,25±0,16 |
| ОЛ, г/л | ♂ | 8 | 3,52±0,40 | 8 | 1,92±0,28 | 8 | 1,83±0,14 |
| | ♀ | 8 | 2,62±0,49 | 8 | 2,2±0,2 | 8 | 1,92±0,30 |
| ТГ, ммоль/л | ♂ | 8 | 1,17±0,12 | 8 | 1,4±0,7 | 8 | 0,86±0,31 |
| | ♀ | 8 | 1,42±0,08 | 8 | 1,5±0,5 | 8 | 1,32±0,18 |
| ХС, ммоль/л | ♂ | 8 | 1,82±0,39 | 8 | 1,8±0,50 | 8 | 1,7±0,35 |
| | ♀ | 8 | 1,98±0,47 | 8 | 1,78±0,5 | 8 | 1,57±0,22 |

Примечание: * — различие в сравнении с контролем значимо по t-критерию Стьюдента

Как видно из представленных в таблицах результатов эксперимента введение образца PV70 в дозах 500, 1000, 1500, 2000 мг/кг, не отмечено высоких показателей. Не повышены концентрации липидов в сыворотке крови животных, что свидетельствует об отсутствии токсического эффекта, тем самым образец PV70 не влияет на патологию почек и печени. Таким образом данные свидетельствуют об отсутствии токсического эффекта.

В ходе изучения острой токсичности образец PV70 при пероральном введении белым беспородным мышам не было выявлено признаков токсичности, летальность отсутствовала, что не позволило установить LD₅₀.

Таким, образом, образец PV70 при однократном пероральном введении *in vivo* относится к малотоксичным веществам (IV класс токсичности).

В данном разделе оценивалась антимикробная, антиоксидантная, противовоспалительная активность, цитотоксичность и острая токсичность. PV 70 показал выраженную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Кроме того, PV70 показал высокий уровень DDPH 76,51 и высокий уровень FRAP 2,51±0,15, что сопоставимо со стандартами ВНА и аскорбиновой кислоты. PV70 продемонстрировал значительное (P < 0,05) подавление отека лапы на 76,8% на 4-м часу воспалительной реакции. Анализ методом ВЭЖХ выявил высокое содержание розмариновой кислоты в PV70, оцениваемое в 7,6%, что определяет наличие вышеописанной биологической активности. Кроме того, PV70 в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл показал низкую токсичность по *A. Salina*. Результаты этих исследований позволяют предположить, что *Prunella vulgaris* L. является потенциальным источником природного агента. Полученные результаты позволяют нам подчеркнуть потенциальное использование травы *Prunella vulgaris* L. в качестве источника незаменимых природных биологически активных веществ.

6 РАЗРАБОТКА СОСТАВА И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА *PRUNELLA VULGARIS* L.

6.1 Обоснование состава и разработка технологии гелевой лекарственной формы на основе Na-КМЦ

Сухой экстракт из черноголовки обыкновенной, обладающий высокой противовоспалительной и антиоксидантной активностью благодаря сочетанию биологически активных соединений, является объектом исследования. Для создания оптимальной составной части геля было разработано несколько гелевых композиций, которые были проверены на их биологическую эффективность и фармацевтическую доступность.

Выбор подходящих основ для формирования геля является значимой задачей, поскольку требовалось использовать как липофильные, так и гидрофильные основы, которые не вызывают аллергических реакций, раздражения и обеспечивают эффективное высвобождение лекарственного вещества из геля. Предварительно проведены исследования по подбору гелеобразователей и оценке физико-химических и структурно-механических свойств используемых основ. В процессе этого были определены параметры, такие как температура плавления, кислотное, перекисное и йодное числа. Все выбранные основы соответствовали требованиям Государственной Фармакопеи Республики Казахстан и Фармакопеи Евразийского экономического союза, предъявляемым к основам для приготовления гелей. Нами изготовлено 10 образцов геля с использованием карбопола и 5 образцов с натрия карбоксиметилцеллюлозой (Na-КМЦ).

Исходный этап экспериментов включал в себя подбор состава геля, использование основных и дополнительных компонентов, разработку технологии его приготовления, анализ полученных характеристик и обоснование перспективности применения этого состава для разработки новой мягкой лекарственной формы.

В качестве гелеобразователя использовали натрия карбоксиметилцеллюлозу (Na-КМЦ) из России (таблица 35). Нами смешено необходимое количество очищенной воды с расчетным количеством концентрированного натрия гидроксида и в течение 30 минут вращали при 20 ± 5 оборотах в минуту. Проведение оценки органолептических характеристик геля осуществлялось визуально. Были замечены следующие аспекты: равномерность и прозрачность. Определение уровня pH проводилось с использованием потенциометра в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан.

При анализе полученных образцов модельных гелей были установлены органолептические свойства (внешний вид, окрас, аромат, равномерность) и определено значение pH. Однородность определялась отсутствием видимых частиц ингредиентов, посторонних примесей, а также признаков свертывания, скопления частиц или разделения фаз. Все исследуемые образцы базовых

компонентов, которые получены, отличались высокой прозрачностью, однородностью.

Для объективной оценки были подготовлены пять гель-композиций с разной концентрацией действующего вещества на основе Na-КМЦ. На основе ранее проведенных фармакологических исследований, концентрация сухого экстракта в геле составляла 1%. Эти гели включают в себя экстракт черноголовки обыкновенной, натрий карбоксиметилцеллюлозу, глицерин и воду.

Натриево-карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ) добавляют в лекарственные гели по нескольким причинам:

Толщина и текстура: Na-КМЦ является гелеобразующим агентом, который помогает придать гелю нужную консистенцию и текстуру. Это особенно важно для лекарственных гелей, чтобы обеспечить удобное и легкое нанесение на кожу или другие поверхности.

Удержание влаги: Na-КМЦ способствует удержанию влаги в геле, что может быть полезно для кожи, особенно при лечении сухости или раздражения.

Увеличение адгезии и длительности действия: Этот компонент может помочь гелю лучше прилегать к коже или другим поверхностям, что улучшает его способность к длительному действию и усваиванию активных ингредиентов.

Стабилизация формулы: Na-КМЦ может служить стабилизатором, предотвращая разделение или осаждение ингредиентов в геле.

Повышение эффективности лекарственного вещества: Поскольку Na-КМЦ помогает увеличить адгезию и длительность действия геля, это может также улучшить эффективность лекарственного вещества, позволяя ему дольше оставаться на месте применения и медленнее выделяться.

Таблица 35 - Состав образцов противовоспалительного и антиоксидантного геля на основе Na-КМЦ (10 г)

| Название ингредиентов | Назначение | Образцы | | | | |
|--|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | | PVN1 | PVN 2 | PVN 3 | PVN 4 | PVN 5 |
| Экстракт черноголовки обыкновенной (г) | Действующее вещество | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Na-КМЦ (г) | Гелевая основа | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 |
| Глицерин (мл) | Пластификатор | 2 | 3 | 2 | 2,5 | 1,5 |
| NaOH гидроксид 10% | Регулятор кислотности | 2,5 | 1,5 | 2 | 0,5 | 1 |
| Твин 80 (мл) | Стабилизатор | 1,2 | - | 1,2 | - | 1,2 |
| вода очищенная (мл) | Растворитель до | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Таким образом, добавление Na-КМЦ в лекарственные гели помогает

обеспечить необходимую текстуру, повысить эффективность и длительность действия лекарственных веществ, а также обеспечить стабильность формулы.

Образец №1 вызывает жгучее ощущение на поверхности кожи из-за добавления большого количества гидроксида натрия, которая была необходима для контроля pH разрабатываемого геля.

ТВИН-80, также известный как полисорбат-80, часто используется в косметических и фармацевтических продуктах, включая гели. Его добавляют по нескольким причинам: Эмульгатор ТВИН-80 помогает смешивать ингредиенты, которые обычно не смешиваются, такие как вода и масло. Это важно для создания геля с однородной текстурой и стабильными свойствами.

В некоторых случаях ТВИН-80 может помочь усилить проникновение активных ингредиентов в кожу, что делает продукт более эффективным.

Итак, добавление ТВИН-80 в гель может обеспечить ему лучшую текстуру, стабильность, увлажняющие свойства и улучшить его эффективность.

Образец №2 характеризуется слишком жидкой текстурой, что затрудняет равномерное нанесение геля, возможно слишком большое количество жидких ингредиентов и привело к текучести.

Замечено, что образцы №4 и №5 имеют недостаточные клейкие свойства и не обладают обволакивающими характеристиками, а также неудовлетворительными органолептическими характеристиками.

Возможно, это характеризуется уменьшением глицерина или полным его отсутствием.

Глицерин обладает высокими увлажняющими свойствами, которые помогают смягчить и увлажнить кожу.

Это особенно важно для лекарственных гелей, которые могут применяться на кожу для лечения различных состояний, таких как сухость, раздражение или экзема.

Помощь в усвоении активных ингредиентов: Глицерин может помочь активным ингредиентам лучше проникать в кожу благодаря своим увлажняющим свойствам. Это может улучшить эффективность лекарственного геля.

Стабилизация текстуры: Глицерин может помочь создать стабильную текстуру геля, предотвращая его разделение или осаждение активных ингредиентов.

Повышение срока годности: Глицерин обладает консервантными свойствами, которые могут помочь продлить срок годности лекарственного геля, защищая его от микробного загрязнения. Таким образом, добавление глицерина в лекарственные гели помогает улучшить их увлажняющие свойства, помочь активным ингредиентам проникать в кожу, обеспечить стабильность текстуры и продлить срок годности продукта.

Проведенное исследование качества различных составов геля, изготовленных по образцам с 1 по 5, показало, что оптимальным с точки зрения текстуры, удобства применения и эффективности лечения является образец №3. Исходя из этого, в качестве оптимального состава геля был выбран образец №3.

6.2 Обоснование состава и разработка технологии гелевой лекарственной формы на основе карбопола.

Карбопол – акриловый полимер. Карбопол нетоксичен и не вызывает раздражений, поэтому подходит для гелевых препаратов. Карбопол 940 часто используется в качестве гелеобразователя в гелевых препаратах.

Для получения хорошего гелевого препарата необходимо учитывать концентрацию карбопола 940 в качестве гелеобразующего агента.

По результатам описательного исследования было получено, что карбопол 940 оказывал влияние на физические свойства геля в виде рН, вязкости, растекаемости, адгезии, органолептики и стабильности.

Карбопол 940 обычно используется в лекарственных формах с контролируемым высвобождением. Процесс получения геля с карбополом 940 и сухим экстрактом может быть описан следующим образом:

Необходимо подготовить необходимое оборудование и ингредиенты, включая карбопол 940, сухой экстракт, воду, растворитель (как правило, требуется нейтрализующий агент, такой как натрия гидроксид) и другие компоненты, необходимые для конкретной формулы геля.

Вода должна быть чистой и деионизированной для предотвращения примесей и загрязнений. Постепенно добавить карбопол 940 в воду, обеспечивая медленное и равномерное вмешивание, чтобы избежать образования комков. Перемешивать до полного растворения карбопола и образования геля.

Этот этап может занять некоторое время. Далее добавить сухой экстракт в получившийся гель и тщательно перемешать, чтобы обеспечить равномерное распределение действующего вещества, а также добавить другие компоненты, указанные в составе и продолжить перемешивание.

Необходимо нейтрализовать гель, добавив 10% раствор натрия гидроксида (NaOH), медленно и осторожно. При этом регулярно необходимо проверять рН с использованием рН-метра.

Отслеживать консистенцию и текстуру геля, чтобы убедиться, что они соответствуют заданным характеристикам. Нами разработан состав 10 моделей геля с карбополом 940 (таблица 36).

Таблица 36 - Состав образцов противовоспалительного и антиоксидантного геля на основе карбопола.

| Название ингредиента | Назначение | Образцы гелей с карбополом 940 | | | | | | | | | |
|--|----------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | | GP V1 | GP V2 | GP V3 | GP V4 | GP V5 | GP V6 | GP V7 | GP V8 | GP V9 | GPV 10 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Экстракт черноголовки обыкновенной (г) | Действующее вещество | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Продолжение таблицы 36

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------------|-----------------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Эфирное масло мяты | Корригент запаха, БАВ | - | 0,5 | - | 0,5 | - | 0,5 | - | 0,5 | - | 0,5 |
| Карбопол - 940 (г) | Гелевая основа | 0.5 | 0.5 | 0.75 | 0.75 | 1.0 | 2.0 | 1.5 | 1.5 | 2.0 | 2.0 |
| Глицерин (мл) | Пластификатор | - | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 |
| NaOH гидроксид 10% (мл) | нейтрализатор | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Твин 80 (мл) | Эмульгатор | 0.5 | 0.5 | 0.75 | 0.75 | 1.0 | 1.0 | 1.5 | 1.5 | 2.0 | 2.0 |
| вода очищенная (мл) | Растворитель до | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Карбопол (карбомер) часто добавляют в лекарственные гели по нескольким причинам:

Гелеобразующее свойство: Карбопол обладает высокой вязкостью водных растворов, что делает его отличным гелеобразующим агентом. Он помогает придать гелю нужную текстуру и консистенцию для легкого и равномерного нанесения. **Стабилизация формулы:** Карбопол образует гель-сетку в водных растворах, которая помогает стабилизировать другие ингредиенты в геле. Это предотвращает разделение фаз и осаждение частиц, обеспечивая однородность и стабильность геля. **Регулирование вязкости:** Карбопол позволяет регулировать вязкость геля в зависимости от его концентрации в формуле. Это важно для создания гелей с оптимальной текучестью и удобством использования. **Увеличение адгезии и удержание влаги:** Карбопол способствует увеличению адгезии геля к поверхности кожи или другим материалам, что обеспечивает более длительное действие лекарственных веществ. Он также помогает удерживать влагу на коже, что может быть полезно при лечении различных состояний кожи.

Помощь в усвоении лекарственных веществ: Карбопол может увеличить усвояемость лекарственных веществ благодаря своим гелеобразующим и стабилизирующим свойствам, что способствует более эффективному лечению.

Таким образом, добавление карбопола в лекарственные гели помогает обеспечить нужную текстуру, стабильность формулы, увеличение адгезии и удержание влаги, а также увеличить усвояемость лекарственных веществ.

Добавление глицерина в гели с карбополом может иметь несколько целей:

Увлажнение кожи: Глицерин обладает отличными увлажняющими свойствами, которые помогают смягчить и увлажнить кожу. Даже в присутствии карбопола, который сам по себе способен удерживать влагу, глицерин может усилить увлажняющий эффект геля и сделать его более подходящим для ухода за кожей.

Повышение комфорта использования: Глицерин способен смягчать и сглаживать кожу, что делает процесс нанесения геля более комфортным для пользователя. Это особенно полезно при использовании гелей на чувствительных участках кожи или при длительном контакте с кожей.

Повышение эффективности увлажнения: Комбинация глицерина и карбопола может создать более эффективное средство увлажнения за счет их совместного действия. Глицерин усиливает удержание влаги в коже, тогда как карбопол обеспечивает структурную поддержку и удерживает воду в самом геле.

Повышение стабильности формулы: Глицерин может помочь поддерживать стабильность формулы геля, предотвращая сушку и обеспечивая сохранение его текстуры и свойств в течение длительного времени.

