Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 547:615:23 На правах рукописи

КАСЫМОВА ДАРИЯ ТАЛГАТОВНА

Разработка технологической схемы получения геля растительного происхождения и ее валидация

8D07105 – «Химическая технология органических веществ»

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Отечественный научный консультант:
д.х.н., профессор
Жусупова Г.Е.

Зарубежный научный консультант:
Full Professor
Bruno Botta
(Римский Университет Ла Сапиенца, Италия)

Республика Казахстан
Алматы, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ 6
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 7
ВВЕДЕНИЕ 9
1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15
1.1 Особенности фармацевтической разработки гелей как разновидности мягких лекарственных форм 15
1.2 Этапы производства препаратов растительного происхождения и требования к их качеству 26
1.3 Валидация технологического процесса производства препаратов растительного происхождения 34
1.4 Биологическая доступность лекарственных растительных субстанций в мягких лекарственных формах 37
1.5 Растения вида *L. gmelinii*, как источник биологически активных веществ и их биологическая активность 44
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 50
2.1 Материалы и реактивы 50
2.2 Проведение экстракции биологически активных веществ 50
2.3. Определение содержания общей суммы полифенолов 51
2.4 Исследование компонентного состава субстанций из растений вида *L. gmelinii* методом LC-DAD-QToF 52
2.4.1 Приготовление растворов 52
2.4.2 Прибор и аналитические условия 52
2.5 Спектральный анализ 52
2.6 Исследование моносахаридного состава 53
2.7 Количественное определение (–)-эпигаллокатехин галлата методом ВЭЖХ-ДАД 53
2.7.1 Прибор и хроматографические условия 53
2.7.2 Приготовление стандартного раствора 54
2.7.3 Приготовление испытуемых растворов 54
2.7.4 Специфичность 54
2.7.5 Линейность 54
2.7.6 Правильность 55
2.7.7 Точность 55
2.7.8 Диапазон применения 55
2.8 Исследование антибактериальной активности *in vitro* анализом зоны ингибирования 55
2.9 Исследование иммуномодулирующей активности 56
2.9.1 Подготовка исследуемых образцов 56
2.9.2 Животные 56
2.9.3 Выделение лимфоцитов 56
2.9.4 Выделение перитонеальных макрофагов 56
2.9.5 Определение уровней цитокинов 57

2.10 Физико-химические исследования гелей 57
2.10.1 Реологические исследования 57
2.10.2 Исследование кинетики высвобождения 57
2.10.3 Измерение pH образцов гелей 58
2.10.4 Исследование температурной стабильности гелей 58
2.10.5 Исследования коллоидной стабильности гелей 59
2.11 Исследование противовоспалительной активности 59
2.11.1 Исследование противовоспалительной активности 59
2.11.2 Гистологический исследования 59
2.12 Статистическая обработка данных 60
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 61
3.1 Фармакотехнологический анализ лекарственного растительного сырья кермека Гмелина (*L. gmelinii)* и его стандартизация 61
3.1.1 Разработка надлежащей технологии сбора и заготовки сырья кермека Гмелина (*L. gmelinii)* 61
3.1.2 Технологические и фармакопейные параметры качества растительного сырья на примере корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* 62
3.2 Фармацевтическая разработка оптимального метода экстракции растительного сырья кермека Гмелина (*L. gmelinii)* 64
3.2.1 Оптимизация процесса ультразвуковой экстракции для получения растительных субстанций из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* 65
3.2.2 Оптимизация технологии сверхкритической флюидной экстракции для получения растительных субстанции из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* 67
3.2.3 Сравнительный анализ методов получения растительных субстанций из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* методами классической мацерации, ультразвуковой экстракции и сверхкритической флюидной экстракции 71
3.2.4 Сравнительный анализ химического состава растительных субстанций из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* с помощью метода LC-QToF-MS 72
3.2.5 Сравнительный анализ моносахаридного состава растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii* 80
3.3 Исследование антибактериальной активности растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii* 84
3.4 Исследование иммуномодулирующей активности субстанций из растений вида *L. gmelinii* 87
3.4.1 Влияние растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii* на уровни IL-6 в мышиных макрофагах и лимфоцитах 87
3.4.2 Влияние растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii* на уровни TNF-α в мышиных макрофагах и лимфоцитах 89
3.4.3 Влияние растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii* 91

на пролиферацию лимфоцитов селезенки мышей
3.5 Технологическая схема производства растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii* методом ультразвуковой экстракции и ее валидация 93
3.6 Стандартизация растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* и исследование стабильности 104
3.7 Валидация методики количественного определения конденсированных дубильных веществ в субстанциях из растений вида *L. gmelinii* 105
3.8 Фармацевтическая разработка гелей с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* и оценка их качества 116
3.8.1 Обоснование выбора компонентов гелей и определение их совместимости. 116
3.8.2 Определение оптимальных концентраций компонентов гелей 119
3.8.2.1 Определение оптимальной концентрации гелеобразователя 119
3.8.2.2 Определение оптимальной концентрации вспомогательных веществ 123
3.8.2.3 Определение оптимальной концентрации субстанций и исследование стабильности гелей 131
3.8.3 Разработка технологической схемы получения гелей с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* и их спецификаций 135
3.9 Разработка спецификаций качества гелей с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* и исследование их стабильности 145
3.10 Исследование противовоспалительной активности гелей с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* 147
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 152
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 154
Приложение А 172
Приложение Б 173
Приложение В 174
Приложение Г 178
Приложение Д 182
Приложение Е 185
Приложение Ж 186
Приложение З 187
Приложение И 188
Приложение К 189
Приложение Л 190
Приложение М 191
Приложение Н 192
Приложение О 194
Приложение П 196

Приложение Р 201

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 6.38-90 Унифицированные системы документации. Система организационно-распорядительной документации. Требования к оформлению документов.

ГОСТ 7.12-93 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращения слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.32–2001 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.9–95 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

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

ГОСТ Р 7.0.100–2018 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АНД – Аналитический нормативный документ
АФИ – Активный фармацевтический ингредиент
АФС – Активная фармацевтическая субстанция
БАВ – Биологически активные вещества
БАС – Биологически активные соединения
ВВ – Вспомогательное вещество
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГОСТ – Государственный отраслевой стандарт
ГФ – Государственная Фармакопея
ГХ – Газовая хроматография
ГХ-МС – Газовая хроматография-масс-спектрометрия
ГЭЦ – Гидроксиэтилцеллюлоза
ДАД – Диодно-матричный детектор
ДВ – Дубильные вещества
ЕАЭС – Евразийский экономический союз
ЕС – Европейский Союз
ЕФ – Европейская фармакопея
ИК – Инфракрасный
ИЛ – Испытательная лаборатория
ЛВ – Лекарственное вещество
ЛПС – Липополисахарид
ЛР – Лекарственное растение
ЛРС – Лекарственное растительное сырье
ЛС – Лекарственное средство
ЛЭК – Локальная этический комиссия
МЛФ – Мягкая лекарственная форма
МФ – Международная Фармакопея
НД – Нормативная документация
НЧ – Надземная часть
НПП – Нестероидный противовоспалительный препарат
ОКК – Отдел контроля качества
ПМР – Протонный магнитный резонанс
ПКК –Протокол контроля качества
РБ – Республика Беларусь
РК – Республика Казахстан
РСО – Рабочий стандартный образец
РФ – Российская Федерация
СО – Стандартный отклонение
СОП – Стандартные операционные процедуры
СФЭ – Сверхкритическая флюидная экстракция
ТФЭ – Твердофазная экстракция

УФ-спектр – Ультрафиолетовый спектр
УЗЭ – Ультразвуковая экстракция
ФР – Фармацевтическая разработка
ЭТС – Эмбриональная телячья сыворотка
ЯМР – Ядерный магнитный резонанс
ConA – Конканавалин А (КонА)
Ср – Индекс пригодности процесса (потенциальная пригодность технологического процесса)
Cpk – Индекс пригодности процесса (подтвержденное качество технологического процесса)
CTD – Common Technical Document (Общий технический документ)
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
EMEA – Европейское агенство по оценке лекарственных средств (European Medicines Evaluation Agency)
Escherichia coli – E. coli
GACP – Good Agricultural and Collection Practice for starting materials of herbal origin (Надлежащая практика культивирования и сбора исходного сырья растительного происхождения)
GCP – Good Clinical Practice (Надлежащая клиническая практика)
GLP – Good Laboratory Practice (Надлежащая лабораторная практика)
GMP – Good Manufacturing Practice (Надлежащая производственная практика)
ICH – International Council for Harmonisation (международная конференция по гармонизации)
IL-6 – Интерлейкин-6 (ИЛ-6)
ISO – International Organization for Standardization (Международная организация по стандартизации)
L. gmelinii – Limonium gmelinii
LC-DAD – Жидкостная хроматография с диодно-матричным детектором
LC-QToF-MS – Тандемная квадруполь-времяпролётная масс-спектрометр
NEML – National Essential Medicines List
QbD – Quality by Design («Качество через дизайн»)
QTPP – Quality Target Product Profile (целевой профиль качества препарата)
RSD – Относительное стандартное отклонение
RT – Время удерживания
S. epidermidis – Staphylococcus epidermidis
TNF-α – Фактор некроза опухоли
WHO – World Health Organization (Всемирная организация здравоохранения)

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена валидации технологии получения растительных субстанций из корней и надземной части растений вида *Limonium gmelinii*, отобранных в эксперименте при сравнительном анализе различных методов их экстракции: ультразвуковой экстракции (УЗЭ), сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ) и классической мацерации (КМ); стандартизации субстанций, исследованию их антибактериальной и иммуномодулирующей активностей; фармацевтической разработке гелей с выделенными растительными субстанциями и изучению их противовоспалительной активности.

Актуальность темы исследования. Пандемия COVID-19, вспыхнувшая в мире в 2020 году и ставшая причиной серьезных социально-экономических перемен, оказала значительное влияние на фармацевтическую отрасль Казахстана. Острая ситуация в период карантина показала необходимость развития и поддержки фармацевтического сектора, как фактора национальной безопасности и конкурентоспособности [1]. Частью государственной программы «Стратегия «Казахстан-2050» является Национальный проект «Качественное и доступное здравоохранение для каждого гражданина «Здоровая нация», в котором намечено доведение доли отечественной фармацевтической продукции с 17 % в 2020 году до 50 % в 2025 году [2]. Для достижения данной цели поставлены общенациональные задачи наращивания научного и кадрового потенциала для фармацевтической и медицинской промышленности и развитие отечественного производства лекарственных средств и медицинских изделий.

Биоразнообразие и богатый видовой состав флоры Казахстана являются благоприятными факторами для развития отечественных фитопрепаратов, признанных во всем мире как безопасная и эффективная альтернатива синтетическим аналогам. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) примерно более трех четвертей людей полагаются на растительные лекарственные средства в качестве первичной медико-санитарной помощи [3].

Растения рода *Limonium gmelinii (L. gmelinii)* являются перспективным видом с точки зрения экономической и экологической целесообразности их внедрения в медицину, ввиду их высокой биологической активности, ресурсной обеспеченности, простоте заготовки [4]. Ряд исследований по изучению данного вида растения показали перспективность его применения в медицине и необходимость дальнейших разработок в этом направлении. *L. gmelinii* уже является фармакопейным сырьем для получения растительной субстанции, обладающей антиоксидантными, противовоспалительными ранозаживляющими, гепатопротекторными свойствами [5], и из которой были получены такие лекарственные формы, как сироп [6], мазь [7] и настойка [8], оказывающие благоприятный терапевтический эффект в исследованиях *in vivo* и доклинических испытаниях.

С учетом вышесказанного, использование данного растительного сырья для разработки новых лекарственных форм с применением современного научно обоснованного подхода, а также с учетом принципов и требований надлежащей производственной практики (GMP) представляется актуальной задачей. Такой способ создания фитопрепаратов позволяет решать одну из главных сложностей их развития, а именно отсутствие должного контроля качества и стандартизации, которые напрямую влияют на их безопасность и эффективность. Сложный и изменчивый химический состав растительного сырья затрудняет обеспечение качества [9]. Важной составляющей методологии GMP служит валидация, целью которой является доказательство пригодности выбранной технологии, методики, процесса, оборудования или системы в процессе производства лекарственных средств [10]. *Валидация технологии производства субстанций и лекарственных форм на их основе подтверждает ее постоянство при выпуске лекарственных средств независимо от серии, для каждой единицы лекарственной формы и упаковки*. Применение данной концепции к производству фитопрепаратов как сложного для стандартизации продукта безусловно позволит достичь улучшения их качества и гарантировать его в процессе производства.

Исходя из вышеизложенного, актуальность диссертационной работы заключается в разработке и валидации технологии получения отечественных лекарственных средств на основе перспективного растительного сырья *L. gmelinii* с учетом требований GMP, и исследование их биологической активности, с целью внедрения в медицинскую практику.

Цель работы – Фармацевтическая разработка и валидация технологии получения мягких лекарственных форм в виде гелей с растительными субстанциями, выделяемыми в сравнительном аспекте различными методами экстракции из корней и надземной части (НЧ) растений вида *L. gmelinii*, проанализированных как по химическому составу, так и по впервые изученной их иммуномодулирующей активности для выбора наиболее рациональной и приемлемой из них.

Задачи.

1. Фармакогностическое исследование корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* и определение показателей их качества.
2. Разработка оптимального получения субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* сравнением трех методов экстракции: классической мацерации (КМ), ультразвуковой экстракции (УЗЭ) и сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ).
3. Сравнительный анализ химического состава растительных субстанций, выделенных из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii*, и их иммуномодулирующей активности.
4. Апробация отобранной в эксперименте лабораторной технологии получения растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* к опытно-промышленным условиям ТОО «Научно-производственное предприятие «Антиген» и ее валидация.

5. Фармацевтическая разработка гелей с растительными субстанциями из корней и надземной части *L. gmelinii*, включая их состав, технологию получения, валидацию, стандартизацию и исследование стабильности.

6. Определение противовоспалительной активности гелей с растительными субстанциями из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii.*

Объекты исследования: лекарственное растительное сырье (ЛРС) – корни и НЧ растений вида *L. gmelinii*; субстанции, выделенные из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii,* гели с растительными субстанциями из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii.*

Предмет исследования: оптимизация технологии получения субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii*, их валидация, биологические свойства, разработка оптимального состава и технологии получения гелевых композиций, их стандартизация, изучение стабильности, валидация технологического процесса получения гелей, а также исследование их противовоспалительной активности.

Сведения о метрологическом обеспечении и методологическая база.

В диссертационной работе были использованы фармакогностические, химические и физико-химические методы анализа, такие как макроскопический, микроскопический и фитохимический анализы; микробиологический контроль; УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием, ВЭЖХ-ДАД, ВЭЖХ-квадрупольная времяпролетная масс-спектрометрия, ^{1}Н ЯМР-спектроскопия, метод горизонтальной диффузионной ячейки, вискозиметрия, *in vitro* исследование антибактериальной активности методом диффузионного анализа зоны ингибирования, *in vitro* исследования иммуномодулирующей активности методами иммунореферентного анализа (ИФА) и проточной цитометрии, *in vivo* исследования противовоспалительной активности на модели формалинового отека лап экспериментальных мышей, а также статические методы.

Научная новизна и основные результаты исследования.

1. Впервые проведен сравнительный анализ различных способов получения растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* методами КМ, УЗЭ и СФЭ с установлением в каждом из них оптимальных условий экстракции.

2. Впервые установлена иммуномодулирующая активность растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii.* Установлено, что оптимальные условия получения растительных субстанций методами УЗЭ и запатентованного ранее способа КМ позволяют получить равные по иммуномодулирующей активности субстанции.

3. Впервые проведен сравнительный анализ компонентного состава растительных субстанций, полученных разными методами, в частности УЗЭ и КМ. В субстанциях S1 и S2, полученных из корней, и в субстанциях S3 и S4, полученных из надземной части, методами УЗЭ (S1, S3) и КМ (S2, S4), установлена идентичность их химических композиций. В результате анализа

химического состава растительных субстанций методом LC-QToF-MS в них идентифицировано 62 соединения на основании их фрагментных ионов и в сравнении с данными ранее опубликованных исследований. Показано также, что субстанции S1 и S2 содержат большее количество сульфатированных производных флавоноидов в отличие от субстанций S3 и S4 с доминированием в них агликонов флавоноидов.

4. Впервые были установлены положения связей моносахаридов в полисахаридных комплексах, выделенных из растительных субстанций, полученных из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii*, путем анализа частично метилированных ацетатов альдитола (МАА). Во всех растительных субстанциях присутствовали рамноза (Rha-терминальная и Rha-3,4), арабиноза (Ara-терминальная), глюкуроновая кислота (GlaA), манноза (Man), галактоза (Gal), и глюкоза (Glc). В полисахаридном комлексе из НЧ также была найдена ксилоза (Xyl-теримнальная) и галактуроновая кислота (GalA).

5. Впервые проведен трансфер и валидация технологии получения растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* методом УЗЭ в опытно-промышленных условиях ТОО «Антиген». Построены индивидуальные диаграммы и карты скользящего размаха, диаграммы стандартного отклонения и рассчитаны индексы воспроизводимости технологических процессов. Разработаны и утверждены нормативные документы на производство субстанций.

6. Впервые разработана и составлена фармацевтическая разработка мягких лекарственных форм в виде гелей с растительными субстанциями, выделенными из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii*, с использованием карбомера в качестве гелеобразователя. Впервые обоснован состав вспомогательных веществ и активных субстанций методами ICH Q8. Проведена валидация технологии на уровне лабораторных серий.

7. Впервые исследованы органолептические и реологические свойства разработанных гелей, изучена кинетика высвобождения АФИ из них и установлена их противовоспалительная активность в тестах *in vivo.*

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оптимальными условиями получения растительных субстанций из корней и надземной части растений вида *Limonium gmelinii* по показателям выхода и содержанию дубильных веществ – это однократная 45-минутная УЗЭ 50 %-ным этиловым спиртом при соотношении сырья к экстрагенту 1:5 для корней и 1:7 для надземной части, а также СФЭ в течение 240 минут при давлении 35 Мпа, температуре 45 ^{0}С с применением сорастворителя этилового спирта в количестве 60 %.

2. Полисахаридный комплекс, полученный из надземной части растения вида *Limonium gmelinii*, отличается от комплекса, выделенного из корней, наличием ксилозы (терминальная Xyl) и галактуроновой кислоты (GalA), что установлено методом дериватизации ацетилированных метилгликозидов.

3. Метанольные фракции экстрактов из корней и надземной части растений вида *Limonium gmelinii* проявляли антибактериальную активность

против *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, в то время как водные фракции, содержащие полисахариды, не проявили антибактериальной активности, что указывает на ведущую роль фенольных соединений в антибактериальном действии экстрактов *Limonium gmelinii*.

4. На основании анализа кинетики высвобождения и реологических свойств, оптимальными гелевыми составами с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* были выбраны гели, содержащие 1 % карбомера и 10 % пропиленгликоля, и проявляющие противовоспалительное действие в эксперименте *vivo* на мышах. Технологический процесс получения гелей стабилен и воспроизводим, что подтверждается валидацией лабораторных серий.

Теоретическая значимость работы.

Материалы диссертации могут быть использованы для организации в вузах/НИИ подразделения по трансферу технологий; для обучения и повышения квалификации практических работников фармацевтической отрасли и обучения магистрантов и докторантов фармацевтических факультетов.

Практическая значимость работы.

Разработаны условия оптимального получения растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* методами УЗЭ и СФЭ для дальнейшей разработки лекарственных форм. Разработанные условия получения субстанций методом УЗЭ представляются более выгодными с экономической и практической точки зрения. Для получения растительных субстанций в производственных условиях ТОО «Антиген» методом УЗЭ составлены и утверждены проекты опытно-промышленных регламентов, проведена валидация и изучена стабильность процесса. Комплексные исследования МЛФ в виде гелей с растительными субстанциями из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* показали их удовлетворительные потребительские и технологические качества, стабильность в процессе хранения и наличие противовоспалительного действия в модели формалин индуцированного отека лап мышей *in vitro*. Полученные экспериментальные данные позволят продолжить работы по производству гелей в опытно-промышленных условиях производства с последующим внедрением в медицину.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам.

Диссертационная работа выполнялась в рамках программы грантового финансирования Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан AP05134034 «Разработка и создание высокоэффективных гелей на основе фармакопейных дикорастущих растений Казахстана и их комплексное исследование» 2018-2020 г. и AP19174425 «Разработка состава и технологии получения гелей, содержащих экстракты растений *Limonium gmelinii*, их опытно-промышленное производство, стандартизация, изучение биологической безопасности и активности» 2023-2025 г.

Личный вклад автора заключается в непосредственном выполнении экспериментальной части работы, участии в анализе, обобщении и интерпретации полученных экспериментальных данных.

Апробация практических результатов.

Результаты и основные положения научной работы представлены на: XI Всероссийской молодежной научной конференции (Сыктывкар, Россия, 2019 г.), 47th IUPAC WORLD CHEMISTRY CONGRESS (Париж, Франция, 2019), 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (Инсбрук, Австрия, 2019 г.), книжной коллекции стран Содружества Независимых Государств «Лучший молодой ученый - 2020» (Астана, 2020), GA – 70th Annual Meeting (Салоники, Греция, 2022), научно-практической конференции «Проблемы синтеза новых лекарственных средств в фармацевтической химии» (Ташкент, Узбекистан, 2024).

Публикации.

В результате проведенных исследований в рамках диссертационной работы было опубликовано в соавторстве 9 научных работ, в том числе 2 статьи в международных рецензируемых журналах Plants (Q1, процентиль 90 %), Antioxidants (Basel) (Q1, процентиль 90 %), 1 статья в журнале «International Journal of Biology and Chemistry», входящих в перечень журналов, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан, а также материалы и тезисы 6 докладов на международных научных конференциях.

Личный вклад автора в подготовку каждой публикации:

1. . Статья «Study of the hexane fraction isolated from the substance obtained from the roots *Limonium gmelinii* by GC-MS» получение и обсуждение экспериментальных данных, анализ и обработка.
2. Статья «Plant Extract of *Limonium gmelinii* Attenuates Oxidative Responses in Neurons, Astrocytes, and Cerebral Endothelial Cells In Vitro and Improves Motor Functions of Rats after Middle Cerebral Artery Occlusion» экспериментальная часть по получению растительной субстанции и исследованию ее физико-химических свойств, анализ данных по их химическому составу.
3. Статья «Phytochemical Profiles and In Vitro Immunomodulatory Activities of Extracts Obtained from Limonium gmelinii Using Different Extraction Methods» разработка методологии, подготовка обзора, анализ данных, получение, обсуждение и обработка результатов, коммуникация с журналом.

Структура и объем диссертации.

Диссертации изложена на 205 страницах машинописного текста и включает введение, 3 раздела, заключение, 32 таблицы, 54 рисунка, список использованных источников из 228 наименований.

1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности фармацевтической разработки гелей как разновидности мягких лекарственных форм

Фармацевтическая классификация лекарственных форм для местного применения и определение данного термина существуют в нескольких вариантах. Рассмотрение мягких лекарственных форм интересно в свете требований разных фармакопей, и особенно государств-членов ЕАЭС, членом которого является РК, создающие общий рынок лекарственных препаратов с задачей обеспечения единства требований и применения одинаковых или сопоставимых методов исследования и контроля при оценке качества, эффективности и безопасности лекарственных средств [11].

Номенклатура «Мягкие лекарственные формы для местного применения», включающие мази, гели, кремы, линименты, пасты, припарки, пластыри, применена в монографиях Международной Фармакопеи (МФ), Фармакопее ЕС, Фармакопеях РК и Республики Беларусь (РБ). В данных фармакопеях обозначено, что «мягкие лекарственные средства для местного применения предназначены для местного или трансдермального высвобождения действующих веществ или для смягчающего или защитного действия», которые в зависимости от структуры характеризуются реологическими свойствами: определенной структурной вязкостью, псевдопластическими или пластическими и тиксотропными свойствами [12-15]. В Фармакопее РФ же существует заметное отличие в номенклатуре, а именно, приводится общая фармакопейная статья «Мази – МЛФ, предназначенные для нанесения на кожу, раны и слизистые оболочки» [16], и объединяющая все вышеперечисленные МЛФ, в том числе гели.

Наиболее распространённым и применимым все же является термин «Мягкие лекарственные формы» для местного применения, включающие мази, гели, пасты, кремы, линименты и др. [17]. Основанием для объединения данной группы лекарственных средств, являются специфические реологические свойства, а именно формирование вязкопластической консистенции, определенной структурной вязкости, проявление местного терапевтического действия через кожу или слизистые оболочки, многокомпонентность состава и обязательная однородность [18].

Гели, согласно определению Международной Фармакопеи, – это гомогенные, прозрачные, полутвердые лекарственные средства, состоящие из жидкой фазы в трехмерной полимерной матрице с физическими или иногда химическими поперечными связями с помощью подходящих гелеобразователей [13]. В ГФ РК и РБ, гели – это жидкости, желированные подходящими гелеобразователями природного или синтетического происхождения [14,15]. В Фармакопее РФ определение гелей – это мази, в которых для получения основы используются гелеобразователи природного и синтетического происхождения [16].

Число зарегистрированных МЛФ от общего количества лекарственных средств на фармацевтическом рынке Казахстана составляет около 5 % [19] и они применяются в самых разнообразных областях медицины. Хотя их рыночная доля не так высока, МЛФ пользуются спросом в медицинской практике для лечения больных с дерматологическими заболеваниями, комбустиологиии и хирургии, гинекологии и проктологии, офтальмологии, отоларингологии и других [18]. Широкий терапевтический охват и нижеприведенные преимущества МЛФ укрепили их позиции на рынке ЛС и способствуют развитию разработок новых составов последующим причинам:

- возможность оказания местного и резорбтивного действия, лучший контакт с поверхностью кожи и всасывание активных компонентов;
- возможность комбинирования веществ из различных фармакотерапевтических групп, отличающихся также по консистенции, фильности и другим физическим свойствам;
- относительная простота и безопасность применения, особенно при лечении ожогов, отморожений, опрелостей, инфицированных ран, дерматитов различной этиологии;
- экономичность и технологичность производства [18].

Высокий спрос на данный вид лекарств обуславливает и высокие требования, выдвигаемые к их качеству. А именно МЛФ должны:

- легко и полностью высвобождать введенные в них ЛВ, т.е. обеспечивать необходимый фармакологический эффект;
- быть однородными, т.е. иметь оптимальную дисперсность ЛВ, их равномерное распределение в объеме;
- сохранять стабильность в течение всего срока хранения;
- иметь необходимые реологические свойства, т.е. равномерно распределяться, фиксироваться на поверхности, легко намазываться и др.;
- не подвергаться микробной контаминации;
- не вызывать аллергические реакции, не оказывать сенсибилизирующее действие
- иметь pH близкое к pH поверхности, для которой предназначено средство [13, 18].

Рекомендации ГФ РК к разработке данной лекарственной формы включают контроль и учет в процессе создания параметров однородности и размера диспергированных частиц; при использовании консервантов контроль в соответствии с тестом *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3);* проведение проверки качества упаковки согласно статье «*Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1)* и подразделу *«Контейнеры» (3.2*); а также оценку микробиологической чистоты в соответствии с требованиями раздела *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4)* [14].

Для того, чтобы МЛФ соответствовали вышеуказанным требованиям, производитель должен следовать руководящим принципам GMP, согласно которым качество готовой продукции закладывается и обеспечивается на

протяжении всего жизненного цикла, т.е. встраивается в сам продукт, и полагает непрерывную самоинспекцию, а не основывается только на контроле качества конечного продукта [20]. Руководство GMP является одним из надежных инструментов обеспечения качества лекарственных средств и служит основополагающим документом фармацевтической системы качества государств-членов ЕАЭС. Правила надлежащей практики производства гармонизированы с документами ICH (Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения). Разработанные руководства (ICH) Q8, Q9 и Q10 призваны облегчить работу, как производителей, так и регуляторных органов [21-23]. Подход, основанный на рекомендациях ICH, применим и к МЛФ.

Первая стадия жизненного цикла ЛС, согласно ICHQ10 («Фармацевтическая система качества»), это фармацевтическая разработка (рисунок 1). Далее за ней следуют выпуск опытно-промышленных партий, трансфер технологии и последующее масштабирование в производстве [22].



Рисунок 1 – Жизненный цикл лекарственного препарата

Этап фармацевтической разработки своей целью ставит создание препарата с заданными характеристиками и моделирование процесса его производства, базируясь на научных знаниях [21]. Достижение этой цели по научно-методическому руководству ICHQ8 возможно путем всестороннего исследования и схематично выглядит как представлено на рисунке 2.



Рисунок 2 – Схема фармацевтической разработки лекарственных препаратов

Информация, полученная на каждом этапе исследования, подлежит обязательному обобщению и резюмированию в регистрационном досье: Общий технический документ (CTD, ICH M4) представлен в разделе 3.2.P.2 «Фармацевтическая разработка» [21].

Фармацевтическая разработка реализуется применением концепций минимального или улучшенного подходов («спланированное качество»), а также их комбинации [24]. Спланированный подход описан в Части 2 руководства ICHQ8 под термином «Quality by Design» (QbD) и носит лишь рекомендательный характер, т.е. разработчик может выбрать проведение таких исследований, которые могут привести к расширению знаний о характеристиках продукта в более широком диапазоне свойств исходных материалов, вариантах проведения производственных процессов и их контроля, что дает возможность продемонстрировать более высокую степень их понимания [21]. Научное понимание облегчает создание расширенного пространства разработки – «Design Space (DS)». В стратегии QbD объектами изучения становятся планируемый профиль продукта – «Quality Target Product Profile (QTPP)», пространство разработки, установление критических параметров качества – «Critical Quality Attributes», оценка рисков, управление жизненным циклом, план стратегии контроля, технология анализа процессов – «Process Analytical Technology (PAT)» [21]. Подход «спланированное качество» построен на экспериментальных исследованиях и математическом моделировании, это более углубленный и систематический способ ФР, требующий от фармацевтических компаний высокого научного и методического уровней и должного материального обеспечения.

Практическое применение QbD, к примеру, отражается в разработке автоматизированных синтезов лекарственных субстанций с применением информационных и математических методов планирования, автоматически настроенных алгоритмов выбора вспомогательных веществ, систематизации информации в базы данных [25, 26]. Инновационными являются работы по созданию моделей информационной поддержки всех этапов фармацевтической разработки конкретного продукта. Например, в работе [27] представлена интеллектуальная информационная система алгоритмического и программного обеспечения синтеза активного фармацевтического ингредиента во взаимосвязи с управлением процессами и базами данных лекарственных и вспомогательных веществ. В исследовании [28] показана возможность использования программного обеспечения для определения оптимальных соотношений компонентов таблеток и построения математических моделей, описывающих зависимость их технологических свойств от количества ВВ и технологических параметров.

Немало работ посвящено использованию «улучшенного подхода» в разработке МЛФ. QTPP для МЛФ представляет собой список желательных атрибутов качества, которые должны присутствовать в конечном продукте, включая такие элементы, как тип лекарственной формы, путь введения, размер частиц или глобул, реологическое поведение, концентрация лекарственного

средства, гомогенность и однородность, pH, высвобождение и проникновение лекарственного средства *in vitro*, микробиологическая чистота и другие [29]. Их можно контролировать и оптимизировать в рамках процесса QbD для получения желаемого конечного продукта. В QbD разработках МЛФ коррелируется взаимосвязь критических свойств материала и критических параметров процесса, т.е. компонентного состава и технологических параметров производства (вариация исходных материалов, температуры нагрева, скорости перемешивания и охлаждения, изотермического перемешивания, температуры заполнения контейнера и др.) с конечными свойствами продукта [24, 29]. Подобные исследования требуют тщательного вдумчивого планирования эксперимента и грамотной интерпретации результатов.

Однако, как и было сказано ранее, подход «quality by design» в ФР пока является рекомендательным и вспомогательным. Базовым же остается «минимальный подход» [24], руководствуясь которым, разработчик исследует нижеприведенные элементы технологии и докладывает полученную информацию в отчете CTD под указанными ниже номерами:

1. Компоненты лекарственного препарата (раздел 3.2.P.2.1.)
1.1. Действующие вещества (раздел 3.2.P.2.1.1.)
1.2. Вспомогательные вещества (раздел 3.2.P.2.1.2.)
2. Лекарственный препарат (раздел 3.2.P.2.2.)
2.1. Разработка состава / рецептуры (раздел 3.2.P.2.2.1.)
2.2. Допустимый избыток (раздел 3.2.P.2.2.2.)
2.3. Физико-химические и биологические свойства (раздел 3.2.P.2.2.3.)
3. Разработка производственного процесса (раздел 3.2.P.2.3.)
4. Система герметизации упаковки (раздел 3.2.P.2.4.)
5. Микробиологические характеристики (раздел 3.2.P.2.5.)
6. Совместимость (раздел 3.2.P.2.6.) [21].

Руководство ICHQ8 дает определенные рекомендации по объему исследований на каждый вышеприведенный пункт отчета. Первый этап, который иногда называют предварительными исследованиями компонентов (Preformulation Studies), фокусируется на анализе физических, химических, биологических и микробиологических свойств активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) и вспомогательных веществ. В рамках этого этапа основная задача заключается в выявлении ключевых характеристик исходных материалов, способных повлиять на качество конечного продукта. На данном этапе преследуется цель выявить критические характеристики исходных материалов, влияющие на качество готового продукта. Для МЛФ такими критическими факторами могут быть дисперсность и химическая модификация АФИ, гидрофильно-гидрофобные свойства, полиморфизм, природа носителя и др. Значимость таких исследований обусловлена тем, что до 50 % проблем, связанных с технологией производства и качеством готовых форм, возникают из-за АФИ и вспомогательных веществ [30].

В частности, фармакокинетическая активность мази во многом зависит от физико-химического состояния ЛВ. ЛВ в виде кислоты, основания или соли проявляет различную эффективность. Например, лидокаин в виде основания оказывает лучшее действие в мази, чем лидокаина гидрохлорид [20]. Растворимость ЛВ также влияет на фармакологический эффект, т.к. наиболее активны средства локального действия, содержащие вещества в растворенном или тонкоизмельченном состоянии. Это обуславливает важность контроля дисперсности всех компонентов [17].