Таким образом, *добавление глицерина в гели с карбополом* позволяет усилить увлажняющие свойства геля, улучшить комфорт его использования, повысить эффективность увлажнения кожи и обеспечить стабильность формулы.

Добавление NaOH гидроксида 10% в гели с карбополом часто используется для регулирования pH-уровня и активации карбопола. Вот несколько основных причин:

Активация карбопола: Карбопол, или карбомер, является полимером, который образует гель при контакте с водой. Однако он обычно находится в нейтральной среде и может требовать добавления щелочи для активации. NaOH гидроксида 10% в помогает установить оптимальный pH для карбопола, что способствует его эффективной гелеобразующей способности.

Регулирование pH: NaOH гидроксида 10% в добавляется для регулирования pH-уровня геля. Поддержание определенного pH важно для обеспечения стабильности и эффективности лекарственных формул. Кроме того, оптимальный pH может быть важен для совместимости с кожей или другими поверхностями.

Улучшение текучести и консистенции геля: NaOH гидроксида 10% в может влиять на консистенцию геля, делая его более пластичным и легко наносимым. Это помогает улучшить общее впечатление от использования геля и обеспечить более равномерное распределение активных ингредиентов.

Улучшение совместимости с кожей: Правильный pH геля может быть важен для его совместимости с кожей. Слишком низкий или высокий pH может вызвать раздражение или сухость кожи. Добавление NaOH гидроксида 10% в позволяет достичь оптимального pH, что способствует более комфортному использованию геля.

Таким образом, добавление NaOH гидроксида 10% в в гели с карбополом помогает активировать карбопол, регулировать pH, улучшить текучесть и совместимость с кожей, что в целом улучшает эффективность и комфорт использования геля.

Добавление биологически активной субстанции (сухой экстракт черноголовки обыкновенной) в гели с карбополом может быть полезным для

достижения определенных терапевтических целей. Вот несколько причин, по которым это может быть сделано:

Усиление терапевтического эффекта: Карбопол образует гель, который может служить хорошей основой для локального применения биологически активных веществ. Добавление экстракта усиливает их терапевтический эффект и обеспечивает более эффективное лечение.

Контролируемая и длительная доставка активных ингредиентов: Гели на основе карбопола могут обеспечить контролируемую и длительную доставку биологически активных веществ к месту применения. Это позволяет увеличить продолжительность действия и улучшить биодоступность активных ингредиентов.

Улучшение структуры геля: Некоторые биологически активные вещества экстракта могут влиять на структуру и консистенцию геля, делая его более устойчивым или улучшая его текстуру. Это может быть полезно для обеспечения равномерного распределения активных ингредиентов и удобства использования геля.

Комбинированное действие: Экстракт имеет дополнительные полезные свойства, которые могут быть комбинированы с действием карбопола для достижения оптимального терапевтического эффекта. Например, добавление антиоксидантов в гель может помочь защитить кожу от воздействия свободных радикалов.

Повышение стабильности формулы: Некоторые биологически активные вещества могут требовать специфических условий хранения или могут быть нестабильными в растворе. Включение их в гель на основе карбопола может помочь обеспечить стабильность формулы и сохранить их активность на протяжении длительного времени.

Таким образом, добавление экстракта в гель с карбополом может помочь усилить терапевтический эффект, обеспечить контролируемую доставку активных ингредиентов, улучшить структуру геля и обеспечить стабильность формулы.

Добавление эфирного масла мяты в гель с карбополом может придать продукту ряд преимуществ и добавить новые свойства:

Освежающий эффект: Эфирное масло мяты обладает характерным освежающим ароматом и ощущением прохлады на коже. Добавление его в гель может создать приятное ощущение прохлады и освежения при использовании продукта.

Успокаивающие свойства: Мятное масло обладает успокаивающими свойствами и может помочь снять раздражение и усталость кожи. Это особенно полезно после интенсивного физического напряжения или наложения геля на раздраженные участки кожи.

Антисептический эффект: Мятное масло обладает антисептическими свойствами, что может помочь в борьбе с бактериями и предотвращать развитие инфекций на коже.

Улучшение ароматических свойств: Добавление мятного масла может

улучшить ароматические свойства геля, делая его более приятным для использования. Это может улучшить общее впечатление от продукта и сделать его более привлекательным для пользователей.

Стимуляция кровообращения: Мятное масло может стимулировать кровообращение, что способствует более быстрому заживлению и регенерации кожи.

При добавлении эфирного масла мяты в гель с карбополом важно учитывалась его концентрация, чтобы избежать излишней острой прохлады или раздражения кожи. Также необходимо учитывать индивидуальную чувствительность кожи к мятному маслу.

Добавление воды в гели с карбополом является обязательным, так как карбопол является гелеобразующим агентом, который активируется при контакте с водой. Вот несколько основных причин добавления воды в такие гели:

Активация карбопола: Карбопол, или карбомер, является полимером, который образует гель при взаимодействии с водой. Добавление воды позволяет активировать карбопол, что приводит к образованию структурированной сетки геля.

Формирование нужной текстуры и консистенции: Вода помогает придать гелю нужную текстуру и консистенцию. Количество добавленной воды регулируется для достижения оптимальной текучести и удобства использования геля.

Удержание влаги и увлажнение: Вода служит основным носителем для удержания влаги в геле, что важно для увлажнения и смягчения кожи или других обрабатываемых поверхностей.

Усиление эффективности активных ингредиентов: Вода может служить средой для растворения и распределения активных ингредиентов в геле. Это обеспечивает более равномерное распределение активных компонентов и увеличивает их эффективность.

Обеспечение структурной поддержки: Вода, в сочетании с карбополом, обеспечивает структурную поддержку гелю, помогая сохранить его форму и предотвращая разделение или оседание ингредиентов.

Таким образом, добавление воды в гели с карбополом не только активирует гелеобразующий процесс, но и обеспечивает необходимую текстуру, удерживает влагу, увеличивает эффективность активных ингредиентов и обеспечивает структурную поддержку геля.

Исходя из выше сказанного, в качестве оптимального состава геля принят образец GPV6. В результате проведенных комплексных фитохимических и технологических исследований обоснован и предложен состав геля: сухой экстракт черноголовки обыкновенной, полученный в условиях ультразвуковой кавитации – 1.0 г; карбопол – 2.0 г; глицерин – 2,0 мл; NaOH гидроксид – 2,0 мл; ТВИН 80 – 1.0 мл; эфирное масло мяты – 0,5 мл; вода очищенная – до 100 мл.

6.3 Технология получения геля сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.

Заболевания кожи, в том числе воспалительные, играют важную роль в медицине и требуют эффективных наружных средств для лечения. Современная медицина предлагает разнообразные препараты для решения этой проблемы. Однако, наряду с их положительными фармакологическими свойствами и клинической эффективностью, многие из них сопровождаются нежелательными побочными реакциями. Поэтому исследование и разработка природных лекарственных препаратов, включая комбинированные составы, становятся все более важными.

В Казахстанской флоре можно найти множество растений с богатым фармакологическим потенциалом, особенно в области противовоспалительного и антиоксидантного действия. Воспалительные заболевания кожи, как и любой воспалительный процесс, являются серьезным звеном в патогенезе многих заболеваний, и в настоящее время продолжается поиск эффективных наружных лекарственных препаратов для их лечения. Современная медицина располагает широким арсеналом лекарственных средств с подобной направленностью действия. Однако многие из них, несмотря на благоприятные фармакологические свойства и клиническую эффективность, вызывают нежелательные побочные реакции. Поэтому разработка соответствующих природных лекарственных препаратов, особенно с комплексным составом, не только привлекательна, но и актуальна и полезна. В растительном мире Республики Казахстан существует ряд растений, обладающих значительным фармакологическим потенциалом, особенно в области противовоспалительного и антиоксидантного действия.

Кожа подвергается воздействию как внешних, так и внутренних факторов, которые могут привести к старению кожи. Старение кожи может происходить по двум основным путям: первый - хронологическое старение, то есть естественное старение, и второй - старение, вызванное воздействием ультрафиолетовых лучей солнечного света, ускоряющих естественный процесс старения и называемое фотостарением.

Технологический процесс получения геля включает в себя ряд последовательных этапов, начиная с подготовки исходных компонентов, составления гелевой базы, введения лекарственных веществ в мазевую основу, последующей гомогенизации полученной смеси, дозирования готового продукта в тубы объемом 10 грамм, осуществления маркировки и последующей упаковки во внешнюю упаковку. Визуальное представление технологического и аппаратного процессов изготовления геля демонстрируется на схеме, представленной на рисунке 15.

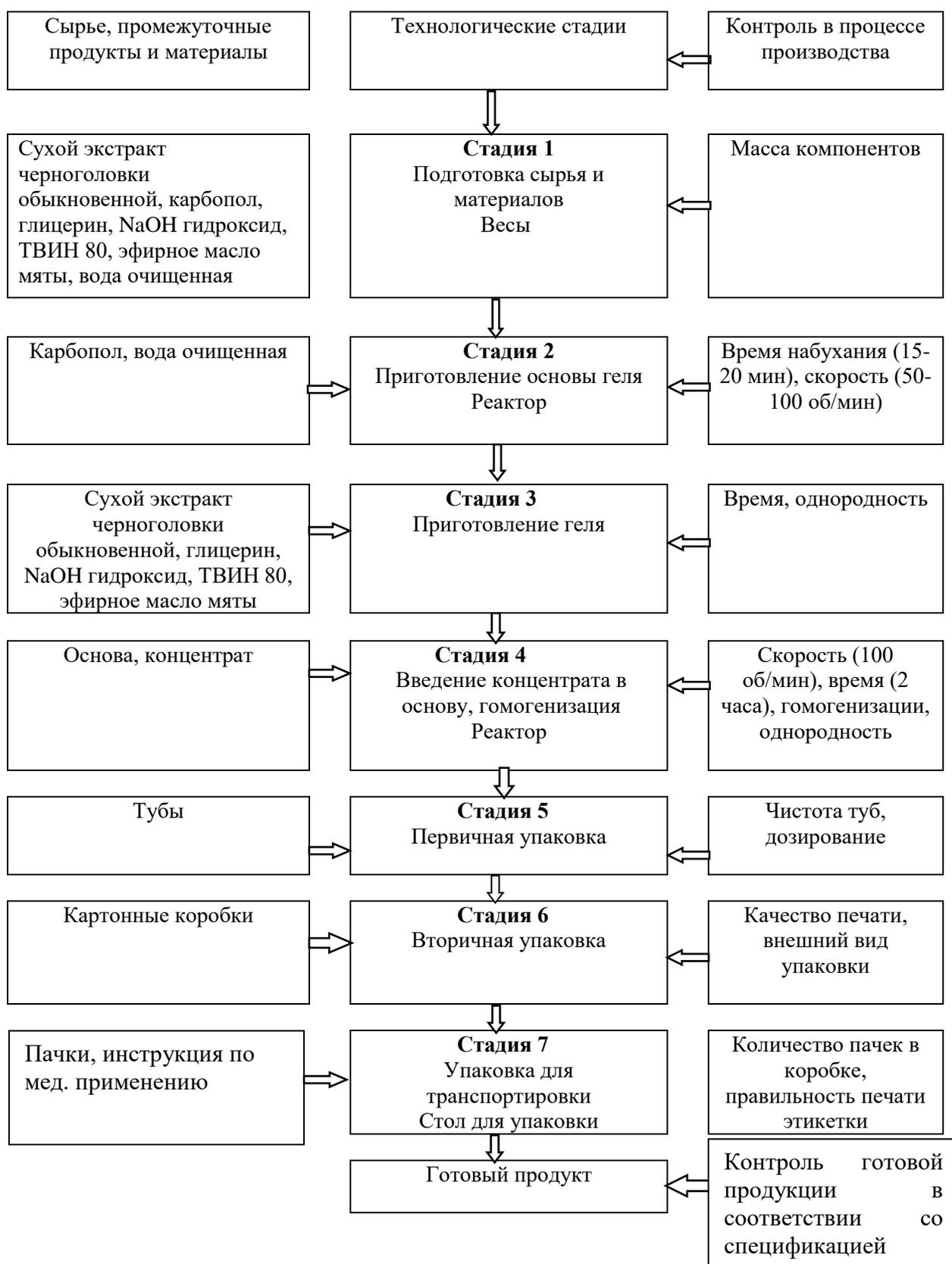


Рисунок 15 - Технологическая схема производства геля на основе сухого экстракта черной головки обыкновенной

Технологическая схема производства геля состоит из следующих стадий:

Стадия 1. Подготовка исходных веществ.

Для приготовления противовоспалительного и антиоксидантного геля выделяли ультразвуковой экстракт из чернойголовки обыкновенной, который получен методом ультразвуковой кавитации с использованием ультразвуковой ванны Digital Ultrasonic Cleaner VGT 1200, с ультразвуковой частотой 40 кГц из воздушно-сухой массы растительного сырья. Качественный состав и количественное содержание компонентов экстракта чернойголовки обыкновенной определяли методом ВЭЖХ.

Стадия 2. Подготовка гелевой основы.

Для получения 100,0 грамм геля в химический стакан вместимостью 500 мл заливали деионизированной холодной очищенной водой, добавляли рассчитанный объем карбопола 940 и перемешивали. Затем раствор перемешивали при включённой мешалке до полного растворения. Добавили нейтрализатор (10% раствор NaOH) постепенно, чтобы нейтрализовать карбопол и достичь желаемого pH (обычно близкого к нейтральному). Периодически проверяли pH с помощью pH-метра. Карбопол начал увеличивать вязкость воды и образовал гель.

Стадия 3. Приготовление геля

Далее, в отдельной колбе, в измеренном количестве глицерина растворяли экстракт чернойголовки обыкновенной. Затем постепенно добавлялось заданное количество мятного эфирного масла и остальных компонентов при работающей мешалке со скоростью 100 оборотов в минуту и перемешивалось до получения однородной массы.

Гель подвергался диспергированию в течение 2 часов, затем проверялся на следующий этап фасовки после достижения однородности и размера частиц менее 100 микрон.

Стадия 4: Фасовка, маркировка и упаковка.

Из полученного геля извлекалась средняя образцовая порция для контроля качества геля по следующим характеристикам: внешний вид, идентификация, pH, однородность, количественное определение активных компонентов и микробиологический анализ. При получении положительных результатов анализа гель перераспределялся в дозатор (объемный дозатор) и упаковывался в тубы по 10 грамм.

Тубы маркировались, упаковывались в пачки и затем в транспортные коробки, после чего наклеивались этикетки. Таким образом, была разработана технология получения геля на основе сухого экстракта чернойголовки обыкновенной, полученного в результате ультразвуковой кавитации, которая является новаторской в данной области.

6.4 Изучение высвобождения действующего вещества из гелей методом прямой диффузии в агар

В процессе разработки состава гелей было изучено воздействие технологических параметров на высвобождение розмариновой кислоты из

основы. Оценка высвобождения действующих веществ из разработанных гелей проводилась путем анализа способности основы к их высвобождению.