Не менее важно изучение полиморфизма ЛВ, который особенно часто встречается в суспензиях, мазях, суппозиториях, гранулах, таблетках, капсулах [31]. Полиморфные формы отличаются различной биодоступностью, стабильностью, технологичностью и даже физиологической активностью [32]. В МЛФ полиморфные превращения АФИ могут произойти под влиянием вспомогательных веществ и влияют на высвобождение из основы [33]. Так, твин-80 способствует образованию наиболее активной полиморфной формы метилпреднизолона [20]. Явления полиморфизма и сокристаллизации изучают методами ИК, вибрационной, рамановской и терагерцевой спектроскопии, термоаналитическими методами, оптической и сканирующей электронной микроскопией и др. [32,33].

Анализ наличия примесей и установления их структуры на этапе «Preformulation Studies» является важным моментом для токсикологической оценки препарата, его терапевтической эффективности, стабильности. Так, например, в МЛФ примеси могут вступать во взаимодействие с активными центрами макромолекулы или вызывать их деструкцию, тем самым понижая вязкость и ухудшая качество геля [34]. В качестве нормативного документа для контроля примесей используется руководство Q3A(R2), в котором примеси разделяются на органические, неорганические и остаточные растворители [35]. Для разработчика важно понимать природу примесей и возможные механизмы их образования. Примеси могут возникать в результате распада исходных материалов, образовываться в ходе синтеза или являться продуктом взаимодействия компонентов лекарственного средства; экзогенные примеси, примеси старения и др. [36]. Научный подход к данному вопросу, комплекс аналитических методов исследований, нормативные рекомендации являются ключевыми в решении проблемы примесей.

Вспомогательные вещества и их концентрации в ЛС также подвергаются тщательному изучению при фармацевтической разработке. Применение того или иного ВВ возможно только после подтверждения информации об их безопасности, качестве и соответствии нормативным требованиям. Стоит также учесть, что ВВ, полученные от разных производителей, могут отличаться по своим характеристикам [32], и поэтому данный фактор учитывается при ФР.

Функция каждого вспомогательного компонента и его способность поддерживать эту функцию, обеспечивая эффективность препарата на всем сроке хранения, должны быть подтверждены экспериментально. Также в процессе разработки должны быть обоснованы диапазоны содержания ВВ,

включенных в материальный баланс, а также их совместимость между собой и с АФИ. Среди специалистов FDA существует мнение о том, что ключевую роль в функционировании ЛВ в организме человека, играют именно вспомогательные вещества, а не биологические свойства самого активного фармацевтического ингредиента [30]. Состав ВВ должен быть подобран так, чтобы успешно воздействовать на слои кожи и доставлять АФИ, так как основным препятствием для этого являются ее превосходные барьерные свойства, в основном обеспечиваемые роговым слоем и плотными соединениями, что делает введение активных веществ через кожу технологической проблемой и требуют разработку составов способных, преодолеть этот барьер [37].

После исследования свойств АФИ и ВВ следует стадия разработки состава и рецептуры лекарственной формы, а также изучение физико-химических и биологических свойств препарата. Технология производства моделируется с учетом пути введения, терапевтического действия и способа применения препарата. Должны быть обоснованы составы каждой серии и отличия между ними, подтверждены совместимость компонентов и предоставлены данные о стабильности препарата. Использование допустимых избытков должно быть отражено в отчете и также обосновано [21]. Примером может служить внесение избытка этанола или воды при производстве МЛФ, ввиду их потери из-за испарения при гомогенизации под вакуумом при повышенной температуре. В таких случаях необходимо прогнозировать избытки, а затем уточнять при трансфере технологии и сопутствующей валидации процесса [30].

При дизайне МЛФ выбор ВВ для основы-носителя является первостепенной задачей, так как от этого зависит степень высвобождения ЛВ [38]. Как показал анализ литературы, выбор предполагаемых носителей делается на основании их физико-химических и фармакологических свойств, и далее оценкой высвобождения и анализом ряда свойств конечного продукта выбирается основа. е только способствуют процессу высвобождения активной фармацевтической субстанции, но и могут ускорять или замедлять абсорбцию активной молекулы [38]. Грамотный подбор вспомогательных компонентов позволяет усилить или ослабить действие препарата, а также обеспечить его местное или системное воздействие.

В состав МЛФ могут быть добавлены консерванты (п-гидроксибензоаты, фенол, бензойная кислота, сорбиновая кислота, метилпарабен, пропилпарабен и др.), антиоксиданты для предотвращения микробной и окислительной порчи продукта соответственно (лимонная, малеиновая, фосфорная или винная кислоты); эмульгаторы для стабилизации эмульсий (жирные кислоты и спирты, поливалентные ионы, глины); солюбилизаторы (глицерин, пропиленгликоль, сорбитол и др.), функция которых заключается в предотвращении потери влаги препаратом, а также красители и ароматизаторы при необходимости улучшения органолептических характеристик целевого продукта.

Также в состав МЛФ могут быть включены усилители проницаемости кожи, для увеличения скорости всасывания активного фармацевтического

ингредиента, включающие воду, углеводороды, сульфоксиды (особенно диметилсульфоксид) и их аналоги, пирролидоны, жирные кислоты, сложные эфиры и спирты, поверхностно-активные вещества, амиды (включая мочевину и ее производные), полиолы, эфирные масла и др. Регулированием гидрофильно-липофильного баланса, а также включением в состав МЛФ эмульгаторов, растворителей, солюбилизаторов, регуляторов pH и других компонентов достигают необходимой фармакодинамики и фармакокинетики лекарственных веществ [39].

Совместимость эксципиентов с активным фармацевтическим ингредиентом возможно установить физико-химическими методами. Например, в работе [40] сравнивали ИК-спектры исходных компонентов геля *с ИК-спектром* их смеси. Анализ спектров показал первоначальные полосы поглощения исходных веществ с небольшим их смещением и отсутствие новых полос, что свидетельствовало о совместимости компонентов [40].

Один из способов определения совместимости активных и вспомогательных компонентов гелей может служить изучение их агрегативной стабильности, например, при центрифугировании [41]. Авторами [42] технологическая совместимость компонентов биогелей определялась по органолептическим показателям, а также по отсутствию расслаивания при центрифугировании 3000 об/мин.

Методом исследования совместимости *лека*рственных веществ и основы в препаратах локального действия также является изучение высвобождения ЛВ методом диализа через мембрану [42]. Тестирование высвобождения *in vitro* это хорошо зарекомендовавший себя аналитический метод, используемый для измерения скорости высвобождения активного ингредиента из полутвердой лекарственной формы и для характеристики терапевтического действия лекарственных препаратов [39]. Динамика высвобождения анализируется определением процентного определения ЛВ, перешедшего из образца в буферный раствор, что определяет выбор наиболее подходящей основы для конкретного АФИ [43].

Исследование структурно-механических свойств, как показателя совместимости компонентов МЛФ, проводится изучением реологических характеристик методом ротационной вискозиметрии [41,44]. В некоторых работах для этой цели определяется экструзия образцов препарата из туб [44]. Реология полутвердых составов дает критически важную информацию о характеристиках продукта, его стабильности и служит полезным индикатором для подбора упаковки, технологических параметров производства и оборудования. Измерения, основанные на реологии, позволяют предсказать, какие составы могут демонстрировать флокуляцию, коагуляцию или коалесценцию, приводящие к таким нежелательными эффектами, как осаждение или расслоение [39].

Еще одним способом исследования реологии МЛФ может служить растекаемость образца геля или мази за определенный промежуток времени на модельной поверхности [44,45]. Растекаемость определяет однородность и

консистенцию состава, позволяет оценить микроструктуру МЛФ, приемлемость размеров и форм частиц АФИ и ВВ в рецептуре [46].

После непосредственной разработки состава и изучения лекарственного препарата следует разработка производственного процесса (раздел 3.2.P.2.3 отчета по лекарственному препарату). В процессе ФР производственного процесса, во-первых, определяются технологические процессы, лежащие в основе изготовления выбранной лекарственной формы. Схематично технологию получения МЛФ можно представить схемой, изложенной на рисунке 3 [18].

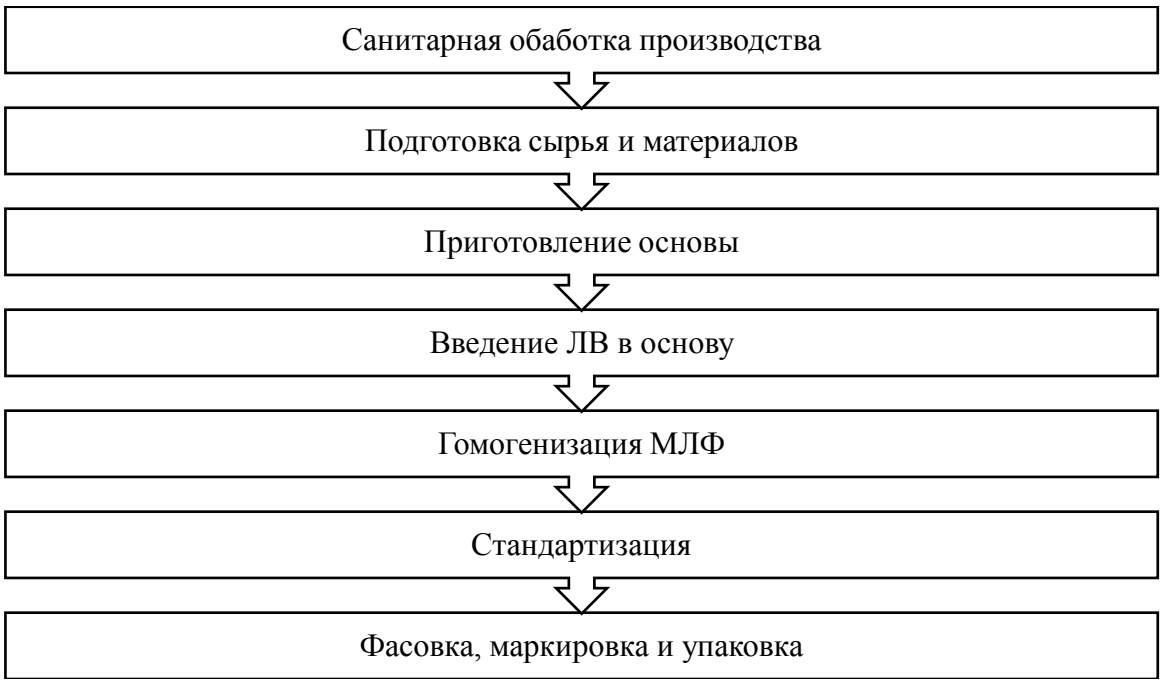


Рисунок 3 – Этапы технологии производства МЛФ

Далее план разработки должен учесть критические параметры, обязательные для контроля независимо от используемого оборудования и размера серии [21]. Проводится оценка степени влияния изменений технологических параметров на качество лекарственного препарата. Иначе говоря, рассматриваются «наихудшие случаи» для выбора производственного процесса и подтверждение пригодности компонентов выбранной лекарственной формы [30]. Пять критических параметров технологии МЛФ – температура, скорость нагревания и охлаждения, методы и скорость смешивания, время смешивания и скорость потока оказывают большое влияние на степень дисперсии и исследуются в процессе валидации [47]. Некачественно проведенная гомогенизация может привести к образованию комков или глобул из-за недостаточного или неполного смешивания масляной и водной фаз, что пагубно влияет на качество, стабильность и дозировку готового продукта, снижает эффективность действия препарата [47].

К примеру, параметром контроля в производстве МЛФ может быть температура на стадии приготовления эмульсии типа масло/вода. В данном

случае более низкая температура водной фазы в сравнении с масляной при их смешении может привести к затвердению расплавленных компонентов, и как следствие разрушению эмульсии или выпадению осадка. Слишком высокие температуры могут быть критическими при использовании термолабильных компонентов ввиду их деструкции, а в некоторых случаях избыточное охлаждение приведет к образованию осадка растворенных веществ [48].

Максимальные и минимальные значения должны быть определены для времени перемешивания компонентов гелей. Разработчику необходимо ориентироваться на диапазон времени, достаточный для растворения ингредиентов, но не приводящий к утрате надлежащих реологических характеристик продукта. Для полимерных гелей чрезмерное перемешивание, особенно высокое напряжение сдвига, может разрушить структуру полимера. Так избыточное перемешивание гелей на основе акриловой кислоты становится причиной разрушения структуры полимера и резкого падения вязкости. В эмульсионных составах чрезмерное смешивание может привести к преждевременному разделению фаз, что приведет к резким изменениям вязкости [47].

На стадии перемешивания критическим показателем также может стать частота оборотов мешалки. Как отмечает автор [49] нарушение определенных границ этого параметра может привести к неоднородности геля в отношении активного лекарственного вещества и действующих компонентов. Такие процессы, как эмульгирование, требуют гомогенизации с высоким напряжением сдвига для получения капель желаемого размера и дисперсности, и напротив, при получении геля требуется низкое усилие сдвига для достижения оптимальных физических характеристик [50].

Скорость подачи ингредиентов на стадии смешивания является также важным моментом при производстве МЛФ. Эмульсии вода-в-масле требуют более медленной скорости добавления ингредиентов, чем традиционные эмульсии масло-в-воде, и скорость потока в составах такого типа должна быть соответствующим образом изменена. Режимы работы диспергаторов сырья и поточных гомогенизаторов необходимо теоретически и экспериментально оптимизировать и валидировать для достижения приемлемых параметров смешивания [47].

Еще один немаловажный аспект на стадии разработки производственного процесса – это доказательство пригодности оборудования. На данном этапе необходимо проводить оценку соответствия конструкции, размера и мощностей оборудования ожидаемым результатам и возложенным функциям, доказать его стабильность на предельных режимах работы. Качество МЛФ зависит от надлежащего применения квалифицированных резервуаров, мешалок, скребков и другого производственного оборудования. Важность применения валидированного оборудования равносильна важности оптимальных технологических параметров и рецептуры [51]. В отличие от пероральных твердых дозированных лекарственных средств, производственные процессы для МЛФ не могут быть остановлены в моменте какой-либо операции до

завершения цикла работы, так как есть риск потери всей партии. Работа по оптимизации процесса должна быть подготовлена заранее, и операторы должны убедиться, что все необходимое для завершения цикла готово до начала следующей процедуры.

Стоит также учесть непосредственное влияние оборудования на лекарственный препарат [30]. Смазывающие материалы, газы, исходящие от деталей и узлов конструкции, и посторонние примеси из внешней окружающей среды не должны контаминировать лекарственные вещества [21]. Для минимизации возможных рисков проводится анализ робастности процесса, т.е. проверяется его устойчивость путем внесения искусственных изменений в условия работы или размер серии результаты [21].

Следующим существенным критерием обеспечения качества лекарственного препарата служит упаковка и система герметизации упаковки, описываемые в разделе 3.2.P.2.4 отчета CTD. Исследования на данном этапе направлены на обоснование выбора типа и вида контейнера, материала упаковки, исходя из данных стабильности активной субстанции в конкретном упаковочном материале [52]. Упаковка должна быть инертной по отношению к лекарственному препарату, т.е. не взаимодействовать с компонентами продукта, а также быть безопасной и удобной [30]. Разработчик лекарственного препарата должен изучить способность упаковки защищать и сохранять лекарственные средства от повреждений и потерь, внешних факторов среды.

Для МЛФ форм наиболее популярной упаковкой являются тубы, изготовленные из алюминия или полимеров (чаще всего полиэтилен, полипропилен, поливинилхлорид) [18]. Материалы и полимеры, отличающиеся от описанных в Фармакопее, могут использоваться только после их утверждения в каждом конкретном случае компетентным уполномоченным органом [14]. Контейнер/система упаковки могут оказывать влияние на напряжение сдвига в процессе использования МЛФ, что, в свою очередь, влияет на микроструктуру и характеристики продукта [18]. Рекомендации FDA по стабильности требуют, чтобы стабильность пилотных партий во время ФР исследовалась в выбранном типе упаковки для подтверждения ее безопасности и эффективности.

После изготовления и расфасовки МЛФ в первичную и вторичную упаковку проводится проверка качества конечного продукта. Мониторинг качества лекарственных препаратов требует проведения физических, микробиологических и химических испытаний на всех этапах разработки и производства. Согласно монографии «Мягкие лекарственные средства для местного применения» ГФ РК обязательными испытаниями при контроле качества МЛФ являются описание, идентификация, извлекаемая масса или объем, микробиологическая чистота, количественное определение [14].

Существуют также дополнительные методы контроля, такие как измерение консистенции для определения проникновения, оценка вязкости (или кажущейся вязкости), а также испытания, демонстрирующие соответствующее высвобождение активного вещества (или активных веществ), дополнительно

можно контролировать pH, кислотное и перекисное число, характерные свойства основы, сопутствующие примеси, герметичность контейнера, стерильность для стерильных МЛФ. В случае, если АФИ нерастворим в основе МЛФ применяют методы, контролирующие однородность АФИ, а если АФИ диспергировано, то необходимо проводить контроля размера частиц [14].

Приведенный в данной главе обзор литературы подтверждает, что качество готовой МЛФ определяется каждым этапом в процессе ФР и планирования дизайна МЛФ, от компонентного состава и технологии изготовления до выбора упаковки и условий хранения готового продукта. Учитывая и регулируя критические факторы качества МЛФ, разработчик прогнозирует начало, скорость и степень терапевтического ответа, что и служит целью научных исследований лекарственных форм. Используя набор вышеприведенных методов всестороннего изучения МЛФ, возможно разработать успешную лекарственную форму для доставки через кожные компоненты.

1.2. Этапы производства препаратов растительного происхождения и требования к их качеству

Традиционно лекарственные растительные продукты прописывались народными целителями в общинах или самостоятельно. В связи с этим оценка эффективности и безопасности основывалась на истории использования и неформальных знаниях, передаваемых из поколения в поколение. Однако при коммерциализации необходимы научные доказательства того, что продукты эффективны и безопасны.

Распространёнными являются случаи безрецептурного и самостоятельного приема пациентами фитопрепаратов, влекущие за собой серьезные побочные реакции [53], что является определенной трудностью и проблемой их производства. Различные исследования продемонстрировали недостатки качества растительных лекарственных средств; от фальсификации традиционными лекарствами до замены неэффективными или некачественными растительными материалами, загрязненными почвой, микроорганизмами, пестицидами, афлатоксинами и т. д. [54]. В базе данных ВОЗ имеется более шестнадцати тысяч сообщений о случаях побочных реакций, вызванных применением лекарственных растений. Наиболее частыми побочными реакциями являются гипертензия, гепатит, отек лица, ангиодема, судороги, тромбоцитопения, дерматит и смерть [55]. Для решения этого вопроса требуется налаженная система фармакологического надзора и мониторинга растительных лекарственных средств.

Как подчеркивает ВОЗ, в настоящее время растительные материалы активно используются в развитых и развивающихся странах в качестве народных средств домашнего пользования, безрецептурных лекарственных препаратов и сырья для фармацевтической промышленности, и составляют значительную часть мирового рынка лекарств. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), по состоянию на 2018 г. только 124 государства-члена (64 %) сообщили, что у них есть законы или нормативные

акты, касающиеся продуктов растительного происхождения, и еще не существует стандартного подхода к оценке совокупности доказательств при оценке безопасности и эффективности таких продуктов [54]. Поэтому перед производителями стоит задача соблюдения международных общепризнанных руководящих принципов для обеспечения качества и его оценки путем использования современных методов контроля и применения соответствующих стандартов [56].

Качество, эффективность и безопасность – это тесно взаимосвязанные основополагающие критерии приемлемости современных лекарственных средств. Для гарантии надлежащего качества необходимо соблюдение множества показателей в процессе разработки и производства соответствующего препарата, что достигается путем выполнения требований ряда международных стандартов и нормативных требований, таких как, например, Надлежащая производственная практика (Good Manufacturing Practice, GMP), ICH Guidelines, ISO 9001 и др.

Характерными сложностями разработки, производства и стандартизации растительных лекарственных препаратов можно назвать следующие:

1. Многокомпонентность состава и как следствие сложность схем идентификации всех компонентов.
2. Изменчивость химического состава и свойств растительного материала ввиду генетических, экологических, сезонных факторов, и вследствие возможные отличия сырья от партии к партии.
3. Терапевтически активные компоненты в большинстве случаев неизвестны.
4. Возможное отсутствие селективных аналитических методов и эталонных соединений в продаже.
5. Источники сырья и качество сырья изменчивы и взаимозависимы.
6. Способы сбора, сушки, хранения, транспортировки и обработки (например, режим экстракции и полярность экстрагирующего растворителя, нестабильность компонентов и т. д.) также влияют на качество готового продукта.
7. Частое отсутствие токсикологических, фармакокинетических и фармакодинамических данных, а также зависимости реакции от дозы. и исследования взаимодействия. Кроме того, эффект плацебо в испытаниях лечебных трав часто очень высок [57].

Чтобы свести к минимуму отклонения в качестве конечных растительных препаратов, стандартизация процедур должна охватывать всю область исследований, от выращивания лекарственных растений до их клинического применения [52]. Разработка качественных и эффективных растительных препаратов включает этапы поиска высококачественного сырья, создание надежных методик идентификации компонентов и проверка их биологической активности, проведение токсикологических исследований с последующими клиническими испытаниями [58].

Растущий спрос на растительные препараты, а также вышеперечисленные особенности их производства, повлекли за собой разработку особых рекомендаций к системе контроля качества, учитывающих специфичность данной группы лекарственных средств. Как было сказано ранее, основными регуляторными документами в обеспечении качества, безопасности и эффективности лекарственных препаратов являются руководства ВОЗ и Международной конференции по гармонизации требований к регистрации лекарственных средств для человека (ICH), а для растительных препаратов дополнительными являются руководства Комитета по лекарственным растительным продуктам (HMPC) Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) и Европейского научного кооператива по фитотерапии (ESCOP). Для производителей лекарственных средств на территории ЕАЭС (Республика Беларусь, Республика Армения, Республика Казахстан, Кыргызская Республика, Российская Федерация), созданного в 2016 г., разработана наднациональная нормативная база, которая выдвигает единые требования к вопросам регулирования всех этапов производства лекарственных средств, в том числе требования к растительным гомеопатическим лекарственным средствам, к проведению клинических исследований и вопросам их обращения на рынке [59].

Основополагающим принципом производства качественного продукта по требованиям вышеназванных организаций является идея того, что качество может быть достигнуто только в том случае, если ему уделяется приоритетное внимание начиная с самых ранних этапов процесса разработки, т.е. качество закладывается на каждом этапе изготовления продукции, а не только проходит проверку в готовом продукте [52]. Внедрение производителями методов контроля GMP, повышает гарантию того, что лекарственные препараты изготавливаются ожидаемой подлинностью, эффективностью, качеством и чистотой. В производстве фитопрепаратов рекомендовано использовать стандартные операционные процедуры и строго следовать им, внедрять системы для обнаружения и исследования отклонений в качестве продукции, а также иметь надежные испытательные лаборатории.

Исходя из всего вышесказанного, для препаратов растительного происхождения, производственные стадии, требующие строго регламентированной процедуры и подлежащие соответствию стандартам надлежащей практики, описаны в таблице 1.

Таблица 1 – Нормативные ссылки к этапам производства препаратов растительного происхождения

№	Наименование процесса	Нормативная база
1	2	3

Продолжение таблицы 1

1	2	3
1	Идентификация/аутентификация культивируемых/дикорастущих лекарственных растений	[60, 61]
2	Выбор материалов для культивирования	[60, 61]
3	Культивирование	[60, 61]
4	Сбор урожая растительного материала, транспортировка и хранение	[60-62]
5	Первичная обработка растительного сырья (мойка, сушка, резка, дистилляция и т.д.)	[60, 61]
6	Получение экстракта, фракционирование, очистка, концентрирование или ферментация	[53, 63]
7	Переработка в лекарственную форму	[63–66]
8	Контроль качества	[63, 67, 68]
9	Стабильность	[69]
10	Упаковка и маркировка	[63]

Как было отмечено, современная концепция производства препаратов по требованиям GMP смещает акцент с контроля качества готового продукта на обеспечение качества всего процесса. Правила надлежащего производства и контроля качества распространяются на все этапы жизненного цикла продукции: переносу технологии, промышленному производству, и даже прекращению производства лекарственных средств [70].

Надлежащий уровень проведения каждого из вышеперечисленных этапов производства лекарственных средств растительного происхождения, гарантирует безопасность, надежность и стабильность конечного продукта. Система контроля качества включает подразделы: аналитические методы, контроль поступающих материалов на склад, контроль критических точек производственного процесса; контроль поставщиков. Опорной документацией для выполнения этих задач являются внутрипроизводственные спецификации, производственные рецептуры и технологические инструкции, инструкции по контролю качества и отбору проб, инструкции по упаковке, записи по производству серии и т.д. Критические стадии производственного процесса и существенные изменения процесса проходят валидацию [70].

Производитель должен соблюдать требования к используемым помещениям (зоны хранения, производственные площадки) и оборудованию (например, совместимость фильтрующих материалов с экстрактами растений). На каждом этапе производственного процесса необходимо соблюдать высокую степень чистоты и гигиены. Требования по гигиене выдвигают к персоналу, зонам хранения, оборудованию, производственным материалам и упаковке. Особенностью лекарственного растительного сырья является изначальная микробная загрязненность, и работа с ним сопровождается опасностью загрязнения и запыления [71]. Операции уборки, взвешивания, отбора проб, смешивания и обработки сырья должны исключать перекрестной контаминации, что достигается путем грамотного проектирования помещений.

Культивирование/сбор качественного растительного материала первый шаг на пути к качеству фитопрепаратов. Культивирование и селекционные исследования в основном сосредоточены на оптимизации получения активных компонентов и снижении возможных загрязнений, а также на улучшении условий уборки и сушки. Рекомендации одного из основных руководств GACP по данному этапу устанавливают, например, строгие сезонные периоды и области сбора лекарственного растительного сырья, предупреждают чрезмерный и неконтролируемый сбор, чрезмерную эксплуатацию ресурсов [60].

Выбор соответствующих способов первичной обработки зависит от конкретного вида сырья. Процессы первичной обработки проводят в соответствии с национальными и/или региональными стандартами качества, регулятивными правилами и нормами. На территории РК для данной цели действуют рекомендации Решения Совета ЕЭК от 26 января 2018 года № 15.

В зависимости от способа употребления и обработки, растительное сырье может использоваться в свежем и высушенном виде. Послеуборочная обработка сырья включает сортировку от грязи, посторонних примесей, остаточных нелекарственных или дефектных частей растения согласно рекомендациям для конкретного вида растения.

После этапа сортировки следует первичная обработка растительного материала, включающая мойку, вымачивание, первичную резку, вызревание, ферментацию, бланширование, кипячение, обработку паром, обжиг, фумигацию, облучение и т.д. Специальная обработка является профилактикой образования плесени и предотвращения вреда, причиняемого другими микроорганизмами и насекомыми, позволяет повысить чистоту используемых частей растений, уменьшить время последующей сушки, обезвредить токсические компоненты и усилить терапевтическую эффективность [60].

Растительные материалы, полученные из одних и тех же видов, но обработанные разными методами, могут демонстрировать значительные различия в качестве и терапевтических свойствах из-за влияния процесса обработки на химический состав [52]. Поэтому так важен спланированный и регламентированный подход к процессу подготовки сырья с самых первых стадий. Методы, установленные к применению для конкретного вида растения, валидируются и включаются в СОПы. Персоналом регистрируются все процессы и операции по производству лекарственного сырья растительного происхождения, а также даты их осуществления [52]. Соблюдение СОПов необходимо для обеспечения стабильности свойств материала от партии к партии.

Некоторые процессы первичной обработки направлены на целевое изменение химического состава растительного материала. В процессе дополнительной выдержки сырья (применяется термин «старение» в руководстве ВОЗ) на солнце или в тени испаряется избыточное количество воды и проходят различные ферментативные реакции. Например, в корнях *Frangula purshiana Cooper* при «старении» в течение не менее одного года происходит

окисление восстановленной формы гликозидов эмодина в мономерные гликозиды эмодина, которые являются более мягким слабительным с менее раздражающим действием. Аналогичным процессом является ферментация, которая заключается в хранении растительного сырья при температуре 45–65 °C в условиях высокой влажности в течение длительного периода, сроком в зависимости от вида растения [60]. При этом также происходят процессы изменения состава метаболитов за счет протекающих реакций.

Некоторые растительные материалы могут подвергаться процессу пропаривания или бланширования, при котором их на короткое время помещают в кипящую воду без полной варки. Таким способом возможно не только увеличение срока хранения, предотвращение заражения плесенью или насекомыми, упрощение сушки, но и также изменение терапевтической активности. В случае корней женьшеня (*Panax ginseng C.A. Mey*.) различные процедуры первичной обработки приводят к получению нескольких продуктов переработки. Белый женьшень – это травяной материал, высушенный на солнце или при нагревании, в то время как красный женьшень готовится с помощью ряда этапов пропаривания и варки. Эти два типа продуктов из женьшеня имеют различное терапевтическое применение в некоторых контекстах традиционной медицины, красный женьшень более эффективен, чем белый женьшень, благодаря своему согревающему или тонизирующему действию [60].

Если сырье используется в высушенном виде, то после сортировки и мойки его подвергают сушке одним из нижеперечисленных методов:

• Естественная сушка на открытом воздухе. Рекомендацией руководства GACP является избегание попадания прямых солнечных лучей, которые могут иметь неблагоприятные последствия на химический состав растения.

• Сушка горячим воздухом. Рабочая температура зависит от природы активных компонентов и может составлять от 40°C для эфирных масел до 100°C для гликозидсодержащих материалов.

• Микроволновая сушка часто используется в сочетании с сушкой горячим воздухом и является благоприятной для уменьшения микробного загрязнения.

• Лиофильная сушка – сублимационная

• Инфракрасная сушка

Выбор метода сушки обусловлен биологическими и морфологическими характеристиками растений, зависит от целевой композиции биоактивных веществ и влияет на выход экстракта [72]. Конечное содержание влаги в высушенном растительном сырье варьируется в зависимости от структуры ткани, но должно быть ниже 12 % [52]. Эффективный процесс сушки охватывает четыре ключевых аспекта: контроль температуры, уровня влажности, потока воздуха и его чистоты. Во избежание микробиологического и грибкового роста на растительном сырье, разложения активных химических компонентов необходимо контролировать критические параметры сушки – влажность и температуру. Например, сушка в тени предпочтительнее для сохранения или минимальной потери цвета листьев и цветов; более низкие температуры нужно использовать с целью сохранения летучих веществ [60].

Следующей при необходимости является стадия измельчения высушенного материала с целью создания частиц одинакового размера, что позволяет добиться равномерного и максимального проникновения растворителя в растительный материал и увеличить скорость экстракции. Измельчение может быть выполнено с помощью различных дробилок и мельниц, обычно оснащенных магнитным сепаратором для сбора посторонних металлических частиц.

Последующий контроль качества обработанного растительного материала включает в себя детальную оценку всех ботанических и фитохимических аспектов растения и включает тесты на идентификацию и чистоту, а также методики количественного анализа [60].

Помимо обычных тестов на чистоту, включенных в монографии, растительные субстанции должны соответствовать дополнительным требованиям чистоты в связи с их природным происхождением. К примеру, исходное сырье должно строго контролироваться на остатки пестицидов и тяжелых металлов, загрязнений, токсинов, микробов и т.д. [52].

Идентификация и анализ растительного материала могут быть аналогичны таковым для соответствующего растительного препарата и состоять из «отпечатка пальца» или количественного определения характерных для данного растения групп БАВ. Макроскопическую и микроскопическую идентификацию проводят согласно требованиям монографий на данное растительное сырье. Если такая монография недоступна, должна быть предоставлена и оформлена исчерпывающая спецификация на растительную субстанцию [73]. Распространённым подходом для оценки подлинности растения является обнаружение ключевых активных или аналитических биомаркеров путем прямого сравнения с эталонными химическими соединениями или с помощью методов разделения ГХ- или ВЭЖХ-МС или МС/МС со ссылкой на публичные или коммерческие библиотеки соединений [74]. Интересным является подход аналитического профилирования, направленный на определение эталонного хроматографического, спектроскопического или хромато-спектрометрического профиля или «отпечатка пальца» для данного растения или экстракта. Химические отпечатки пальцев также можно использовать для оценки качества сырья, экстрактов и готовой продукции.

Растительное сырье, прошедшее должную переработку согласно вышеприведенным операциям и соответствующее требованиям по качеству, может быть использовано в качестве исходного материала для производства растительных лекарственных средств. Технологический процесс переработки сырья должен также осуществляться в соответствии с технологическим регламентом и нормативам, и систематически пересматриваться с учетом накопленного опыта для подтверждения их способности обеспечивать постоянное производство требуемого качества [52].

Экстракция – это одна из самых распространённых процедур технологической обработки растительного материала и эффективный способ извлечения из него основных групп биологически активных веществ в виде

комплекса. Описано множество *видов экстракции, эффективных для тех или иных видов растений в зависимости от природы извлекаемых компонентов и цели экстракции (*мацерация, перколяция, сверхкритическая-, флюидная-, микроволновая- и УЗ-экстракция).

Цель стандартизированных процедур экстракции состоит в том, чтобы получить терапевтически желаемую часть и удалить инертный балластный материал путем обработки селективным растворителем [75]. Экстракт, полученный таким образом, уже может быть использован в качестве лекарственного средства в форме настоек, *жидких, густых и сухих экстрактов (субстанций)*, или дополнительно обработан для включения в любую дозированную форму, такую как таблетки, капсулы или МЛФ. Существует также практика выделения индивидуальных химических веществ, которые становятся активными терапевтическими ингредиентами, например, как в качестве действующего вещества в составе МЛФ.

Инструкции по производству растительных препаратов должны содержать детализированную информацию о применяемом растворителе и процессе его приготовления, продолжительности и температурных условиях экстракции, а также сведения о любых этапах концентрирования и используемых методах. Вспомогательные вещества, добавляемые в процессе производства, также описывают и проверяют на соответствие фармакопейным статьям (монографиям) ведущих Фармакопей мира.