Для этого были проведены эксперименты *in vitro*, включающие диффузию в агаровом геле и через полупроницаемую мембрану. Диффузия может происходить как напрямую, так и через полупроницаемую мембрану. В случае прямой диффузии средой, где происходит высвобождение действующего вещества, может выступать агаровый или желатиновый гель. При диффузии через полупроницаемую мембрану используются естественные (животные или растительные) или синтетические пленки, имитирующие кожу (например, нелакированный целлофан). Изучение высвобождения действующего вещества из мази прямой диффузией проводили в агаровый гель. После набухания агар нагревали до кипения, доводили до необходимой массы. Агаровый гель разливали в чашки Петри с горизонтальной поверхностью дна ($d = 98-100$ мм, $h = 20$ мм), которые необходимо выставить на ровной поверхности. Агар разливали в чашки двумя порциями по 10 и 15 мм. После застывания агара (первой порции) на его поверхность в каждую чашку поместили металлические цилиндры (наружный диаметр 8,5 мм и высотой до 10 мм) и заливали второй слой агара. После застывания агара цилиндры осторожно извлекали и в образовавшиеся углубления помещали образцы гелей, окрашенных индикатором. В качестве индикатора использовали 10-% раствор бихромата калия. Гель в лунки переносили с помощью стеклянной палочки, обеспечивая хороший контакт с агаром. Чашки помещали в термостат с температурой $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 3 часа [135]. Определение диаметра окрашенных зон проводили каждые 30 минут. На основании полученных данных были построены графики зависимости количества высвободившегося действующего вещества (розмариновой кислоты) из гелей в течение определенного временного промежутка. Проведено исследование процесса высвобождения. Результаты представлены на рисунке 16 в виде диаграммы, показывающей изменения размеров диаметров окрашенных зон, образованных гелями при высвобождении действующего вещества в промежутке трех часов в агаровый гель. В процессе прямой диффузии действующего вещества из гелей наблюдается увеличение окрашенной зоны геля. Для оценки степени диффузии данного вещества были использованы линейные размеры этой зоны.

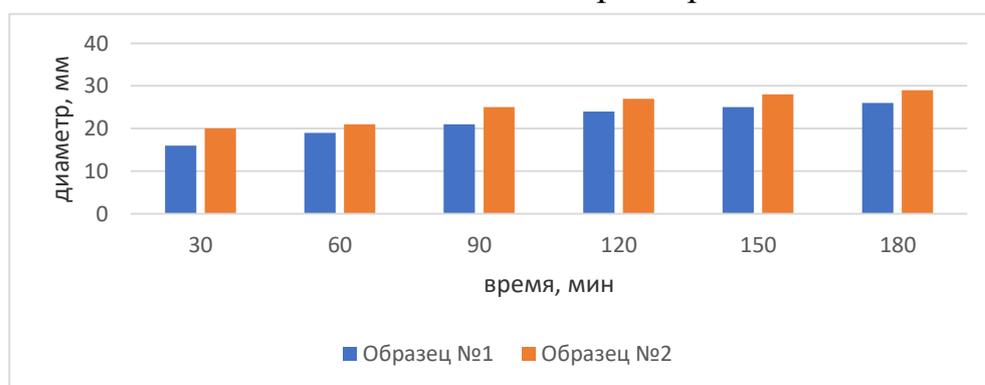


Рисунок 16 – Зависимость диаметра окрашенной зоны от времени термостатирования

По данным средних значений диаметра окрашенной зоны строили диаграмму степени высвобождения розмариновой кислоты из исследуемых гелевых композиций. Полученная диаграмма представлена на рисунке 16. Как видно из данных диаграммы, высвобождение розмариновой кислоты происходило из всех изученных гелевых композиций. При этом, полнота высвобождения розмариновой кислоты из состава № 1 оказалась достаточно невысокой, в связи с чем данная композиция была признана нецелесообразной для последующих испытаний. Что касается гелевой композиции № 2, приготовленной на основе карбопола, то зоны диффузии розмариновой кислоты из нее существенно превосходили таковые для состава № 1, что свидетельствовало о гораздо более полном высвобождении розмариновой кислоты.

6.5 Реологические свойства геля

В настоящее время требования к контролю качества медицинских лекарственных форм становятся все более строгими, включая стандартизацию, показатели качества и параметры технологического процесса. Реологические свойства этих форм, такие как динамическая вязкость и тиксотропность, играют важную роль в их терапевтических и потребительских характеристиках, влияя на высвобождение активных веществ, удобство применения и легкость использования.

Цель исследования: изучить структурно-механические свойства геля из сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. на разных основах. Составы представлены в таблице 37. Результаты этого исследования необходимы для получения МЛС с высокими показателями качества, а также для разработки технологии получения и методов стандартизации МЛФ.

Таблица 37 – Составы исследуемых модельных образцов гелей на основе Карбопола и Na-КМЦ из сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.

| Образцы исследования | Состав модельных образцов |
|----------------------|---|
| Образец 1 | Na-КМЦ 2,2г, экстракт чернойголовки обыкновенной 1г, Глицерин 2мл, NaOH гидроксид 10% 2мл, Твин 80 1,2мл, Вода очищенная до 100мл |
| Образец 2 | Карбопол-940 2г, экстракт чернойголовки обыкновенной 1г, Глицерин 2г, NaOH гидроксид 10% 2мл, Твин 80 1мл, Эфирное масло мяты 0,5 мл, вода очищенная до 100мл |

Для изучения вязкости разработанного геля был применен метод ротационной вискозиметрии, основанный на измерении силы сдвига в жидкой среде, помещенной между двумя коаксиальными цилиндрами. Один из цилиндров вращается двигателем, а второй приводится во вращение первым. Ротационные вискозиметры могут использоваться при различных температурах. При изменении скорости вращения ротора возможно изучение текучести и тиксотропии неньютоновских жидкостей, включая мягкие

лекарственные средства. Для измерения динамической вязкости и тиксотропии геля на основе Карбопола и Na-КМЦ из сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. использовался ротационный вискозиметр Laboao NDJ-1F.

Из кривых вязкости, построенных по данным измерений при температурах 20°C, 30°C и 40°C (рисунки 17 и 18), видно, что с повышением температуры измерения динамическая вязкость гелей на основе Натрий карбоксиметицеллюлозы значительно не изменяется, в то время как образцы на основе карбопола становятся менее вязкими, сохраняя общий характер реологических кривых.

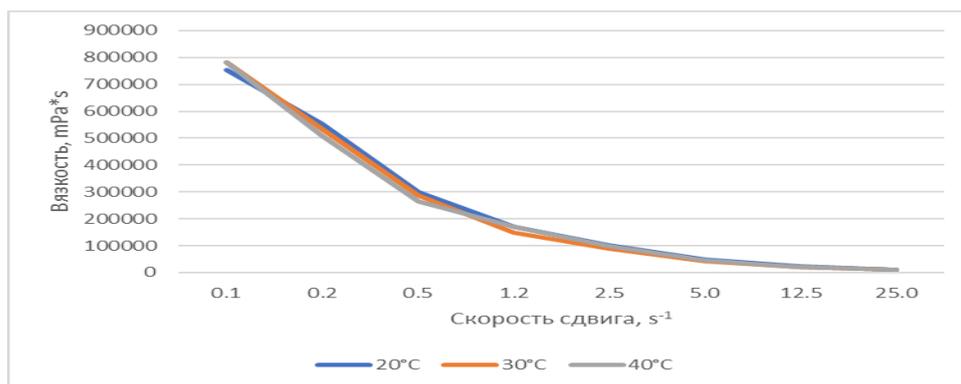


Рисунок 17 – Зависимость изменения вязкости от скорости сдвига при различных температурах для геля, образец 1

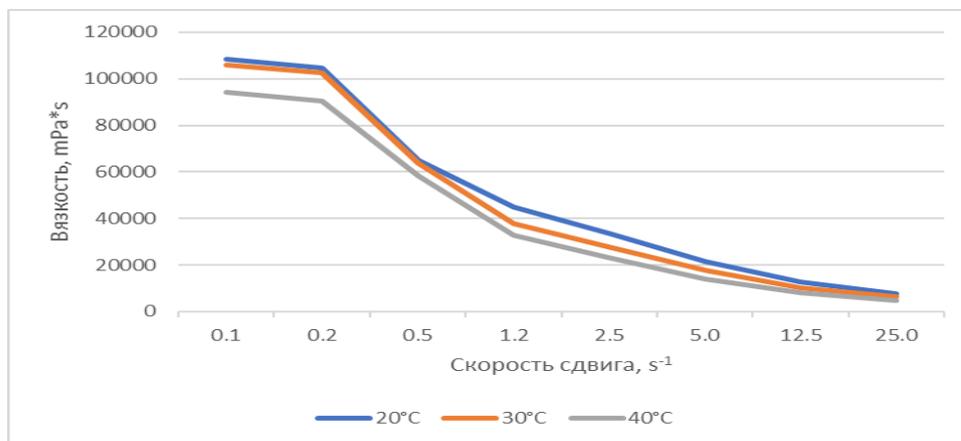


Рисунок 18 – Зависимость изменения вязкости от скорости сдвига при различных температурах для геля, образец 2

На основе проведенного исследования было обнаружено, что все образцы представляют собой тиксотропные структуры и образуют петли гистерезиса. Тем не менее, замечается значительное различие в их ширине, что служит относительным показателем степени формирования структуры в дисперсной системе и описывает такие свойства, как легкость нанесения и равномерное распределение гелей на поверхности, способность к заполнению туб при упаковке, выдавливаемость гелей из туб и другие характеристики

лекарственных форм для наружного применения. Образец №2 обладает оптимальной петлей гистерезиса, что указывает на более структурированную систему с преимущественно коагуляционным типом связей, а также характеризуется наилучшей легкостью нанесения и равномерным распределением по поверхности (рисунок 19).

"Восходящая" кривая, характеризующая разрушение системы, отличается от "нисходящей" кривой, отражающей восстановление системы. Это объясняется сохранением остаточной деформации после сильного ослабления структуры под воздействием предыдущего напряжения. Кривая вязкости для образца №2 показывает, что система имела наибольшую вязкость при малых скоростях сдвига, что указывает на полное разрушение структуры геля, за которым следует полное восстановление. С увеличением градиента скорости сдвига величина вязкости образца уменьшается, так как разрушение структуры становится преобладающим фактором. При высоких скоростях сдвига вязкость минимальна, так как структура полностью разрушается. После удаления внешнего воздействия вязкость гелей восстанавливается, но с некоторыми различиями от исходных значений.

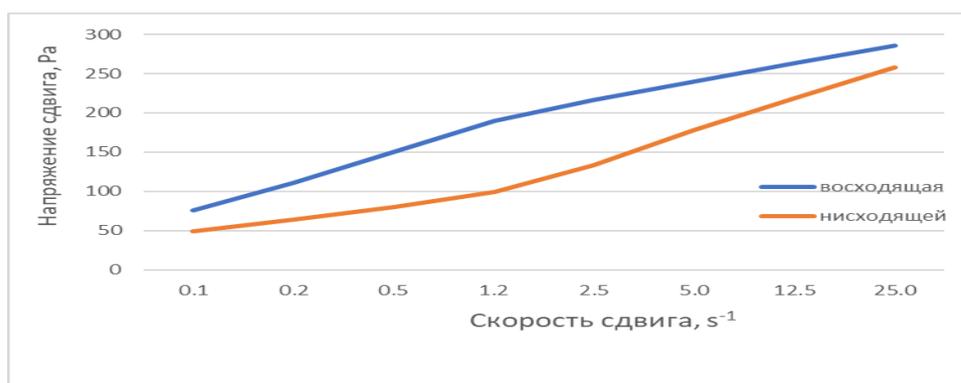


Рисунок 19 А – Реограмма течения образца № 1 при 20°C

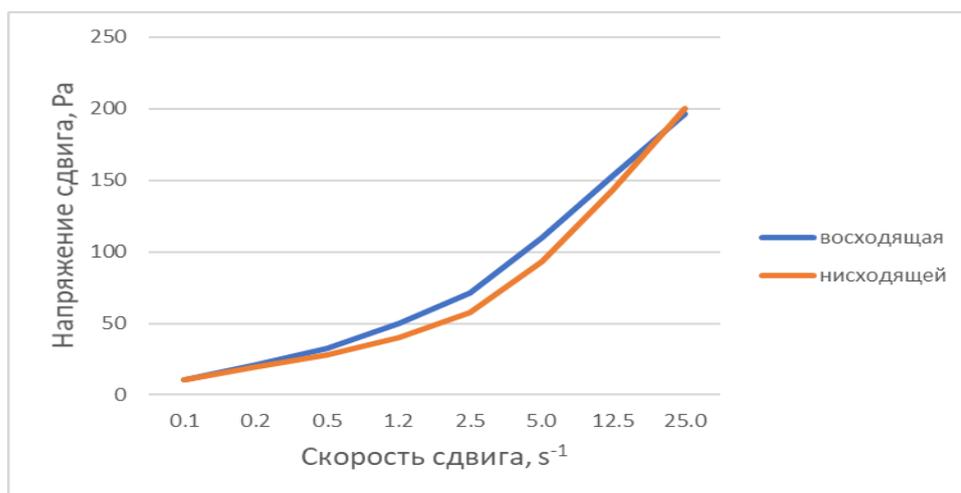


Рисунок 19 Б – Реограмма течения образца № 2 при 20°C

При этом степень восстановления для всех образцов различна (таблица 38).

Таблица 38 – Степень восстановления образцов

| Образцы | Образец №1 | Образец №2 |
|------------------------|------------|------------|
| Степень восстановления | 88% | 95% |

Из представленной таблицы очевидно, что образец №2 проявляет наивысший процент восстановления геля после полного разрушения. Это свидетельствует о том, что в структуре геля преобладают только коагуляционные связи, обеспечивающие полную обратимость деформаций после снятия напряжений. Это также указывает на стабильность его реологических свойств в процессе длительного хранения.

Результаты реологических исследований мягких лекарственных форм, содержащих сухой экстракт *Prunella vulgaris* L., показали, что образец №2, представляющий собой гелевую композицию с добавлением Карбопола 940, обладает оптимальными структурно-механическими свойствами. Он представляет собой тиксотропную систему, которая достаточно стабильна и пластична. Этот образец способен равномерно наноситься на кожу и обеспечивать необходимую стабильность системы в процессе технологических операций.

6.6 Биофармацевтическое исследование геля

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан были определены основные качественные характеристики геля, включая внешний вид, идентификацию, однородность, размер частиц, уровень рН, микробиологическую чистоту и содержание розмариновой кислоты в лекарственной форме.

Состав геля противовоспалительного и антиоксидантного действия на основе сухого экстракта черноголовки обыкновенной (таблица 39).

Таблица 39 – Состав противовоспалительного и антиоксидантного геля GPV6.

| № | Название ингредиентов | Количественное содержание |
|----|--|---------------------------|
| 1. | Экстракт черноголовки обыкновенной (г) | 1 |
| 2. | Карбопол (г) | 2 |
| 3. | Глицерин (мл) | 2 |
| 4. | NaOH гидроксид 10% (мл) | 2 |
| 5. | Твин 80 (мл) | 1 |
| 6. | Эфирное масло мяты (мл) | 0,5 |
| 7. | Вода очищенная до (мл) | 100 |

Карбопол 940 использовался как агент для создания геля. Многочисленные исследования показали, что наилучшей опцией для основы геля является

водный раствор карбопола с добавлением твин 80 в качестве эмульгатора. Эта основа обладает хорошей структурной и механической устойчивостью, способностью хорошо высвободить активные компоненты и хорошей совместимостью как с химическими, так и с растительными лекарствами.