Если конечным продуктом экстракции является фармацевтическая субстанция, то на нее составляется полная спецификация, содержащая подробную характеристику продукта и сведения об испытаниях на подлинность и чистоту. Тесты по спецификации часто включают микробиологическую чистоту, содержание микотоксинов и радионуклидов, тесты на остаточное содержание пестицидов, фумигантов, токсичных элементов, остаточные уровни растворителей, количественное определение компонентов с установленной терапевтической активностью или маркеров [52].

В рамках количественного анализа различают три категории растительных субстанций: (1) стандартизированные субстанции, содержащие компоненты с доказанной терапевтической активностью, (2) квантифицированные субстанции с известными активными компонентами (или активными маркерами), и (3) растительные субстанции, у которых активные компоненты или маркеры с известной терапевтической активностью не определены. Маркеры, в свою очередь, делятся на два типа: «активные» — это компоненты или группы компонентов, которые обычно оказывают терапевтическое воздействие, и «аналитические» — компоненты, используемые исключительно в аналитических целях [52].

Важной проблемой стандартизации растительных субстанций является ограничения в использовании маркеров, поскольку эталонные стандарты доступны не для всех трав/растений, используемых в лекарственных препаратах. Также широко признано, что ключевые химические маркеры

могут не быть (единственными) активными метаболитами в экстракте [76]. Кроме того, для конкретного вида растения монографии могут различаться в разных изданиях, так как существуют различные стандарты стран в отношении одного препарата [77]. И как было отмечено ранее, большая часть аналитических работ, используемых для обеспечения качества и, следовательно, безопасности и эффективности растительного сырья и субстанций на их основе, сочетает в себе многофакторный поход и применение комплекса ботанических и физико-химических методов. Одним из решений в вопросе стабильного качества фитопрепаратов и важным инструментом его обеспечения является проведение валидации технологического процесса, позволяющее глубже понимать и управлять процессами производства, уменьшить риски некачественного продукта и сократить риски возникновения несоответствий.

1.3. Валидация технологического процесса производства препаратов растительного происхождения

Валидация – это один из основополагающих инструментов GMP для обеспечения качества, эффективности и безопасности лекарственных препаратов. Валидация технологического процесса представлена отдельным приложением GMP и включает в себя оценку рисков по качеству и управление изменениями в процессах [70]. Как было сказано выше, валидация является надежным дополнением к вышеперечисленным процедурам производства фитопрепаратов, т.е. каждая из технологических операций, перечисленных в таблице 1, сопровождается валидацией процессов и валидацией аналитических методик контроля качества, характеризующих степень приемлемости проведения данного процесса.

Валидация может служить системой контроля и оценки влияния любых изменений на качество растительных лекарственных средств, особенно на содержание активных ингредиентов. При разработке фитопрепаратов воспроизводимость производственного процесса является одним из главных средств достижения постоянства качества, эффективности и безопасности между партиями. Валидация на фармацевтическом производстве представляет собой комплекс процедур, схематично представленных на рисунке 4.

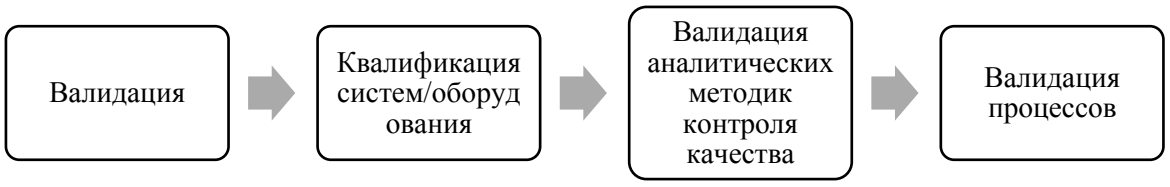


Рисунок 4 – Компоненты валидации фармацевтического производства

Первым шагом валидации является «квалификация оборудования/систем», т.е. сначала необходимо убедиться в том, что оборудование, инженерные системы, комплекс помещений, используемые в производстве, не влияют на качество продукта [10]. Например, при производстве растительного экстракта

контролируются такие параметры, как скорость и время смешивания в реакторе, частота колебаний, скорость центрифугирования, размер пор фильтров, а также объем заполнения флаконов. Все эти параметры документируются и анализируются с помощью контрольных карт [78] и других методов, в зависимости от требований конкретного производственного процесса.

Также перед началом валидации процесса проводится валидация методов контроля качества/аналитических методик, надежно определяющих фитохимический состав, которые, как было сказано выше, служат инструментом проверки валидности технологических операций. Очевидно, что этот инструмент проверки должен быть надежен и стабилен, поэтому оценка аналитических методик является неотъемлемой частью валидации. Разработка и валидация методов контроля качества необходимы для обеспечения одинаковой эффективности от партии к партии, а также для определения совместимости состава растительного экстракта с другими активными компонентами и вспомогательными веществами [74]. Валидации подлежат все химические, биологические и фармакологические методы, используемые в производстве лекарственного препарата, в соответствии с последними официальными рекомендациями и последними фармакопеями [10].

В процессе разработки фитопрепаратов ключевым моментом становится разработка и валидация аутентичных аналитических методов, надежно определяющих фитохимический состав для проверки надежности производственного процесса. Определение биологически активных маркерных соединений как критического показателя качества на этапе проектирования и разработки технологии производства является ключевым способом стандартизации технологии. Это обеспечивает фитоэквивалентность при коммерческом производстве, а также постоянство качества и эффективности от партии к партии [74].

Исходя из этого, многие работы по валидации технологии производства фитопрепаратов начинаются с разработки и валидации методов контроля активных компонентов. Валидация аналитических методик проводится в соответствие с рекомендациями действующей Фармакопеи и/или новейшими рекомендациями (например, AOAC, FDA, EMA, ВОЗ и т. д.) с оценкой параметров: специфичность/селективность, линейность, точность, повторяемость, промежуточная прецизионность, предел обнаружения, предел количественного определения и надежность [79]. Стабильность метаболитов в выбранных растворителях во время анализа также должна быть оценена; новый растворитель выбирается, если стабильность выходит за пределы критериев приемлемости (обычно ± 2%). Если экстракты или выделенное соединение нестабильны в течение необходимого времени анализа, следует выбрать и оценить новый растворитель [79].

Процесс разработки и валидации методики можно проиллюстрировать с помощью схемы, представленной на рисунке 5. Во-первых, определяется четкая аналитическая цель - вполне очевидный, но важный предварительный шаг, за которым следуют выбор/оптимизация или разработка метода анализа,

предварительная его проверка на стабильность исследуемых компонентов и в заключении составляется протокол вадидации, т.е. ключевого инструмента для структурирования, регулирования и документирования процесса валидации методики [80].

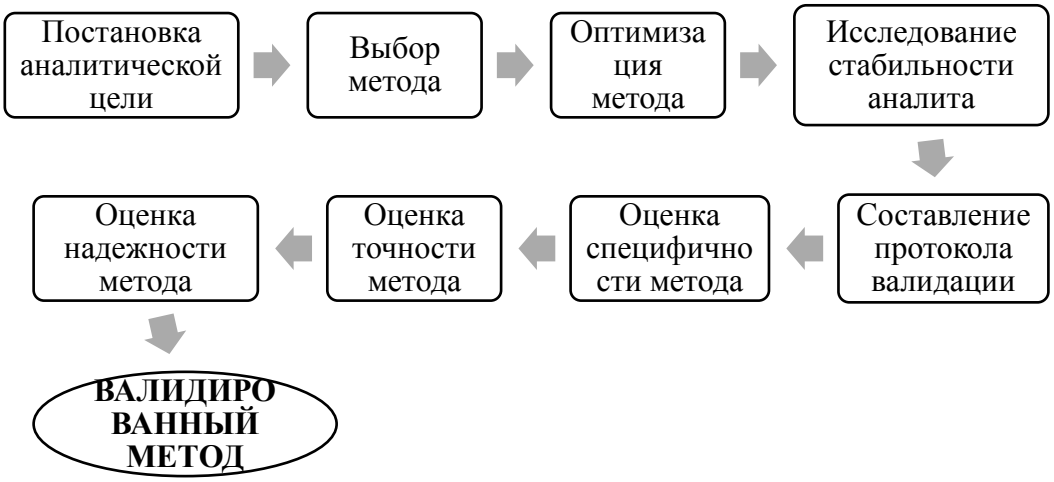


Рисунок 5 – Этапы валидации аналитической методики

После проведения всех экспериментов, описанных в протоколе валидации, полученные данные оцениваются на выше- и нижеперечисленные критерии приемлемости. Если метод соответствует всем критериям приемлемости, он считается валидным. Традиционно в протокол валидации включают следующие компоненты отчета:

1. Цель аналитического метода
2. Общие критерии приемлемости
3. Персонал (руководитель исследования, аналитики первичной и вторичной лаборатории)
4. Подробное описание метода
5. Валидация:

5.1 Материалы (химикаты, растворители, эталоны, инструменты, пластины и т. д.)

5.2 Стабильность

5.3 Специфичность

5.4 Точность

5.4.1 Повторяемость

5.4.2 Промежуточная точность

5.4.3 Воспроизводимость

5.4.4 Надежность

6. Результаты, выводы

После документального подтверждения квалификации систем/оборудования и валидации аналитических методов контроля возможно проведение валидации технологических процессов. Валидацию традиционно проводят на минимум трех идущих подряд сериях (для установки вариации

процесса, возможных тенденций и обеспечения необходимого количества данных для оценки процесса) такого же размера, как и серии, которые планируются для промышленного производства и в условиях наихудшего случая [70]. Однородность внутри партии и стабильность между партиями – цели валидации технологических процессов, устанавливаемые статистическим регулированием процессов [81].

При валидации технологии получения растительных экстрактов проводится оценка рисков всех критических стадий. Удовлетворительным результатом валидности процесса может быть статистическое постоянство показателей качества и контролируемость процесса во времени [77, 83]. В план валидации включается каждый этап технологии с указанием его параметров, методов контроля, регламентируемых норм и методов оценки результатов. Например, первым шагом валидации получения экстракта может быть валидация процессов подготовки сырья и экстрагента, включающая контроль качества исходного сырья согласно НТД, контроль концентрации экстрагента, массы сырья, скорости и времени смешивания экстрагента с фиксацией количества отбора проб в одной серии для каждого из перечисленных фармако-технологических параметров процесса [77, 82, 83].

Аналогично, валидации подвергаются и последующие этапы технологического процесса, такие как получение экстракта из лекарственного растительного сырья (ЛРС), предварительная очистка, фильтрация, подготовка упаковки, фасовка, маркировка и упаковка готовой продукции, а также другие стадии, специфичные для конкретного растения. Процесс повторяется на трех партиях для статистической оценки технологии, например, построением контрольных карт Шухарта, расчётом индексов воспроизводимости и индексов возможностей процесса [77, 82, 83].

На основании результатов валидации утверждается опытно-промышленный регламент производства, следуя которому возможен выпуск коммерческих серий, соответствующих качеству валидационных серий.

Приведенная в главе информация подчеркивает важность валидации в производстве препаратов растительного происхождения. Сложности их стандартизации требуют особо продуманного планирования, четкого выполнения и подробного документирования, которые могут быть достигнуты применением принципов валидации. Разработанные стандарты и накопленный опыт в данном вопросе показывают, что валидация разрешает вероятные риски и трудности производства, преодолевая их непрерывным контролем каждого технологического этапа, систем, оборудования и методик и систематизацией полученных данных, что в свою очередь гарантирует эффективность, надежность и безопасность продукции.

1.4 Биологическая доступность лекарственных растительных субстанций в мягких лекарственных формах

Активный фармацевтический ингредиент согласно определению ICH Q7 «Руководству по надлежащей производственной практике активных

фармацевтических ингредиентов» – это вещество или смесь веществ, используемые в производстве лекарственного препарата, которые являются его активным ингредиентом и обеспечивают фармакологическую активность или другой прямой эффект в диагностике, лечении, облегчении или профилактике заболеваний или для воздействия на структуры и функции организма [46] . АФИ могут быть синтетического, растительного, животного происхождения или получены путем биотехнологий.

АФИ для производства препаратов растительного происхождения могут быть необработанные растения; растительный материал (измельченное растительное сырье в высушенном или сыром виде) и растительные субстанции, полученные путем обработки растительного материала методами экстракции, дистилляции, отжима, фракционирования, очистки, концентрирования или ферментации (настойки, экстракты, эфирные масла, сцеженные соки и обработанные экссудаты) [83]. Растительные субстанции разделяют на растительные экстракты – жидкие (*extracta liquida, tincturae*), густые (*extracta spissa*) и сухие (*extracta sicca*) [83].

Использование препаратов на основе АФИ растительного происхождения в медицинской практике приветствуется системой здравоохранения большинства государств в мире. Согласно докладу ВОЗ за 2019 г в 109 государствах-членов ВОЗ существует система регистрации лекарственных растительных препаратов, а 34 члена включили их в национальный список основных лекарственных средств (NEML: national essential medicines list) [84], и эти данные показывают рост в сравнение с предыдущими годами.

Это обусловлено нарастающим количеством исследований химического состава растительных экстрактов, совершенствованием техник выделения вторичных метаболитов, установлением новых биологических активностей и эффективности фитопрепаратов. Также растет число научных публикаций, описывающих интересы потребителей и пациентов, посвященных клиническим испытаниям и конкретным аспектам терапевтического использования лекарственных растений и препаратов на их основе [85]. На сегодняшний день от 35 000 до 70 000 видов растений прошли скрининг на предмет их использования в лечебных целях [86]. Популярными показаниями к применению фитотерапии считаются заболевания дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной системы, болезней суставов, а также в качестве седативных средств [85].

Благодаря широкому спектру терапевтической активности растительные субстанции ценятся как АФИ и в МЛФ. Фармакологическая активность фитопрепаратов обуславливается разнообразием вторичных метаболитов в экстрактах и их уникальными комбинациями в каждом из растений. В большинстве случаев почти невозможно определить конкретный класс БАВ, который отвечает за биологическую активность, что объясняется синергическим взаимодействием присутствующих в нем компонентов [87].

Для лечения кожных заболеваний используется около трети всех традиционных лекарств по сравнению с 1-3 % современных лекарств. АФИ из

лекарственной формы-носителя поступает в область локального действия через кожную циркуляцию по всему телу и далее к более глубоким слоям -тканям. Кожа избирательно поглощает компоненты лекарственных средств, которые поступает в кровоток через волосяные фолликулы, потовые железы и поры, имеющиеся на ней, что открывает широкие возможности для доставки лекарств [88]. Другими преимуществами накожного введения лекарственных веществ: простота применения и лучшее соблюдение пациентами схемы приема, устойчивая и контролируемая доставка АФИ, избежание нежелательных побочных эффектов за счет локальной концентрации АФИ, предотвращение метаболизма первого прохождения через печень и проблем с желудочно-кишечным трактом [89].

Обзор литературы, опубликованной за последние пять лет, указывает на ряд растительных экстрактов, демонстрирующих антибактериальную, противогрибковую, противовирусную и др. активности в отношении кожных заболеваний [90]. Кроме того, БАВ, содержащиеся в растительных экстрактах, могут влиять на кожные иммунологические процессы, повышая иммунный ответ, и оказывая противовоспалительное действие [90].

Имеются положительные результаты тестирования растительных гелей при атопическом дерматите [91, 92], псориазе [93], витилиго [94, 95], акне [96], артрите [97, 98] и остеоартрите [99], герпесе [100], ушном отеке [101], диабетических язвах конечностей [102], ожогах [103] и т.д. Используемые в данных исследованиях экстракты обладали антимикробными и ранозаживляющими [100, 103], антиоксидантными [96, 100, 103], противовоспалительными [96, 97, 100, 101], антидиабетическими [100], гепатопротекторными и жаропонижающими [97] свойствами.

Как было сказано ранее, растительные экстракты оказывают комплексное действие за счет широкого спектра биологической активности и представляются перспективными агентами в терапии заболеваний воспалительного характера. Химически сложный и многообразный состав растительных препаратов способен оказывать действие на множество потенциальных биологических мишеней, что представляется интересным для лечения сложных хронических заболеваний, где требуется охват нескольких терапевтических целей. И напротив, применение традиционной лекарственной терапии при хронических воспалениях часто приводит к полипрагмазии [104].

Воспалительные заболевания кожи и прилежащих к ней тканей, таких как мышцы, кости и внутренние органы, провоцируются патогенами, вредными механическими и химическими агентами, а также аутоиммунными реакциями, и представляют собой сложный физиологический процесс, в ходе которого организм восстанавливает поврежденные ткани и защищает себя от вредных раздражителей [105]. Хронические воспалительные заболевания возникают в связи с избыточной продукцией противовоспалительных медиаторов, таких как IL-1β, IL-6, TNF-α и PGE2, инициирующих каскад воспалительных реакций.

В основе классической противовоспалительной терапии лежит применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПП), ингибирующих

воспалительные ферменты (циклооксигеназа/простагландин-эндопероксидсинтазы), и соответственно подавляющих выработку простагландинов, ответственных за воспалительный процесс [106]. Еще одна группа распространённых препаратов - глюкокортикостероиды, обладающие иммунодепрессивными свойствами за счет трансактивации противовоспалительных сигнальных путей и подавления воспалительных (MAPK, NF-kB) [107]. Также набирают популярность разработки более специфичных таргетных препаратов таких как, агонисты противовоспалительных медиаторов, как IL-4-10 [108], анти-TNF агенты [109], анти-IL-5 и анти-IL-13 препараты [110], ингибиторы инфламмасомы NLRP3 [111,112], регуляторы путей передачи NF-kB [113] и др. Однако для пациентов применение вышеописанных препаратов не остается без различных побочных эффектов, которые описаны для каждой из названных групп лекарств.

Аналогично действию НПП, растительные препараты модулируют иммунный ответ посредством взаимодействия с различными компонентами иммунных клеток и, воздействуя на внутриклеточные сигнальные пути [114]. Во многих экспериментальных работах и обзорах описана эффективность терапевтического действия природных компонентов при воспалениях различных органов и их иммуномодулирующие свойства, а также механизм их молекулярного действия на биологические мишени [114,115]. Доказано, что среди БАВ противовоспалительным действием обладают: органические кислоты (галловая, кофейная кислоты) [116,117], лактоны [43], танины и терпены [114,115], флавоноиды (кемпферол, кверцетин, лютеолин, генистеин, куркумин, эпигаллокатехин галлат и др.) [114,115,118], алкалоиды [114,115,118,119], фитостеролы [114,115], полисахариды [114], лактоны [120].

Противовоспалительное действие БАВ *in vitro* или на клеточных моделях проявляется в ингибировании синтеза и активности различных провоспалительных медиаторов, таких как эйкозаноиды, цитокины, молекулы адгезии и С-реактивный белок, и ингибировании факторов транскрипции (NF-κB, MAPK, ERK и Akt и др.) [121]. Кроме того, при воспалении организм находится в состоянии сильного стресса, что приводит к увеличению производства активных форм кислорода (АФК) и азота (гидроксильных радикалов, супероксидных анион-радикалов, оксида азота и перекиси водорода и др.). А наличие антиоксидантной активности у многих БАВ, таких как полифенолы, флавоноиды, каротиноиды и др. позволяет ингибировать производство АФК и благотворно влияет на разрешение воспалительного процесса [122].

Антиоксидантная активность БАВ оказывает вспомогательное положительное действие при кожных заболеваниях, вызванных воздействием вредных факторов окружающей среды, в том числе ультрафиолетового излучения (УФ) и свободных радикалов. Клетки кожи постоянно подвергаются вредному воздействию свободных радикалов, которые генерируются как эндогенными, так и экзогенными факторами. Свободные радикалы могут повреждать кожу, разрушая липидные компоненты кожного сала и керамиды

межклеточного цемента рогового слоя, а также путем окисления полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран [103,123]. Окислительный стресс усугубляет течение многих дерматологических заболеваний, таких как псориаз, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, вульгарные угри, витилиго, красный плоский лишай, очаговая алопеция и меланома [124,125]. К примеру, в обзоре [126] сообщается о потенциальных результатах скрининга фитокомпонентов в лечении витилиго благодаря их антиоксидантной активности, которая способствует увеличению экспрессии меланина, останавливая депигментацию и выполняя защитную роль в меланоцитах.

Иммуномодулирующая активность фитопрепаратов также является востребованной и потенциальной мерой в терапии воспалительных заболеваний. БАВ способны модулировать, ингибировать и стимулировать любые компоненты адаптивного или врожденного иммунитета, что является перспективным в разработке иммуномодулирующих агентов местного вспомогательного действия в курсе химиотерапии и лечении рака, аутоиммунных и хронических заболеваний, аллергий, инфекций [127]. Например, местное применение мази на основе эфирного масла из *Cymbopogon citratus* способствовало ускорению процесса заживления ран за счет регулирования экспрессии провоспалительных цитокинов, факторов роста и антиоксидантных свойств [128]. Клинический скрининг мази, содержащей экстракт цветков ромашки, при лечении больных с воспалительными дерматозами кистей, предплечий и голеней, показал положительный терапевтический эффект сравнимый с активностью 0,25% гидрокортизона и других НПП [129].

Мощное противовоспалительное, иммуномодулирующее и антиоксидантное действие природных полифенолов признано особенно перспективным для применения в топических лекарственных препаратах для лечения различных кожных заболеваний. Термин «растительный полифенол» охватывает соединения многих структурных типов, такие как дубильные вещества, флавоноиды и производные кофейной кислоты, которые широко распространены в растениях [130].

Иммуномодулирующая активность полифенолов специфична, и зависит от типов иммунных клеток, а также от структуры самого полифенола [131]. Полифенолы могут блокировать высвобождение TNF-α, модулируя сигнальные путь MAPK на разных уровнях [132]. Например, лютеолин снижает высвобождение TNFα LPS-активированными макрофагами мыш, блокирует фосфорилирование ERK1/2 и p38 [132], а EGCG уменьшает воспаление в различных типах клеток, например, снижая экспрессию IL-12 в LPS-активированных мышиных макрофагах, ингибируя фосфорилирование p38 MAPK [107, 117].

Антиоксидантная и некоторые другие активности низкомолекулярных полифенолов обычно ниже, чем у более крупных молекул танинов, за некоторыми исключениями. Сравнение действия полифенолов с одинаковой

молекулярной массой показывает, что присутствие определенных функциональных групп в молекуле индуцирует более высокие уровни активности, чем у других функциональных групп, что может быть связано со стабильностью генерируемых свободных радикалов [133].

В последнее время также наблюдается интерес к полисахаридам растительного происхождения как фитокомпонентам с противовоспалительной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью [114]. Механизмом иммуномодулирующей активности полисахаридов является их участие в модуляции врожденного иммунитета, особенно функции макрофагов. Эти соединения обладают способностью подавлять уровни цитокинов, включая TNF-α, IL-6, и индуцировать цитокины, включая IL-2, IL-4 и IL-10. Кроме того, эти молекулы способны регулировать процесс пролиферации макрофагов [134].

Более того, в МЛФ данный класс соединений может выступать вспомогательным компонентом (загустителями, гелеобразователем, стабилизаторами, эмульгаторами) и наравне с этим оказывать терапевтическую активность [135]. Составы с применением полисахаридов в качестве гелеобразователей при нанесении на кожу могут обеспечить замедленное высвобождение лекарственных средств, улучшая терапевтический эффект [37]. Обеспечивая контролируемое высвобождение в системах доставки, природные полисахариды к тому же являются биоразлагаемыми, биосовместимыми, легкодоступными, недорогими [136]. Например, кроме того, что хитозан является эффективным анионным гелеобразователем, он обладает кровоостанавливающим и антибактериальным действием, что позволяет использовать его гидрогели как перевязочные материалы [137].

Особым предметом изучения является взаимосвязь биоактивности полисахарида и его химической структуры. На активность полисахаридов влияют их химический состав, молекулярная масса, степень разветвления, тип гликозидной связи и конформация [138]. Например, у фракции полисахаридов с высокой молекулярной массой, выделенных из *Sargassum thunbergii*, противоопухолевая активность проявлена выше в сравнение с низкомолекулярными полисахаридами [139]. В другом исследовании, напротив, сульфатированный полисахарид фукоидан, экстрагированный из бурых морских водорослей, с низкой молекулярной массой обладал большей активностью по сравнению с высокомолекулярным аналогом, а именно эффективнее индуцировал высвобождение NO, секрецию TNF-α, IL-6 и экспрессию iNOS, а также стимулировал сигнальные пути, таких как NF-κB и MAPK [140]. Как лекарственная форма, гидрогель на основе полисахарида из *Laminaria japonica* (LJP) с низкой молекулярной массой, проявлял лучший противовоспалительный эффект, подавляя экспрессию генов TNF-α, IL-1β и IL-6 в клетках [137]. А на этапе пролиферации клеток лучший лечебный эффект оказывали, наоборот, гидрогели на основе LJP с более высокой молекулярной массой [137].

Shi и др. в своем исследовании показали, что на повышение активности влияло меньшее содержание глюкозы и более высокое содержание галактозы в полисахаридной цепи [141]. В других работах, было показано, что содержание

маннозы и рамнозы положительно влияло на противоопухолевую и антиоксидантную активность полисахаридов [142]. В целом принято, что более сложный моносахаридный состав повышает биологическую активность полисахарида [143].

Также признано, β-конфигурация полисахаридов проявляет более высокую активность, тогда как большинство полисахаридов с α-конфигурацией не обладают биологической активностью [142]. Кроме этого, более сложная степень разветвления, как правило, обеспечивает более высокую биологическую активность. К примеру, авторы [144] полагают, что иммуномодулирующая активность полисахарида из *Cordyceps sinensis* объясняется его сверхразветвленной структурой. С другой стороны, обнаружили, что полисахарид женьшеня с небольшой степенью разветвления оказался более эффективным иммуномодулятором, лучше стимулируя пролиферацию лимфоцитов [145].

Разработки гидрогелей растительных полисахаридов находят широкий интерес среди исследователей ввиду широкого спектра их биологической активности и возможностей модификации их технологических свойств. Среди множества исследованных МЛФ полисахаридов, можно перечислить, гели на основе лигнина, обладающие антиоксидантными, антимикробными, солнцезащитными свойствами [146]. Благодаря ценным биологическим лигнин комбинировали с другими полимерами (например, хитозаном, поливиниловым спиртом (ПВС), альгинатом, целлюлозой) для получения ранозаживляющих гидрогелей [147]. Гели на основе камеди, еще один из примеров ценного материала, используемого для лечения поражений кожи. Камедь кешью представляет собой растительный разветвленный гетерополисахарид, состоящий из галактозы, глюкозы, глюкуроновой кислоты, арабинозы, рамнозы и маннозы [146]. Данный полисахарид исследован на способность модулировать воспалительный процесс, что способствует лучшему сокращению раны, увеличению выработки коллагена, подавлению некроза и стимуляции ранней эпителизацию у лабораторных животных [148].

Представленные в данной главе исследования показывают перспективы разработок гелей для наружного применения на основе растительных фитокомпонентов и экстрактов, которые обладают комплексным терапевтическим действием, низкой токсичностью и хорошей усвояемостью. Как правило, если экстракт проявляет определенный вид биологической активности, то при оптимально подобранной лекарственной форме-носителе, конечный препарат также проявляет данную терапевтическую активность. Как показал анализ литературы, обширный интерес исследователей проявлен к разработке топических средств с противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью, так как разрешение и подавление острого и хронического воспаления в начальных фазах является определяющим в профилактике более серьезных нарушений и осложнений, таких как аутоиммунные и онкологические заболевания. Для этих фармакологических целей полифенолы и полисахариды зарекомендовали себя как сильные

терапевтические агенты, ввиду множества доказательств их способности модулировать воспалительные реакции организма, подавляя или стимулируя компоненты иммунной защиты. В связи с этим поиск и изучение препаратов растительного происхождения, как источника новых безопасных молекул или как альтернативная вспомогательная терапия при воспалительных заболеваниях остается востребованной и интересной.

1.5. Растения вида *L. gmelinii,* как источник биологически активных веществ и их биологическая активность

Limonium Mill – богатый род многолетних трав и кустарников, насчитывающий на данный момент около 600 видов [149]. Способность данных растений к смешанному размножению (половое, вегетативное, апомиксис) с встречающимися случаями гибридизации и полиплоидии обуславливают их широкое космополитичное распространение и биоразнообразие [150]. *Limonium Mill* восприимчив к экстремальным условиям произрастания, таким как засушливые и засоленные почвы, скалистые местности, пустыни, степи и т.д. Это возможно благодаря таким адаптивным механизмам растения, как наличие эпидермальных солевых желез на листьях и стеблях [151], участвующих в выведении токсичных ионов, а также в поддержании ионного баланса и осмотического давления за счет биосинтеза осмолитов (аминокислот и их производных, таких как пролин, метилированный пролин и родственные соединения; соединения четвертичного аммония, такие как бетаин глицин, β-аланин-бетаин; растворимых сахаров; и полиолов) [152]. Устойчивость рода *Limonium Mill* к абиотическим факторам представляет особый интерес в культивировании практически значимых видов, в частности растений, для декоративного, медицинского, пищевого применения, для деконтаминации почв, зараженных тяжелыми металлами и др.

Широкий спектр доказанной терапевтической активности некоторых видов *Limonium Mill* служит темой многочисленных исследований химического состава их экстрактов и способов оптимального извлечения биологически активных веществ. Так, например *Limonium delicatulum* - галофит, растущий на солончаках Средиземноморского побережья, изучен на антиоксидантную и антимикробную активности [153], а также проявляет себя как ингибитор некоторых ферментов [154,155]. *Limonium densiflorum* еще один представитель галофитов, распространённый в средиземноморских солончаках, обладает антиоксидантной, противовоспалительной, антимикробной, противоопухолевой [156] и противовирусной активностями [157]. Метанольные экстракты североафриканского эндемика *Limonium spathulatum (Desf.) Kuntze* проявляют также антиоксидантную и противовоспалительную активности [158]. Семь антиоксидантов были идентифицированы и в *Limonium aureum* [159]. Антиоксидантная и противовоспалительная активность *in vitro* доказана для отваров и настоев цветков *Limonium algarvense* [160]. В исследовании [161] была доказана противоопухолевая и иммуномодулирующая активности полисахаридов *Limonium sinense* (Girard) Kuntze, полученных из корня

растения, а авторами [162] доказан гепатопротекторный эффект экстрактов из корней и листьев, в [163] продемонстрировано ингибирующее дейстие выделенных БАВ на репликацию вируса герпеса типа 1 (HSV-1). В работе [164] сообщается об ингибирующей активности водных экстрактов *Limonium brasiliense* в отношении ксантиноксидазы при лечении гиперурикемии, а также имеются данные об их антибактериальной активности против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [165] и антиоксидантной активностях [165]. *Limonium tetragonum*, а именно выделенные из его надземной части гликозиды мирицетина, проявили себя как наиболее эффективные гепатопротекторные агенты экстракта данного растения [166].

Наиболее изученными видами из рода *Limonium Mill,* произрастающими на территории Казахстана, являются *Limonium gmelinii (Willd.) Kuntze, Limonium myrianthum, Limonium leptophyllum, Limonium Caspium.* Изолированные соединения из экстракта *L. caspium* были положительно исследованы на предмет их антибактериальной, противогрибковой, противомалярийной и противолейшманиозной активности [167], а также подобные активности проявили вторичные метаболиты *Limonium myrianthum, Limonium leptophyllum и Limonium gmelinii* при соответствующем биоскрининге [168].

Доклинические испытания субстанции Лимонидин, выделяемой из корней растений вида *L. gmelinii* показали ее высокие антиоксидантные, гепатопротекторные, антимикробные, антимутагенные, противоопухолевые и антивирусные свойства [169]. На основе данной субстанции получены мазь и сироп, а из корней – настойка с одноименным названием «Лимонидин» [170], отличающиеся широтой терапевтического действия при отсутствии аллергизирующих и кумулятивных свойств и улучшающих иммунный статус организма.

Недавнее исследование также показало, что экстракт из корней *L. gmelinii* защищает нейроны, астроциты и церебральные эндотелиальные клетки от окислительных и воспалительных реакций *in vitro*, улучшает двигательные функции после ишемического инсульта *in vivo* [171].

Также имеются данные другой группы авторов об антидиабетической, цитотоксической, противовоспалительной активностях лигнанамидов, выделенных из этилацетатного экстракта из корней *L. gmelinii (Willd.) Kuntze* [172]. Кроме того, важно отметить, что корни *L. gmelinii* традиционно используются в народной медицине как вяжущее средство при острых заболеваниях желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей [172].

Данные в таблице 2 демонстрируют богатый химический состав растений вида *L. gmelinii*, включающий множество биологически активных веществ, в том числе, ранее неописанных соединений, среди которых разнообразные флавоноиды, флавоноидные гликозиды, полифенольные соединения и лигнанамиды.

Таблица 2 – Химический состав растений вида *L. gmelinii*

1	2	3	4
Соединение	Часть растения	Активность	Неописанные соединения ранее
Флавоноиды			
дигидромирицетин	Корни [173]	антиоксидантная [173]	
дигидросирингетин	Корни [173]	-	*Впервые выделен*
аромадденрен	Корни [173]	-	*Впервые выделен*
нарингенин	Корни [173]	-	*Впервые выделен*
Флавонолы			
кемпферол	Корни [173]		
мирицетин	Корни [173,174], НЧ [174,175]	антибактериальная [173], антиоксидантная [173], антилейшманиальная [176]	
3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлавон	Корни [174] НЧ [174]	-	*Впервые выделен*
Флаван-3-олы			
3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван	Корни [177]	-	*Впервые выделен*
2R, 3R, 4R-(-)-эпигаллокатехин-(4 β→8)-(-)-2R,3R,3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван	Корни [178]	-	*Впервые выделен*
(+)-галлокатехин	Корни [178]	-	
(-)-эпигаллокатехин	Корни [178]	-	
Фенолокислоты и их производные			
галловая кислота	Корни [173,174] НЧ [174]	-	
метилгаллат	Корни [173]	антиоксидантная [173]	*Впервые выделен*
ванилиновая кислота	Корни [173]	-	*Впервые выделен*
тирозол	Корни [173]	-	*Впервые выделен*
сиреневая кислота	Корни [176]	-	
эллаговая кислота	Корни [176]	-	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Гликозиды флавоноидов			
кверцитрин (3',4',5,7-тетрагидрокси-3-(α-L-рамнопираносилокси) флавон)	Корни [173,174] НЧ [176]	антибактериальная [173]	
рутин	Корни [174]	-	
(-)-эпигаллокатехин-3-О-галлат	Корни [178] НЧ [175]	-	
3-О-α-L-рамнопиранозид мирицетина	НЧ [175]	-	
3-О-α-D-галактопиранозид мирицетина	НЧ [175]	-	*Впервые выделен*
3,5,7,3',4',5'-гексагидрокси-3-О-альфа-D-галактопираносилфлавон (Гмелинозид I)	НЧ [176]	-	*Впервые выделен*
мирицетин-3-О-β-D-галактозид-6''-О-галлат	НЧ [176]	-	
мирицетин 3-О-β-D-(6″-галлоил)галактопиранозид	НЧ [174]	-	
7-О-α-L-рамнопиранозид	Корни [174]	-	
рутинозид	Корни [174]	-	
3-О-α- L-арабопиранозид	Корни [174]	-	
3-О-β-D-ксилозид	Корни [174]	-	
3-О-α-L-(2″-О архамнопиранозил)-рамнопиранозид	Корни [174]	-	
3-О-α-L-(2″-О-α-рамнопиранозил)рамнопиранозид	Корни [174]	-	
3-О-α-L-(2''-галлоил)-арабинопиранозид мирицетина	НЧ [174]	-	*Впервые выделен*
3-О-β-D-глюкопиранозид кампестерина	Корни [177]	-	*Впервые выделен*
эпигаллокатехин-(4β→8)-(-)-3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван	Корни [177]	-	*Впервые выделен*
(+)-галлокатехин-(4α→8)-[(-)-эпигаллокатехин]5-(4β→8)-(-)-эпигаллокатехингаллат	Корни [178]	-	*Впервые выделен*
3-О-β-D-(6″-галлоил)галактопиранозид	НЧ [174]	-	

1	2	3	4
Лигнанамиды			
(2,3-транс)-3-(3-гидрокси-5-метоксифенил)-N-(4-гидроксифенетил)-7-{(E)-3-[(4-гидроксифенетил)амино]-3-оксопроп-1-ен-1-ил}-2,3-дигидробензо[b][1,4-диоксин-2-карбоксамид	Корни [172]	-	
Лимониумин A		антидиабетическая [172]	*Впервые выделен*
Лимониумин B		противовоспалительная, цитотоксическая [172]	*Впервые выделен*
Лимониумин C		антидиабетическая [172]	*Впервые выделен*
Лимониумин D			*Впервые выделен*
Лимониумин E			*Впервые выделен*
Лимониумин F			*Впервые выделен*
Лимониумин G		противовоспалительная, цитотоксическая [172]	*Впервые выделен*
Лимониумин H		антидиабетическая [172]	*Впервые выделен*
Лимониумин I			*Впервые выделен*
6-гидрокси-4-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-(4-гидроксифенил)- 7-метокси-1H-бензо(*f*)изоиндол-1,3(2H)- дион		-	
Каннабизин A		антидиабетическая [172]	
Каннабизин B		антидиабетическая, противовоспалительная [172]	
Каннабизин C		антидиабетическая [172]	
Каннабизин D		-	
Каннабизин F		цитотоксическая [172]	
Каннабизин I		антидиабетическая, противовоспалительная [172]	
N-цис-феруloилтирамин N-транс-феруloилтирамин			

Также, анализ аминокислотного состава экстрактов из растений вида *L. gmelinii* показал высокое содержание незаменимых аминокислот, среди которых глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, аланин, пролин [179]. Авторы [179] отмечают, что содержание незаменимых аминокислот было выше в экстрактах из надземной части растения (31,65%) в сравнение с экстрактами из корней (24,06%).

Исследование неполярных фракций, выделенных из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii*, выявило четкие различия в липидном составе [180]. Всего в гексановой вытяжке из корней идентифицировано 27 соединений, среди которых в основном углеводороды и эфиры высших жирных кислот [181]. Напротив, в вытяжке из надземной части растения преобладали трикозан и ацетат фитола, производные ациклических дитерпеновых спиртов [180]. Эти результаты согласуются с литературными данными, что свидетельствует о том, что неполярные соединения, такие как углеводороды, чаще накапливаются в надземных частях растений, в то время как водорастворимые углеводы и полифенолы преобладают в корнях [180,182,183].

Приведенная информация показывает, что растения вида *L. gmelinii* содержат богатый комплекс биологически активных веществ, которые обладают значительным потенциалом для применения в медицине и фармацевтике. Флавоноиды, флавонолы, флаван-3-олы, фенолокислоты и их производные, а также гликозиды флавоноидов и лигнанамиды, выявленные в корнях и надземной части растения, демонстрируют различные биологические активности, включая антиоксидантную, антибактериальную, противовоспалительную и антидиабетическую. Эти результаты подчеркивают важность дальнейших исследований для более глубокого понимания и оптимального использования препаратов на основе *L. gmelinii*. Улучшенное планирование экспериментов, разработка лекарственных форм и методик их приготовления с применением международных стандартов качества, регуляторных норм и принципов валидации сделают будущие исследования более надежными и повысят эффективность конечных продуктов.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и реактивы

Корни и надземная части были собраны на территории Алматинской области в период цветения 2020 года и идентифицированы в Институте ботаники и фитоинтродукции (г. Алматы, Казахстан) по ваучеру 154958. Координаты места сбора и произрастания вида *L. gmelinii* – Талгарский район, село Жаналык (H = 1326 м над уровнем моря, N = 43°34′28″, E = 077°03′20″).

Этанол ≥90% производства фирмы «Талгар-спирт» использовали без предварительной очистки.

Реагент Фолина-Чокальтеу (CAS No 10377-48-7), галловая кислота ≥96% (CAS No 149-91-7), (–)-эпигаллокатехин галлат ≥95% (CAS No 989-51-5), ЛПС (из Escherichia coli 0111:B4), бульон Лурия-Бертани (LB), агароза (CAS No 9012-36-6), дейтерированный ДМСО ≥99.9 % (CAS No 67-68-5), ментол ≥99 % (CAS No 89-78-1), триэтаноламин ≥98% (CAS No 102-71-6), пропилпарабен ≥99% (CAS No 94-13-3), метилпарабен ≥99% (CAS No 99-76-3), полиэтиленгликоль-400 ≥99% (CAS No 25322-68-3), калия сорбат ≥99% (CAS No 24634-61-5) производства фирмы Sigma-Aldrich.

Ацетонитрил, метанол, ортофосфорная и муравьиная кислоты сертифицированные для ВЭЖХ > 95%, производства фирмы Sigma-Aldrich.

Карбонат натрия CAS No 497-19-8, хлорид алюминия (CAS No 7446-70-0. 1.2) производства фирмы у AppliChem GmbH.

Среда DMEM с высоким содержанием глюкозы производства фирмы «Gibco».

Воду очищали с использованием системы Milli-Q производства фирмы «Millipore».

В антибактериальных анализах использовались штаммы бактерий: для грамотрицательных *E. co*li ATCC 25922, для грамположительных - S. aureus ATCC 25923, S. epidermidis ATCC 12228, чашки для тканевых культур 3030-150 производства фирмы «IWAKI».

Карбомер 980 (CAS No 9007-20-9) производства фирмы «Sumitomo Seika Chemicals» использовали без предварительной очистки.

Глицерин ≥99. % (CAS No 56-81-5), пропиленгликоль (1, 2-пропандиол) ≥99.8 % (CAS No 57-55-6) производства фирмы «The DOW Chemical Company».

Гидрофосфат натрия (CAS No 10028-24-7), дигидрофосфат натрия (CAS No 7558-80-7), натрия хлорид (CAS No 1341-49-7), калия хлорид (CAS No 7447-40-7) производства фирмы «РеактивСнаб» использовали без предварительной очистки.

Препарат сравнения «Диклофенак» гель для наружного применения 1.0 % производства фирмы «Нижфарм».

2.2 Проведение экстракции биологически активных веществ

Для получения субстанций методом УЗЭ проводили экстракцию измельченного растительного сырья в ультразвуковой ванне Elmasonic S 450

(Elma, Германия). Отфильтрованный водно-спиртовой экстракт концентрировали на роторном испарителе модели IKA RV20 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Германия) при температуре 40-45°C в вакууме досуха до получения коричневого кристаллического порошка.

Для получения субстанций методом КМ проводили 5-часовую двукратную экстракцию шестикратным избытком 50% этанола при температуре 20-23°C с последующей промывкой растительного материала водой для удаления остатков экстракта. Первый и второй экстракты смешивали и концентрировали досуха в мягких условиях на роторном испарителе с получением сухого экстракта.

Получение субстанций методом СФЭ проводили с помощью системы сверхкритической экстракции (Jasco Europe s.r.l., Италия). Система была снабжена насосом $scCO_2$Jasco-PU-4347, проходящим через сосуд из нержавеющей стали, оснащенный 10-микропористыми фильтрующими дисками из нержавеющей стали емкостью 316 л. Экстрактор (100 мл) был заполнен измельченным растительным сырьем. Регулятор противодавления CO_2-BP-4390 настраивали на целевое давление. После 30-минутного предварительного уравновешивания проводили сверхкритическую экстракцию в смеси CO_2/EtOH при давлении 25–45 МПа и скорости потока 5 мл/мин. Полученные экстракты затем выпаривали на роторном испарителе и хранили при температуре 4 ◦C до проведения дальнейших анализов.

Высушенные субстанции также подвергали твердофазной экстракции с помощью колонки Discovery®DSC-18 SPETube (Merck Life Science, S.r.l., Италия). После предварительного кондиционирования колонки водой и метанолом около 200 мг экстракта растворяли в метиловом спирте и загружали в колонку. Колонку последовательно промывали метиловым спиртом и водой до полной очистки колонки и собирали полученные фракции. Полученные фракции сушили при пониженном давлении и температуре 30°C на роторном испарителе, взвешивали и хранить при температуре 4 ◦C до проведения дальнейших анализов.

Выходы субстанций рассчитывали по формуле (1):

$$\text{Выход, \%} = \frac{\text{Масса высушенного экстракта}}{\text{Масса растительного материала}} * 100\ \% \qquad (1)$$

2.3. Определение содержания общей суммы полифенолов

Сумму полифенолов определяли с использованием реактива Фолина-Чокальтеу в соответствии с методикой [184] с некоторыми модификациями. Около 200.0 мг вещества переносили в мерную колбу вместимостью 100.0 мл и количественно растворяли в 30% этаноле. Далее аликвоту объемом 2.0 мл разбавляли дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 100.0 мл (Раствор А).

1.0 мл раствора А смешивали с 1.0 мл реактива Фолина-Чокальтеу и 15,0 мл дистиллированной воды и оставляли на 6 минут. Затем добавляли 3.0 мл

20.0% раствора карбоната натрия и оставляли колбу в темное место на 120 минут. Через 120 минут измеряли оптическую плотность при 738 нм на спектрофотометре «Analytik Jena» (Япония), используя дистиллированную воду в качестве раствора сравнения. В качестве стандарта для построения калибровочной линии использовали галловую кислоту.

2.4 Исследование компонентного состава субстанций из растений вида *L. gmelinii* методом LC-DAD-QToF

2.4.1 Приготовление растворов

Около 20.0 мг субстанции обрабатывали ультразвуком в 1.0 мл метанола в течение 5 минут с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 5000 об/мин отдельно. Отфильтрованный надосадочный раствор использовали для анализов.

2.4.2 Прибор и аналитические условия

Измерения проводились в соответствие с ранее описанными условиями анализа [171]. Масс-спектрометрический анализ проводился на приборе QToF-MS-MS (модель № G6530A, Agilent Technologies, США), оснащенного источником ESI с технологией Jet Stream, с использованием следующих параметров: скорость потока осушающего газа (N_2) – 11,0 л/мин; температура сушильного газа 275 °C; давление распылителя 25 psi, температура распыляющего газа 325 °C; скорость потока распыляющего газа – 11 л/мин; капиллярное напряжение – 3000 В; скиммер, 65 В; напряжение фрагментатора 150 В. Все операции, сбор и анализ данных контролировались с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Data Acquisition Software Ver. A.05.01 и обрабатывались с помощью пакета обновления MassHunter Qualitative Analysis B.07.00. Каждый образец анализировался в положительном режиме m/z = 100–1100 и расширенном динамическом диапазоне (время полета m/z 1700 при скорости сбора данных 2 ГГц). Точные массы фрагментных ионов были получены путем сравнения с эталонными массами при m/z 121,0509 (протонированный пурин) и 922,0098 [протонированный гексакис (1H, 1H, 3H-тетрафторпропокси) фосфазен или HP-921] в режиме положительных ионов.

2.5 Спектральный анализ

ИК-спектры образцов субстанций и вспомогательных веществ были получены с помощью ИК Фурье-спектрометра Spectrum 65 («PerkinElmer Inc.», США).

УФ-спектры были получены на приборе Specord 200 (Analytik Jena, Германия).

^{1}H-ЯМР (400,13 МГц) записывали на спектрометре BrukerAvance 400 (Италия), оснащенным консолью Nanobay и зондом CryoprobeProdigy. Полученные спектры ЯМР ^{1}H обрабатывали с использованием программного обеспечения BrukerTOPSPIN. В качестве растворителя использовали ДМСО-d_6, D_2O, TMS выступал внутренним стандартом.

2.6 Исследование моносахаридного состава

Полисахаридный комплекс осаждали из концентрированного водного раствора субстанции *этиловым спиртом 95.0 %* при нагревании на водяной бане и перемешивании. Через 1 час осадок фильтровали под вакуумом и промывали последовательно этанолом, ацетоном и этилацетатом для удаления низкомолекулярных сопутствующих веществ [185]. Моносахаридный состав анализировали методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) после дериватизации образца в виде ацетилированных метилгликозидов (АМГ) [186]. Вкратце, 1.0 мг образца сушили над P_2O_5 в течение 1 часа и далее проводили метанолиз в 1.0 мл 1.25 М раствора HCl/MeOH при 80°C в течение 20 часов. Полученную смесь трижды экстрагировали гексаном, метиловый слой сушили и ацетилировали в смеси 50 мкл Ac_2O и 50 мкл пиридина при 100 °C в течение 30 минут. После трехкратной экстракции смесью $CHCl_3/H_2O$ (1:1) образец растворяли в ацетоне и анализировали методом ГХ-МС на приборе Agilent Technologies 7820A (Agilent Technologies, США), оснащенном масс-селективным детектором 5977B и капиллярной колонкой HP-5 (Agilent, внутренний диаметр 30 м×0,25 мм; скорость потока 1 мл/мин, газ-носитель He). АМГ анализировали с использованием следующей температурной программы: 140 °C в течение 3 мин, затем повышение до 240 °C со скоростью 3 °C/мин.

Положения связей моносахаридов были получены путем анализа частично метилированных ацетатов альдитола (ПМАА) [186]. Реакцию метилирования осуществляли инкубацией 2 мг каждого образца с CH_3I (100 мкл) и порошком NaOH в 300 мкл ДМСО в течение 20 часов. Далее продукт реакции гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой при 120 °C в течение 2 часов, восстанавливали $NaBD_4$ и ацетилировали. Режим анализа ПМАК: программирование температуры колонки на 90 °C в течение 1 мин, затем повышение до 140 °C со скоростью 25 °C /мин, далее повышение от 140 до 200 °C со скоростью 5 °C /мин, затем до 280 °C со скоростью 10 °C /мин и выдерживание температуры 280 °C в течение 10 мин.

2.7 Количественное определение (–)-эпигаллокатехин галлата методом ВЭЖХ-ДАД

2.7.1 Прибор и хроматографические условия

Для разработки и валидации метода использовалась система ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent, Калифорния, США). Прибор был оснащен высокоскоростным насосом G1312A, термостатом колонок G1316A, ультрафиолетовым (УФ) детектором G1314A, автосамплером G1329A и модулем управления. Хроматографическое разделение проводили на разделительной колонке AcquityC18 с размерами 150 мм×2 мм и размером частиц 5 мкм компании Waters (Милфорд, Массачусетс, США). В системе было установлено программное обеспечение Chemstation для анализа и оценки данных. Во время измерения эти колонки термостатировали при температуре 30°C. Подвижная фаза 14 % ацетонитрил и 86 % ортофосфорная кислота (0.2 %), скорость потока

1.0 мл/мин, объем вкола 25 мкл. Измерения осуществляли с при длине волны детектора 270 нм.

2.7.2 Приготовление стандартного раствора

Необходимую навеску стандартного образца ЭПКГ растворяли в подвижной фазе для приготовления растворов концентраций 1.0, 3.0, 5.0, 8.0 и 10.0 ug/ml. Затем растворы обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут перед использованием для хроматографического анализа и фильтровали с использованием шприцевого фильтра с размером пор 0.45 микрона, отбрасывая первые порции фильтрата.

2.7.3 Приготовление испытуемых растворов

Необходимую навеску растительной субстанции растворяли в мерной колбе, используя подвижную фазу в качестве растворителя, и далее готовили серию образцов для построения калибровочного графика. Затем растворы обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут перед использованием для хроматографического анализа и фильтровали с использованием шприцевого фильтра с размером пор 0.45 микрона, отбрасывая первые порции фильтрата.

2.7.4 Специфичность

Специфичность аналитического метода заключается в его способности надежно определять анализируемое вещество в присутствии других веществ, находящихся в матрице пробы и генерировать сигналы, свободные от помех [187]. В методе ВЭЖХ это подтверждается четким отделением пика анализируемого вещества от других пиков, которые могут исходить из матрицы образца, а также количественно его определять в сложных матрицах. Оценку специфичности проводили путем введения в систему отдельно холостого раствора (подвижная фаза).

2.7.5 Линейность

Для исследования линейности метода готовили растворы стандартного образца ЭПКГ в концентрации 1.0, 3.0, 5.0, 8.0 и 10.0 ug/ml. Линейность оценивали путем построения калибровочного графика, представляющего зависимость площади пика от концентрации ЭПКГ. Кроме того, был проведен линейный регрессионный анализ для оценки линейности калибровочной кривой с использованием метода линейной регрессии наименьших квадратов для получения наклона, точки пересечения и коэффициента корреляции [187]. Также были проведены исследования линейности определения ЭГКГ в испытуемых образцах путем приготовления серии образцов субстанций в концентрации 20, 40, 60, 80 и 120 ug/ml и построением зависимости площади пика найденного ЭПКГ от концентрации субстанции.

2.7.6 Правильность

Правильность аналитического метода определяется как близость полученного значения к истинному [187] и определялась путем добавления известных навесок стандартного образца ЭПКГ к испытуемым растворам. Готовили три уровня концентрации с введением 3.0, 5.0, 8.0 ug/ml ЭПКГ и анализировали каждый раствор в трех повторностях для получения 9 определений. Правильность оценивали по величине открываемости R, рассчитанной по формуле (2), среднему значению открываемости и стандартному отклонению.

$$R = \frac{\text{найденное количество ЭПКГ}}{\text{добавленное количество ЭПКГ}} * 100\ \% \qquad (2)$$

2.7.7 Точность

Точность метода устанавливали на уровне повторяемости и воспроизводимости. *Повторяемость* – это степень близости результатов каждого измерения, оцениваемые относительным стандартным отклонением (RSD) для не менее 6 определений [187]. Для оценки повторяемости проводили статистический анализ шести последовательных вколов с определением RSD времени удерживания (RT) и площади пика ЭПКГ в пределах диапазона применения методики. *Внутрилабораторную прецизионность (ВП)* изучают для исследования влияний вариаций внутри лаборатории на результаты испытаний идентичных образцов, отобранных из одной и той же серии [187]. Для исследования ВП готовилось 6 модельных растворов, полученных двумя аналитиками для сравнения выборок по RSD, критериям Фишера и Стьюдента.

2.7.8 Диапазон применения

Диапазон применения метода определяется как интервал между верхним и нижним пределами концентраций, в которых метод доказал свою линейность, повторяемость и точность [187].

2.8 Исследование антибактериальной активности *in vitro* анализом зоны ингибирования

Антибактериальную активность исследовали методом диффузии в агаре [188]. Эталонные грамотрицательные (*Escherichia coli* ATCC 25922) и грамположительные (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) бактериальные штаммы выращивали при 37°C в бульоне Лурия-Бертани (LB) при осторожном встряхивании до достижения оптической плотности 0,8 при длине волны 590 нм. Далее бактериальную культуру разводили в соотношении 1:2000 и высевали на чашки с LB-агарозой.

Анализируемые растительные субстанции растворяли в ДМСО в концентрации 10 мг/мл и аликвоты по 3 мкл загружали в отверстия, предварительно сделанные в агарозных планшетах. Планшеты (IWAKI, 3030-150) инкубировали в течение 24-48 часов и измеряли диаметры зоны ингибирования.

2.9 Исследование иммуномодулирующей активности

2.9.1 Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые субстанции растворяли в питательной среде DMEM в следующих 7 концентрациях: 1 mg/ml; 500 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml. Стерилизацию разведенных растворов проводили с помощью полиэфирсульфонного мембранного фильтра с размерами пор 0,2 мкм (TPP, Швейцария).

2.9.2 Животные

Мыши-самцы C57BL/6 в возрасте 10-12 недель были приобретены в Национальном научном центре особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева (Алматы, Казахстан). Животных содержали в среде с контролируемой температурой (23°C) и относительной влажностью 60% с 12-часовым циклом света/темноты. Животные имели свободный доступ к пище и воде. Экспериментальные процедуры с участием животных полностью соответствовали действующим международным законам и политике (Руководство по уходу и использованию лабораторных животных, National Academy Press, 1996) и были одобрены Местным комитетом по этике использования животных в Национальном центре биотехнологии (Протокол № .4 от 8 сентября 2020 г.).

2.9.3 Выделение лимфоцитов

Эксперимент проводился в соответствии с методикой, описанной в работе [189]. Животное подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. После обработки 70%-ным раствором этанола аккуратно вскрывали брюшную полость и извлекали селезенку. Сразу после этого орган помещали в чашку Петри с средой DMEM для промывания. Далее селезенку переносили в гомогенизатор, где она измельчалась с использованием тефлонового пестика в 4-5 мл среды DMEM. Полученный гомогенат, преимущественно состоящий из лимфоцитов, отбирали пастеровской пипеткой и переносили в стерильные пробирки объемом 15 мл. Клетки осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 минут. Для удаления эритроцитов в осадок добавляли 3 мл раствора хлористого аммония (pH=7,2) и оставляли на 5 минут при комнатной температуре. После лизиса эритроцитов клетки промывали трижды с использованием DMEM для полного удаления NH_4Cl. Затем к клеточному осадку добавляли 2 мл среды RPMI-1640 с 10% ЭТС и ресуспендировали с помощью шейкера. Подсчет клеток проводили с использованием автоматического счетчика BioRad TC20, используя 0,1%-ный трипановый синий для окрашивания мертвых клеток.

2.9.4 Выделение перитонеальных макрофагов

Эксперимент проводился в соответствии с методикой, описанной в работе [190]. Животное умерщвляли с использованием метода цервикальной дислокации, после чего обрабатывали брюшную полость 70%-ным раствором

этанола и снимали кожу, не повреждая брюшную стенку. В брюшную полость вводили 2,5-3 мл DMEM с 5% ЭТС и небольшим количеством воздуха, что приводило к увеличению объема брюшной полости. Затем брюшную стенку массировали в течение 1 минуты для выделения макрофагов в суспензию. Полученную жидкость отсасывали шприцем и переносили в стерильные пробирки объемом 15 мл. Макрофаги отделяли по адгезивности, чтобы удалить сопутствующие клетки. Для этого клеточную суспензию в концентрации 2×10^6 клеток/мл добавляли в среду RPMI-1640 с 10 мМ HEPES и 10% ЭТС, распределяли по 1 мл в лунки 24-луночного планшета и оставляли инкубироваться при 37°C и 5% CO2 в течение 1 часа. Неприлипшие клетки удаляли, а монослой макрофагов промывали средой DMEM. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0,1%-ного трипанового синего. Макрофаги инкубировали в среде RPMI-1640 при 37°C и 5% CO_2 в течение 24 часов.

2.9.5 Определение уровней цитокинов

Определение уровней цитокинов проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). ИФА выполняли с использованием следующих наборов: Mouse TNF alpha SimpleStep ELISA KIT (Abcam), IL-6 Mouse SimpleStep ELISA KIT (Abcam). Все процедуры выполняли согласно инструкции производителя.

2.10 Физико-химические исследования гелей

2.10.1 Реологические исследования

Изучение динамической вязкости полученных образцов гелей проводили на Anton Paar Modular Compact Rheometer 102 (Anton Paar GmbH, Австрия) с применением вращающегося измерительного диска. Измерения проводились при температуре 25°C и 37°C. Прибор позволял измерить касательное напряжение сдвига геля при скорости сдвига 1,5–1312 $с^{-1}$.

Кривые течения были построены измерением зависимости напряжения сдвига от скорости сдвига в диапазоне 0.01–150 $с^{-1}$ на ротационном реометре RheolabQC (Anton Paar GmbH, Австрия), используя программное обеспечение RHEOPLUS/32 V3.61 21006242-33024.

2.10.2 Исследование кинетики высвобождения

Изучение кинетики высвобождения субстанций проводили методом *in vitro*-диффузии через диализную мембрану с использованием стеклянной диффузионной ячейки Франца, погруженной в термостатируемую баню при 36-37^0C (рисунок 6).

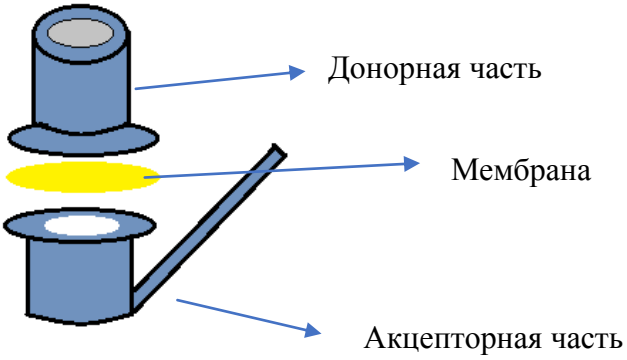


Рисунок 6 – Внешний вид установки для изучения кинетики высвобождения

Между акцепторным и донорным (верхним) отсеками помещали полупроницаемые мембраны Durapore™ (поливинилиденфторид (ПВДФ)) (Milli-pore) диаметром 0,1 мкм, пористостью 70%, толщиной 125 мкм. Эксперимент проводился в фосфатно-буферном растворе (pH 6,0–6,5). Объем буферного раствора в акцепторной части установки Franz Diffusion Cell составлял 37 мл, скорость перемешивания 100 об/мин при постоянной температуре.

0,3 г образца геля помещали в донорную часть установки на диализную мембрану. Через каждые 10 мин в течение 5 часов отбирались пробы объемом 2 мл из акцепторной части и измеряли на УФ-спектрофотометре Analytyc Jena Specord 200 при длине волн 268 нм. После каждого отбора пробы доливали 1 мл свежего фосфатно-буферного раствора в систему для поддержания объема. Процент высвобождения субстанций в каждый момент времени рассчитывали с использованием калибровочной кривой (R2=0.99).

2.10.3 Измерение pH образцов гелей

pH образцов гелей определяли с помощью цифрового pH-метра HANNA HI 2020-02 Edge (США). 1 г геля растворяли в 100.0 мл дистиллированной воды и оставляли на два часа. Измерение pH каждого состава проводили трижды и рассчитывали средние значения. pH. Измерения проводили трехкратно. pH-метр калибруется стандартными буферными растворами (pH 4, 7 и 10) перед каждым использованием.

2.10.4 Исследование температурной стабильности гелей

Гелевые образцы после их приготовления хранили при комнатной температуре в течение 48 часов, далее помещали в морозильную камеру (-8 – -2°C) и чередовали такой цикл хранения в течение 6 периодов. В конце теста оценивали внешний вид гелей.

2.10.5 Исследования коллоидной стабильности гелей

Определение коллоидной стабильности гелевых композиций осуществляли с применением центрифуги ApexLAB 80-2S (Китай) при скорости оборотов 3000 $с^{-1}$.

2.11 Исследование противовоспалительной активности гелей *in vivo.*

2.11.1 Противовоспалительная активность гелей

Противовоспалительная активность гелей с растительными субстанциями из корней и надземной части растений вида *Limonium gmelinii* была исследована на модели формалин-индуцированного отека задних лап мышей по методике, описанной в [191]. В качестве объектов исследования использовались самцы мышей линии CD1. Мышей разделили на 8 групп по 6 особей в каждой: контрольная группа 1 (негативный контроль, без обработки), контрольная группа с формалин-индуцированным отеком (позитивный контроль), группа, обработанная гелем диклофенака (1%), и группы, получавшие гели с экстрактами кермека Гмелина в концентрациях 5% и 7%.

Мышам в контрольной группе 1 в первый и третий день эксперимента вводили апоневротическую инъекцию фосфатного буфера 20 мкл в правую заднюю лапу, в остальных группах подобным образом за один час до применения лекарственного средства вводилось 20 мкл 3,75 % формалина для создания модели отека.

40 мг каждого из исследуемых растительных гелей и стандартного геля диклофенака 1.0% наносили на место отека лап мышей в испытуемых группах и осторожно втирали до полного впитывания.

Вес всех экспериментальных мышей измеряли ежедневно за 1 день до начала эксперимента и в течение 12 дней исследования с использованием автоматических электронных весов.

Толщина, длина и ширина лап измерялись ежедневно в фиксированное время в течение двенадцати последовательных дней за 1 час до первой инъекции или за 2 часа до применения растительных гелей и Диклофенака с помощью цифрового штангенциркуля (ASIMETO, Германия). Объем лап был посчитан аналогично формуле в исследовании [191]: объем лапы = ½ (длина*ширина*толщина).

Эффект противовоспалительных препаратов оценивали по снижению отека лап в сравнении с контрольной группой. Результаты выражались как процент ингибирования воспаления по сравнению с контрольной группой.

2.11.2 Гистологический анализ

Анализ проводился в соответсвие с методикой, описанной в [191]. Задние лапы мышей были ампутированы и зафиксированы в 10%-ном нейтральном буферном формалине. Для декальцинации образцы тканей помещали в специальный декальцинирующий раствор на три дня. После этого образцы подвергали последовательной дегидратации с использованием этанола в концентрациях 70%, 95%, 95%, 100%, 100%. После промывки в фосфатном буфере образцы погружали в ксилол. Далее их пропитывали парафином и заключали в парафиновые блоки. Гистологические срезы толщиной 4 мкм делали на микротоме (SLEE, Германия) и наносили на предметные стекла. Для удаления парафина стекла с парафиновыми срезами дважды обрабатывали ксилолом, после чего образцы регидратировали по схеме: 100%, 100%, 95%,

95%, 70% этанола и дистиллированная вода. Образцы окрашивали гематоксилином, промывали водой, затем окрашивали эозином и вновь дегидратировали этанолом в концентрациях 95%, 95%, 100%, 100%. После обработки ксилолом на слайды наносили гистологическую среду и покрывали их покровным стеклом. Окрашенные образцы исследовали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Йена, Германия). Окрашенные образцы анализировали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Йена, Германия).

2.12 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводился с помощью пакета программ Microsoft Excel. Статистическая обработка результатов валидации технологии получения субстанций проводили при помощи программы Minitab Statistical Software 21.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Фармакотехнологический анализ лекарственного растительного сырья кермека Гмелина (*L. gmelinii)* и его стандартизация

3.1.1 Разработка надлежащей технологии сбора и заготовки сырья кермека Гмелина (*L. gmelinii)*

Как было отмечено ранее, современная концепция производства препаратов по требованиям GMP смещает акцент с контроля качества готового продукта на обеспечение качества всего процесса. Сбор доброкачественного растительного материала первый шаг на пути к гарантии качества конечного фитопрепарата [60–62]. Цель, преследуемая на данном этапе, оптимизация получения активных компонентов и снижение возможных загрязнений растительного сырья [60,61]. Одним из ключевых инструментов GMP является спланированный и регламентированный подход к процессу подготовки сырья с самых первых стадий, то есть составление документации для функционирования процессов. На основании этого был подробно составлен план подготовки растительного сырья и прописан СОП с указанием критических точек контроля и технологическая схема процесса (на базе ТОО «Антиген», Приложение А).

Организацию сбора корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* осуществляли в период цветения на территории Энбекшиказахского района Алмаатинской области в 2019 г. в соответствии с требованиями GACP, Рекомендаций ЕАЭС от 26 января 2018 года № 15 от и статьи № 42 Лесного кодекса РК, подчеркивающие важность сбора с учетом биологических особенностей растительного сырья, экологические и экономические факторы [60].

Надземная часть растений вида *L. gmelinii* была собрана в период их цветения (июнь 2020), а корни заготовлены в ноябре 2023 года, поскольку, как известно, именно в эти периоды происходит максимальное накопление в них комплекса биологически активных веществ, относящихся к вторичным метаболитам.

Послеуборочная обработка сырья включала сортировку от грязи, посторонних примесей, очистку. Очищенный растительный материал был идентифицирован в Институте ботаники и фитоинтродукции (контрольный номер ваучера 154 9580, высушен в хорошо вентилируемых чистых помещениях и далее измельчен до размера частиц 2.0-3.0 мм.

Высушенные корни и надземную часть растений вида *L. gmelinii* упаковывали в мешки из крафтбумаги и произвели маркировку с указанием наименования сырья, места заготовки, время сбора и массы нетто.

Исходя из полученных данных была проведена оценка рисков технологического процесса заготовки сырья, в качестве инструмента которой применялся метод «Анализа видов и последствий отказов» (FMEA, «Failure Mode Effect Analysis»). Технологическая схема заготовки сырья с описанием контроля критических точек представлена на рисунке 7.