Гель имеет коричневый цвет и интенсивный аромат. РН водного раствора колеблется 5,5 - 7,0. Содержание розмариновой кислоты составляет не менее 1,5% от массы геля.

Идентификация проводилась методом ВЭЖХ. В хроматограмме исследуемого раствора время удерживания основного пика должно соответствовать времени удерживания пика розмариновой кислоты в хроматограмме рабочего стандартного образца.

Однородность геля, созданного на основе экстракта чернойголовки обыкновенной, обеспечивается следующим образом: четыре пробы по 20-30 мг намазывают на предметное стекло, покрывают другим стеклом и прижимают до образования пятен диаметром около 2 см. Затем пятна проверяют на наличие видимых частиц, и в трех из четырех пятен не должно быть видимых частиц. Образцы из пяти серий удовлетворяют этим критериям однородности.

Размер частиц не превышает 100 мкм в соответствии с требованиями ГФ РК. После анализа пяти серий образцов геля, созданного на основе экстракта чернойголовки обыкновенной, не было обнаружено частиц, размер которых превышал бы 100 мкм, что свидетельствует о соответствии выбранной технологии приготовления геля.

РН водного раствора препарата был определен потенциометрическим методом в соответствии с ГФ РК. Анализ пяти серий опытных образцов геля показал, что значение рН водных растворов препарата находится в пределах 5,6-7,1. На основании результатов этого исследования было установлено, что значение рН водных растворов геля должно находиться в пределах 5,5-7,0.

Микробиологическая чистота также была оценена. Препарат допускает наличие в 1 г не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10 энтеробактерий и не допускается наличие бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

6.7 Определение критериев качества и установление сроков хранения геля

Разработана спецификация качества геля для стандартизации, учитывая последние требования при создании инновационных лекарственных препаратов. Результаты исследований включены в проект нормативной документации на гель. В соответствии с требованиями Приказа Министерства здравоохранения РК №КР ДСМ-165/2020 от 28 октября 2020г «Об утверждении Правил проведения производителем лекарственного средства исследования стабильности, установления срока хранения и повторного контроля лекарственных средств» нами определены сроки хранения геля, в течении 18 месяцев методом долгосрочного испытания. В геле не наблюдается в процессе хранения деструкции. Средство стабильно, и при этом сохраняются его

основные свойства, влияющие на качество, терапевтический эффект, токсичность и другие показатели. Гель расфасовали в тубы из металла и в картонные коробки. Лекарственную форму хранили при температуре 5°C и подвергли анализу через 3, 6, 12, 18 месяцев после изготовления.

Разработана спецификация качества противовоспалительного и антиоксидантного геля для стандартизации с учетом современных требований при разработке новых лекарственных средств. Результаты исследований представлены в таблице 40. Данные разработанной спецификации качества включены в проект НД на гель.

Таблица 40 – Спецификация качества геля на основе сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.

| Показатели качества | Нормы отклонений | Методы испытаний |
|--|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Описание | Гель светло-желтого цвета, с характерным запахом | Ф ЕАЭС, т.1, ч.1, 2.1.6.0., ГФ РК, т.1, с.547 |
| Идентификация: - розмариновая кислота | При определении на хроматограмме количества розмариновой кислоты испытуемого раствора, полученной, время удерживания основного пика должно совпадать с временем удерживания пика розмариновой кислоты на хроматограмме раствора рабочего стандартного образца розмариновой кислоты. | В соответствии с НД |
| Однородность | Однородная масса | Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.1.9.10 ГФ РК, т. 1, 2.2.1 приложение 1. |
| рН | 5,5-7,0 | Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.1.2.3 ГФ РК, т. 1, 2.2.3 |
| Микробиологическая чистота | В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10 энтеробактерий. В 1 г не допускается наличие бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> | Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.1.9.10 ГФ РК, т. 1, 2.6.12, 2.6.13 |
| Количественное определение | Содержание $C_{18}H_{16}O_3$ (розмариновой кислоты) в препарате должно быть не менее 0,076 %. | ГФ РК, т. 1, 2.9.7 Ф ЕАЭС т.1, ч.1, 2.1.2.27 |
| Упаковка | ГОСТ 17768-90. МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ. СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение. Алюминиевые тубы для медицинских мазей. Каждую тубу вместе с листком - вкладышем | В соответствии с НД |

Продолжение таблицы 40

| 1 | 2 | 3 |
|-------------------------------------|---|---------------------|
| | на государственном и русском языках помещают в пачку из картона коробочного, марки А или хром-эрзац по ГОСТ 7933-89 Е. Допускается текст инструкции по применению наносить на пачку. Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90 Е | |
| Маркировка | На этикетке и пачке указывают название страны-производителя, название предприятия-изготовителя, его товарный знак, адрес, название препарата на латинском, государственном и русском языках, содержание действующего вещества в процентах, количество препарата в граммах, состав, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, условия отпуска, предупредительные надписи «беречь от детей», «не применять по истечении срока годности». На этикетке групповой тары дополнительно указывают количество упаковок. | В соответствии с НД |
| Транспортировка | В соответствии с ГОСТ 17768-90 Е. | ГОСТ 17768-90Е |
| Хранение | «Хранить при температуре +2 ⁰ С - +8 ⁰ С». В холодильнике. | В соответствии с НД |
| Срок хранения | 18 месяцев | В соответствии с НД |
| Основное фармакологическое действие | Противовоспалительное и антиоксидантное средство | В соответствии с НД |

Результаты испытания стабильности геля на основе ультразвукового экстракта черноголовки обыкновенной представлены в таблицах 41-43. Периодичность контроля серии составляла по основным показателям качества: 0, 3, 6, 9, 12, 18 месяцев. Значительных изменений контролируемых параметров качества не наблюдалось.

Таблица 41 - Изучение стабильности геля на основе ультразвукового экстракта *Prunella vulgaris* L., серия 1

| Упаковка: алюминиевые тубы Дата начала испытания: 06.2022 ж Дата окончания испытания: 12.2023 ж Серия: 0106GPV | | | | | | | | | | |
|---|---|----------------------------|---|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели | Условия испытания | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Описание | Температура (+2 - +8)°С, относительная влажность: (60±5)% | ГФ РК 1 т., 571 ч. | Гель светло-желтого цвета, со специфическим запахом | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| Идентификация - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | К 1 мл препарата прибавляют 3 капли 1% раствора ванилина в кислоте серной концентрированной образуется красновато-фиолетовое окрашивание. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| pH | | ГФ РК 1 т | 5,5-7,0 | 6,5 | 6,6 | 6,7 | 6,6 | 6,5 | 6,5 | |
| Однородность | | ГФ РК 1 т., 2.9.7 | Необходимо иметь однородную консистенцию | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК 1 т., 2.6.12, 2.6.13 | В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10 энтеробактерий. В 1 г не допускается наличие бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |

Продолжение таблицы 41

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Количественное определение: - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | - не менее 0,076 % | 0,109 | 0,108 | 0,109 | 0,108 | 0,107 | 0,107 |
| Масса внутри упаковки | | В соответствии с НД | 10 г | 9,7 | 9,5 | 9,4 | 9,2 | 8,6 | 8,5 |

Таблица 42 - Изучение стабильности геля на основе ультразвукового экстракта *Prunella vulgaris* L.,серия 2

| Упаковка: алюминиевые тубы Дата начала испытания:06.2022 ж Дата окончания испытания:12.2023ж Серия: 0206GPV | | | | | | | | | | |
|--|---|----------------------------|---|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели | Условия испытания | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Описание | Температура (+2 - +8)°С, относительная влажность: (60±5)% | ГФ РК, 1 т., 571 ч. | Гель светло-желтого цвета, со специфическим запахом | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| Идентификация - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | К 1 мл препарата прибавляют 3 капли 1% раствора ванилина в кислоте серной концентрированной образуется красновато-фиолетовое окрашивание. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| рН | | ГФ РК 1 т | 5,5-7,0 | 6,7 | 6,8 | 6,9 | 6,8 | 6,7 | 6,6 | |
| Однородность | | ГФ РК 1 т., 2.9.7 | Необходимо иметь однородную консистенцию | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК 1 т., 2.6.12, 2.6.13 | В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10 энтеробактерий. В 1 г не допускается наличие бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. |

Продолжение таблицы 42

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Количественное определение: - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | - не менее 0,076 % | 0,108 | 0,108 | 0,107 | 0,108 | 0,107 | 0,106 |
| Масса внутри упаковки | | В соответствии с НД | 10 г | 9,6 | 9,7 | 9,6 | 9,5 | 8,9 | 8,8 |

Таблица 43 - Изучение стабильности геля на основе ультразвукового экстракта *Prunella vulgaris* L., серия 3

| Упаковка: алюминиевые тубы Дата начала испытания: 06.2022 ж Дата окончания испытания: 12.2023 ж Серия: 0306GPV | | | | | | | | | | |
|---|--|----------------------------|---|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Показатели | Условия испытания | Методы исследований | Нормы | Периоды контроля, мес | | | | | | |
| | | | | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 18 | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Описание | Температура (+2 - +8)°С, относительная влажность: (60±5)% | ГФ РК, 1 т., 571 ч. | Гель светло-желтого цвета, со специфическим запахом | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| Идентификация - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | К 1 мл препарата прибавляют 3 капли 1% раствора ванилина в кислоте серной концентрированной образуется красновато-фиолетовое окрашивание. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | соотв. | |
| pH | | ГФ РК 1 т | 5,5-7,0 | 6,5 | 6,5 | 6,6 | 6,5 | 6,4 | 6,5 | |
| Однородность | | ГФ РК 1 т., 2.9.7 | Необходимо иметь однородную консистенцию | соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. |
| Микробиологическая чистота | | ГФ РК 1 т., 2.6.12, 2.6.13 | В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и грибов (суммарно), не более 10 энтеробактерий. В 1 г не допускается наличие бактерий <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> | соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. | Соотв. |

Продолжение таблицы 43

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Количественное определение: - розмариновая кислота | | В соответствии с НД | - не менее 0,076 % | 0,108 | 0,107 | 0,107 | 0,106 | 0,105 | 0,105 |
| Масса внутри упаковки | | В соответствии с НД | 10 г | 9,8 | 9,6 | 9,6 | 9,5 | 8,8 | 8,7 |

На основе проведенных исследований можно сделать вывод о том, что образец, разработанный с заявленной основой, проявил себя как наиболее стабильный при хранении и показал высокие показатели качества, включая сохранение гомогенности и однородности в течение времени. Технологические параметры качества разработанного геля были изучены и предложены стандартные показатели качества, такие как внешний вид, цвет, запах, однородность, pH и содержание действующего вещества.

Гели, полученные с метилцеллюлозой (МЦ), образовывали очень жидкую пенистую массу беловатого цвета. Отмечена недостаточность органолептических свойств, консистенция состава была жидкой, на коже образовывались пенистые массы, которые не наносились равномерно.

Образцы гелей с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) были с комками. Они также имели липкий эффект при нанесении на кожу. При визуальном контроле гелей консистенция была неравномерной.

Таким образом, оптимальными композициями, отвечающими требованиям мягкой лекарственной формы (однородность, стабильность, pH), были типовые композиции натрия карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) и карбопола 940. Дальнейшие исследования были проведены с этими двумя образцами.

7 ТЕХНИКО – ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО СРЕДСТВА С СУХИМ ЭКСТРАКТОМ *PRUNELLA VULGARIS L.*

В данном исследовании произведен анализ мирового рынка и рынка Казахстана лекарственных препаратов, содержащих чернуюголовку обыкновенную, сравнительный анализ по лекарственным препаратам, обладающим противовоспалительным, антиоксидантным и комбинированным действиями, определение доли лекарственных средств отечественного производства, определение преобладающей лекарственной формы на фармацевтическом рынке Казахстана.

В исследовании использовались: государственный реестр лекарственных средств и медицинских изделий Казахстана (NDDA), справочник Видаль, контент-анализ, логический, структурный, сравнительный, графический и методы маркетингового анализа.

Prunella vulgaris L. является не фармакопейным видом растительного сырья, однако данный вид сырья включен в номенклатуру гомеопатических лекарственных средств согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25 февраля 1998 г. № 56. ПВ - действующее вещество мази для лечения ожогов.

Главной целью исследования был поиск препаратов, содержащих в своем составе *Prunella vulgaris L.*, как на рынке Казахстана, так и на мировом фармацевтическом рынке.

Исходя из проведенного анализа (рисунок 20) было установлено, что *Prunella vulgaris L.* не используется отечественными товаропроизводителями для производства препаратов. На мировом фармацевтическом рынке *Prunella vulgaris L.* активно используется для производства различных растительных препаратов под названием Self heal и входит в состав антицеллюлитного укрепляющего геля Liren Bio-lipopolis (производитель Лаб. Dr Irena Eris, Польша), смеси растительного сырья, используемого при производстве капсул Маммолептин для лечения фиброзно-кистозной мастопатии, средства Frudia для лица маска (производитель – WelcosCo. LTD., Южная Корея). Кроме того, *Prunella vulgaris L.* активно используется на мировом рынке как сырье для производства биологически активных добавок под названием Self heal в виде таблеток и жидких экстрактов на основе *Prunella vulgaris L.* (производители – Nature's health, Secrets of the Tribe, HawaiiPharm, Naturopath Herbals, New way herbs, Napiers herbalist, Herbalist & Alchemist, Inc.).

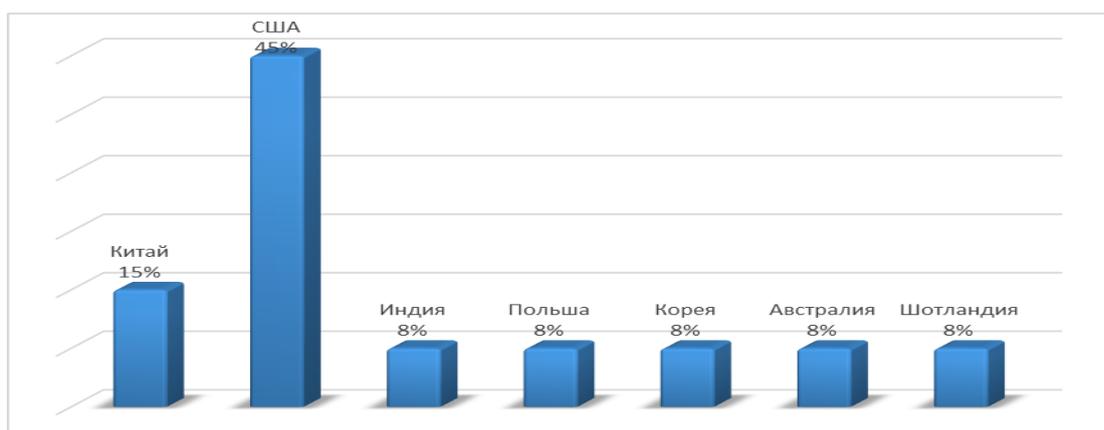


Рисунок 20 – Страны производители лекарственных средств на основе *Prunella vulgaris* L.

Из рисунка 20 видно, что лидером по производству препаратов на основе *Prunella vulgaris* L. является США (45%), затем следует Китай 15%. Данный анализ показал, что препараты на основе *Prunella vulgaris* L. в Казахстане ранее разработаны не были.