Рисунок 7 – Технологическая схема заготовки сырья с описанием контроля критических точек

Исходя из проведенной оценки рисков технологического процесса заготовки сырья, были определены контрольные точки на различных стадиях этого процесса. Такой подход позволяет систематически отслеживать потенциальные риски и предотвращать возможные отказы на каждом этапе. Таким образом, повышается надежность технологического процесса, что обеспечивает более стабильное и качественное производство растительных субстанций.

3.1.2 Технологические и фармакопейные параметры качества растительного сырья на примере корней и надземной части растений вида L. gmelinii

Контроль качества обработанного растительного материала включает в себя детальную оценку всех ботанических и фитохимических аспектов растения и включает тесты на идентификацию и чистоту, а также методики количественного анализа [60].

Входной контроль качества проводили согласно требованиям монографии ГФ РК. Были проведены тесты «Идентификация», «Посторонние примеси», «Потеря в массе при высушивании», «Зола общая», «Зола, нерастворимая в 10% кислоте хлороводородной; количественное содержание», «Количественное определение» [192], данные результатов анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Данные входного контроля качества растительного материала

Спецификация	Надземная часть	Корни	Допустимые нормы
Идентификация - при смачивании среза корня раствором *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества) - при смачивании среза корня 1 % раствором *ванилина Р* в *кислоте хлороводородной Р* появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	соответствует	соответствует	- черно-синее окрашивание - оранжево-красное окрашивание
Потеря в массе при высушивании, %	8.59±1.22	9.15±1.04	Не более 10.0 %
Общая зола, %	4.35±0.23	4.84±0.14	Не более 5.0 %
Зола, нерастворимая в 10% HCl, %	0.81±0.12	0.79±0.18	Не более 1.0 %
Количественное определение - содержание дубильных веществ в сухом сырье, %	15.70±0.65	18.15±0.89	В корнях - не менее 15.0 %; В надземной части – не менее 15.0 %
Микробиологическая чистота	соответствует	соответствует	Грамотрицательных и дрожжевых грибов - не более 10^{-3} и 10^{-4} соответственно на 1.0 г
Радионуклиды	соответствует	соответствует	Sr – 90 – не более 200 Бк/кг Cs – 137 – не более 400 Бк/кг
Тяжёлые металлы	не обнаружено	не обнаружено	Не более 0,001%

Результаты анализа, представленные в таблице 3, свидетельствуют о высоком качестве сырья и его соответствии фармакопейным требованиям и международным стандартам. Надземная часть и корни растения *L. gmelinii* продемонстрировали соответствие всем установленным спецификациям, включая содержание дубильных веществ, микробиологическую чистоту, радионуклиды и отсутствие тяжёлых металлов. Проведённый контроль качества подтверждает пригодность растительного материала для дальнейшего использования в фармацевтических целях, обеспечивая стабильное и качественное производство растительных субстанций.

3.2 Фармацевтическая разработка оптимального метода экстракции растительного сырья кермека Гмелина (*L. gmelinii*)

Растительное сырье, прошедшее должную переработку согласно вышеприведенным операциям и соответствующее требованиям по качеству, может быть использовано в качестве исходного материала для производства растительных лекарственных средств. Технологический процесс переработки сырья должен также осуществляться в соответствии с технологическим регламентом и нормативам, и систематически пересматриваться с учетом накопленного опыта для подтверждения их способности обеспечивать постоянное производство требуемого качества [52].

Экстракция является одним из наиболее распространенных и эффективных способов извлечения комплекса БАВ из растительного сырья. Цель стандартизированных процедур экстракции состоит в том, чтобы получить терапевтически желаемую часть и удалить инертный балластный материал путем обработки селективным растворителем [75].

Фармацевтические субстанции из корней и надземной части растения *L.gmelinii,* полученные методом классической мацерации, прошли клинический скрининг и зарегистрированы для применения в медицинской практике [193]. Способ получения субстанции включает двухкратную экстракцию в течение 5 часов 50 % этиловым спиртом при соотношении сырье:экстрагент – 1:5 [194]. Данный способ позволяет получить комплекс БАВ, обогащенные такими ценными компонентами как флавонолы (мирицетин, кверцетин, изорамнетин, монометиловый эфир мирицетина и их гликозиды (мирицитрин, рутин, 3-β-галактозилкверцетин и 3-β-галактозилмирицетин и другие) [194].

В настоящем исследовании был проведен сравнительный анализ способов получения растительных субстанций методами мацерации (КМ), ультразвуковой экстракции (УЗЭ) и сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ) с целью выбора оптимального метода экстрагирования извлечений с высоким содержанием БАВ в них.

УЗЭ основана на применении звуковой энергии очень высокой частоты, превышающей 20 кГц, для разрушения растительных клеток и увеличения площади поверхности для проникновения растворителя, что улучшает извлечение искомых групп веществ, являющихся вторичными метаболитами, определяющими физиологическую ценность растений. Высокая звуковая

энергия ускоряет процесс, что сокращает время экстракции, также уменьшает количество используемого растворителя и энергии, способствуя меньшему загрязнению окружающей среды и низкой стоимости обслуживания оборудования [75]. Более того, ряд исследований показал увеличение выхода экстрактов и их активности при использовании ультразвука по сравнению с другими методами [195,196]. В то же время некоторые авторы отмечают, что выходы вторичных метаболитов, полученные при использовании УЗЭ, ниже или равны таковым, полученным при использовании КМ [197].

СФЭ в последнее время становится также перспективным альтернативным способом получения растительных экстрактов ввиду ряда ценных преимуществ. СФЭ основан на сольватирующих свойствах сверхкритической жидкости, которую можно получить, используя давление и температуру выше критической точки. Преимуществами метода СФЭ является его экологичность, минимальный расход органических растворителей и пригодность для термочувствительных веществ, низкая концентрация балластных веществ в экстрактах [198].

Исходя из вышесказанного, была проведена оптимизация условий получения субстанций из корней и надземной части (НЧ) растения *L.gmelinii*, используя методы УЗЭ и СФЭ.

3.2.1 Оптимизация процесса ультразвуковой экстракции для получения растительных субстанций из корней и надземной части растений вида L. gmelinii

Первым шагом оптимизации процесса экстракции было установление оптимальной пропорции в смеси этилового спирта с водой. Вода является наиболее полярным растворителем, которая используется для экстракции широкого спектра полярных соединений. Однако недостатками применения воды как растворителя являются рост бактерий и плесени в экстрактах, большой расход энергии при концентрировании, а также возможный гидролиз некоторых соединений [75]. Этиловый спирт также полярен по своей природе, но обладает консервирующими свойствами при концентрации выше 20 %, нетоксичен при низкой концентрации, и для концентрирования экстрактов с его применением требуется небольшое количество тепла [75]. Таким образом, оптимальная смесь данных растворителей позволяет подобрать благоприятный экстрагент для растительного материала.

Концентрацию этилового спирта варьировали от 30.0 до 70.0 %, оставляя неизменными массу растительного материала (100.0 г), время экстракции (30.0 минут), соотношение сырье:экстрагент (1:3). На основании данных проведенного эксперимента, 50.0 % этиловый спирт был выбран как наиболее оптимальный растворитель (рисунок 8).

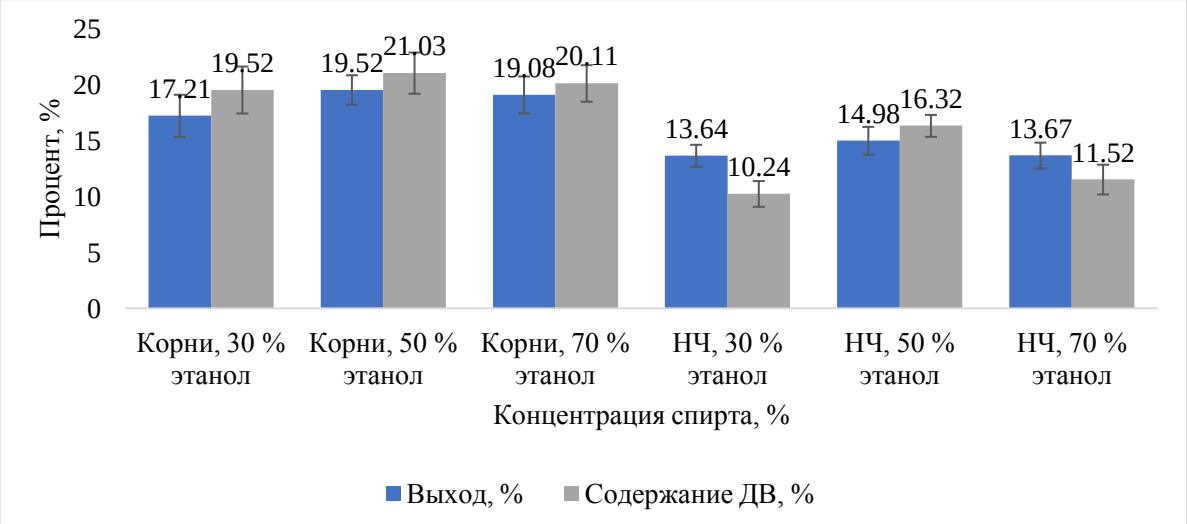


Рисунок 8 – Выход субстанции и содержание дубильных веществ (ДВ), выделяемые из растений вида *L.gmelinii* при ультразвуковой экстракции с применением этилового спирта различной концентрации

Согласно полученным данным, представленным на рисунке 8, использование 50.0 % этилового спирта более экономично и позволяет получить фитопрепарат с более высоким выходом и содержанием ДВ в полученных субстанциях из корней и надземной части растений вида *L.gmelinii*.

Установление оптимального времени экстракции было проведено в интервале от 30 до 60 минут при неизменных других параметрах экстракции (масса сырья – 100.0 г, экстрагент – 50.0 % этиловый спирт, соотношение сырье:экстрагент – 1:3). Было проведено три серии опытов для проверки сходимости результатов. Наибольший выход субстанции из корней и НЧ растений вида *L.gmelinii* с максимальным содержанием дубильных веществ в ней достигается при времени экстракции 45 минут (рисунок 9).

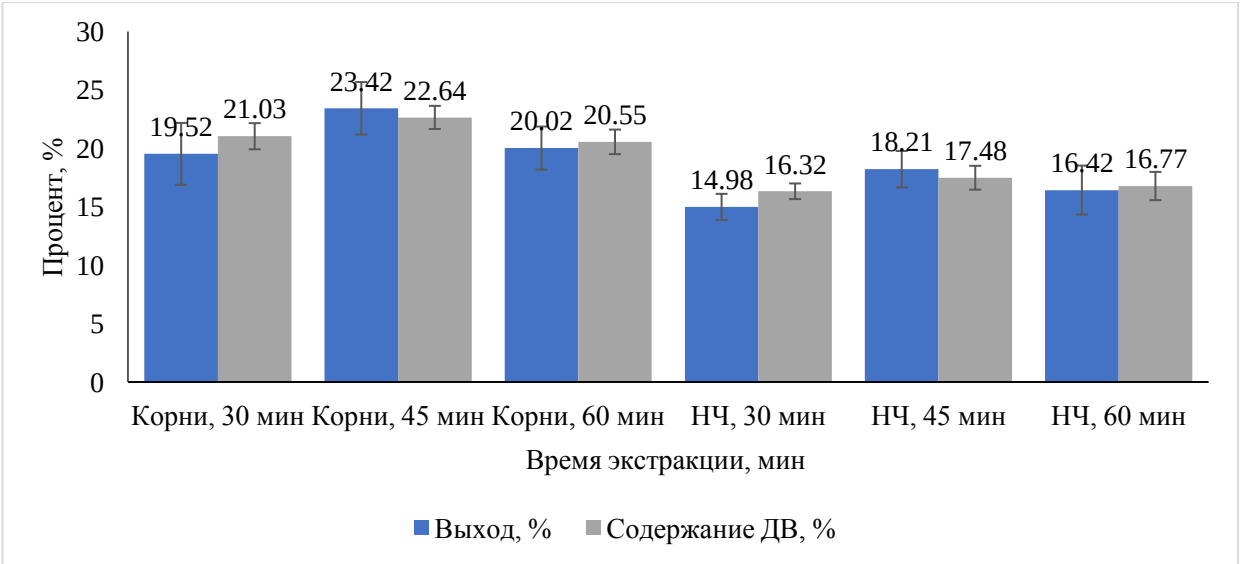


Рисунок 9 – Выход субстанции и содержание ДВ, выделяемые из растения вида *L. gmelinii* в зависимости от времени УЗ экстракции

Далее исследовали оптимальное соотношение сырье:экстрагент, варьируя показатель от 1:3 до 1:7 в трехкратной повторности каждой серии. Согласно полученным данным (рисунок 10), наилучшие результаты экстракции достигаются при соотношении сырья к растворителю 1:5 и 1:7. Выход субстанции из корней составит 27.25 и 27.62 % соответственно, с содержанием ДВ 30.21 и 29.05 %, соответственно. Разница, полученная при соотношениях 1:5 и 1:7 статистически незначима, однако для более экономного расхода растворителя, более оптимальным соотношением сырье:экстрагент было выбрано 1:5 для экстракции корней.

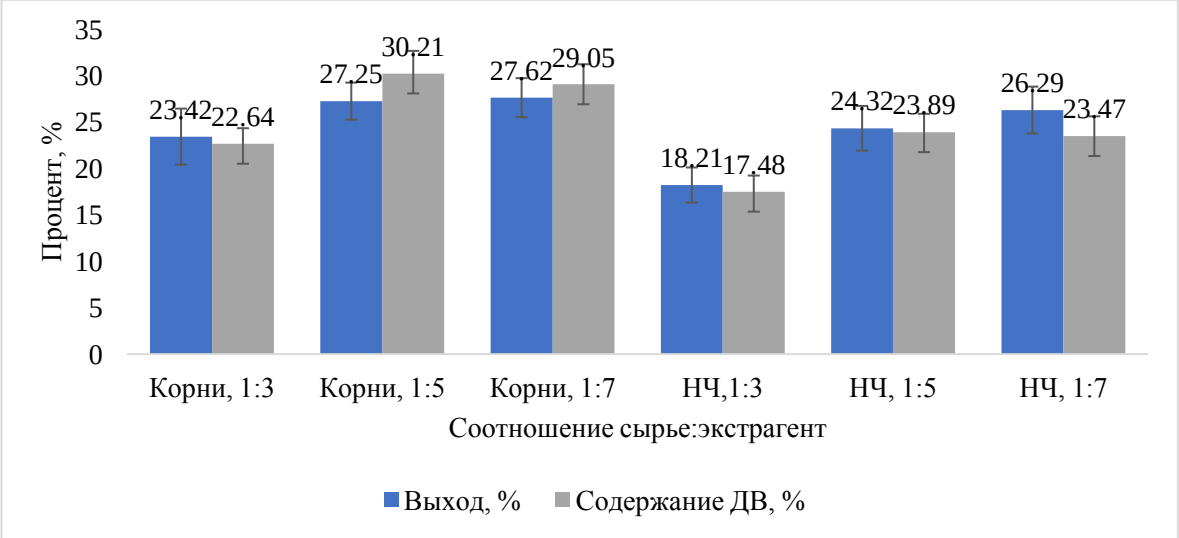


Рисунок 10 – Выход субстанции и содержание ДВ, выделяемой из растений вида *L. gmelinii* в зависимости от соотношения сырье:экстрагент при УЗ экстракции

Для УЗЭ экстракции НЧ при соотношении 1:7 достигается более высокий выход субстанций 26.29 %, а при соотношении 1:5 выход субстанции составил 24.32 %. Но содержание ДВ при этом изменялось статистически незначимо - 23.47 % и 23.89 %, при соотношениях 1:7 и 1:5 соответственно.

Таким образом, оптимальные условия получения субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* методом УЗ экстракции – это однократная 45-минутная экстракция 50 % этиловым спиртом при соотношении сырье:экстрагент – 1:5 для корней и 1:7 для НЧ.

3.2.2 Оптимизация технологии сверхкритической флюидной экстракции для получения растительных субстанции из корней и надземной части растений вида L. gmelinii

В ходе проведенных исследований была оптимизирована технология получения субстанции методом сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ). В результате изменения параметров процесса, таких как температура, давление, время экстракции, получены углекислотные экстракты из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii*.

Экстрактор заполняли высушенным измельченным растительным материалом. Экстракцию проводили при фиксированной скорости потока CO_2 (5.0 мл/мин), изучаемые переменные включали температуру (40-55 ^{0}C), давление (25-45 МПа), время экстракции (60-300 минут), объем сорастворителя этанола (10-70 %). На основании проведенных исследований по выбору параметров получения углекислотного экстракта из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* максимальный процентный выход на воздушно-сухое сырье был получен при следующих параметрах: рабочее давление – 35 МПа, температура – 45 ^{0}C, время экстракции – 4 ч, объем сорастворителя – 60 %. При этом общий выход составил для корней составил – 26.08 %, для надземной части – 29.89 %.

Из данных таблицы 4 видно, что скорость экстракции увеличивалась при росте давления в диапазоне 25-45 Мпа и достигала максимального выхода субстанции при давлении 35 МПа (концентрация этилового спирта 75 %, температура 45 °C, объем сорастворителя 40 %, время – 120 мин).

Таблица 4 – Выход субстанции и содержание ДВ, выделяемые методом СФЭ из растений вида *L. gmelinii*, в зависимости от давления

Давление	Сухой остаток в расчете на растительное сырье, %		Содержание ДВ в расчете на субстанцию, %	
	корни	НЧ	корни	НЧ
25	9.21	10.29	12.02	10.36
35	12.68	14.95	15.10	12.41
40	12.00	14.14	13.55	12.08
45	10.24	11.68	14.12	10.21

Такое увеличение эффективности, вероятно, было связано с повышением плотности CO_2, способствующим лучшему растворению БАВ и эффективности массопереноса. Также увеличение давления способствует разрыву растительных клеток и более эффективному высвобождению БАВ [199]. Однако эффективность экстракции снижалась при давлениях более 40 МПа. Из соображений технологической безопасности и экономической эффективности оптимальным давлением экстракции корней и надземной части *L. gmelinii* можно считать давление 35 МПа.

В таблице 5 показано влияние температуры на выход субстанций и содержание ДВ в них.

Таблица 5 – Выход субстанции и содержание ДВ, выделяемые методом СФЭ из растений вида *L. gmelinii*, в зависимости от температуры

Температура	Сухой остаток в расчете на растительное сырье, %		Содержание ДВ в расчете на субстанцию, %	
	корни	НЧ	корни	НЧ
40	11.21	13.29	12.02	10.36
45	12.68	14.95	15.10	12.41
50	10.24	12.68	12.40	10.08
55	10.00	10.24	11.12	8.21

Из данных таблицы 5 видно, что повышение температуры экстракции с 40 до 45°С в целом увеличивает выход экстрактов и содержание ДВ в них с максимальными значениями 12.68 % и 15.10 % и 14.95 и 12.41 % для корней и надземной части соответственно. Это явление можно объяснить тем, что при повышении температуры до 45°С ускоряются процессы диффузии и массопереноса, проницаемости клеточных стенок и растворимости целевых компонентов [200]. При температуре экстракции выше 45°С наблюдалось снижение данных показателей. Более высокие температуры негативно сказываются на выходе и содержании ДВ, ввиду того что природные полифенолы термически нестабильны и легко гидролизуются или окисляются. Таким образом, для дальнейших исследований была выбрана температура экстракции 45°С.

В следующем эксперименте изучали влияние объема сорастворителя на выход экстракции. Объем этилового спирта варьировался в широких пределах от 10 до 70 %, а именно: 10, 15, 20, 30, 40, 60, 70 % при неизменных параметрах экстракции, как и ранее (температура 45 °С, давление 35 МПа, время экстракции 120 мин). Результаты, представленные в таблице 6, показывают, что выход субстанций в виде сухих экстрактов продолжает увеличиваться с увеличением объема модификатора и достиг максимального значения при объеме сорастворителя 60 %, с последующим снижением при больших объемах.

Таблица 6 – Выход растительной субстанции и содержание ДВ, выделяемые методом СФЭ из растений вида *L. gmelinii*, в зависимости от количества сорастворителя

Объем сорастворителя, %	Сухой остаток в расчете на растительное сырье, %		Содержание ДВ в расчете на субстанцию, %	
	корни	НЧ	корни	НЧ
1	2	3	4	5
10	7.94	8.08	6.12	5.41
15	10.15	11.44	7.45	6.04

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5
20	10.52	12.95	13.21	10.08
30	12.05	13.26	14.05	11.58
40	12.68	14.95	15.10	12.41
60	19.08	21.89	19.31	16.12
70	19.22	19.58	18.47	15.00

Проведение экстракции с добавлением сорастворителя позволяет увеличить растворяющую способность углекислого газа по отношению к полярным веществам [199]. Доминирующими компонентами растений вида *L. gmelinii*, как было отмечено ранее, это полифенолы различной природы, которые более растворимы в полярных экстрагентах. Это объясняет то, что увеличение полярности углекислого газа приводит к заметному росту выхода субстанций [199].

Исследование влияние продолжительности экстракции на показатели выхода и содержание ДВ проводили в диапазоне 60-300 минут, сохраняя другие условия экстракции постоянными (температура 45 °С, давление 35 МПа, объем сорастворителя 60 %). Результаты, приведенные в таблице 7, показывают, что эффективность экстракции увеличивалась со временем и достигала максимума через 4 часа, а затем снижалась. Такое поведение может быть вызвано тем, что после достижения полного растворения БАВ более длительное время экстракции не приводит к более высокие темпам массопереноса.

Таблица 7 – Выход растительной субстанции и содержание ДВ, выделяемые методом СФЭ из растений вида *L. gmelinii*, в зависимости от времени экстракции

Время	Сухой остаток в расчете на растительное сырье, %		Содержание ДВ в расчете на субстанцию, %	
	Корни	НЧ	корни	НЧ
60	6.25	8.47	8.12	7.91
120	19.08	21.89	19.31	16.12
180	22.08	24.28	21.35	18.12
240	26.08	29.89	25.31	21.12
300	24.62	28.03	21.12	18.55

Таким образом, оптимальные условия получения субстанций из корней и надземной части *L. gmelinii* методом СФЭ – это 240-минутная экстракция при давлении 35 Мпа, температуре 45 ^{0}С с применением сорастворителя этилового спирта в количестве 60 %.

Дополнительно процесс СФЭ был проведен в градиентном режиме для разделения экстракта на фракции различной полярности, а именно условиями получения экстрактов были выбран выше описанный оптимальный режим

(продолжительность – 240 минут, давление 35 Мпа, температура – 45^0 С), но с использованием градиента $EtOH/H_2O$ (75%) (Растворитель А) и CO_2 (растворитель В). Экстракты получены постепенным увеличением полярности углекислого газа и соответственно, фракция 1 – наименее полярная; фракция 2 – средне-полярная; фракция 3 – полярная; фракция 4 – наиболее полярная (таблица 8).

Таблица 8 – Выход фракций, выделяемых методом СФЭ из растений вида *L. gmelinii* в градиентном режиме

Фракция	$EtOH/H_2O$ (75:25)	CO_2	Выход, % (Корни)	Выход, % (НЧ)
1	45	55	9.94	12.08
2	75	25	3.39	4.47
3	85	15	5.27	1.26
4	92	5	4.61	1.20

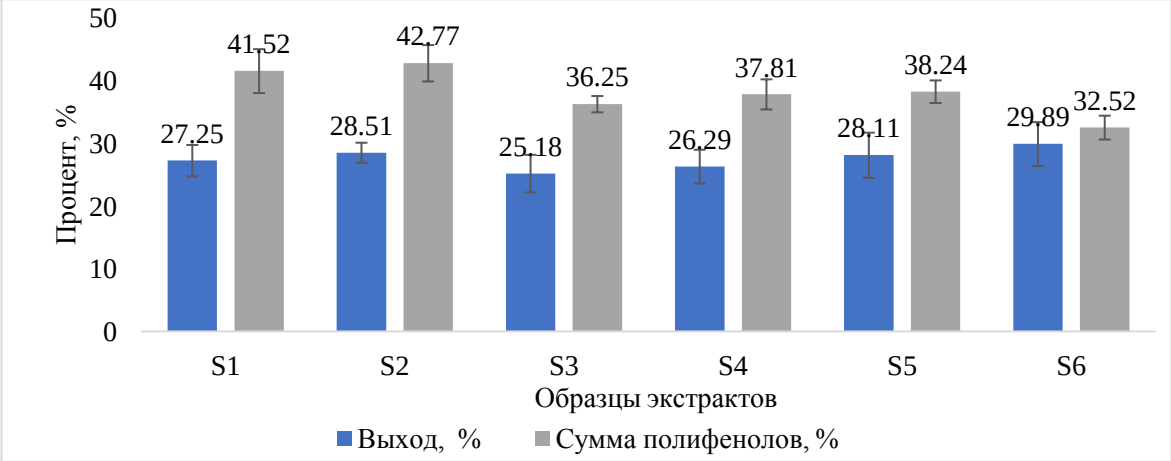
Полученные углекислотные экстракты из НЧ (фракции 1 и 2) характеризуются мазеподобной густой консистенцией, а из корней и НЧ (фракции 3 и 4) – сухие кристаллические порошки, цвет которых варьировался от золотисто-желтой до коричневого и темно-коричневого оттенка со своеобразным приятным запахом, характерным для исследуемого вида растения.

3.2.3 Сравнительный анализ методов получения растительных субстанций из корней и надземной части растений вида L. gmelinii методами классической мацерации, ультразвуковой экстракции и сверхкритической флюидной экстракции

В ходе оптимизации методик УЗЭ и СФЭ и сравнительного анализа количественных показателей выхода субстанций и ДВ из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii*, установлено, что метод УЗЭ более оперативен, прост в исполнении и эффективен.

Практический интерес также представляло сравнение эффективности методов УЗЭ, СФЭ и мацерации, запатентованного ранее способа получения субстанций, заключающийся в проведении двухкратной экстракции в течение 5 часов 50.0 % этиловым спиртом. Для оценки трех методов экстракции было получено 6 субстанций (S1 – S3 из корней, полученные методами УЗЭ, КМ и СФЭ, соответственно; S4 – S6 из надземной части, полученные методом УЗЭ, КМ и СФЭ, соответственно), которые изучали на выход (%) и на общее содержание в них суммы полифенолов.

Было установлено, что выходы субстанций методами УЗЭ и КМ и содержание суммы полифенолов в них различается незначительно (рисунок 11) для обоих частей растения.



Примечание: S1 – субстанция из корней, полученная методом УЗЭ; S2 – субстанция из корней, полученная методом КМ; S3 – субстанция из корней, полученная методом СФЭ; S4 – субстанция из НЧ, полученная методом УЗЭ; S5 – субстанция из НЧ, полученная методом КМ; S6 – субстанция из НЧ, полученная методом СФЭ

Рисунок 11 – Сравнительный анализ способов получения субстанций из растений вида *L. gmelinii*

Как видно из данных, представленных на рисунке 11, при экстракции корней методы УЗЭ и КМ позволяют достичь одинаково высоких показателей выхода субстанций: 27.25 и 28.51 %, соответственно и общей суммы полифенолов в них 41.52 и 42.77 % соответственно. Метод СФЭ при получении субстанции из корней был менее эффективным с выходом, равным 26.08 % и содержанием суммы полифенолов 36.25 %.

В случае экстракции НЧ достигаются следующие выходы субстанций: для УЗЭ, КМ и СФЭ – 26.29, 28.11 и 29.89 %, соответственно, с содержанием суммы полифенолов в них в количестве 37.81, 38.24 и 32.52 %, соответственно. Все три метода демонстрируют сопоставимо высокие показатели экстракции для извлечения комплекса БАВ из НЧ растений вида *L. gmelinii* (рисунок 11).

Таким образом, сравнительный анализ различных методов экстракции показал, что классической мацерации, запатентованной ранее как способ получения субстанций из растений вида *L. gmelinii*, альтернативой могут быть УЗЭ для НЧ и корней, а также СФЭ для НЧ. Однако, сравнивая СФЭ и УЗЭ, стоит отметить простоту, экономичность и оперативность последнего метода, что способствовало последующему анализу химического состава субстанций, полученных данной техникой экстракции.

3.2.4 Сравнительный анализ химического состава растительных субстанций из корней и надземной части растений вида L. gmelinii с помощью метода LC-QToF-MS

Еще одним доказательством сопоставимости УЗЭ и КМ методов стало отсутствие различий в хроматографических профилях субстанций при проведении LC-QToF-MS анализа. Данные по химическому составу были

получены с использованием как положительного, так и отрицательного режима источника ионизации электрораспылением (ESI). Было найдено, что фенолокислоты и их производные ионизировались в отрицательном режиме, тогда как флавоноиды ионизировались как в положительном, так и в отрицательном режимах. Идентифицированные соединения были обобщены в таблице 9, с описанием их времени удерживания, молекулярных формул, значения m/z как в положительном, так и в отрицательном режимах, а также основных ионов массовых фрагментов. На основании фрагментных ионов и при сопоставлении данных с ранее опубликованными исследованиями было идентифицировано 62 соединения [201].

Субстанции S1 и S2, полученные из корней, содержали большее количество сульфатированных производных фенолокислот и флавоноидов. Субстанции S3 и S4, полученные из надземной части, содержали больше флавоноидов в виде агликонов.

Также, согласно полученным данным лигнанамиды и N-трансферулоилтирамин не наблюдались в профилях субстанций из корней.