Также был проведен сравнительный анализ существующих лекарственных форм на основе *Prunella vulgaris* L. (рисунок 21), который показал, что 45% из общей доли приходится на жидкие лекарственные формы, твердые лекарственные формы 31%. Самой нераспространенной лекарственной формой является мягкая лекарственная форма, которая представляет особый интерес для разработки новой продукции, в связи с невысокой разработанностью.



Рисунок 21 – Сравнительный анализ лекарственных форм на основе *Prunella vulgaris* L., представленных на мировом рынке

Ассортимент жидких экстрактов Self heal представлен различным соотношением сырья и выбором экстрагента. 1:3 (Hawaii Pharm и Herbalist alchemist), 1:10 (Nature's health). В большинстве случаев используется в качестве экстрагента водно-спиртовой раствор неизвестной концентрации.

В связи с тем, что в ходе исследования не было найдено информации о производителях и препаратах на основе *Prunella vulgaris* L. нами был проведен информационный поиск по препаратам растительного происхождения схожими по свойствам с *Prunella vulgaris* L., а именно обладающими противовоспалительным, антиоксидантным и комбинированным действиями.

В ходе проведенного анализа установлено, что фармацевтический рынок лекарственных препаратов растительного происхождения противовоспалительного и антиоксидантного действия представлен 112 наименованиями, в том числе 11 наименований (9%) – отечественного производства, 102 (91%) наименования - импортного производства (рисунок 22). Отечественными производителями являются ТОО «ПЛП Жанафарм», ТОО «Фито-Аромат», ТОО «Карагандинский фармацевтический комплекс», ТОО «ТК Фарм Актобе», ТОО «ДАУЛЕТ-ФАРМ», ТОО «Фито-Аромат», ТОО «Шаншаров-фарм», ТОО «Фармация 2010». Из 11 наименований отечественного производства наиболее популярными являются мягкие лекарственные формы, представленные в своем большинстве густыми экстрактами 4 наименования и кремами 2 наименования, жидкие лекарственные формы представлены 3 наименованиями и твердые 2 наименованиями.

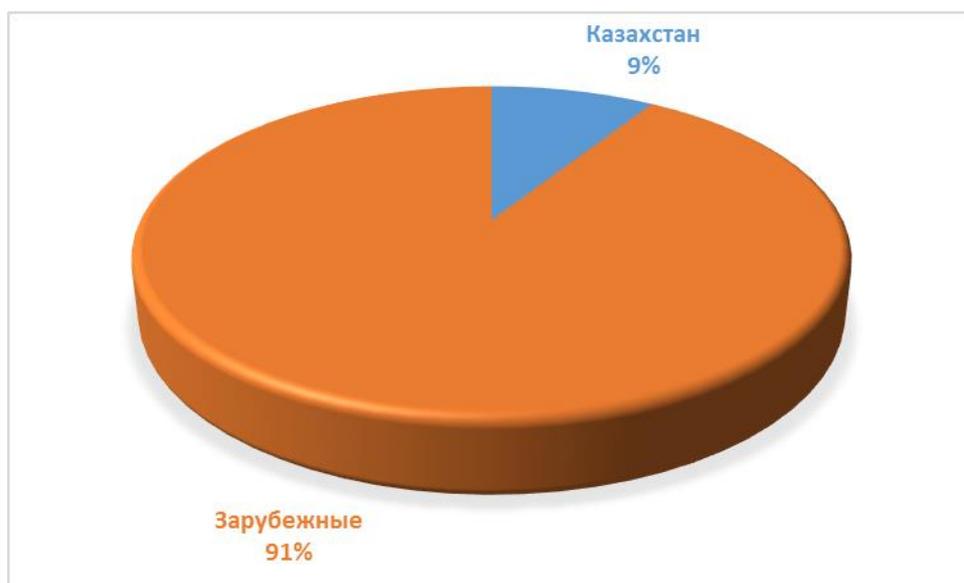


Рисунок 22 – Доля рынка отечественных производителей по производству противовоспалительных, антиоксидантных и комбинированных препаратов растительного происхождения

В таблице 44 приведено ранжирование данных по противовоспалительным, антиоксидантным и комбинированным препаратам растительного происхождения по странам производителям.

Таблица 44 – Структура количества противовоспалительных, антиоксидантных и комбинированных препаратов растительного происхождения по странам производителям

| Страны-производители | Противовоспалительные препараты растительного происхождения | | Антиоксидантные препараты растительного происхождения | | Комбинированные препараты растительного происхождения | |
|----------------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| | число препаратов, ед | удельный вес, % | число препаратов, ед | удельный вес, % | число препаратов, ед | удельный вес, % |
| Россия | 24 | 55,8 | 26 | 86,6 | 34 | 87,2 |
| Казахстан | 4 | 9,3 | 1 | 3,3 | 5 | 12,8 |
| Германия | 4 | 9,3 | - | - | - | - |
| Польша | 4 | 9,3 | 1 | 3,3 | - | - |
| Нидерланды | 2 | 4,65 | - | - | - | - |
| Швейцария | 1 | 2,32 | - | - | - | - |
| Украина | 3 | 6,97 | - | - | - | - |
| Румыния | - | - | 1 | 3,3 | - | - |
| Индия | 1 | 2,32 | 1 | 3,3 | - | - |
| Всего | 43 | 100 | 30 | 100 | 39 | 100 |

Следует отметить, что, рынок представлен 9 странами производителями, в том числе для противовоспалительных препаратов – 8, антиоксидантных – 5, комбинированных – 2. Лидером по производству во всех трех группах является Российская Федерация: противовоспалительные 55,8%, антиоксидантные 86,6%, комбинированные – 87,2%. Исходя из полученных данных установлено, что лекарственные средства выпускаются в разнообразных лекарственных формах (таблица 45).

Таблица 45 – Лекарственные формы противовоспалительных, антиоксидантных и комбинированных препаратов растительного происхождения по всем странам производителям.

| Лекарственная форма | Противовоспалительные препараты растительного происхождения | Антиоксидантные препараты растительного происхождения | Комбинированные препараты растительного происхождения |
|----------------------------|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Жидкие лекарственные формы | | | |
| Настойка | 1 | 1 | 2 |
| Раствор | 2 | 7 | 1 |
| Жидкий экстракт | 8 | 1 | - |
| Капли | - | 1 | - |
| Сироп | 1 | - | - |

Продолжение таблицы 45

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------------------|----|----|---|
| Итого | 12 | 10 | 3 |
| Мягкие лекарственные формы | | | |
| Линимент | 1 | 1 | - |
| Крем | 1 | - | - |
| Мазь | - | - | 1 |
| Сухой экстракт | 5 | - | - |
| Итого | 7 | 1 | 1 |
| Твердые лекарственные формы | | | |
| Растительное сырье | 3 | - | 2 |
| Таблетки | - | 9 | - |
| Сбор | - | 4 | - |
| Итого | 3 | 13 | 2 |
| Газообразные лекарственные формы | | | |
| Спрей | 1 | 4 | - |
| Аэрозоль | - | 3 | - |
| Итого | 1 | 7 | - |

Удельный вес в общей номенклатуре занимают жидкие лекарственные формы, затем следуют твердые лекарственные формы, далее мягкие лекарственные формы.

Наименее распространенной лекарственной формой является газообразная лекарственная форма.

Для подтверждения целесообразности производства сухого экстракта, полученный методом УЗ экстракций из черноголовки обыкновенной в промышленных масштабах был проведен расчет технико-экономического обоснования, представленный в таблице 46.

Таблица 46 - Технико-экономическое обоснование ультразвукового экстракта *Prunella vulgaris* L.

| № | Наименование | Ед.изм. | Норма расхода | Цена (тг) | Стоимость |
|---------------------------|--|---------|---------------|-----------|-----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| ОСНОВНОЕ СЫРЬЕ | | | | | |
| 1 | Растительное сырье <i>Prunella vulgaris</i> L. | кг | 3 461 | 600 | 2 076 600 |
| 2 | Спирт этиловый | л | 69 | 1 150 | 79 350 |
| Итого основное сырье | | | | | 2 155 950 |
| ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ | | | | | |
| 1 | Стеклянные флаконы | шт | 10 000 | 30 | 300 000 |
| 2 | Этикетка | шт | 10 000 | 5 | 50 000 |
| 3 | Амортизация основных средств | | | 30 000 | 30 000 |

Продолжение страницы 46

| | | | | | |
|---|----------------------------------|---|---|--------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 4 | Другие вспомогательные материалы | | | 10 000 | 10 000 |
| Итого вспомогательные материалы | | | | | 390 000 |
| ДРУГИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ | | | | | |
| 1 | З/плата+отчисления | | | | 100 000 |
| 2 | Прочие расходы | | | | 10 000 |
| Итого других расходов | | | | | 110 000 |
| ВСЕГО ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ СЕБЕСТОИМОСТЬ | | | | | 2 655 950 |
| Б. ПОЛНАЯ СЕБЕСТОИМОСТЬ | | | | | |
| Производственная себестоимость | | | | | 2 655 950 |
| Административные расходы | | | | 30% | 796 785 |
| Коммерческие расходы | | | | 20% | 531 190 |
| ВСЕГО ПОЛНАЯ СЕБЕСТОИМОСТЬ | | | | | 3 983 925 |
| Полная себестоимость единицы продукции | | | | | 399 |
| В. РАСЧЕТНАЯ МИНИМАЛЬНАЯ ЦЕНА РЕАЛИЗАЦИИ | | | | | |
| Полная себестоимость | | | | | 3 983 925 |
| Минимальная доходность (рентабельность) | | | | 30% | 1 195 178 |
| ВСЕГО РАСЧЕТНАЯ МИНИМАЛЬНАЯ ЦЕНА 10000 ЕД. ПРОДУКЦИИ | | | | | 5 179 103 |
| Стоимость одного флакона углекислотного экстракта <i>Prunella vulgaris</i> L. | | | | | 518 |

Себестоимость одной единицы флакона ультразвукового экстракта составила 399 тг, производственная себестоимость – 518 тг, при рентабельности 30% срок окупаемости составляет 3 года 4 мес.

При расчете ТЭО производства геля на основе ультразвукового экстракта *Prunella vulgaris* L., установлена полная себестоимость одной единицы продукции, которая составляет 597 тг, при этом производственная себестоимость – 3 975 865 тг, административные расходы – 1 192 760 тг, а коммерческие расходы – 795 173 тг (таблица 47).

Таблица 47 - Расчет минимальной стоимости единицы продукции при реализации

| А. ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ СЕБЕСТОИМОСТЬ | | | | | 10000 ед.продукции |
|-----------------------------------|---|---------|---------------|-----------|--------------------|
| № | Наименование | Ед.изм. | Норма расхода | Цена (тг) | Стоимость |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| ОСНОВНОЕ СЫРЬЕ | | | | | |
| 1 | Ультразвуковой экстракт <i>Prunella vulgaris</i> L. | кг | 50 | 51 800 | 2 590 000 |
| 2 | Глицерин | кг | 20 | 900 | 18 000 |
| 3 | Твин 80 | л | 10 | 5 777 | 57 770 |
| 4 | Карбопол-940 | кг | 20 | 1 500 | 30 000 |
| 5 | NaOH гидроксид 10% | л | 20 | 1 000 | 20 000 |
| 6 | Эфирное масло мяты | л | 5 | 1 000 | 5 000 |
| 7 | Вода очищенная | л | 820 | 40 | 32 800 |

Продолжение таблицы 47

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|----------------------------------|----|--------|-------|------------------|
| Итого основное сырье | | | | | 2 753 570 |
| ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ | | | | | |
| 1 | Туба | шт | 10 000 | 100 | 1 000 000 |
| 2 | Инструкции по применению | шт | 10 000 | 8 | 80 000 |
| 3 | Крафт бумага | м | 1 | 495 | 495 |
| 4 | Скотч | м | 2 | 160 | 320 |
| 5 | Этикетка групповая | шт | 200 | 2,4 | 480 |
| 6 | Другие вспомогательные материалы | | | 1 000 | 1 000 |
| Итого вспомогательные материалы | | | | | 1 082 295 |
| ДРУГИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ | | | | | |
| 1 | З/плата+отчисления | | | | 120 000 |
| 2 | Прочие расходы | | | | 20 000 |
| Итого других расходов | | | | | 140 000 |
| ВСЕГО ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ СЕБЕСТОИМОСТЬ | | | | | 3 975 865 |
| Б. ПОЛНАЯ СЕБЕСТОИМОСТЬ | | | | | |
| Производственная себестоимость | | | | | 3 975 865 |
| Административные расходы | | | | 30% | 1 192 760 |
| Коммерческие расходы | | | | 20% | 795 173 |
| ВСЕГО ПОЛНАЯ СЕБЕСТОИМОСТЬ | | | | | 5 963 798 |
| Полная себестоимость единицы продукции | | | | | 597 |
| В. РАСЧЕТНАЯ МИНИМАЛЬНАЯ ЦЕНА РЕАЛИЗАЦИИ | | | | | |
| Полная себестоимость | | | | | 5 963 798 |
| Минимальная доходность (рентабельность) | | | | 30% | 1 789 140 |
| ВСЕГО РАСЧЕТНАЯ МИНИМАЛЬНАЯ ЦЕНА 10000 ЕД. ПРОДУКЦИИ | | | | | 7 752 938 |
| Стоимость одной единицы продукции, тубы 10 г | | | | | 775 |

На фармацевтическом рынке цены на экстракты, полученные методом ультразвуковой кавитаций из растительного сырья, колеблются от 550 до 1200 тенге. Отсутствует информация о производстве ультразвукового экстракта черноголовки обыкновенной производителями Казахстана, стран ближнего и дальнего зарубежья.

Расчитана розничная цена одной единицы продукции – 775 тг при рентабельности 30%. Цена аналогичных препаратов на фармацевтическом рынке Казахстана составляет более 900 тг. Окупаемость проекта составляет 3 года и 4 мес при себестоимости продукции на 10 000 ед – 5 963 798 тг и 30% чистой прибыли.

Таким образом, *Prunella vulgaris* L. является перспективным сырьем для разработки лекарственного средства на ее основе, в связи с отсутствием таковых на территории Республики Казахстан. Представленное технико-экономическое обоснование продукции показывает целесообразность выпуска ЛС в промышленных масштабах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена разработке технологии нового лекарственного средства противовоспалительного и антиоксидантного действия на основе *Prunella vulgaris* L.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. При изучении распространения, сырьевых запасов и оценки перспективности выявлено, трава *Prunella vulgaris* L. является возобновляемым источником растительного сырья для получения лекарственных средств. В Восточно-Казахстанской области выявлены значительные запасы сырья: площадь зарослей с участием травы *Prunella vulgaris* L. составила 41,2 га при эксплуатационном запасе 5,7 т и объеме возможного сбора сырья –3,4 т. В виду полиморфности вида проведено фармакогностическое изучение травы *Prunella vulgaris* L., собранной на территории Улутауской области, установлены диагностические анатомо-морфологические признаки, позволяющие проводить идентификацию. Диагностическими признаками сырья черноголовки обыкновенной являются форма и расположение листьев на стебле, отсутствие опустошения. Стебли растения бурые, четырехгранные, прямостоячие или приподнимающиеся, простые или ветвистые, снизу гладкие, в верхней части по ребрам с редкими и довольно длинными, вверх прилегающими волосками. Цветки на коротких цветоножках в ложных мутовках, собранные в головчатые и колосовидные, яйцевидные или продолговатые соцветия. Установлены параметры и нормы качества растительного сырья *Prunella vulgaris* L. По результатам проведенных исследований по определению параметров качества растительного сырья *Prunella vulgaris* L., полученные данные включены в проект нормативной документации по сырью.

2. Впервые разработана технология получения сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. и изучены параметры качества: сравнительно максимальный выход экстракта обеспечивается двухкратной экстракцией ультразвуком воздушно-сухого сырья, 70% этанолом при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, в течение 30 минут; основным компонентом экстракта является фенилпропаноид розмариновая кислота до 7,6%, разработан лабораторный регламент на производство сухого экстракта сырья *Prunella vulgaris* L. и установлены показатели и нормы качества сухого экстракта травы *Prunella vulgaris* L. Определен срок хранения сухого экстракта черноголовки обыкновенной – 24 месяца. Разработан проект нормативного документа на субстанцию сухой экстракт *Prunella vulgaris* L. Скрининг на биологическую активность экстрактов *Prunella vulgaris* L., полученные различными методами, выявил, что сухой экстракт, полученный при экстракции 70% этиловым спиртом в условиях ультразвуковой кавитации сырья *Prunella vulgaris* L. обладает выраженной противовоспалительной и антиоксидантной активностями и относится к малотоксичным соединениям, а именно к IV классу опасности.

3. Впервые разработан состав мягкой лекарственной формы, содержащий

сухой экстракт *Prunella vulgaris* L, карбопол 940 как гелевую основу и в качестве пластификатора - глицерин, при следующем соотношении компонентов мас. (%): сухой экстракт черноголовки обыкновенной, полученный в условиях ультразвуковой кавитации – 1,0 г; карбопол – 2,0 г; глицерин – 2,0 мл; NaOH гидроксид 2,0 мл; твин-80 – 1,0 мл; эфирное масло мяты – 0,5 мл; вода очищенная – до 100 мл. Разработана технология получения мягкой лекарственной формы на основе сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.

4. Получены воспроизводимые результаты физико-химических, биофармацевтических, фармакологических показателей геля на основе сухого экстракта из травы черноголовки обыкновенной. Разработаны методики качественного и количественного определения действующего вещества розмариновой кислоты в мягкой лекарственной форме (геля) на основе экстракта из травы черноголовки обыкновенной методом ВЭЖХ-МС. Впервые разработаны спецификации качества и проекты НД, лабораторный регламент на мягкую лекарственную форму на основе сухого экстракта черноголовки обыкновенной.

5. Разработано технико-экономическое обоснование продукции, которое показывает целесообразность выпуска противовоспалительного и антиоксидантного средства с экстрактом черноголовки обыкновенной в промышленных масштабах.

Оценка полноты решения поставленных задач.

Поставленные задачи по фармакогностическому исследованию травы *Prunella vulgaris* L.; определению показателей и норм качества, сроков хранения растительного сырья *Prunella vulgaris* L.; исследований по выбору оптимального способа получения сухого экстракта из травы черноголовки обыкновенной; исследования его химического состава, технологических свойств, скрининга образцов на биологическую активность, полученных традиционными способами и методом ультразвуковой кавитации; разработки технологии получения субстанции с выраженным биологическим действием из травы *Prunella vulgaris* L.; определению показателей и нормы качества, сроков хранения сухого экстракта, полученного из травы *Prunella vulgaris* L.; исследования биологической активности сухого экстракта черноголовки обыкновенной; разработки оптимального состава мягкой лекарственной формы в виде геля, содержащей биологически активные вещества *Prunella vulgaris* L. на основании физико-химических свойств и биологического действия; разработки технологии получения геля на основе сухого экстракта *Prunella vulgaris* L.; 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 травы *Prunella vulgaris* L. Полученный экстракт может быть использован как субстанция, так и готовое лекарственное средство. Разработана технология производства мягкой лекарственной формы на основе сухого

экстракта *Prunella vulgaris* L. 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 *Prunella vulgaris* L., полученного ультразвуковой кавитацией, что позволяет существенно снизить энерго затраты. Внедрение в производство лекарственных средств из *Prunella vulgaris* L., 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 2 патента РК на полезную модель, 1 статья в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, 3 статьи в зарубежных научных изданиях входящих в международную базу данных Web of Science Core Collection (Clarivate Analytics) и Scopus, 3 статьи в материалах международных конференций. В целом, научно-методический уровень представленной диссертационной работы соответствует современным аналогам, опубликованным в открытой научной печати.

Таким образом, описанные в диссертационной работе результаты проведенных исследований подтверждают перспективность применения экстрактов *Prunella vulgaris* L. в фармацевтической промышленности и медицине.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Wang S.J. et al., 2019. *Prunella vulgaris*: a comprehensive review of chemical constituents. Pharmacological effects and clinical applications. *Curr. Pharm. Des.*, 25, 359- 369, doi.org/10.2174/1381612825666190313121608
- 2 Huang N. et al., 2009. Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 and nitric oxide in RAW 264.7 mouse macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10579-10589, doi.org/10.1021/jf9023728
- 3 Bai Y, Xia B, Xie W, Zhou Y, Xie J, Li H, Liao D, Lin L, Li C. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella*. *Food Chem.* 2016 Aug 1; 204:483-496. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.047.
- 4 Ryu SY, Oak MH, Yoon SK, Cho DI, Yoo GS, Kim TS, Kim KM. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med.* 2000 May;66(4):358-60. doi: 10.1055/s-2000-8531.
- 5 Psotová J, Kolár M, Soušek J, Svagera Z, Vicar J, Ulrichová J. Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytother Res.* 2003 Nov;17(9):1082-7. doi: 10.1002/ptr.1324.
- 6 Lee J, Jung E, Koh J, Kim YS, Park D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2008 Dec;35(12):768-71. doi: 10.1111/j.1346-8138.2008.00565.x.
- 7 Vostálová J, Zdarilová A, Svobodová A. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2010 Apr;302(3):171-81. doi: 10.1007/s00403-009-0999-6
- 8 Pan Junying, Wang Haoyu, Chen Yinghua. *Prunella vulgaris* L. – A Review of its Ethnopharmacology, Phytochemistry, Quality Control and Pharmacological Effects. *Frontiers in Pharmacology*. VOLUME 13, 2022. DOI:10.3389/fphar.2022.903171
- 9 Malencic D. J., Gasic O., Popovic M., Boza P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* forneri // *Phytother. Res.* 2000. Vol. 14. P. 546–548.
- 10 Бадекова К.Ж., Левая Я.К., Атажанова Г.А., Жолдасбаев М.Е. Биологические свойства розмариновой кислоты // *Фармация Казахстана – Алматы*. – 2020. – № 7-8. С. 29-34.
- 11 Розмариновая кислота и её источники в Крыму / А. Е. Палий, Ф. М. Меликов, О. А. Гребенникова, В. Д. Работягов. —// *Фармация и фармакология*. — 2015. — № 2 (9). — С. 7-12.
- 12 Al-Sereiti, M.R. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials / M.R. Al-Sereiti, K.M. Abu-Amer, P. Sen // *Ind. J. Exper. Biol.* – 1999. – №37. – P. 124-130.
- 13 Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi P. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacol.* 2011; 2011:451682. doi: 10.5402/2011/451682
- 14 Ethanol extract of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* inhibits HMGB1 release by

induction of heme oxygenase-1 in LPS-activated RAW 264.7 cells and CLP-induced septic mice / M.S. Jun [et al.] // *Phytother Res.* — 2012 Apr. — Vol. 26, № 4. — P. 605-612.

15 Zholdasbayev M. E. et al. *Prunella vulgaris* L.: An Updated Overview of Botany, Chemical Composition, Extraction Methods, and Biological Activities // *Pharmaceuticals.* – 2023. – T. 16. – №. 8. – C. 1106.

16 Azwanida N.N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation// *Med. Aromat. Plants.* 2015. - N 4., P.196, 10.4172/2167-0412.1000196

17 Čujić N., Šavikin K., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique//*Food Chem.* – 2016. – Vol. 194.- P. 135-142

18 Cittan M., Altuntaş E., Çelik A. Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: a comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method// *Ind. Crops Prod.* – 2018. – Vol. 122. – P. 553-558, 10.1016/j.indcrop.2018.06.044

19 Albuquerque B.R. Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques // *Ind. Crops Prod.* -2016. – 10.1016/j.indcrop.2016.10.050

20 Trifunski S., Ardelean D. Flavonoid extraction from *Ficus carica* leaves using different techniques and solvents. – 2013.- Vol. 125, P. 81–86. doi:10.2298/ZMSPN1325081T.

21 Sharma V., Janmeda P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves // *Arabian J. Chem.* -2014. – Vol.10.1016/j.arabjc.2014.08.019

22 Šavikin C., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique//*Food Chem.* – 2016. – Vol.194, pp.135-142, 10.1016/j.foodchem.2015.08.008

23 Chanda S.V., Kaneria M.J. Optimization of conditions for the extraction of antioxidants from leaves of *Syzygium cumini* L // *Using Differ. Solvents* – 2012. – Vol.5., N 3.- P.332-338,10.1007/s12161-011-9242-0

24 Zhang F., Chen Bo., Xiao S., Yao S. Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. // *Separation and Purification Technology.* -2004.- Vol. 42(3). – P. 283–290. doi:10.1016/j.seppur.2004.09.002.

25 Mahmudati N., Wahyono P., Djunaedi D. Antioxidant activity and total phenolic content of three varieties of Ginger (*Zingiber officinale*) in decoction and infusion extraction method//*J. Phys. Conf. Ser.* – 2020.- P.1567, 10.1088/1742-6596/1567/2/022028

26 Kryževičiūte N., Kraujalis P., Venskutonis P.R. Optimization of high pressure extraction processes for the separation of raspberry pomace into lipophilic and hydrophilic fractions// *J. Supercrit. Fluids.* – 2016. – Vol.108. – P.61-68.

27 Rahmalia W., Fabre J.F, Mouloungui Z. Effects of cyclohexane/acetone ratio

on bixin extraction yield by accelerated solvent extraction method//*Procedia Chem.*-2015. –Vol.14. – P.455-464

28 Brachet A., Rudaz S., Mateus L., Christen P., Veuthey J.-L. Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves // *J. Sep. Sci.*, - 2001. – Vol. 24, N 10–11. - P.865-873

29 Gonçalves E.C.B.A. Byproduct generated during the elaboration process of isotonic beverage as a natural source of bioactive compounds // *J. Food Sci.* – 2018. – Vol. 83. - 10.1111/1750-3841.14336

30 Figueroa J. Comprehensive identification of bioactive compounds of avocado peel by liquid chromatography coupled to ultra-high-definition accurate-mass Q-TOF // *Food Chem.* – 2018. – Vol. 245. – P.707-716, 10.1016/j.foodchem.2017.12.011

31 Sarkar S., Alvarez V.H., Saldaña M.D.A. Relevance of ions in pressurized fluid extraction of carbohydrates and phenolics from barley hull // *J. Supercrit. Fluids.* – 2014. – Vol.93. –P. 27-37,10.1016/j.supflu.2014.04.019

32 Jentzer J.-B., Alignan M., Vaca-Garcia C., Rigal L., Vilarem G. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves// *Food Chem.* – 2015. – Vol.166. – P.561-567,10.1016/j.foodchem.2014.06.078

33 Saha S.,Walia S., Kundu A., Sharma K., Paul R.K. Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry//*Food Chem.* – 2015. – Vol.177.- P.369-375,10.1016/j.foodchem.2015.01.039

34 Benito-Román O., Alvarez V.H., Alonso E., Cocero M.J., Saldaña M.D.A. Pressurized aqueous ethanol extraction of β -glucans and phenolic compounds from waxy barley//*Food Res. Int.* – 2015.- Vol. 75. – P. 252-259, 10.1016/j.foodres.2015.06.006

35 Cho S.-K., Abd El-Aty A.M.,Choi J.H., Kim M.R., Shim J.H. Optimized conditions for the extraction of secondary volatile metabolites in *Angelica* roots by accelerated solvent extraction//*J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol.44, N 5.- P.1154-1158,10.1016/j.jpba.2007.03.011

36 Machado A.P., Pasquel-Reátegui J.L., Barbero G.F., Martínez J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods// *Food Res. Int.* – 2015. – Vol.77. P.675-683,10.1016/j.foodres.2014.12.042

37 Pereira D.T.V., Tarone A.G., Cazarin C.B.B., Barbero C.F., Martínez J/. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc//*J. Food Eng.*, 2019. – Vol.240. - P.105-113, 10.1016/j.jfoodeng.2018.07.019

38 Gomes G.V.F., Portugal L.A., Jeancarlo P., Jesus O.N., Oliveira O.J., David L.P., David J.N. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species//*Microchem. J.* -2017. - Vol.107. –P.28-35, 10.1016/j.microc.2016.12.021

39 Kinross A.D., Hageman K.J., Doucette W.J., Foster A.L. Comparison of Accelerated Solvent Extraction (ASE) and Energized Dispersive Guided Extraction

(EDGE) for the analysis of pesticides in leaves//J. Chromatogr. A. -2020. - Vol.1627. - 10.1016/j.chroma.2020.461414

40 Zhao L.C., He Y., Deng X., Yang C.L., Li W., Liang J., Tang Q.L. Response surface modeling and optimization of accelerated solvent extraction of four lignans from fructus schisandrae// Molecules. – 2012. - Vol.17, N4. – P. 3618-3629, 10.3390/molecules17043618

41 Bagade S.B, Patil M. Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: a review//Crit. Rev. Anal. Chem. 2019. – Vol.10.- 1080/10408347.2019.1686966

42 Kaufmann B., Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction// Phytochem. Anal. -2002. – Vol.13. –P.105-113

43 Taşkın B., Özbek E.A.. Optimisation of microwave effect on bioactives contents and colour attributes of aqueous green tea extracts by central composite design//J. Food Meas. Charact. -2020. – Vol.14. – P.2240-2252, 10.1007/s11694-020-00471-8

44 Ismail-Suhaimy N.W., Gani S.S.A., Zaidan U.H., Halmi M.I.E., Bawon P. Optimizing conditions for microwave-assisted extraction of polyphenolic content and antioxidant activity of *Barleria lupulina* Lindl//Plants. -2021. – Vol.10. - P. 682, 10.3390/plants10040682

45 Vinatoru M., Mason T.J., Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials//TrAC Trends Anal. Chem. -2017. – Vol.17. – P.159-178,10.1016/j.trac.2017.09.002

46 Levaya Ya.K., Zholdasbaev M. E., Atazhanova G. A., Akhmetova S. B. valuation of Antibacterial Activity of *Salvia stepposa* Extracts Isolated using Microwave Extraction, Growing Wild in Kazakhstan //Trends in sciences.- 2022.- Vol. 19(7).- P. 3217. (CiteScore – 0,8).