Таблица 9 – Характеристика фитохимических соединений в субстанциях из НЧ и корней растений вида *L. gmelinii* с использованием LC-QToF в режимах положительной и отрицательной ионизации

№	RT (мин)	Название соединения	Молекулярная формула	Масса	$[M+H]^+$	Фрагментарные ионы (Режим оположительных ионов)	$[M-H]^-$	Фрагментарные ионы (Режим отрицательных ионов)	НЧ		Корни	
									КМ	УЗЭ	КМ	УЗЭ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Сульфатированные фенольные кислоты и флавоноиды												
1	3.40	6'-сульфосалидрозид	$C_{14}H_{20}O_{10}S$	380.0777	-	-	379.0704 (379.0704)*	96.9602	+	+	н.о	н.о
2	3.71	Сульфоновая кислота	$C_8H_{10}O_5S$	218.0249	-	-	217.0184 (217.0176)	96.9605	+	+	н.о	н.о
3	4.66	п-кумароил-(β-D-глюкоза-6-О-сульфат)	$C_{15}H_{18}O_{11}S$	406.0570	-	-	405.0506 (405.0497)	247.0291, 241.0034, 163.0404, 96.9607	+	+	н.о	н.о
4	7.09	Дигидромирицетин-3'-О-сульфат	$C_{15}H_{12}O_{11}S$	400.0100	-	-	399.0032 (399.0028)	319.045, 151.003, 137.0245	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
5	11.41	Дезокси-дигидромирицетин-3'-О-сульфат	$C_{15}H_{12}O_{10}S$	384.0151	-	-	383.0083 (383.0078)	151.0042	+	+	+	+
6	12.70	Мирицетин-3'-О-сульфат	$C_{15}H_{10}O_{11}S$	397.9944	-	-	396.9874 (396.9871)	317.0308,151.003, 137.0246	+	+	+	+
7	13.09	Пинорезинол-4-сульфат	$C_{20}H_{22}O_9S$	438.0985	-	-	437.0920 (437.0912)	396.9873, 380.9929	+	+	н.о	н.о
Фенолокислоты/производные												
8	1.64	Глюкогаллин	$C_{13}H_{16}O_{10}$	332.0743	-	-	331.0677 (331.0671)	211.0253, 169.0148, 123.0069	но	но	+	+
9	2.04	Галловая кислота	$C_7H_6O_5$	170.0215	-	-	169.0148 (169.0142)	125.0250	+	+	+	+
10	2.90	Протокатеховая кислота	$C_7H_6O_4$	154.0266	-	-	153.0202 (153.0193)	109.0299	+	+	+	+
11	8.94	Сиринговая кислота	$C_9H_{10}O_5$	198.0528	-	-	197.0459 (197.0455)	169.0148	+	+	+	+
Флавоноиды												
12	2.84	Галлокатехин/эпигаллокатехин/3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван	$C_{15}H_{14}O_7$	306.074	307.0812 (307.0812)	139.0382	305.0669 (305.0667)	137.0246	+	+	+	+
13	3.24								+	+	+	+
14	4.00								+	+	+	+
15	4.93								+	+	+	+

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
16	4.46	(+)–галлокатехин–(4α→8)–[(-)–эпигаллокатехин]5–(4β→8)–(-)–эпигаллокатехин галлат	$C_{52}H_{42}O_{25}$	1066.2015	1067.2075 (1067.2088)	763.1495, 475.0858, 287.0547, 153.0181, 139.0372	1065.1934 (1065.1942)	761.1318	но	но	+	+
17	6.00								но	но	+	+
18	6.67								но	но	+	+
19	5.00	(-)-Эпигаллокатехин-(4β→8)-(-)-эпигаллокатехин-3-О-галлат	$C_{37}H_{30}O_{18}$	762.1432	763.1508 (763.1505)	307.0817, 139.0392	761.1358 (761.1359)	423.0715	+	+	+	+
20	6.07	Эпигаллокатехин-(2β→7,4β→8)-эпигаллокатехин-3-О-галлат	$C_{37}H_{28}O_{18}$	760.1276	761.1348 (761.1348)	287.0544, 139.0389	759.1200 (759.1203)	453.1038	+	+	+	+
21	6.59	3-О-галлолепигаллокатехин (4β→8)-эпигаллокатехин-3-О-галлат/теазинензин А/теазинензин D	$C_{44}H_{34}O_{22}$	914.1542	915.1607 (915.1614)	745.1371, 595.1069, 457.0760, 287.0555, 153.0186	913.1477 (913.1469)	423.0729, 285.0405	+	+	+	+
22	6.98								+	+	+	+
23	9.75								+	+	+	+
24	6.72	Эпигаллокатехин галлат/Галло-эпикатехин галлат	$C_{22}H_{18}O_{11}$	458.0849	459.0926 (459.0922)	289.0711, 139.0393	457.0777 (457.0776)	305.0681, 169.0157	+	+	+	+
25	7.45								+	+	+	+
26	7.13	Апигенин диглюкозид	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.1585	595.1652 (595.1657)	433.1140, 271.0605	593.1506 (593.1512)	-	но	но	+	+
27	7.83	Мирицетин 7-(6'/6"-галлоилглюкозид)	$C_{28}H_{24}O_{17}$	632.1013	633.1089 (633.1086)	481.0966, 319.0446, 287.0545, 153.0180	631.0947 (631.0941)	559.0402, 479.0836, 317.0307	+	+	+	+
28	8.13					319.0455, 153.0182		479.0832, 316.0226	+	+	+	+

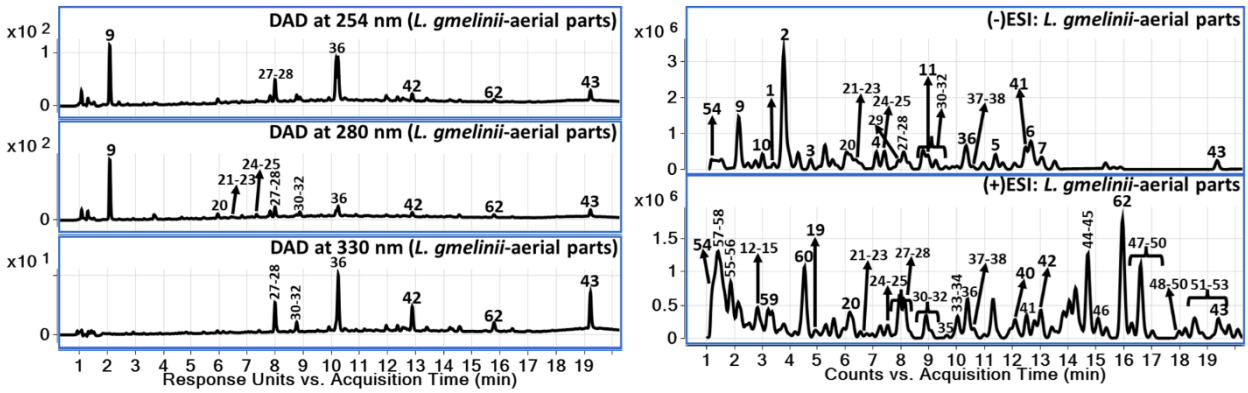
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
29	7.91	Самарангенин B	$C_{44}H_{32}O_{22}$	912.1385	913.1449 (913.1458)	743.1225, 617.0932, 455.0596	911.1305 (911.1312)	-	+	+	+	+
30	8.67	Мирицетин 3-галактозид (Гмелинозид I)/Мирицетин 3-β-D-сорбозид/Мирицетин 3-глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{13}$	480.0904	481.0974 (481.0977)	319.0451	479.0836 (479.0831)	316.0235	+	+	+	+
31	8.91								+	+	+	+
32	9.10								+	+	+	+
33	9.46	Мирицетин 3-ксилозид	$C_{20}H_{18}O_{12}$	450.0798	451.0871 (451.0871)	319.0453	449.0727 (449.0725)	316.0229	+	+	+	+
34	10.05								+	+	+	+
35	9.62	Кверцетин 3-(2"-галлоил)-галактозид	$C_{28}H_{24}O_{16}$	616.1064	617.1142 (617.1137)	303.0496	615.0992 (615.0992)	301.0350	но	но	+	+
36	10.38	3,3',4',5,5',7-гексагидроксифлавон; 3-O-[рамнопиранозил-(1→2)-рамнопиранозид]	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.1534	611.1607 (611.1606)	465.1043, 319.0461	609.1461 (609.1461)	463.0893, 316.0233	+	+	+	+
37	10.60	Кверцетин глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.0955	465.1030 (465.1028)	303.0497	463.0881 (463.0882)	301.0346	+	+	но	но
38	10.86								+	+	но	но
39	11.06	Мирицетин-3-O-[3,4,5-тригидроксибензоил-(→2)-α-L-арабинопиранозид]	$C_{27}H_{22}O_{16}$	602.0908	603.0985 (603.0981)	319.0441, 153.0180	601.0834 (601.0835)	317.0303	но	но	+	+
40	12.2	Мирицетин	$C_{15}H_{10}O_{8}$	318.0376	319.0453 (319.0448)	153.0183	317.0310 (317.0303)	151.0041, 137.0246	+	+	+	+
41	12.50	Кверцетин рамнозид (Кверцитрин)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.1006	449.1080 (449.1082)	303.0504	447.0929 (447.0933)	301.0354	+	+	+	+
42	12.99	Апигенин-7-глюкуронид	$C_{21}H_{18}O_{11}$	446.0849	447.0925 (447.0922)	271.0611	445.0780 (445.0776)	269.0456	+	+	но	но

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
43	19.37	Апигенин	$C_{15}H_{10}O_5$	270.0528	271.0603 (271.0601)	153.0185, 119.0489	269.0460 (269.0455)	117.0351	+	+	но	но
Лигнанамиды												
44	14.92	Каннабизин А	$C_{34}H_{30}N_2O_8$	594.2002	595.2081 (595.2075)	-	-	-	+	+	но	но
45	14.95	Лимониумин А	$C_{26}H_{19}NO_7$	457.1162	458.1236 (458.1234)	287.0550	-	-	+	+	но	но
46	15.14	Каннабизин В/3,3'-деметилгелиотропамид	$C_{34}H_{32}N_2O_8$	596.2159	597.2235 (597.2231)	295.0599, 187.0391, 153.0181	-	-	+	+	но	но
47	16.40	Лимониумин Б	$C_{27}H_{21}NO_7$	471.1318	472.1382 (472.1391)	287.0547	-	-	+	+	но	но
48	16.80	Лимониумин F/H/I/Каннабизин С	$C_{35}H_{34}N_2O_8$	610.2315	611.2383 (611.2388)	287.0546	-	-	+	+	но	но
49	17.10								+	+	но	но
50	17.73								+	+	но	но
51	18.52	Каннабизин Д/Ф	$C_{36}H_{36}N_2O_8$	624.2472	625.2544 (625.2544)	367.2091	-	-	+	+	но	но
52	18.81								+	+	но	но
53	19.20								+	+	но	но
Другие												
54	1.11	Холин-О-сульфат	$C_5H_{13}NO_4S$	183.0565	184.0638 (184.0638)	104.1072 (Choline)	182.0487 (182.0493)	-	+	+	+	+
55	1.20	Лейцин/Изолейцин (Аминокислоты)	$C_6H_{13}NO_2$	131.0946	132.1022 (132.1019)	86.0957	-	-	+	+	+	+
56	1.81								+	+	+	+
57	1.32	Лимонная кислота/Изолимонная кислота	$C_6H_8O_7$	192.0270	-	-	191.0197 (191.0202)	111.0089	+	+	но	но

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
58	1.41								+	+	но	но
59	3.10	2-Этилцитрат	$C_8H_{12}O_7$	220.0583	-	-	219.0520 (219.0513)	183.0305, 111.0086	+	+	но	но
60	4.51	Гидроксихинолин (производное хинолина)	C_9H_7NO	145.0528	146.0604 (146.0600)	128.0495, 91.0546, 77.0391	-	-	+	+	но	но
61	6.32	Секологанин (Секоиридоидный монотерпен)	$C_{17}H_{24}O_{10}$	388.1369	389.1436 (389.1442)	227.0911, 181.0491	-	-	но	но	+	+
62	15.95	N-транс-феруloилтирамин (Алкалоид)	$C_{18}H_{19}NO_4$	313.1314	314.1385 (314.1381)	177.0541, 145.0281, 117.0330	-	-	+	+	+	+

* теоретическая точная масса; «+» обозначает наличие соединения, «н.о» - не обнаружено в экстракте соответствующей части растения

Хроматограммы LC-DAD при длинах волн 254, 280 и 330 нм субстанций из надземной части и корней растений вида *L. gmelinii* представлены на рисунке 12 (а). Репрезентативные хроматограммы в положительном и отрицательном режиме ионизации представлены также на рисунке 12 (б).



(а) (б)

Рисунок 12 – Хроматограммы LC-DAD-QToF субстанций из растений вида *L. gmelinii*: хроматограммы LC-DAD при 254, 280 и 330 нм (а) и хроматограммы QToF-MS в отрицательном и положительном режимах (б)

Фенолокислоты, флавоноиды и их сульфатированные производные (1-11)

В субстанциях из НЧ и корней растений вида *L. gmelinii* идентифицировано и предварительно охарактеризовано 11 фенолокислот, флавоноидов и их сульфатированных производных. Среди них соединение 6 в больших количествах содержится в корнях, элюируемое на 12,7 минуте. Ион-предшественник с m/z 396,9874 [M-H]- наблюдался вместе с основным фрагментным ионом m/z 317,0308 [Мирицетин-H]-. Дальнейшие фрагментные ионы с m/z 151,0039 и 137,0246 являются характерными ионами мирицетина согласно опубликованным исследованиям [171,202,203]. На основе этих фрагментных ионов соответствующая молекулярная формула была идентифицирована как мирицетин-3-О-сульфат, который является одним из основных соединений в субстанциях, полученных из корней. Аналогичным образом были идентифицированы другие фенолокислоты, такие как галловая кислота, протокатеховая кислота, сиреневая кислота, глюкогаллин и сульфатированные производные. Наблюдаемые фрагментные ионы приведены в таблице 9.

Флавоноиды (12-43)

Флавоноиды являются одним из основных классов соединений, обнаруженных, как в субстанциях из корней, так и в субстанциях из НЧ. Согласно профилям LC-DAD (рисунок 12), субстанции из НЧ содержат большее количество флавоноидов по сравнению с субстанциями из корней. Предварительная характеристика флавоноидов была проведена, основываясь на данных предыдущего исследования [171]. Производные галлокатехина, апигенина, кверцетина и мирицетина являются доминирующими, и обнаружены на основании их агликоновых фрагментов, как показано в таблице 9.

Лигнанамиды (44-53)

В субстанциях из НЧ обнаружены соединения класса лигнанамидов, которые являются характерными соединениями *L. gmelinii*. Это азотсодержащие соединения с характерным фрагментным ионом m/z 287,0547, наблюдаемым для производных лимониумина [172,202].

Другие соединения (54-62)

Помимо вышеупомянутых классов соединений, в субстанциях из растений вида *L. gmelinii* были найдены холин-О-сульфат, лейцин и изолейцин (аминокислоты), лимонная кислота и ее производные, секологанин (секоидоидный монотерпен), производное хинолина и N-трансферулоилтираминовый алкалоид.

Анализ LC-QToF-MS показал богатый компонентный состав всех полученных субстанций, с такими ценными биологически активными соединениями, как апигенин [204], эпигаллокатехин-3-О-галлат и кверцетин [127], обладающие противовоспалительным и иммуномодулирующим потенциалом. Однако, различные способы экстракции, а именно УЗЭ и КМ, приводили к получению субстанций из исследуемого растительного сырья с идентичным химическим составом. Оба метода позволили равноценно извлечь комплекс БАВ, характерный для растений вида *L. gmelinii*, и являются

взаимозаменяемыми. Метод УЗЭ, как было отмечено ранее, обладает некоторыми преимуществами, поскольку позволяет значительно быстрее и проще получить субстанции с меньшим расходом растворителей, а также является более «экологичным» [205].

3.2.5 Сравнительный анализ моносахаридного состава растительных субстанций из растений вида L. gmelinii

Полисахариды растительного происхождения являются ценной группой БАВ, интерес к которым вызван их высокой противовоспалительной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностям [114] . На активность полисахаридов влияют их моносахаридный состав, молекулярная масса, степень разветвления, тип гликозидной связи и конформация [138]. В данной работе впервые изучался моносахаридный состав экстрактов из растений вида *L. gmelinii*.

Были изучены субстанции, полученные методами УЗЭ, СФЭ, КМ, а также более очищенные полярные фракции, приготовленные градиентной СФЭ, как описано в главе 3.2.2 (фракция 1).

Дополнительно субстанции из корней (S1) и НЧ (S4) были очищены на колонках С-18 методом твердофазной экстракции. А именно, каждую из субстанций растворяли в воде, помещали на колонку и далее элюировали метиловым спиртом до обесцвечивания колонки от желтого цвета, характерного для флавоноидных соединений, и промывали водой до полной очистки колонки. Полученные экстракты сушили в мягких условиях, используя возможности роторного испарителя. Выходы сухих экстрактов после их очистки методом твердофазной экстракции в процентах были следующие: водный и метанольные экстракты из корней в количестве 56.36 и 18.48 % и из НЧ 67.65 и 20.90 % соответственно. Полученные метанольные и водные фракции анализировали методом H^1ЯМР для определения химической природы выделенных фракций. Как и ожидалось, ЯМР спектральные данные метанольных фракций субстанций из корней и НЧ содержали интенсивные сигналы в ароматической зоне 6-8 м.д., которые соответствуют сдвигам протонов ароматического ядра, что свидетельствовало о наличии в этой фракции большего количества полифенольных соединений (рисунки 13, 14).

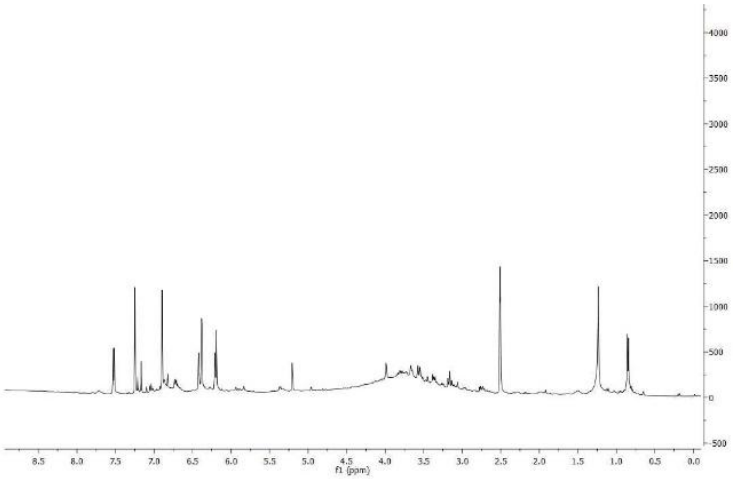


Рисунок 13 – H^1ЯМР спектр метанольной фракции, выделенной методом ТФЭ из субстанции S1

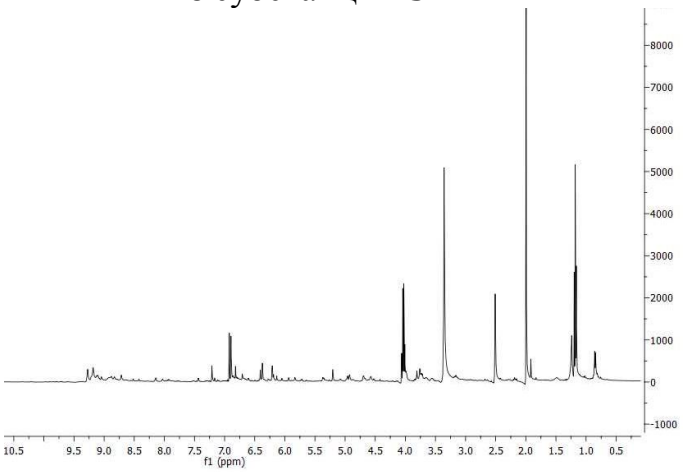


Рисунок 14 – H^1ЯМР спектр метанольной фракции, выделенной методом ТФЭ из субстанции S4

В ЯМР-спектре водных фракций присутствовали более интенсивные сигналы, предположительно, соответствующие сдвигам протонов карбонильной и карбоксильной групп углеводов в области 2.5–5.5 м.д., и незначительное количество пиков в ароматической зоне (рисунки15, 16).

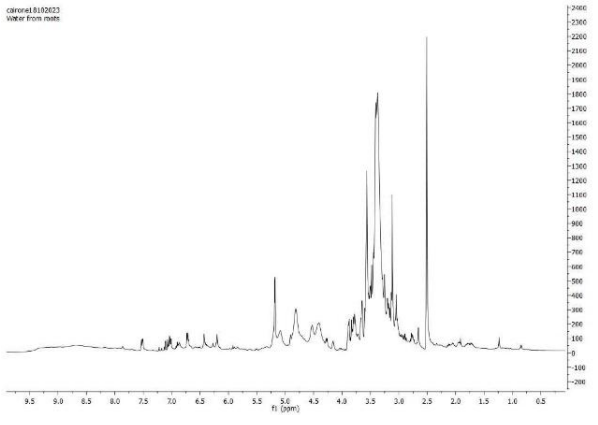


Рисунок 15 – H^1ЯМР спектр водной фракции, выделенной методом ТФЭ из субстанции S1

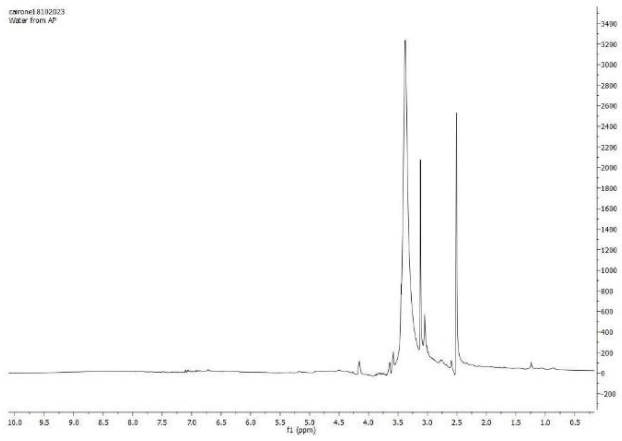


Рисунок 16 – H^1ЯМР спектр водной фракции, выделенной методом ТФЭ из субстанции S4

Экстракты, полученные после ТФЭ, далее были исследованы на моносахаридный состав полисахаридов. Полисахаридный комплекс выделяли осаждением этиловым спиртом из субстанции, растворенной в воде, с последующим промыванием осадка от сопутствующих веществ, растворением его в воде и лиофилизацией.

Первым шагом в определении состава моносахаридов является расщепление полисахаридов на моносахариды [142]. Моносахаридный состав анализировали после их дериватизации как ацетилированные метилгликозиды (АМГ), а положения связей были получены путем анализа частично метилированных ацетатов альдитола (МАА) [186]. АМГ анализировали с помощью ГХ-МС и идентифицировали по времени удерживания и характеру фрагментации в сравнении со стандартами. Результаты проведенного исследования моносахаридного состава всех вышеперечисленных образцов суммированы в таблице 10 и позволяют предположить, что во всех экстрактах, полученных из корней и НЧ, присутствуют рамноза (Rha), арабиноза (Ara), глюкуроновая кислота (GlaA), манноза (Man), галактоза (Gal), и глюкоза (Glc). Анализ ГХ-МС выделенных экстрактов из НЧ выявил также присутствие ксилозы (Xyl) и галактуроновой кислоты (GalA).

Таблица 10 – Моносахаридный состав растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii*

Моносахариды	Rha	Xyl	Ara	GlcA	GalA	Man	Gal	Glc
1	2	3	4	5	6	7	8	9
S1 (УЗЭ, корни)	+		+	+		+	+	+
S2 (КМ, корни)	+		+	+		+	+	+
S3 (СФЭ, корни)	+		+	+		+	+	+
Фракция 1, методом СФЭ (корни)	+		+	+		+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Водная фракция, полученная из S1 методом ТФЭ (корни)	+		+	+		+	+	+
S4 (УЗЭ, НЧ)	+	+	+	+	+	+	+	+
S5 (КМ, НЧ)	+	+	+	+	+	+	+	+
S6 (СФЭ, НЧ)	+	+	+	+	+	+	+	+
Фракция 1, полученная в градиентном режиме СФЭ (НЧ)	+	+	+	+	+	+	+	+
Водная фракция, полученная из S1 методом ТФЭ (корни)	+	+	+	+	+	+	+	+

На рисунке 17 показан пример хроматограмм ГХ-МС АМГ, полученных для растительных субстанций из корней и надземной части из растений вида *L. gmelinii*.

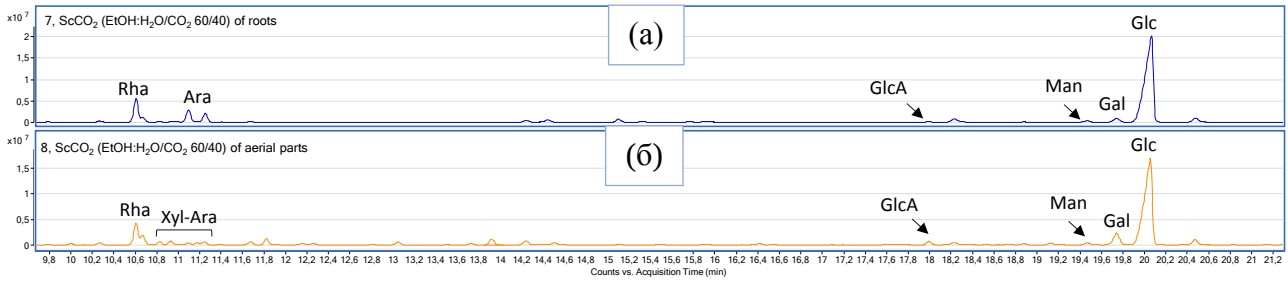


Рисунок 17 – Хроматограммы АМГ экстрактов из корней (а) и НЧ (б), выделенных методом СФЭ

Анализ ГХ-МС частично метилированных ацетатов альдитола (МАА) выявил положения связей с преобладанием терминальной ксилозы, терминальной арабинозы, терминальной рамнозы и 3,4-рамнозы в обеих субстанциях (таблица 11), что дает представление о главной углеводной цепи выделенных полисахаридов из субстанций.

Таблица 11 – Анализ метилированных ацетатов альдитолов

Моносахарид	Xyl	Ara	Rha
S1 (УЗЭ, корни)	-	Ara- терминальная	Rha-терминальная Rha-3,4
S4 (УЗЭ, НЧ)	Xyl- терминальная	Ara- терминальная	Rha-3,4

Исходя из полученных данных, метод экстракции не влиял на тип выделяемых полисахаридов, что еще раз подтверждало то, что отработанные оптимальные условия экстракции позволяли полноценно извлечь весь комплекс БАВ из исследуемого растения. Для полисахаридов, состоящих из идентифицированных выше моносахаридов, имеются данные о наличии противоопухолевой, антиоксидантной [142], гепатопротекторной [143], иммуномодулирующей [144] и др. активностях, что безусловно, повышает интерес к дальнейшим исследованиям данного класса соединений растений вида *L. gmelinii*.

3.3 Исследование антибактериальной активности растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii*

Обзор литературы в главе 1.4, показал, что существует спрос на фитокомпоненты с антибактериальной активностью в отношении кожных заболеваний, способных к тому же повышать кожные иммунологические процессы, оказывая противовоспалительное действие [90]. В связи с этим было интересно провести скрининг антибактериальной активности всех полученных субстанций.

Оценку антибактериальной активности растительных субстанций *in vitro* проводили путем оценки их способности ингибировать рост микробов с помощью анализа зоны ингибирования – диффузионного метода ингибирования роста штаммов на плотной питательной агаровой среде [206]. Исследуемые образцы растворяли в ДМСО в концентрации 10 мг/мл и проводили аппликацию дисков на расстоянии не менее 15 мм от края чашки и не менее 30 мм между дисками. После инкубирования в течение 24 часов антибактериальную активность оценивали по размеру диаметра зон задержки роста.

Результаты биологического скрининга продемонстрировали отсутствие активности в отношении эталонных грамотрицательных (*E. coli* ATCC 25922) бактериальных штаммов у всех выделенных субстанций. Полученные результаты согласуются с литературными данными, подтверждающие низкую активность субстанций из корней и надземной части *L. gmelinii* в отношении данных бактерий [167,207].

В то же время, в ходе сравнительного скрининга было установлено, что субстанции ингибировали рост грамположительных (*S. epidermidis* ATCC 12228) бактериальных штаммов (рисунок 18) с более высокими показателями у субстанций, выделенных из корней в сравнение с надземной частью.

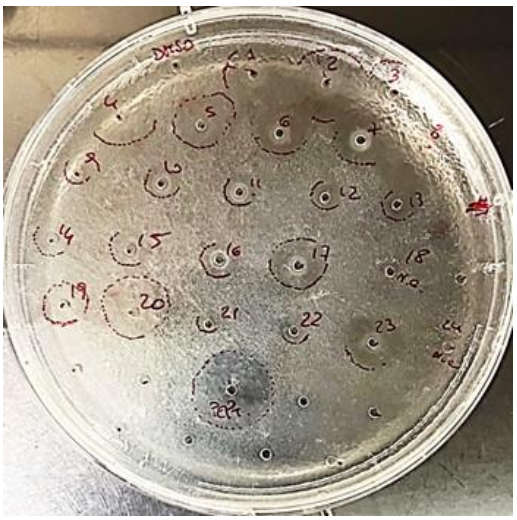


Рисунок 18 – Результаты тестирования антибактериальной активности растительных субстанций из корней и надземной части *L. gmelinii*, полученных методами КМ, УЗЭ и СФЭ, в отношении *S. epidermidis*. Зоны ингибиции роста тест-штамма отмечены окружностями

Диаметры задержки роста тест - штаммов представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты тестирования антибактериальной активности растительных субстанций из корней и надземной части *L. gmelinii*, полученных методами КМ, УЗЭ и СФЭ, в отношении бактериальных штаммов

№	Субстанции	Зона ингибирования (см)	
		Грам-	Грам+
		E. coli	*S. epidermidis*
1	2	3	4
1	S1 (УЗЭ, корни)	н.а.	1.34±0.37
2	S2 (КМ, корни)	н.а.	1.43±0.46
3	S3 (СФЭ, корни)	н.а.	1.29±0.35
4	Фракция 1, полученная в градиентном режиме СФЭ (корни)	н.а.	1.59±0.26
5	Фракция 2, полученная в градиентном режиме СФЭ (корни)	н.а.	1.19±0.37
6	Фракция 3, полученная в градиентном режиме СФЭ (корни)	н.а.	1.28±0.06
7	Фракция 4, полученная в градиентном режиме СФЭ (корни)	н.а.	1.24±0.19
8	Метанольная фракция, полученная из S1 методом ТФЭ	н.а.	1.91±0.14

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
9	Водная фракция, полученная из S1 методом	н.а.	0.63±0.02
10	S4 (УЗЭ, НЧ)	н.а.	0.86±0.02
11	S5 (КМ, НЧ)	н.а.	0.87±0.12
12	S6 (СФЭ, НЧ)	н.а.	0.93±0.21
13	Фракция 1, полученная в градиентном режиме СФЭ (НЧ)	н.а.	0.81±0.15
14	Фракция 2, полученная в градиентном режиме СФЭ (НЧ)	н.а.	0.98±0.02
15	Фракция 3, полученная в градиентном режиме СФЭ (НЧ)	н.а.	1.06±0.21
16	Фракция 4, полученная в градиентном режиме СФЭ (НЧ)	н.а.	1.14±0.22
17	Метанольная фракция, полученная из S4 методом ТФЭ	н.а.	1.62±0.23
18	Водная фракция, полученная из S4 методом ТФЭ	м.а.	м.а.
19	DMSO	н.а.	н.а.
н.а.= не активна. Данные представляют собой среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов			

Было также выявлено, что метанольные фракции, выделенные методом твердофазной экстракции (ТФЭ) из корней и надземной части, зоны ингибирования составляют 1.91±0.14 и 1.62±0.23 см, соответственно, проявляют активность несколько выше в сравнение с суммарными экстрактами, зоны ингибирования составляют 1.34±0.37 и 0.86±0.02 см, соответственно. Активность же водных фракций из корней (зона ингибирования – 0.63±0.02 см) была в три раза ниже активности метанольной фракции (зона ингибирования 1.91±0.14) и в два раза ниже активности самой субстанции S1 (зона ингибирования 1.34±0.37 см), в то время как, водные фракции после ТФЭ из НЧ вообще не обладали активностью.

Сопоставляя полученные результаты с ранее приведенным химическим составом полифенолов и полисахаридов, можно сделать вывод о том, что антибактериальная активность субтанций, выделенных и растений вида *L. gmelinii* в большей степени связана с наличием в них полифенолов различной природы нежели полисахаридов.

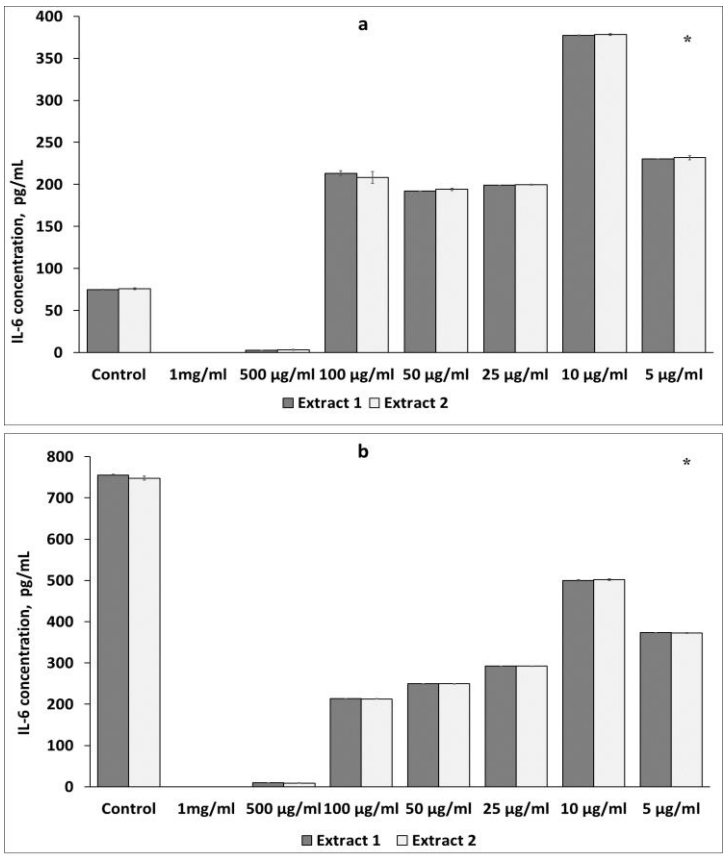
3.4 Исследование иммуномодулирующей активности растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii*

3.4.1 Влияние растительных субстанций из растений вида L. gmelinii на уровни IL-6 в мышиных макрофагах и лимфоцитах

В данное время иммуномодулирующая активность растительных экстрактов, является объектом множества исследований, которые подтверждают их высокий потенциал в действии на иммунные процессы. Для ряда растений доказано иммуноингибирующее действие, заключающееся в подавлении экспрессии провоспалительных цитокинов, обусловленное наличием полифенольных и флавоноидных компонентов [208–210]. И напротив, в некоторых исследованиях сообщается об иммуностимулирующем действии экстрактов, богатых полифенольными соединениями. Так, например, метанольный экстракт *P. Campechiana* в зависимости от концентрации повышал выработку IL-6 и TNF-α мышиными макрофагами [211]. В другом исследовании показано, что растительная композиция, богатая фенолами и флавоноидами, способна увеличивать уровни TNF-α и снижать IL-10 и IL-6 у иммуносупрессированных мышей [212].

Избыточная продукция провоспалительных медиаторов, таких как IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE2 и др. вызывает каскад воспалительных реакций, и как следствие, может служить причиной развития хронических воспалительных заболеваний [105]. В связи с этим, в настоящей работе изучено влияние растительных субстанций из НЧ растений вида *L. gmelinii* на уровни провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF-α), продуцируемых мышиными лимфоцитами селезенки и макрофагами, и их действие на пролиферативные реакции *in vitro*. Субстанции, полученные методами УЗЭ (Extract 1) и КМ (Extract 2), были оценены на их иммуномодулирующую активность.

Согласно результатам, представленным на рисунке 19-а, обе субстанции оказывали стимулирующее действие на продукцию IL-6 неактивированными макрофагами в концентрации от 100 мкг/мл до 5 мкг/мл (рисунок 19-а). Максимальный стимулирующий эффект на продукцию IL-6 неактивированными макрофагами был обнаружен при концентрации 10 мкг/мл обеих субстанций.

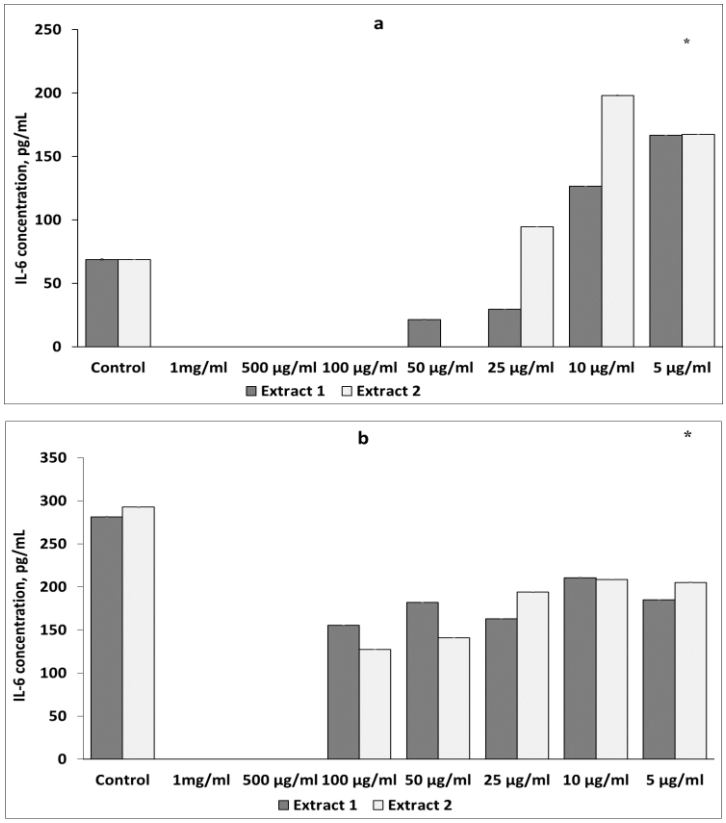


Примечание: в эксперименте использовали контроль: макрофаги без стимуляции и макрофаги, активированные ЛПС. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (n = 6). (*) указывает на существенные различия по сравнению с контролем; p <0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 19 – Влияние субстанций из надземной части растений вида *L. gmelinii* на секрецию IL-6 неактивированными (a) и активированными (b) макрофагами

Как и ожидалось, при действии липополисахарида (ЛПС) на макрофаги повышался уровень IL-6 (747,73 пг/мл; 755,54 пг/мл), который эффективно подавлялся обеими субстанциями (рисунок 19-b). Максимальное почти в 3.5 раза подавление продукции IL-6, вызванное макрофагами, наблюдалось при одинаковой концентрации 100 мкг/мл для обеих субстанций (рисунок 19-b).