47 Machado P.B., Sumere B.R., Mekar C., Martinez J., Bezerra R.M.N., Rostagno M.A. Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: influence of temperature, frequency and operation mode//Int. J. Food Sci. Technol. – 2019. – Vol.54. – P.2792-2801,10.1111/ijfs.14194

48 González-Centeno M.R., Knoerzer K., Sabarez H., Simal S., Rosselló C., A. Femenia. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) - a response surface approach //Ultrason. Sonochem., 2014. – Vol.14. – P.2176-2184, 10.1016/j.ultsonch.2014.01.021

49 Wang X., Wu Y., Chen G., Yue W., Liang Q., Wu Q. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology//Ultrason. Sonochem. – 2013. – Vol.20, N3.- P.846-854,10.1016/j.ultsonch.2012.11.007

50 Thakker M.R., Parikh J.K., Desai M.A. Ultrasound assisted hydrotropic extraction: a greener approach for the isolation of geraniol from leaves of *Cymbopogon martini*//ACS Sustain. Chem. Eng. -2018. – Vol.6.- P.3215-3224

51 Murador C., Braga A.R.C., Martins P.J.L., Mercadante A.Z., Rosso V.V. Ionic liquid associated with ultrasonic-assisted extraction: a new approach to obtain carotenoids from orange peel//Food Res. Int. – 2019. – Vol.126. – P.108653, 10.1016/j.foodres.2019.108653

52 Mansur A.R., Song N.-E., Jang Y.W., Lim T. – L., Yoo M. Tae Gyu Nam, Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts//Food Chem. – 2019. – Vol. 293.- P. 438-445, 10.1016/j.foodchem.2019.05.003

53 Bosiljkov T., Dujmić F., Bubalo M.C.,Hribar J., Vidrih R.,Brnčić M.,Zlatic E., Redovniković I.R.,Jokić S.//Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: green approaches for extraction of wine lees anthocyanins.//Food Bioprod. Process., - 2017. – Vol.102. – P.195-203,10.1016/j.fbp.2016.12.005

54 Ji J.B., Lu X.H., Cai M.Q., Xu Z.C. Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound// Ultrason Sonochem. – 2006. – Vol. 13, N.5. – P. 455-62. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.08.003>

55 Gaete-Garretón L., Vargas-Hernández Y., Cares-Pacheco M.G., Sainz J., Alarcón J. Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina// Ultrasonics. – 2011. – Vol. 51, N5. – P. 581-586. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2010.12.012>

56 Guowen Zh., Li H., Hu M. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2011. – Vol. 12, N 1.- P. 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.12.003>

57 Groșan A., Ștefănescu R., Gurzu S., Muntean D, Vlase L., Vari C. Study of the potential antiulcerous action of hydroalcoholic extracts from *Prunella vulgaris* L. of romanian origin// Farmacia.- 2020. – Vol. 68, N 5. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2020.5.14>

58 Mak W., Walsh S. The Characterization of Steam Distillation as an Extraction Method to Extract Volatile Compounds from *Prunella vulgaris* and the Investigation of Their Anti-Tumorous Effect// Journal of Biosciences and Medicines. – 2021.- Vol. 9. – P. 120-142. <https://doi.org/10.4236/jbm.2021.98011>

59 Xia B.H., Xiong S.H., Tang J., Zhang Z.M., Li Y.M., Li M.J., Lin L.M. Extraction of flavonoids in *Prunella vulgaris* based on deep eutectic solvent method : application of new green solvent// Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2018.- Vol.43, N 17. – P. 3484-3492. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20180702.002>.

60 Alupului, A.; Călinescu, I; Lavric, V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. U.P.B. Sci. Bull., Series B 2012, 74(2), 129-142.

61 Bagade S.B., Patil M. Recent Advances in Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Complex Herbal Samples: A Review// Crit Rev Anal Chem. – 2021. – Vol. 51, N2. – P. 138-149. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1686966>

62 Akhtar I., Javad S., Yousaf Z., Iqbal S., Jabeen Kh. Review: Microwave assisted extraction of phytochemicals an efficient and modern approach//Pak. J. Pharm. Sci. – 2019. – Vol. 32, N1. – P. 223-230.

63 Komal S., Kazmi S.A.J., Khan J.A., Gilani M.M. Antimicrobial activity of *Prunella Vulgaris* extracts against multi-drug re-sistant *Escherichia Coli* from patients of urinary tract infection// *Pak J Med Sci.* – 2018.-Vol. 34, N3. – P. 616-620. <https://doi.org/10.12669/pjms.343.14982>

64 Wu H., Gao M., Ha T., Kelley J., Young A., Breuel K. *Prunella vulgaris* aqueous extract attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells// *Exp Ther Med.* – 2012. – Vol. 3, N6. – P. 919-924. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.524>

65 Lin T.F., Qiu J.N., Zhang S., Zhang Y., Zhang Y., Sun M., Zhang J.H., Liu B., Cheng F.F., Jiang Y.Y. Screening out the an-ti-insomnia components from *Prunella vulgaris* L. based on plasma pharmacochemistry combined with pharmacodynamic experiments and UPLC-MS/MS analysis// *J Ethnopharmacol* 2021.- Vol. 279. –P. 114373. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114373>

66 Zhang Z., Zhou Y., Lin Y., Li Y., Xia B., Lin L., Liao D. GC-MS-based metabolomics research on the anti-hyperlipidaemic activity of *Prunella vulgaris* L. polysaccharides// *Int J Biol Macromol.* – 2020. – Vol. 159. – P. 461-473. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.003>

67 Danthine S., Paul A., Jansen O., Ducrey A., Richel A., Lognay G., Maesen Ph., Mutwale Kapepula P., Mouithys-Mickalad A., Franck Th., Frédéric M. *Prunella vulgaris* L. seeds: a promising source of lipids, proteins, and original phenolic compounds presenting high antioxidant and anti-inflammatory activity// *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* -2022. – Vol. 26, N1. – P. 1-15. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.19412>

68 Özbek O., Saglam B., Canan Usta N., Budak Ya. GC–MS analysis and anti–microbial activity of *Prunella vulgaris* L. extracts,// *Journal of the Indian Chemical Society.* – 2022. – Vol. 99, N6. – P. 100460, <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100460>

69 Lone B.A., Chishti M.Z., Bhat F.A., Tak H., Bandh S.A. Anthelmintic Activities of Aqueous and Methanol Extracts of *Prunella vulgaris* L// *Nat Prod Chem Res.* – 2017. – Vol. 5, N4. – P. 269. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000269>

70 Küpeli Akkol E., Renda G., İlhan M., Bektaş N.Y. Wound healing acceleration and anti-inflammatory potential of *Prunella vulgaris* L.: From conventional use to preclinical scientific verification// *J Ethnopharmacol.*- 2022.- Vol.295. – P. 115411. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115411>

71 Hwang Y.J., Lee E.J., Kim H.R., Hwang K.A. In vitro antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. lilacina// *BMC Complement Altern Med.* – 2013. – Vol. 13. – P. 310. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-310>

72 Tan R., Lai J.X., Loke W.M. Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of *Prunella vulgaris* Tea// *Curr Res Nutr Food Sci.* – 2022.-Vol. 10, N2.- <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.2.9>

73 Lin Y., Yang C., Tang J., Zhang Zh., Xia B., Li Ya., Lin L., Liao D. Characterization and anti-uterine tumor effect of extract from *Prunella vulgaris* L. // *BMC Complement Med Ther.* – 2020. – Vol. 20, N 189.-

<https://doi.org/10.1186/s12906-020-02986-5>

74 Groșan A., Ștefănescu R., Vari C.E., Jîtcă G., Bătrânu M., Muntean L.D. Phytochemical Characterization of Transilvani-an *Prunella vulgaris*// *Acta Biologica Marisiensis*. – 2020. – Vol. 3, N1. – P. 62-69. <https://doi.org/10.2478/abmj-2020-0005>

75 Levaya Ya.K., Zholdasbayev M.E., Atazhanova G.A., Akhmetova S.B., Ishmuratova M.Yu. Antibacterial activity of ultra-sonic extracts of *Salvia stepposa* growing in Kazakhstan// *Bulletin of Karaganda University. Series Biology. Medicine. Geography* 2021 – Vol. 1, N101. – P. 45-49. <https://doi.org/10.31489/2021BMG1/45-49>

76 Gaete-Garretón L., Vargas-Hernández Y., Cares-Pacheco M.G., Sainz J., Alarcón J. Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria Molina* // *Ultrasonics*. – 2011. – Vol. 51, N5. – P. 581-586. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2010.12.012>

77 Chi Keung Mak W., Walsh S. The Anti-Viral Activity of *Prunella vulgaris*: A Narrative Review// *Integrative Medicine Reports*.- 2022. – Vol.107. – P.122. <http://doi.org/10.1089/imr.2022.0045>

78 Behl T., Rocchetti G., Chadha S., Zengin G., Bungau S., Kumar A., Mehta V., Uddin M.S., Khullar G., Setia D., Arora S., Sinan K.I., Ak G., Putnik P., Gallo M., Montesano D. Phytochemicals from Plant Foods as Potential Source of Antiviral Agents: An Overview// *Pharmaceuticals (Basel)*. -2021.- Vol. 14, N 4. – P. 381. <http://doi.org/10.3390/ph14040381>

79 Ao Z., Chan M., Ouyang M.J., Olukitibi T.A., Mahmoudi M., Kobasa D., Yao X. Identification and evaluation of the inhibitory effect of *Prunella vulgaris* extract on SARS-coronavirus 2 virus entry// *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16, N 6. - e0251649. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0251649>

80 Ao Zh., Chan M., Jing Ouyang M., Titus Abiola O., Mahmoudi M., Kobasa D., Yao X. *Prunella vulgaris* extract and suramin block SARS-coronavirus 2 virus Spike protein D614 and G614 variants mediated receptor association and virus entry in cell culture system// *bioRxiv*.- 2020. – p. 270306. <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.270306>

81 Gazanfar A., Mubashir H. M., Nahida T., Sameer A. M., Mir J. I. In vivo hepatoprotective potential of extracts obtained from floral spikes of *Prunella vulgaris* L // *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. - 2020. – Vol. 11, N 4. – P. 502-507, <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2019.08.003>

82 Komal S., Kazmi S.A.J., Khan J.A., Gilani M.M. Antimicrobial activity of *Prunella Vulgaris* extracts against multi-drug resistant *Escherichia Coli* from patients of urinary tract infection// *Pak J Med Sci*. -2018. – Vol. 34, N 3. – P. 616-620. <https://doi.org/10.12669/pjms.343.14982>

83 Zholdasbayev M.E., Atazhanova G.A., Musozoda S.M., Ewa Poleszak. *Prunella vulgaris* L.: an updated overview of botany, chemical composition, extraction methods and biological activities// *Pharmaceuticals*. – 2023.- Vol. 16, 1106. <https://doi.org/10.3390/ph16081106>

84 Psotová J., Kolár M., Sousek J., Svagera Z., Vicar J., Ulrichová. J. Biological

activities of *Prunella vulgaris* extract // *Phytother Res.* – 2003. – Vol. 17(9).-P. 1082-1089. <https://doi.org/10.1002/ptr.1324>

85 Groșan A., Vari C., Ștefănescu R., Danciu C., Pavel I., Dehelean C., Man A., David R., Vlase L., Muntean L. Antibacterial and antitumor activity of the species *Prunella vulgaris* L// *Revista Romana de Medicina de Laborator.* – 2020. – Vol.28, N4. – P. 405-417. <https://doi.org/10.2478/rrlm-2020-0031>

86 Man A., Gâz Florea Ș.A., Mare A.D., Berta L. Effects of low-molecular weight alcohols on bacterial viability// *Rev Romana Med Lab.* – 2017.- Vol. 25, N 4. – P. 335-343. <https://doi.org/10.1515/rrlm-2017-0028>

87 Patel J.K., Joshi C.K., Sharma M.K. *Prunella vulgaris* L. Potentiates Answer to the Emergence of Dreaded Antibiotic Re-sistance// *J Pure Appl Microbiol* 2021. – Vol. 15, N 3. – P. 1429-1441. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.35>

88 Zhao J., Ji D., Zhai X., Zhang L., Luo X., Fu X. Oral Administration of *Prunella vulgaris* L Improves the Effect of Taxane on Preventing the Progression of Breast Cancer and Reduces Its Side Effects// *Front Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 806. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00806>

89 Feng L., Jia X., Zhu M.M., Chen Y., Shi F. Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. in vitro and in tumor-bearing mice// *Molecules.* – 2010. – Vol. 15, N 12.- P. 9145-56. <https://doi.org/10.3390/molecules15129145>

90 Флора Казахстана. Т. 3. – Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1958. – 450 с.

91 Вехов В.Н., Лотова Л.И., Филин В.Р. Практикум по анатомии и морфологии высших растений. – М.: МГУ, 1980. – 560 с.

92 Лотова Л.И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений. – М.:КомКнига, 2007. – 512 с.

93 Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: Высшая школа, 1960. – 206 с.

94 Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. (2004). Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. Москва: Изд-во МГУ, 312 р.

95 Анели Н.А. Атлас эпидермы листа. Тбилиси: Мецниереба, 105 с.

96 Лотова Л.И. (2007). Ботаника: Морфология и анатомия высших растений. – Москва: КомКнига, 2007. – 512 с.

97 Rudall P.J. (2007). *Anatomy of flowering plants.* Cambridge: Cambridge University Press, 159 pages.

98 Федосеева Л.М., Кнауф 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.

99 Федосеева Г.М. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды. Методическое пособие по фармакогнозии. Иркутск, 2009. 67 с.

100 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>

101 Селиванов Е.В. Красители в биологии и медицине. Справочник. – Барнаул: Азбука, 2003. – 40 с.

102 Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. Учебное пособие для ВУЗов. — М.: ГЭОТАР-Мед, 2004. — 560 с.

103 Государственная фармакопея РФ XIII online, ФС.2.5.0047.15. «Трава тимьяна. *Thymi serpylli herba*». - 2016. - 10 с.

104 Звездина Е.В., Шейченко О.П. Исследования по стандартизации травы змеголовника молдавского (*Dracoscephalum moldavica* L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(4):7–12. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-02>

105 Коренская И. М. и др. Фитохимический анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья //Воронеж: Издательский дом ВГУ. – 2017. – С. 78.

106 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. - Vol.9(A). – P. 61-67 <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.5520>

107 Хабриев Р. У. соавт. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ //Москва. – 2005.

108 Zholdasbayev M. E. et al. Macro-and Microscopic Evaluation of above-ground parts of *Prunella vulgaris* L., growing on the Territory of the Republic of Kazakhstan //Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2024. – Т. 17. – №. 1. – С. 156-162.

109 Zholdasbayev M. E. et al. Histochemical Study of above-ground parts of *Prunella vulgaris* L., growing on the Territory of the Republic of Kazakhstan //Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2023. – Т. 16. – №. 12. – С. 5944-5947.

110 Komal S, Kazmi SAJ, Khan JA, Gilani MM. Antimicrobial activity of *Prunella Vulgaris* extracts against multi-drug resistant *Escherichia Coli* from patients of urinary tract infection. Pak J Med Sci. 2018 May-Jun;34(3):616-620. doi: 10.12669/pjms.343.14982.