Аналогичные иммуностимулирующие и иммуносупрессивные эффекты субстанций, полученных методами УЗЭ и КМ, были обнаружены на лимфоцитах селезенки. Обработка клеток растворами субстанций вызывало увеличение секреции IL-6 в неактивированных лимфоцитах, как показано на рисунке 20-a. Продукция IL-6 достигала максимума при концентрации 5 мкг/мл при действии Extract 1 и 10 мкг/мл при действии Extract 2.



Примечание: в эксперименте использовали контроль: Т-лимфоциты селезенки без стимуляции и Т-лимфоциты селезенки, активированные ConA. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (n = 6). (*) указывает на существенные различия по сравнению с контролем; p <0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 20 – Влияние субстанций из надземной части растений вида *L. gmelinii* на секрецию IL-6 неактивированными (a) и ConA активированными (b) Т-лимфоцитами селезенки

Напротив, применение субстанций на Конканавалин А (ConA)-активированные лимфоциты селезенки приводило к значительному снижению уровня IL-6 (рисунок 20-b). Максимальное ингибирующее действие на экспрессию IL-6 субстанции оказывали в концентрации 100 мкг/мл (рисунок 20-b).

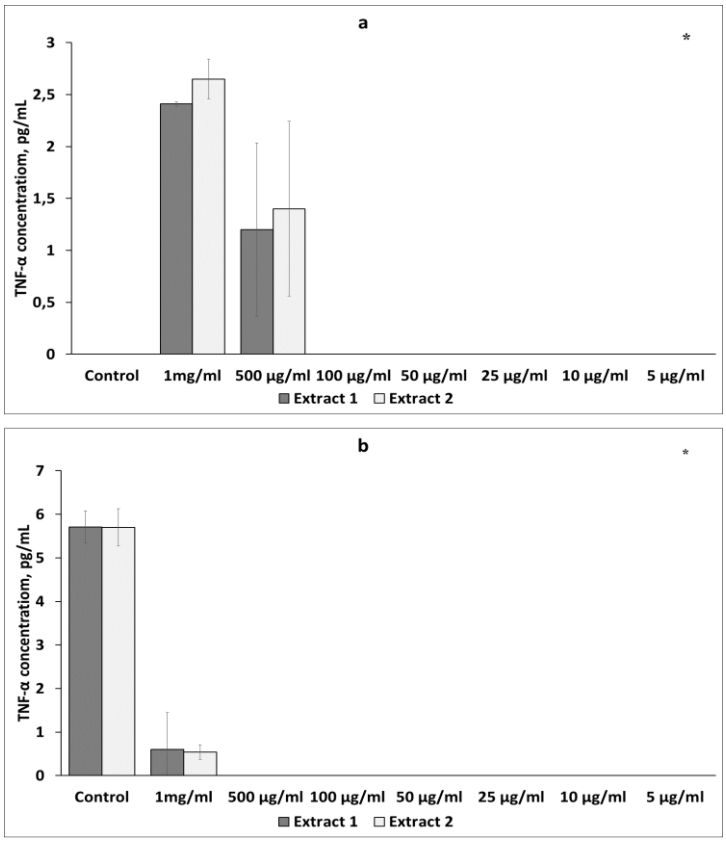
Таким образом, существенной разницы во влиянии Extract 1 и Extract 2, полученные методами УЗЭ и КМ, соответственно, на уровень продукции IL-6 как в интактных, так и в активированных макрофагах и лимфоцитах не наблюдалось.

3.4.2 Влияние растительных субстанций из растений вида L. gmelinii на уровни TNF-α в мышиных макрофагах и лимфоцитах

В ходе исследования был также изучен иммуномодулирующий эффект субстанций из НЧ растений вида *L. gmelinii* на секрецию TNF-α в макрофагах и лимфоцитах мышей. Наблюдалась похожая тенденция повышения уровня TNF-

α в интактных клетках и его снижение в ЛПС-стимулированных макрофагах и КонА-активированных лимфоцитах.

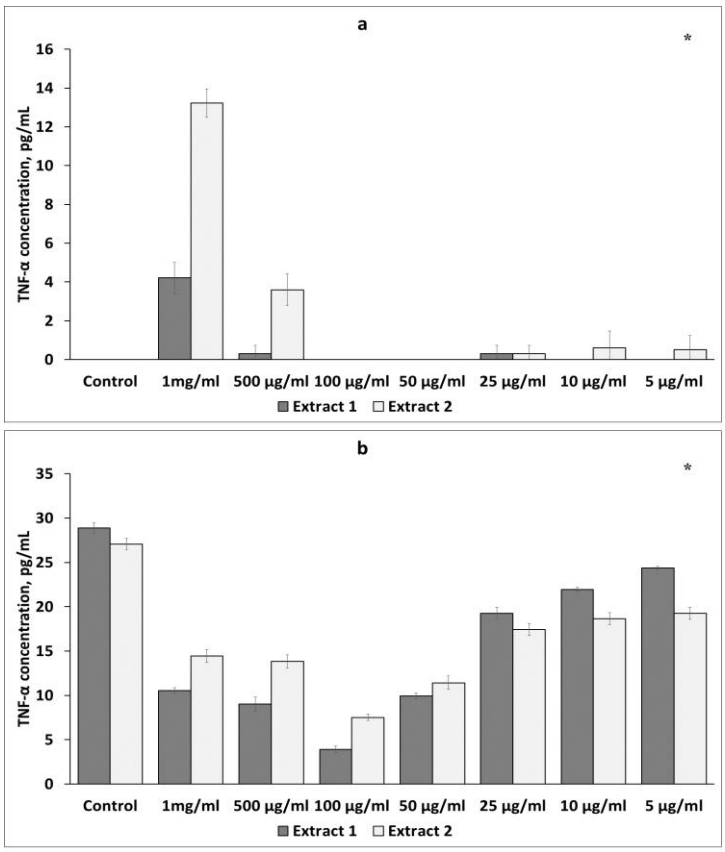
Как показано на рисунке 21-a, субстанции в концентрации 1 мг/мл значительно повышали секрецию TNF-α в интактных макрофагах до 2,41 ± 0,19 пг/мл и 2,65 ± 0,84 пг/мл соответственно. Однако действие обеих субстанций в концентрации 1 мг/мл подавляло уровень продукции TNF-α в активированных макрофагах (рисунок 21-b). Подобных эффектов не наблюдалось при более низких концентрациях растительных экстрактов.



Примечание*:* В эксперименте использовали контроль: макрофаги без стимуляции и макрофаги, активированные ЛПС. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (n = 6). (*) указывает на существенные различия по сравнению с контролем; p <0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 21 – Влияние растительных субстанций из надземной части растений вида *L. gmelinii* на секрецию TNF-α интактными (a) и активированными (b) макрофагами.

При действии субстанций в концентрации 1 мг/мл на неактивированные лимфоциты наблюдалось статистически значимое повышение секреции TNF-α (рисунок 22-a). Однако, при стимулировании лимфоцитов селезенки ConA, экстракты ингибировали секрецию TNF-α при всех концентрациях (рисунок 22-b) с максимальным снижением при дозе 100 мкг/мл.



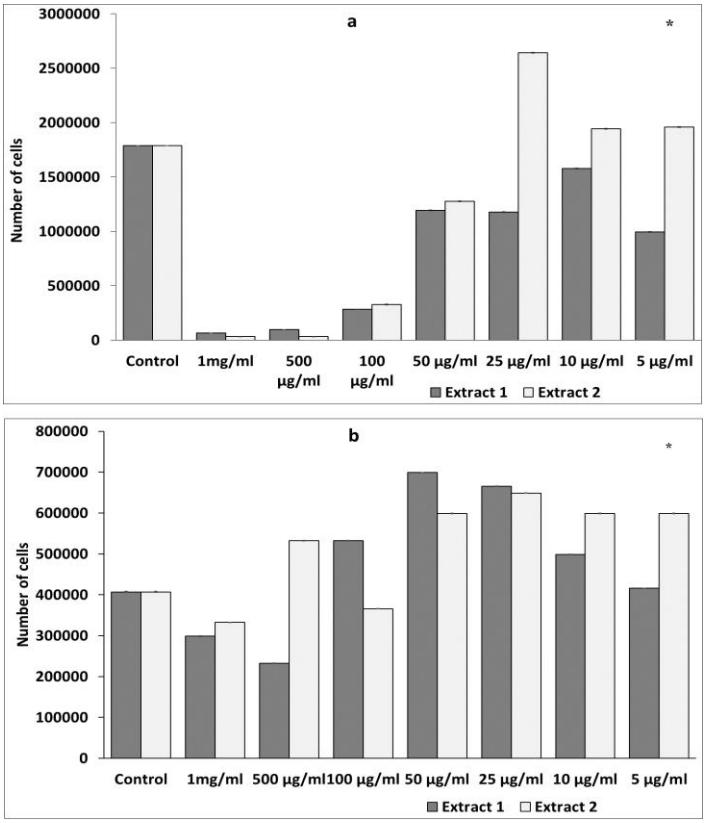
Примечание: в эксперименте использовали контроль: Т-лимфоциты селезенки без стимуляции и Т-лимфоциты селезенки, активированные ConA. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (n = 6). (*) указывает на существенные различия по сравнению с контролем; p <0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 22 – Влияние растительных субстанций из надземной части растений вида *L. gmelinii* на секрецию TNF-α неактивированными (a) и ConA активированными (b) Т-лимфоцитами селезенки

3.4.3 Влияние растительных субстанций из растений вида L. gmelinii на пролиферацию лимфоцитов селезенки мышей

Пролиферация лимфоцитов является критическим этапом при здоровом иммунном ответе, приводящее к инициированию и развитию воспаления. Неконтролируемая пролиферация лимфоцитов также может привести к нежелательным иммунным реакциям организма, вызывая хронические или аутоиммунные заболевания [213].

В ходе исследования было определено иммуномодулирующее действие субстанций на пролиферацию лимфоцитов селезенки, стимулированными Т-клеточным митогеном ConA. Анализ пролиферации клеток показал, что Extract 2 сильнее подавлял пролиферацию активированных лимфоцитов селезенки, чем Extract 1 (рисунок 23-а). Достоверно высокое угнетение количества лимфоцитов селезенки (Extract 1 – 65750±850) и (Extract 2 – 32835±465) наблюдалось при дозе 1 мг/мл по сравнению с контролем (1789364±511 и 1788125±650), соответственно.



Примечание: данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение (n = 6). (*) указывает на существенные различия по сравнению с контролем; p <0,05 по сравнению с контролем.

Рисунок 23 – Влияние растительных субстанций из надземной части растений вида *L. gmelinii* на пролиферацию активированных лимфоцитов селезенки. Контроли, использованные в эксперименте: Т-лимфоциты селезенки без стимуляции (a) и Т-лимфоциты, активированные ConA (b)

С другой стороны, обе субстанции оказывали равнозначное стимулирующее действие на пролиферацию неактивированных лимфоцитов (рисунок 23-b). Максимальное количество пролиферирующих клеток наблюдалось при добавлении 50 мкг/мл Extract 1 и 25 мкг/мл Extract 2 (рисунок 23-b).

Таким образом, субстанции, полученные из надземной части растений вида *L. gmelinii*, эффективно подавляли повышенные уровни TNF-α и IL-6 в ЛПС- и ConA-стимулированных макрофагах и лимфоцитах, соответственно. В то же время при действии субстанций на неактивированные макрофаги и лимфоциты секреция цитокинов значительно повышалась. Также было подтверждено одинаковое стимулирующее или ингибирующее действие субстанций на пролиферацию лимфоцитов в зависимости от их статуса. Однако было установлено, что разница иммуномодулирующей активности субстанций *L. gmelinii*, в зависимости от способа экстракции статистически незначима, что подтверждается приведенными выше данными о химическом составе.

В аналогичных исследованиях иммуномодулирующего действия растений вида *Limonium* было показано, что полисахариды *L. sinense* улучшают фагоцитарную активность макрофагов у мышей с иммуносупрессией и увеличивают пролиферацию и продукцию IFN-γ и IL-2 спленоцитами *in vitro* [161].. А экстракт *L. durusculum* и выделенный из него флавоноид апигенин ингибировали провоспалительные NF-κB транскрипционные ответы в клетках HCT116 и THP-1 [204]. Эти наблюдения, а также результаты настоящего исследования открывают перспективу использования экстрактов *L. gmelinii* и родственных видов для лечения заболеваний, связанных с иммунными нарушениями.

3.5 Технологическая схема производства растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii* методом ультразвуковой экстракции и ее валидация

По результатам сравнительной оценки эффективности методов экстракции для корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* была утверждена оптимизированная технология получения субстанций методом УЗЭ и проведена ее валидация на базе Научно-производственного предприятия «Антиген». Перенос технологий получения субстанций проведен в соответствии с руководящими принципами по трансферу технологии [21,52].

Производство растительной субстанции из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* согласно экспериментальным результатам, представленным в п. 3.2.1, проводится по простой, экономически и экологически целесообразной технологической схеме с высоким выходом при использовании в качестве эксципиента 50.0 % водного раствора этилового спирта, который регенерируется в процессе производства с интенсификацией процесса экстракции воздействием ультразвука.

Технологический процесс состоял из следующих этапов: подготовка сырья (измельчение сырья, подготовка экстрагента), получение жидкого экстракта, предварительная очистка (центрифугирование или отстаивание), фильтрация, сгущение под вакуумом до сухого остатка, упаковка и маркировка. Критическими параметрами процесса производства были определены все критерии спецификаций входного сырья, нерасфасованной и готовой продукции, которые оценивали на соответствие требований нормативных документов [82]. Технологическая схема получения субстанций изображена на рисунке 24.

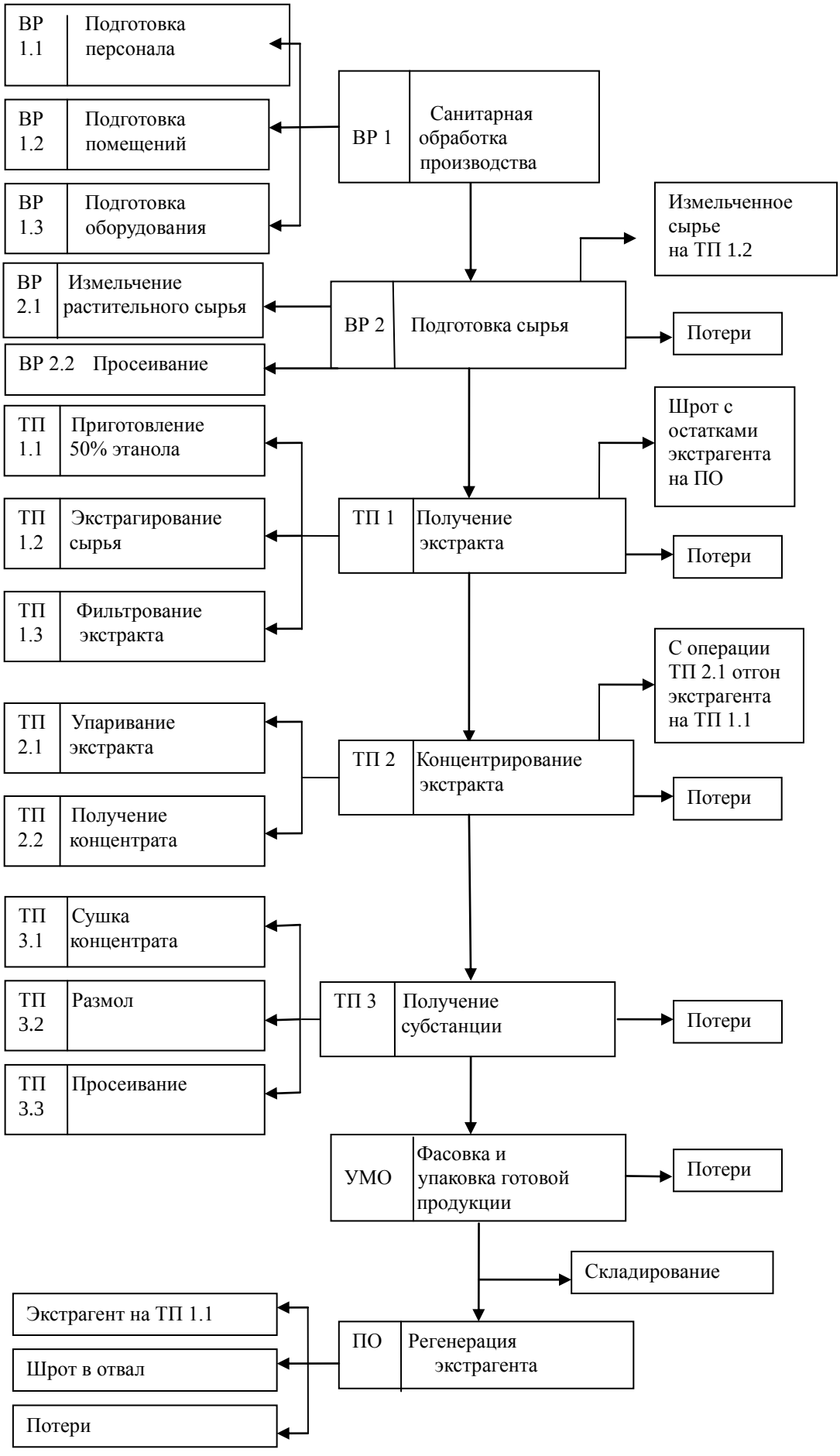


Рисунок 24 – Технологическая схема производства субстанции

Изложение технологического процесса.

ВР-1 Подготовка к технологическому процессу

ВР-1.1 Подготовка персонала

1.1.1 Контролер ОКК должен выдать:

а) мастеру-технологу протокол производственного процесса (далее по тексту ПТП) под запись в журнале «Журнал учета и регистрации протоколов технологического процесса» и заполнить раздел «Проверка предыдущей продукции»;

б) мастеру-технологу и оператору технологическую одежду, соответствующую выполняемым им операциям.

1.1.2 Начальнику производства выдать мастеру-технологу средства индивидуальной защиты, соответствующие выполняемым им операциям.

1.1.3 Мастеру-технологу и оператору:

а) надеть технологическую одежду и средства индивидуальной защиты согласно СОП.

б) вымыть и обработать руки согласно СОП.

ВР-1.2 Подготовка помещений

1.2.1 Мастеру-технологу и операторам смены провести генеральную уборку.

1.2.2 Контролеру ОКК принять помещение после генеральной уборки.

ВР-1.3 Подготовка оборудования

1.3.1 Мастеру-технологу и оператору очистить оборудование и сделать запись в соответствующем разделе ПТП.

1.3.2 Контролеру ОКК принять оборудование после очистки и сделать запись в соответствующем разделе ПТП.

1.3.3 Оператору подготовить оборудование к работе:

1.3.4 Мастеру-технологу следить за производимым оператором процессом подготовки оборудования и сделать запись в соответствующем разделе ПТП.

ВР-2 Подготовка сырья

ВР-2.1 Измельчение растительного сырья

2.1.1 Контролеру ОКК:

а) отобрать среднюю пробу со всех видов сырья, необходимых для экстракции, для определения показателей качества;

б) промаркировать каждую единицу тары, из которой была отобрана проба статусной карточкой «Карантин»;

в) оформить направление на анализ и сдать пробы в испытательную лабораторию завода (далее по тексту ИЛ) и сделать запись в соответствующем разделе протокола контроля качества (далее по тексту ПКК);

г) передать ПКК лаборанту смены ИЛ под запись в журнале «Журнал учета и регистрации протоколов технологического процесса».

Все виды сырья должны соответствовать требованиям ГФ РК.

2.1.2 При получении отрицательных результатов анализа:

а) контролеру ОКК промаркировать все несоответствующие НД единицы тары с сырьем статусными карточками «Брак» и проинформировать начальника ОКК и начальника производства, запретить дальнейшее использование, сделав запись в соответствующем разделе ПКК;

б) начальнику производства и начальнику ОКК принять меры по устранению несоответствий.

2.1.3 При получении положительных результатов анализа:

а) контролеру ОКК промаркировать каждую единицу тары с сырьем статусными карточками «Одобрено», результат количественного содержания активного вещества вписать в статусную карточку, разрешить дальнейшее использование, сделав запись в соответствующем разделе ПКК;

б) оператору в сопровождении начальника производства доставить сырье на участок растаривания сырья и передать мастеру-технологу сырье;

в) мастеру-технологу и оператору произвести распаковку сырья из вторичной упаковки и в присутствии начальника производства взвесить поступившее сырье на весах ГФ-1 и сравнить с количеством, указанным в ПТП в разделе «подготовка сырья».

г) мастеру-технологу записать вес сырья в Журнал регистрации приема сырья на участке производства, а результаты анализа ИЛ в соответствующем разделе ПТП.

2.1.4 Оператору перевезти сырье в отделение измельчения сырья и загрузить сырье в мельницу для измельчения.

ВР-2.2 Просеивание растительного сырья

2.2.1 Оператору установить на вибропросеивателе сито с размером ячеек 3 мм и включить аппарат в работу. Просеять растительное сырье.

2.2.2 Мастеру-технологу следить за производимым оператором процессом установки сита, фиксировать его выполнение в соответствующем разделе ПТП.

2.2.3 Оператору перенести измельчённое растительное сырье в контейнер К-1 и перевезти его в отделение экстракции.

ТП-1 Получение экстракта

ТП -1.1 Приготовление 50 % этилового спирта

1.1.1 Оператору отвесить на настольных весах в контейнер К-2 воду очищенную и этиловый спирт в емкость К-3 для получения соотношения жидкостей 1:5 (для экстракции корней) или 1:7 (для экстракции НЧ) в зависимости от вида используемого сырья.

1.1.2 В мерник-смеситель загружают вручную жидкости из К-2 и К-3 и перемешивают для получения экстрагента, который далее переносят в емкость К-4.

1.1.3 Мастеру-технологу следить за производимым оператором процессом взвешивания, фиксировать его выполнение в соответствующем разделе ПТП и обозначить контейнер карточкой продукта.

1.1.4 Оператору перевезти емкость К-4 с раствором экстрагента в отделение в отделение экстракции.

ТП 1.2 Экстрагирования сырья

1.2.1 Оператору отвесить на настольных весах в контейнер К-5 расчетное количество растительного сырья из контейнера К-1.

1.2.2 В мерник-смеситель К-6 загружают вручную, смешивая растительное сырье из контейнера К-5 и экстрагент из контейнера К-4. Далее проводят экстрагирование на УЗ бане при температуре 30 ^{0}С в течение 45 минут.

ТП 1.3 Фильтрование

1.3.1 По завершению процесса экстракции оператору отфильтровать полученный экстракт от растительного материала, используя фильтрующую установку для получения прозрачной жидкости.

ТП-2 Концентрирование экстракта

ТП 2.1 Упаривание экстракта

2.1.1 Оператору провести выпаривание растворителя в вакуум-выпарной установке до ¼ первоначального объема при температуре 40-50 ^{0}С для регенерации экстрагента.

ТП 2.2 Получение концентрата

2.2.1 Оператору далее провести выпаривание растворителя на роторном испарителе при температуре 40-50 ^{0}С и давлении не более 0.7-0.8 атм. до получения темно-коричневого сиропа.

ТП 3 Получение субстанции

Сконцентрированный экстракт сушат в вакуум-сушилке согласно стадии ТП 3.1 и измельчают до получения мелкодисперсного порошка на шаровой мельнице, выполняя операцию ТП 3.2. Полученный продукт отбирают методом отбора проб и передают в ИЛ для определения показателей качества согласно НД.

УМО. Фасовка и упаковка готовой продукции.

а) Оператору провести фасовку продукции в полиэтиленовые пакеты по 100.0 г в соответствии с СТ РК ГОСТ Р 51958-2010, и наклеиваемой этикеткой, выполненной типографическим способом в соответствии с СТ РК 226-2000.

б) На этикетке на государственном и на русском языке указывают страну-производитель, товарный знак, торговое название, лекарственную форму, массу содержимого упаковки, условия хранения, номер серии, дату выпуска и срок годности. Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

в) Образец продукта передают в ИЛ для определения средней массы пакета, количественного содержания АФИ, влажности, однородности заполнения.

При получении отрицательных результатов анализа:

а) мастеру-технологу записать их в соответствующий раздел ПТП;

б) контролеру ОКК запретить дальнейшее производство, сделав запись в соответствующем разделе ПТП и проинформировать начальника ОКК;

в) начальнику ОКК принять меры по устранению несоответствий.

3.1.7 При получении положительных результатов анализа:

а) мастеру-технологу записать результаты в соответствующий раздел ПТП;

б) контролеру ОКК разрешить дальнейшее производство, сделав запись в соответствующем разделе ПТП;

в) оператору продолжить наработку серии.

Материальный баланс серии рассчитан на растительное сырье массой 1.0 кг и представлен в таблицах 13 и 14.

Таблица 13 – Материальный баланс производства субстанции из корней растений вида *L. gmelinii*

Загружено			Получено		
Наименование сырья	Расход, кг	В 100 % исчислении	Наименование продукта, отходов и потерь	Приход, кг	В 100 % исчислении
Корни из растений вида *L. gmelinii*	1.0	16.7	Субстанция	0.27	4.5
Спирт этиловый 96.0 %	2.6	43.3	Спирт этиловый отгон	3.69	61.5
Вода очищенная	2.4	40.0	Шрот	1.85	30.8
Потери				0.19	3.2
Итого	6.0	100		60	100

Таблица 14 – Материальный баланс производства субстанции из НЧ растений вида *L. gmelinii*

Загружено			Получено		
Наименование сырья	Расход, кг	В 100 % исчислении	Наименование продукта, отходов и потерь	Приход, кг	В 100 % исчислении
НЧ из растений вида *L. gmelinii*	1.0	12.5	Субстанция	0.22	2.8
Спирт этиловый 95.0 %	3.7	46.3	Спирт этиловый отгон	4.78	59.8
Вода очищенная	3.3	41.2	Шрот	2.47	30.9
Потери				0.53	6.5
Итого	8	100		8	100

Валидация технологии получения растительных субстанций методом УЗЭ была проведена с целью подтверждения того, что все стадии процесса эффективны, а также соответствуют стандартам, требованиям и ожиданиям в

заданных технологических условиях. Результаты валидации описанного технологического процесса приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты валидации технологического процесса

Стадии процесса	Параметры	Регламентируемые нормы	Кол-во отбора проб в одной серии	Результаты исследования
1	2	3	4	5
Стадия 1 Подготовка сырья, экстрагента (спирт этиловый 50% и вода очищенная)	Качество сырья	Соответствует требованиям нормативной документации	3 пробы	Исследованы все показатели качества
				Соответствует
	Масса (объем) сырья, кг	Отклонение ±0.005 кг	–	Соответствует
	Время смешивания, мин	30 мин	–	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	15 об/мин	–	Соответствует
	Концентрация этанола	50.0±0.5%	Контроль в 9 точках	Соответствует
	Масса этанола, кг	Отклонение ±0.05 кг	–	Соответствует
Стадия 2 Подготовка ЛРС (измельченное сырье)	Качество сырья	В соответствии с монографией ГФ РК	Контроль в 9 точках	Соответствует
	Масса сырья, кг	Отклонение ±0.05 кг	–	Соответствует
Стадия 3 Получение извлечения из ЛРС	Температура экстракции, °С	30 ± 2°С	Контроль каждые 15 мин	Соответствует
	Время экстракции, мин	45 мин	–	Соответствует
Стадия 4 Фильтрация	Размер пор фильтров, мкм	1.0; 0.5; 0.65/0.45	-	Соответствует

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5
	Органолептические свойства, механические примеси	Прозрачный раствор коричневого цвета со специфическим запахом растения	–	Соответствует
Стадия 5 Концентрирование экстракта	Выход, %	Не менее 20%	Контроль в 9 точках	Соответствует
	Количественное определение активных веществ	Не менее 15%	Контроль в 9 точках	Соответствует
Стадия 7. Подготовка полиэтиленовых пакетов	Микробиологическая чистота	В соответствии с СП	9 проб	Соответствует
Стадия 8. Фасовка, маркировка и упаковка в пачки готовой продукции	Объем заполнения, г (начало, середина, конец процесса)	25 ±0.75 г В соответствии с НТД: тех.регламент, СП	9 проб 9 проб 9 проб	Соответствует
	Качество маркировки (начало, середина, конец процесса)	В соответствии с СП	9 проб 9 проб 9 проб	Соответствует
* Отбор проб осуществляли с верхней, средней частей и со дна емкости СП-спецификация качества фирмы НТД- нормативный технически документ Тех. регламент – технологический регламент				

Дополнительно проводили оценку статистической управляемости процесса УЗ метода получения субстанций по критерию «Количественное определение содержания дубильных веществ». Образцы субстанций для анализа отбирали в трех точках во всем объеме полученной массы продукта трех последовательных партий – «верх», «низ», «середина».

Стабильность процесса оценивали применением статистических подходов, а именно, построением индивидуальных диаграмм и карт скользящего размаха, а также диаграмм стандартного отклонения (I-MR-R/S). Кроме того, были рассчитаны показатели возможностей технологических процессов – Pp и Ppk, Cp и Cpk, и построены гистограммы распределения данных в процессе, для оценки уровня производительности. Данные по анализу возможностей процесса базируются на определенной характеристике продукта и применяются для прогнозирования способности технологического процесса производить продукт, соответствующий критериям спецификации. Стабильный «удовлетворительный» или «трудоспособный» процесс описывается значениями Pp и Ppk, Cp и Cpk в пределах от 1.0 до 1.33, что означает его способность производить продукт в пределах нижних и верхних значений заданного показателя качества. При индексах, превышающих значения 1.33 процесс считается наиболее «хорошим». Если значения данных индексов меньше 1, то процесс определяется как «плохой» и не может быть выполнен для заданной цели [82,214]. Cpk используется для оценки «краткосрочного», а Ppk «долгосрочного» прогнозирования поведения процесса. Стабильный процесс характеризуется эквивалентности Ppk = Cpk, означающее соответствие фактической и потенциальной производительности. Нестабильный процесс смещается со временем и Ppk <Cpk.

Согласно полученным данным (рисунок 25), индексы возможностей процесса Cp, Cpk, Pp, Ppk, рассчитанные по результатам контроля субстанции из корней на содержание ДВ, составляют 1.26, 1.27, 1.53 и 1.52, соответственно, что характеризует процесс производства как близкий к «хорошему» и стабильному, т.е. предполагается незначительный риск отклонения от требований спецификации (выпуска или стабильности). Гистограммы распределения показывают нормальное распределение данных, что также подтверждает стабильность технологического процесса.

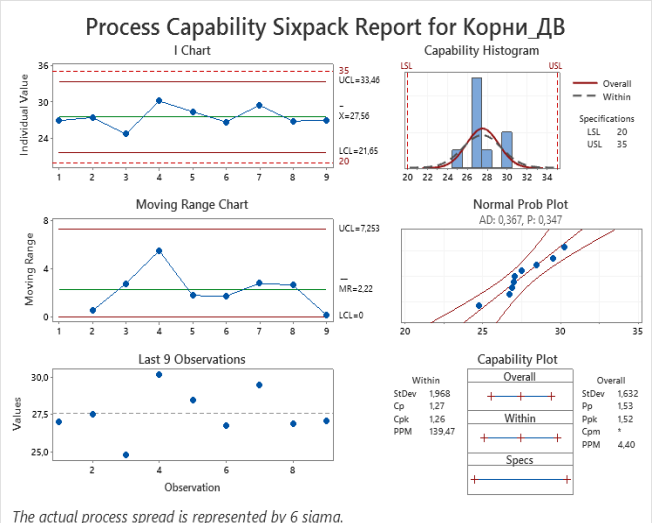


Рисунок 25 – Контрольные карты процесса УЗЭ корней растений вида *L. gmelinii* на стадии ТП-3 «Получение субстанции», параметр – количественное содержание ДВ

Аналогичные расчеты индексов Cp, Cpk, Pp и Ppk для процесса получения субстанции из надземной части составили 1.55, 0.58, 1.58 и 0.59, соответственно (рисунок 26). Значения индексов Cp и Pp >1.33 показывают, что УЗЭ позволяет получить субстанцию из НЧ достаточно «устойчиво» в пределах спецификации. Однако индексы Cpk и Ppk <1 описывают процесс, как недостаточно стабильный из-за смещения значений в сторону верхнего предела (USL) при центрировании относительно целевого среднего значения, что указывает на возможность появления «дефектов» при производстве.

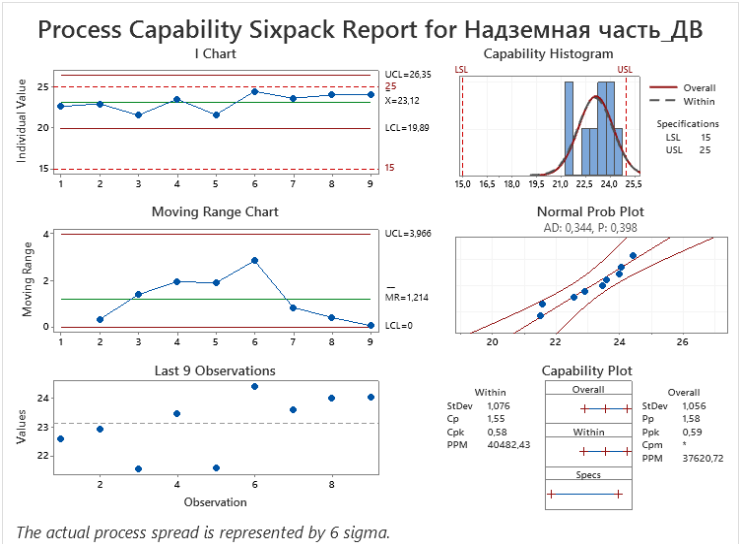


Рисунок 26 – Контрольные карты процесса УЗЭ НЧ растений вида *L. gmelinii* на стадии ТП-3 «Получение субстанции», параметр –количественное содержание ДВ

Полученные результаты позволили оценить «краткосрочные» возможности процесса, так как использовались данные только трех опытно-промышленных серий. Для более полной картины долгосрочных возможностей процесса и инструментов для его улучшения требуется наблюдение данных при непрерывной верификации и дополнительный расчет индексов производительности процесса Pp и Ppk. Более того для растительных субстанций представляется сложным установить верхние пределы значений для количественного содержания действующего вещества и обычно утверждается только нижний предел [82], что также следует учесть при последующей оценке пределов спецификации для получения субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii.* Рассматривая упомянутые ограничения при будущем производстве субстанций, возможно надлежащее применение индексов возможностей и получение более точных результатов.