111 Groșan,A.,Ștefănescu,R.,Vari,C.,Jîtcă,G.,Bătrânu,M. & Muntean,L.(2020). Phytochemical Characterization of Transilvanian *Prunella vulgaris*. Acta Biologica Marisiensis,3(1) 62-69. <https://doi.org/10.2478/abmj-2020-0005>

112 Lone BA, Chishti MZ, Bhat FA, Tak H, Bandh SA, et al. (2017) Anthelmintic Activities of Aqueous and Methanol Extracts of *Prunella vulgaris* L. Nat Prod Chem Res 5: 269. doi: 10.4172/2329-6836.1000269

113 Sabine Danthine, Aman Paul, Olivia Jansen, Aurélien Ducrey, Aurore Richel, Georges Lognay, Philippe Maesen, Paulin Mutwale Kapepula, Ange Mouithys-Mickalad, Thierry Franck & Michel Frédérick, «*Prunella vulgaris* L. seeds:

a promising source of lipids, proteins, and original phenolic compounds presenting high antioxidant and anti-inflammatory activity», Volume 26 (2022), Numéro 1, 1-15. DOI: 10.25518/1780-4507.19412

114 Tan R, Lai J. X, Loke W. M. Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of *Prunella vulgaris* Tea. *Curr Res Nutr Food Sci* 2022; 10(2). doi : <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.2.9>

115 Wu H, Gao M, Ha T, Kelley J, Young A, Breuel K. *Prunella vulgaris* aqueous extract attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells. *Exp Ther Med*. 2012 Jun;3(6):919-924. doi: 10.3892/etm.2012.524.

116 K peli Akkol E, Renda G, İlhan M, Bektaş NY. Wound healing acceleration and anti-inflammatory potential of *Prunella vulgaris* L.: From conventional use to preclinical scientific verification. *J Ethnopharmacol*. 2022 Sep 15;295:115411. doi: 10.1016/j.jep.2022.115411.

117 Hwang YJ, Lee EJ, Kim HR, Hwang KA. In vitro antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Nov 9;13:310. doi: 10.1186/1472-6882-13-310.

118 Lin TF, Qiu JN, Zhang S, Zhang Y, Zhang Y, Sun M, Zhang JH, Liu B, Cheng FF, Jiang YY. Screening out the anti-insomnia components from *Prunella vulgaris* L. based on plasma pharmacochemistry combined with pharmacodynamic experiments and UPLC-MS/MS analysis. *J Ethnopharmacol*. 2021 Oct 28;279:114373. doi: 10.1016/j.jep.2021.114373.

119 Zhang Z, Zhou Y, Lin Y, Li Y, Xia B, Lin L, Liao D. GC-MS-based metabolomics research on the anti-hyperlipidaemic activity of *Prunella vulgaris* L. polysaccharides. *Int J Biol Macromol*. 2020 Sep 15;159:461-473. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.003.

120 Oguz  zbek, Burak Saglam, Necibe Canan Usta, Yakup Budak, GC–MS analysis and anti–microbial activity of *Prunella vulgaris* L. extracts, *Journal of the Indian Chemical Society*, Volume 99, Issue 6, 2022, 100460, <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100460>

121 Lin, Y., Yang, C., Tang, J. et al. Characterization and anti-uterine tumor effect of extract from *Prunella vulgaris* L.. *BMC Complement Med Ther* 20, 189 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02986-5>

122 Levaya Ya.K., Zholdasbaev M.E., Atazhanova G.A., Akhmetova S.B., Ishmuratova M.Yu. Antibacterial activity of ultrasonic extracts of *Salvia stepposa* growing in Kazakhstan. *Вестник Карагандинского университета. Серия Биология. Медицина. География.* – 2021. – №.1(101). – С. 45-49. DOI 10.31489/2021BMG1/45-49

123 Levaya Y. K., Erkenuly, Z. M. ., Abdulkhakimovna, A. G. ., & Boltabaevna, A. S. . (2022). Evaluation of Antibacterial Activity of *Salvia stepposa* Extracts Isolated using Microwave Extraction, Growing Wild in Kazakhstan . *Trends in Sciences*, 19(7), 3217. <https://doi.org/10.48048/tis.2022.3217>

124 Ji JB, Lu XH, Cai MQ, Xu ZC. Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrason Sonochem*. 2006 Jul;13(5):455-62. doi: 10.1016/j.ultsonch.2005.08.003

125 Gaete-Garretón L, Vargas-Hernández Y, Cares-Pacheco MG, Sainz J, Alarcón J. Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. *Ultrasonics*. 2011 Jul;51(5):581-5. doi: 10.1016/j.ultras.2010.12.012.

126 Guowen Zhang, Li He, Mingming Hu, Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 12, Issue 1, 2011, Pages 18-25, ISSN 1466-8564, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.12.003>.

127 Alexandra Groșan, Ruxandra Ștefănescu, Simona Gurzu, Daniela Lucia Muntean, Laurian Vlase, Camil-Eugen Vari. Study of the potential antiulcerous action of hydroalcoholic extracts from *Prunella vulgaris* L. of Romanian origin. *Farmacia*, 2020, Vol. 68, 5. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2020.5.14>

128 Mak, W. and Walsh, S. (2021) The Characterization of Steam Distillation as an Extraction Method to Extract Volatile Compounds from *Prunella vulgaris* and the Investigation of Their Anti-Tumorous Effect. *Journal of Biosciences and Medicines*, 9, 120-142. doi: 10.4236/jbm.2021.98011.

129 Vostálová J., Zdařilová A., Svobodová A. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes // *Arch. Dermatol. Res.* – 2010. – Vol.302, N3. – P. 171–181.

130 Rajabi, S.; Ramazani, A.; Hamidi, M.; Naji, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru* 2015, 23(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>

131 Feng, L.; Jia, X.; Zhu, M.M.; Chen, Y.; Shi F. Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. in vitro and in tumor-bearing mice. *Molecules* 2010, 15(12), 9145-56. <https://doi.org/10.3390/molecules15129145>

132 Seo, J.K.; Kang M.J.; Shin J.H.; Lee, S.J.; Jeong H.G.; Sung, N.J.; Chung Y.C. Antibacterial and antioxidant activities of solvent extracts from different parts of hagocho (*Prunella vulgaris*). *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr* 2010, 39, 1425-1432. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.10.1425>

133 Nayak, A.; Khan, M.A.; Sharma, P.; Mishra, R. Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Prunella vulgaris* for oral thrush. *JDDT* 2018, 8(5-s), 251-258. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5-s.1966>

134 Singh, M.; Joshi, C.; Joshi, N.; Sharma, R.; Brijwal, L.; Kumar, R.S.; Kumar, T. Scrutinizing the antioxidant potential of *Prunella vulgaris* L. : A medicinal plant from central Himalayan region. *IJFAS* 2015, 4(1), 1-8.

135 Сушинская О. А., Голяк Н. С., Царенков В. М. Методы исследования высвобождения лекарственных веществ из наружных лекарственных форм // *Вестник фармации.* – 2019. – №. 4 (86). – С. 86-96.

ПРИЛОЖЕНИЯ ПРИЛОЖЕНИЕ А

КАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 8813

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

 (21) 2023/1123.2
(22) 20.05.2022
(45) 02.02.2024

(54) Prunella vulgaris L. (кәдімгі топырақбас) құрғақ сығындысын микробқа қарсы құрал ретінде қолдану
Применение сухого экстракта Prunella vulgaris L. (черноголовки обыкновенной) в качестве антимикробного средства
Use of a dry extract of Prunella vulgaris L. as an antimicrobial agent

(73) «Қарағанды медицина университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)
Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет Караганды» (KZ)
«Karaganda Medical University» Non-Commercial Joint-Stock Company (KZ)

(72) Жолдасбаев Мұса Еркінұлы (KZ) Zholdasbayev Mussa Erkinuly (KZ)
Ахметова Сауле Балтабаевна (KZ) Akhmetova Saule Baltabayevna (KZ)
Атажанова Гаянэ Абдулкахимовна (KZ) Atazhanova Gayane Abdulkakhimovna (KZ)

 ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Оспанов
Е. Оспанов
Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of RSE «National institute of intellectual property»

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

КАЗАКСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**ПАТЕНТ
PATENT**

№ 8611

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL



(21) 2023/1029.2

(22) 31.05.2022

(45) 10.11.2023

(54) *Prunella vulgaris* L. (кәдімгі топырақбас) құрғақ сығындысын цитотоксикалық құрал ретінде қолдану
Применение сухого экстракта *Prunella vulgaris* L. (черноголовки обыкновенной) в качестве цитотоксического средства
Use of a dry extract of *Prunella vulgaris* L. as a cytotoxic agent

(73) «Қарағанды медицина университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)
Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет Караганды» (KZ)
«Karaganda Medical University» Non-Commercial Joint-Stock Company (KZ)

(72) Жолдасбаев Мұса Еркінұлы (KZ) Zholdasbayev Mussa Erkinuly (KZ)
Атажанова Гаянэ Абдулкахимовна (KZ) Atazhanova Gayane Abdulkakhimovna (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Оспанов
Е. Оспанов
Y. Osipov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of RSE «National institute of intellectual property»

ПРИЛОЖЕНИЕ В

УТВЕРЖДЕН

Председатель Правления -Ректор

НАО «Медицинский университет



А.А. Турмухамбетова

от « 09 » 20 23 г.

ПРИКАЗ

РГУ «Комитет медицинского и

фармацевтического контроля МЗ РК

от « _ » 20 _ г.

№ _____

СОГЛАСОВАН

РГП на ПХВ «Национальный центр
экспертизы лекарственных средств
и медицинских изделий» КМ и ФК

МЗ РК _____

« _ » _____ 20 _ г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Торговое наименование лекарственного препарата

Қабынұға қарсы және антиоксидантты әсер ететін гель

Гель противовоспалительного и антиоксидантного действия

Международное непатентованное наименование:

(при его отсутствии-общепринятое (группировочное) наименование,
при отсутствии последнего-химическое наименование)

Лекарственная форма: гель

Дозировка: 1 %

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 лекарственного средства на
основе Черноголовки обыкновенной

НД РК 42-

Срок введения установлен с

“ _ ” _____ 20 _ г.

Вводится впервые

Срок действия до

“ _ ” _____ 20 _ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ ПЕРЕПЕЧАТКА НЕ РАЗРЕШАЕТСЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Для служебного пользования. Экз. № _____

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»

УТВЕРЖДЕН

Председатель Правления - Ректор
НАО «Медицинский университет
Кагананды»



А.А. Турмухамбетова

09 2023г.

М.П.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на получения геля

«Противовоспалительный и антиоксидантный гель на основе сухого экстракта *Prunella vulgaris L.*»

Срок действия регламента до «01» 09 2026г.

Кагананда – 2023

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

УТВЕРЖДЕН



Протоколы Правления - Ректор
НАО «Медицинский университет
Караганды»

А.А. Турмухамбетова

09 2023г.

СОГЛАСОВАН

РГП на ПХВ «Национальный центр
экспертизы лекарственных средств
и медицинских изделий» КМ и ФК

МЗ РК _____

«__» _____ 20__ г.

ПРИКАЗ

РГУ «Комитет медицинского и
фармацевтического контроля МЗ РК

от «__» _____ 20__ г.

№ _____

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственной субстанции

Prunella vulgaris L. extractum arida

Қәдімгі топырақбастың құрғақ экстрактысы

Черноголовка обыкновенная экстракт сухой

Форма – сухой экстракт

Международное непатентованное наименование

Prunella vulgaris L. Moench Herba (Черноголовка обыкновенная трава)

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 Е

Для служебного пользования. Экз. № _____

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
НЕКОММЕРЧЕСКОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»

УТВЕРЖДЕН

Председатель Правления - Ректор

«Медицинский университет



А.А. Турмухамбетова

от «05» 2024 г.

М.П.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на получения субстанции

«Черноголовка обыкновенная экстракт сухой»

Срок действия регламента до «01» 09 2026 г.

Караганда - 2023

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
НАО «МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»



АКТ ВНЕДРЕНИЯ В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ОРГАНИЗАЦИИ И ПРЕДПРИЯТИИ

1. Наименование научно-исследовательских, научно-технических работ и (или) результатов научной и (или) научно-технической деятельности:

Результаты научно-исследовательской работы на тему «Разработка технологии получения нового лекарственного средства противовоспалительного и антиоксидантного действия на основе *Prunella vulgaris* L.», проводимой в рамках запланированной диссертационной работы Жолдасбаева М.Е. на соискание степени PhD по специальности «ТФП»

2. Краткая аннотация: в учебный процесс Школы фармации НАО «Медицинский университет Караганды» внедрены результаты работы по дисциплине «Фармакогнозия» для студентов образовательных программ 6В10103 «Фармация» и 6807204 «Технология фармацевтического производства» в раздел: «Фармакогностическое изучение растений».

3. Эффект от внедрения: Повышение уровня подготовки специалистов в области ботаники, фармакогнозии и фитохимических исследований;

- Расширение сведения по ассортименту новых лекарственных растений Казахстана;
- Выполнение исследований, связанных с определением и описанием изученного сырья в соответствии с нормативными документами РК, принципами «Good Agricultural and Collection Practice for starting materials of herbal origin» (GACP - Надлежащая практика культивирования и сбора исходного сырья растительного происхождения) и «Good Manufacturing Practice» (GMP - Надлежащая производственная практика).

4. Место и время внедрения: школа фармации НАО «МУК», 2022-23 учебный год.

5. Форма внедрения: Информация о данном виде растительного сырья включена в лекционный курс, тематику СРС, методы фармакогностического изучения сырья включены в лабораторный практикум.

Материалы к настоящему акту рассмотрены на заседании Совета школы фармации (протокол № 1 от «31» сс 2023г.)

Члены комиссии по обеспечению

Качества Школы фармации  Исабаева М.Б.

Руководитель образовательной программы «Технология Фармацевтического производства»  Власова Л.М.

Руководитель образовательной программы «Фармация»  Лосева И.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

СПРАВКА

Дана о том, что представленный для анализа образец лекарственного растительного сырья в фазе бутонизации – цветения является растением черноголовка обыкновенная – *Prunella vulgaris* L., семейства Губоцветные (Яснотковые) – Lamiaceae (Labiatae).

Идентификация вида произведена на основе морфологического анализа листьев и соцветий.

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



С.У. Тлеукунова

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



М.Ю. Ишмуратова

ПРИЛОЖЕНИЕ И

УТВЕРЖДЕН



Председатель Правления - Ректор
НАО «Медицинский университет
Кагананды»

А.А. Турмухамбетова

09 2023г.

СОГЛАСОВАН

РГП на ПХВ «Национальный центр
экспертизы лекарственных средств
и медицинских изделий» КМ и ФК

МЗ РК _____

« ____ » _____ 20 ____ г.

ПРИКАЗ

РГУ «Комитет медицинского и
фармацевтического контроля МЗ РК

от « ____ » _____ 20 ____ г.

№ _____

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного растительного сырья

Prunella vulgaris L.

Кәдімгі топырақбас шөбі

Черноголовка обыкновенная трава

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

Сбор сырья в фазу цветения 2 декада июля.

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 лекарственного средства на основе Черноголовки обыкновенной

НД РК 42-

Срок введения установлен с

« ____ » _____ 20 ____ г.

Вводится впервые

Срок действия до

« ____ » _____ 20 ____ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ ПЕРЕПЕЧАТКА НЕ РАЗРЕШАЕТСЯ