Таким образом, в ходе валидации УЗЭ метода получения активных субстанций из растений вида *L. gmelinii* были оптимизированы технологические операции согласно масштабу технологического процесса, были разработаны стандартные операционные процедуры по обучению персонала и получены статистические данные по стабильности процесса, которые послужат основой для проведения дальнейших мероприятий по верификации технологии.

3.6 Стандартизация растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* и исследование стабильности

Стандартизацию растительных субстанций из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РК [14]. Были определены и установлены критерии показателей качества готового продукта. В Приложениях А, Б представлены спецификации качества на растительные субстанции из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii.*

Описание. Мелкодиспесрный порошок буровато-коричневого цвета, со слабым специфическим запахом.

Идентификация. При добавлении раствора железа хлорида (III) Р2 появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества). При добавлении 1 % раствора ванилина Р в кислоте хлороводородной Р появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)

Потеря в массе при высушивании. Не более 12%

Сульфатная зола и тяжелые металлы. Сульфатная зола из 1 г (точная навеска) препарата должна быть не более 15 %. Тяжелые металлы не более 0,01 %.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РК. Препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют

бактерии семейства *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.*

Количественное определение. Комплексонометрическое титрование, основанное на осаждении дубильных веществ в виде комплекса с цинком и определения количества цинка, израсходованного на осаждение дубильных веществ, с последующим титрованием раствором динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТА - комплексон III). При комплексонометрическом титровании наблюдается четкое изменение окраски индикатора, что обеспечивает хорошую сходимость результатов. Содержание ДВ в корнях – не менее 15.0 %, в надземной части – не менее 15.0 %.

Упаковка. Устанавливается в соответствии с требованиями ГФ РК и проектом НД.

Маркировка. В соответствии с НД и требованиями Приказа Министра здравоохранения Республики Казахстан от 27 января 2021 года № ҚР ДСМ-11 «Об утверждении правил маркировки лекарственных средств и медицинских изделий».

Хранение. В прохладном, защищенном от света месте при температуре не выше 25 ^{0}C.

Экспериментальные данные по исследованию стабильности проводили в соответствии с Приказом Министра здравоохранения РК от 28 октября 2020 года № ҚР ДСМ-165/2020. Результаты испытания стабильности представлены в Приложениях В, Г и позволяют установить срок хранения 24 мес. при температуре 25± 2 °С и относительной влажности 60± 5%.

3.7 Валидация методики количественного определения ЭПКГ в растительных субстанциях из растений вида *L. gmelinii*

Экстракты из растений вида *L. gmelinii* содержат большое количество природных соединений, в основном, относящихся к различным полифенолам, а доминирующим компонентом были признаны дубильные вещества, которые и были выбраны как аналитический маркер при контроле качества растения и препаратов на его основе [4]. Согласно монографии на корни и НЧ растений вида *L. gmelinii* комплексонометрический метод определения ДВ был заложен для количественной оценки и валидирован для применения контроля качества упомянутого растения. Однако данный метод представляется несколько трудоемким и долгим в проведении, что требует разработки и валидации альтернативных способов количественной оценки.

Исходя из этого, аналитической целью данного этапа работы была разработка простого, быстрого и надежного метода ВЭЖХ для разделения и определения эпигаллокатехин галлата (ЭПКГ), который предполагается доминирующим флавоноидом и агликоном в структуре конденсируемых ДВ экстрактов из Кермека гмелина. Кроме того, выбор ЭПКГ оправдан ввиду его ценных биологических свойств и потенциала в отношении воспалительных

заболеваний [131]. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является мощным аналитическим методом благодаря своей надежности, простоте, воспроизводимости и скорости. Валидацию методики проводили в соответствии с рекомендациями Международной конференции по гармонизации.

Оптимизация условий хроматографирования была проведена в соответствие с литературными данными по разделению флавоноидов методом ВЭЖХ [171,215–217]. Наилучшее разделение пиков было достигнуто применением изократического режима со скоростью потока 1 мл/мин, в то время как в градиентом режиме не разделялись компоненты со временем элюирования до 5 минут и результаты были плохо воспроизводимыми. В режиме изократического элюирования при температуре колонки 30 ^{0}C наилучшее разделение наблюдалось при использовании растворителя, представляющего смесь ацентонитрил:H_3PO_4 (0.2 %) = 86:14. Измерения проводили при длине волны УФ детектора 270 нм.

Согласно схеме 5, приведенной в главе 1.3 литературного обзора, определяли стабильность стандарта ЭПКГ и проб субстанций после приготовления и через сутки хранения в холодильнике. Для каждого раствора одновременно выполняли три вкола, и стабильность аналитических растворов оценивали по изменению средней площади пика и значениям RSD площадей пика между повторными вколами. Процент открываемости находился в диапазоне от 98.0% до 102.0%, а RSD составляло не более 2.0 %, что указывает на хорошую стабильность образцов и стандартного раствора в течение 24 часов при обоих условиях, как показано в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты исследования стабильности испытуемых растворов

Испытуемый раствор/время хранения	Среднее время удерживания (минуты)	Средняя площадь пика	RSD (%) площади пика	Открываемость, %
Раствор РСО ЭПКГ				
0 ч	2.907	9.692	0.09	-
24 ч в холодильнике	2.924	9.636	0.11	100.58
Субстанция из НЧ				
0 ч	3.497	8.800	0.22	
24 ч в холодильнике	3.496	8.780	0.11	99.77
Субстанция из корней				
0 ч	3.404	7.779	0.59	-
24 ч в холодильнике	3.400	7.653	0.21	98.38
*Приведены средние значения 6-ти измерений (сред. знач., n=6)				

Эти результаты доказали, что все испытуемые растворы были стабильны и процедура приготовления образцов растворов субстанций и стандартного образца была подходящей для предполагаемого применения метода.

Селективность и специфичность аналитического метода оценивали путем сравнения хроматограмм подвижной фазы, раствора РСО ЭПКГ и образцов, содержащих анализируемые субстанции. В выбранных условиях анализа РСО ЭПКГ элюировался на 2.944±0.03 мин, а при исследовании субстанций на 3.451±0.05 мин. Отсутствие пиков совместного элюирования, мешающих пикам ЭПКГ, указывают на чистоту его пика и специфичность метода. Также отсутствовали пики в данном временном промежутке при хроматографировании подвижной фазы и плацебо.

Также селективность и специфичность подтверждаются линейным откликом 6-ти повторных вколов растворов РСО ЭПКГ в концентрации от 1 до 10 мг/мл. Линейность аналитического метода определяется, как способность метода получать результаты испытаний, которые прямо пропорциональны концентрации аналита в определенном диапазоне применения и оценивается значением коэффициента корреляции R > 0.995 [187,218]. Хроматограммы РСО ЭПКГ, приготовленного в 5 концентрациях представлены на рисунке 27, 28.

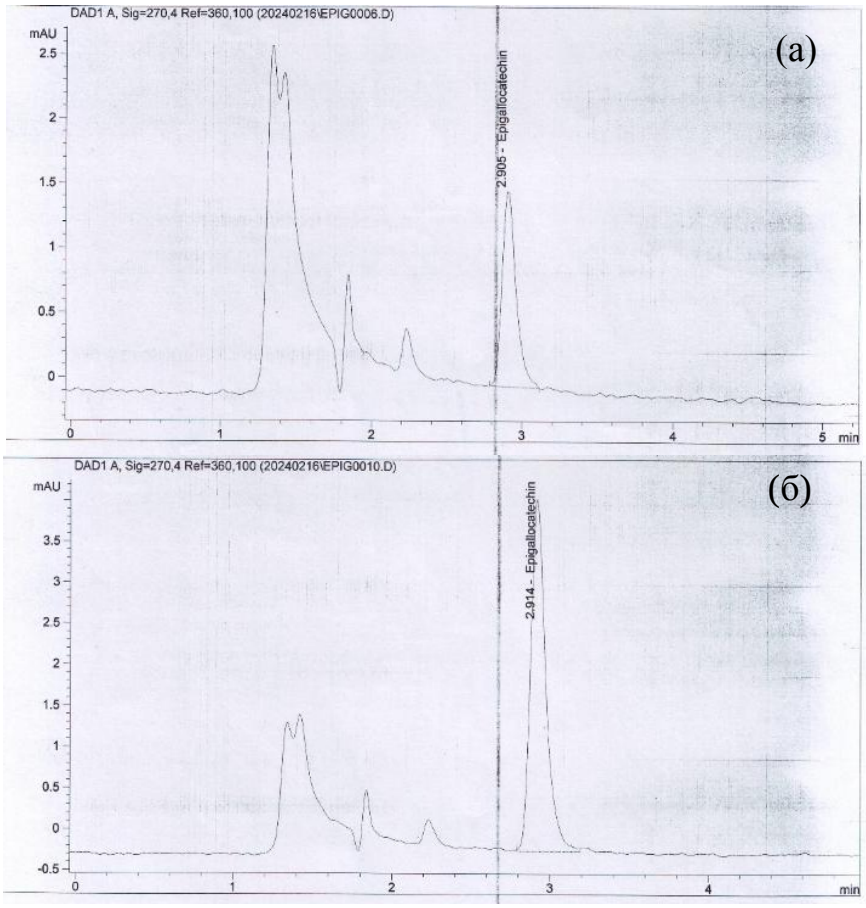
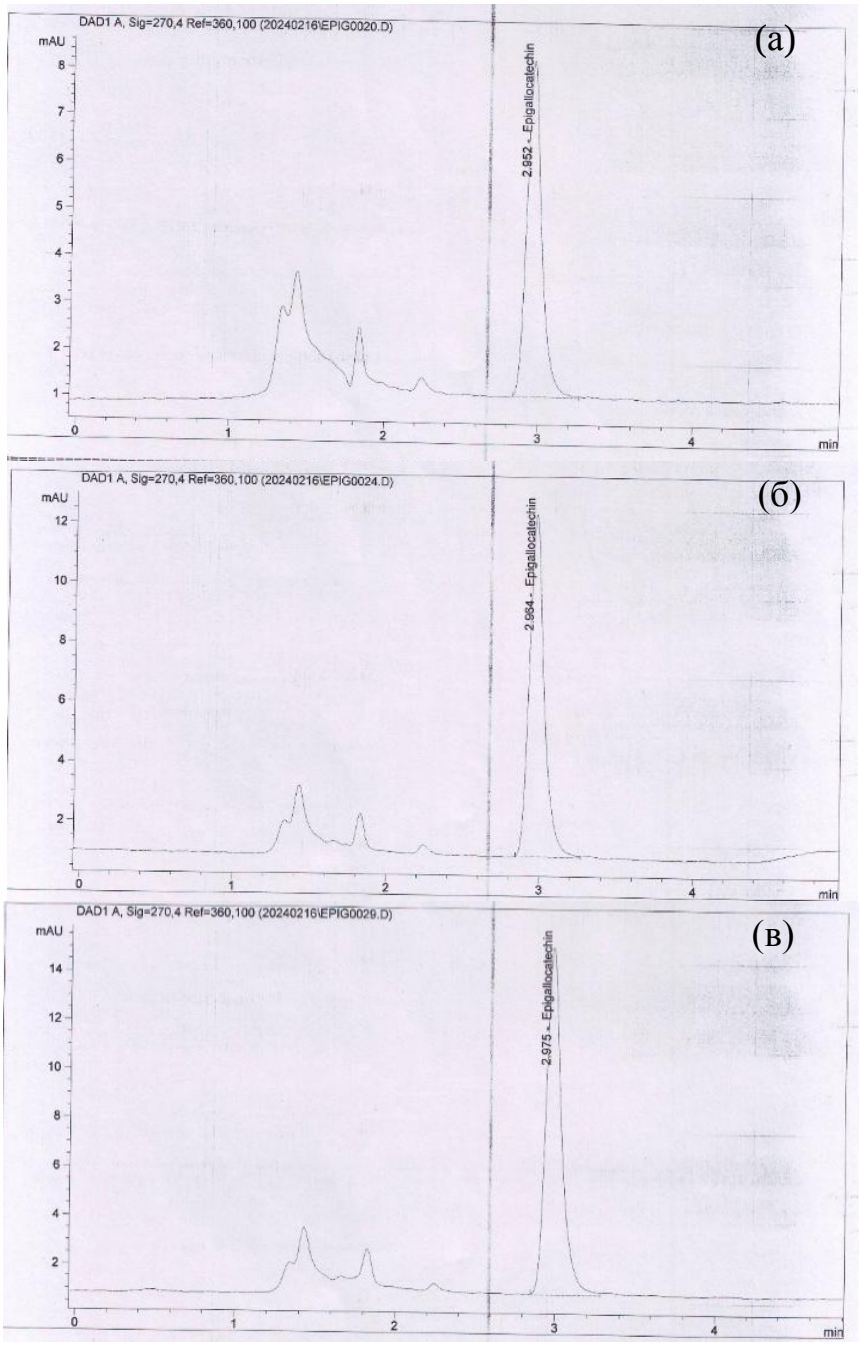


Рисунок 27 – Хроматограммы стандартного раствора ЭПКГ – 1.0 мкг/мл (а), 3.0 мкг/мл (б)



(д)

Рисунок 28 – Хроматограммы стандартного раствора ЭПКГ – 5.0 мкг/мл (а), 8.0 мкг/мл (б), 10.0 мкг/мл (в)

Найденное уравнение регрессии при анализе чистого ЭПКГ выглядит, как $y = 1.42598x + 3{,}94174e^{-2}$, и представлено на графике 29 с коэффициентом корреляции $R = 0.999 > 0.995$ подтверждает линейную зависимость между концентрацией ЭПКГ и площадью пика на хроматограмме.

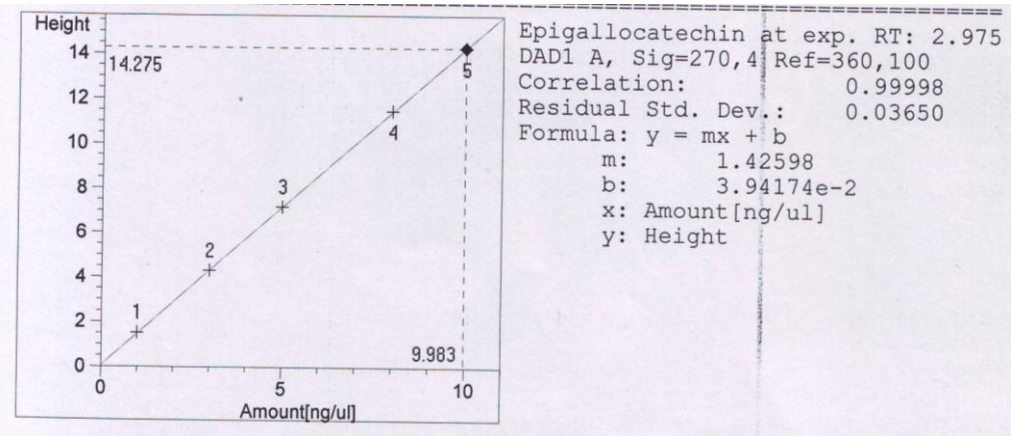


Рисунок 29 – Калибровочная кривая ЭПКГ

Параметры линейной зависимости для испытуемых образцов субстанций были исследованы в диапазоне концентраций от 20 до 120 мг/мл с пересчетом на найденное количество ЭПКГ относительно раствора сравнения (таблицы 17, 18).

Таблица 17 – Результаты количественного определения количества ЭПКГ в субстанции из корней растений вида *L. gmelinii*

Концентрация раствора субстанции из корней, мкг/мл	Найденное количество ЭПКГ*, мкг/мл	RSD, %	Площадь пика ЭПКГ*
0	0	0	0
20	0.153	0.001	2.074
40	0.382	0.007	5.262
60	0.580	0.023	7.779
80	0.720	0.006	9.585
120	1.113	0.008	14.34
*Приведены средние значения 6-ти измерений (сред. знач., n=6)			

Таблица 18 – Результаты количественного определения количества ЭПКГ в субстанции из НЧ растений вида *L. gmelinii*

Концентрация раствора субстанции из НЧ, мкг/мл	Найденное количество ЭПКГ*, мкг/мл	RSD, %	Площадь пика ЭПКГ*
0	0	0	0
20	0.304	0.008	3.643
40	0.495	0.017	6.528
60	0.708	0.003	8.800
80	0.919	0.004	11.52
120	1.343	0.011	16.81
*Приведены средние значения 6-ти измерений (сред. знач., n=6)			

Сравнивая данные по количественному анализу, можно отметить, что найденное количество ЭПКГ в субстанции из НЧ превосходит его содержание в субстанции из корней на 15.62±3.298 %.

Хроматограммы испытуемых растворов субстанций, приготовленных для испытания на линейность, представлены на рисунках 30, 31.

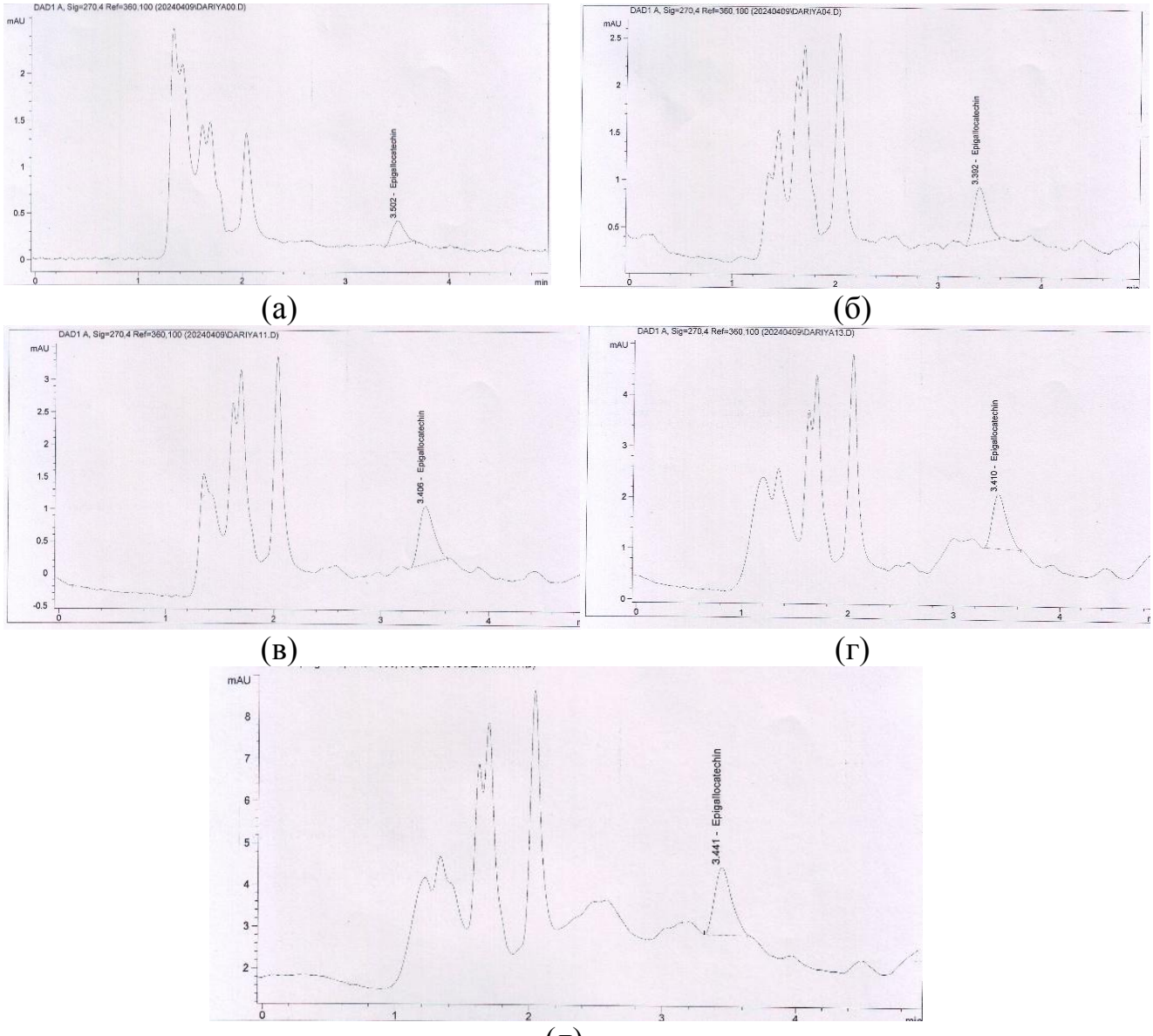


Рисунок 30 – Хроматограммы растворов субстанций из корней– 20.0 мкг/мл (а), 40.0 мкг/мл (б), 60.0 мкг/мл (в), 80.0 мкг/мл (г), 120.0 мкг/мл (д)

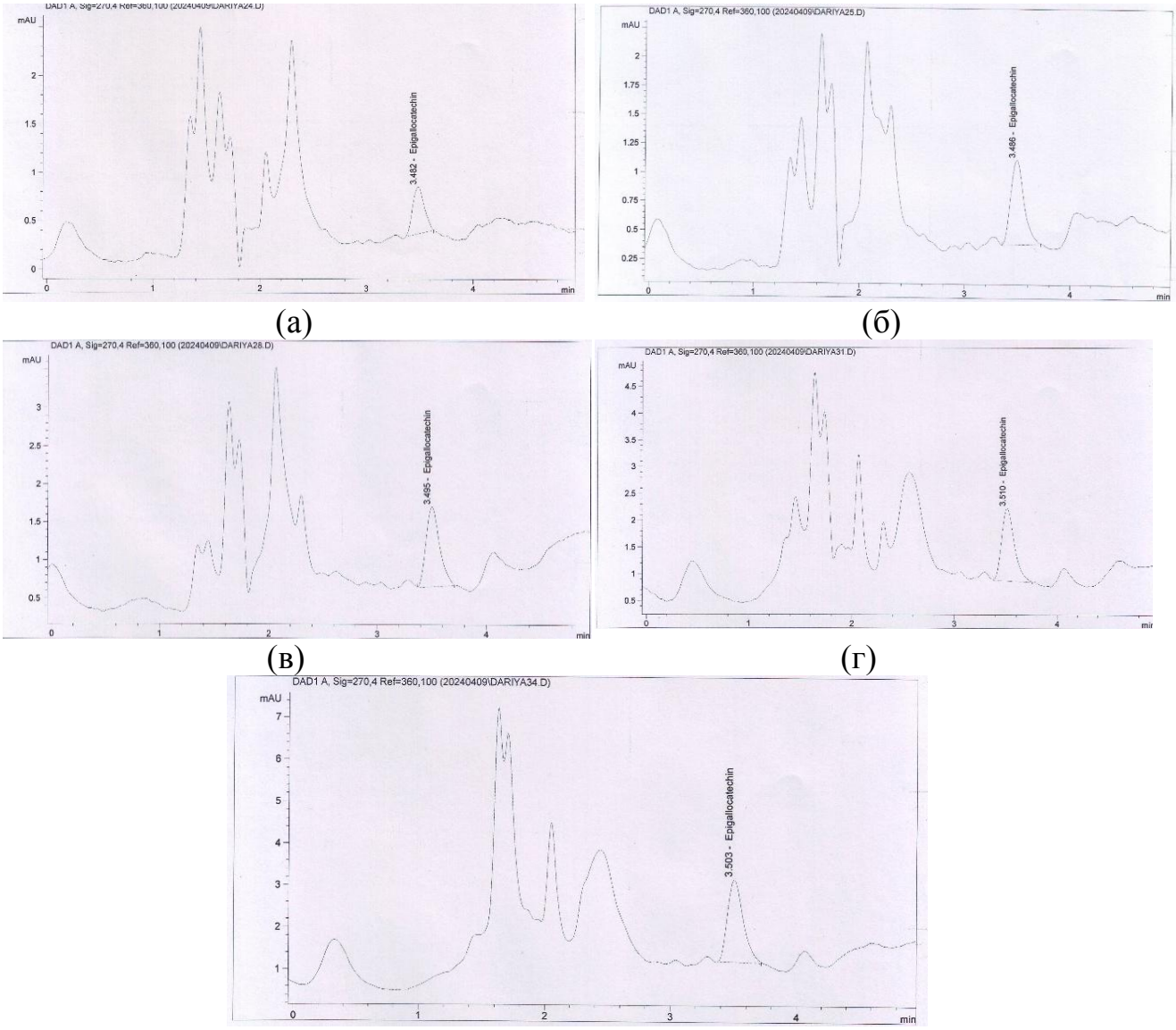


Рисунок 31 – Хроматограммы растворов субстанций из НЧ– 20.0 мкг/мл (А), 40.0 мкг/мл (Б), 60.0 мкг/мл (В), 80.0 мкг/мл (Г), 120.0 мкг/мл (Д)

Графики зависимости величины площади пика от концентрации найденного количества ЭПКГ в субстанциях имеют линейный характер и подтверждаются коэффициентом корреляции R со значением 0.999 для обеих субстанций, что соответствует критерию приемлемости R> 0.995 (рисунки 32, 33). Уравнение зависимости площади пика от концентрации для субстанции из корней представляет собой выражение y = 12.914x + 0.1612, а для НЧ y = 12,524x + 0,0171.

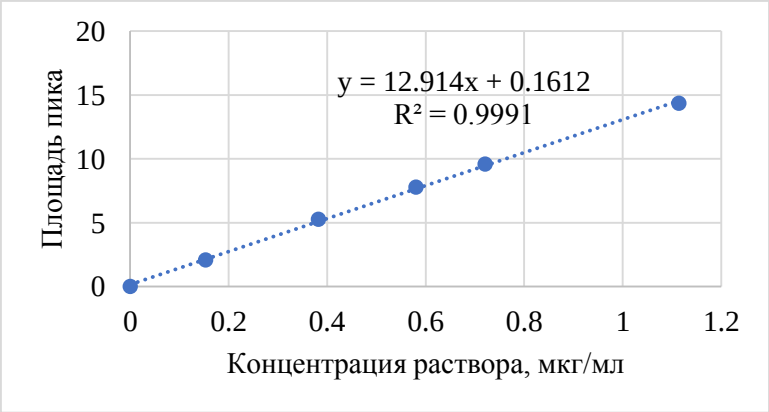


Рисунок 32 – Калибровочная кривая раствора субстанции из корней

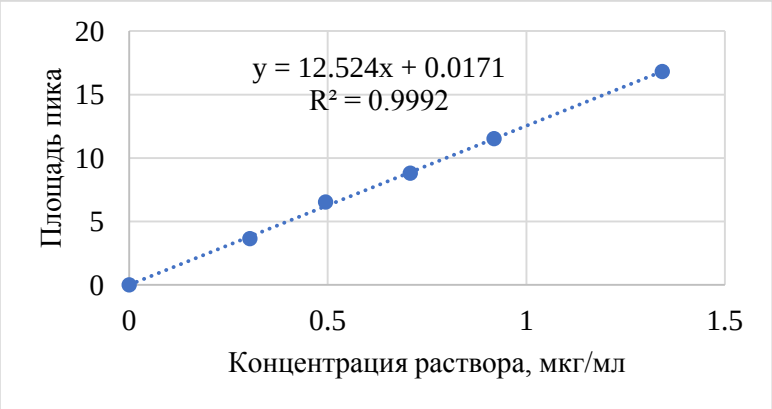


Рисунок 33 – Калибровочная кривая раствора субстанции из НЧ

Аналитическая область методики или диапазон применения устанавливаются в интервале определения линейности [218]. Для РСО ЭПКГ установленный диапазон применения составил 1-10 мг/мл, а для образцов субстанций из НЧ и корней 20-120 мг/мл. В этом интервале результаты, получаемые с использованием валидируемой методики, также должны иметь приемлемый уровень точности, которая в свою очередь определяется по критериям повторяемости, правильности и внутрилабораторной прецизионности [80,187].

Повторяемость или, другими словами, прецизионность внутри методики, определяется как «близость найденных значений между сериями измерений, полученных при многократном отборе проб одного и того же образца в заданных условиях» [187,218]. Валидируемая методика признается прецизионной, если RSD результата отдельного определения для выборки достаточно большого объёма менее 2.0% [187,218]. Как показано в таблице 19, RSD результатов анализа времени удерживания и площадей пика для ЭПКГ в растворе сравнения и субстанций в 5-ти концентрациях после 6-ти определений составляло менее 2.0%, что подтверждает точность метода.

Таблица 19 – Данные по контролю повторяемости методики

Концентрация, мкг/мл	Время удерживания*, мин	Площадь пика*
1	2	3
Раствор РСО ЭПКГ		
1.0	2.907	9.692
RSD, %	0.004	0.098053
3.0	2.920	28.18
RSD, %	0.005	0.385405
5.0	2.946	47.53
RSD, %	0.019	0.534071
8.0	2.966	76.27
RSD, %	0.002	0.415035
10.0	2.979	97.18
RSD, %	0.004	0.574395
Субстанция из НЧ		
20	3.477	3.643
RSD, %	0.005	0.126
40.0	3.490	6.528
RSD, %	0.005	0.431
60.0	3.497	8.800
RSD, %	0.002	0.221
80.0	3.509	11.52
RSD, %	0.002	0.347
120.0	3.51	16.807
RSD, %	0.009	0.178
Субстанция из корней		
20	3.471	2.075
RSD, %	0.044	0.046
40.0	3.391	5.262
RSD, %	0.001	0.148
60.0	3.404	7.779
RSD, %	0.006	0.590
80.0	3.421	9.585
RSD, %	0.018	0.293

Продолжение таблицы 19

1	2	3
120.0	3.444	14.348
RSD, %	0.004	0.223
*Приведены средние значения 6-ти измерений (сред. знач., n=6)		

Для оценки правильности методики было рассчитано соотношение найдено/введено для модельных растворов, приготовленных добавлением ЭПКГ к образцам субстанций из корней и НЧ в количестве 3.0; 5.0 и 8.0 мкг/мл. Процент открываемости рассчитывался как R=(обнаруженное количество/добавленное количество)×100 % [187,218]. Согласно требованиям руководств по валидации методик соответствие теоретических и экспериментальных данных должно быть в диапазоне 98.0-102.0 % [187,218], что подтвердилось при расчетах показателя открываемости (R) при ВЭЖХ анализе исследуемых образцов субстанций. Результаты измерений представлены в таблице 20. Характеристику правильности также подтверждали незначимостью систематической погрешности, которая для всех измерений составляла мене 2.0 %.

Таблица 20 – Данные по контролю правильности валидируемой методики

Образец, №	Введено ЭПКГ*, мкг/мл	Теоретическое содержание ЭПКГ, мкг/мл	Найдено ЭПКГ*, мкг/мл	Открываемость (R)*, %	RSD, %
Субстанция из корней					
1	3.0	3.58	3.59	100.5	1.75
2	5.0	5.58	5.53	99.1	0.96
3	8.0	8.58	8.63	100.6	1.36
Субстанция из НЧ					
4	3.0	3.71	3.75	101.2	0.44
5	5.0	5.71	5.73	100.4	1.22
6	8.0	8.71	8.64	99.2	0.90
*Приведены средние значения 3-х измерений (сред. знач., n=3)					

Внутрилабораторную прецизионность или воспроизводимость изучали результатами 6-ти модельных растворов, полученных двумя аналитиками (таблица 21). Рассчитанные значения критериев Фишера и Стьюдента были меньше табличных, что демонстрирует отсутствие существенных различий между выборками и средними значениями с вероятностью 95%.

Таблица 21 – Данные по контролю воспроизводимости валидируемой методики

Аналитик	1	2
Субстанция из корней (С=60 мкг/мл)		
Найдено ЭПКГ, мкг/мл	0.606	0.615
	0.572	0.6011
	0.562	0.589
	0.58	0.555
	0.561	0.602
	0.59	0.585
Среднее, мкг/мл (n=6)	0.5785	0.591183333
RSD, %	0.017	0.020
Среднее, мкг/мл (n=12)	0.59	
Среднее, %	0.78	
RSD, %	0.02	
F-тест или критерий Фишера	0.18<5.05 (P=0.95; k_1=5; k_2=5)	
t-критерий Стьюдента	1.15 <2.28 (P=0.95; f=10)	
Субстанция из НЧ (С=60 мкг/мл)		
Найдено ЭПКГ, мкг/мл	0.711	0.721
	0.707	0.705
	0.706	0.689
	0.708	0.701
	0.722	0.708
	0.711	0.715
Среднее, мкг/мл (n=6)	0.711	0.707
RSD, %	0.006	0.011
Среднее, мкг/мл (n=12)	0.709	
RSD, %	0.009	
Среднее, %	1.33	
F-тест или критерий Фишера	0.73<5.05 (P=0.95; k_1=5; k_2=5)	
t-критерий Стьюдента	0.95<2.28 (P=0.95; k =10)	
P – уровень значимости; k – число степеней свободы		

Таким образом, был разработан альтернативный метод ВЭЖХ для количественной оценки субстанций из кермека Гмелина. Метод был валидирован в соответствии с рекомендациями ICH и признан пригодным для предполагаемого использования, обеспечивая точные количественные результаты при определении ЭПКГ в предложенных хроматографических

условиях. Более того, насколько известно, ранее метод ВЭЖХ для количественного анализа субстанций из растений вида *Limonium gmelinii* не был описан в научной литературе. Использование простого УФ-детектора делает метод более доступным для широкого использования при контроле качества лекарственных средств растительного происхождения, изготовленных на основе данного растения. В последующих работах потребуются дальнейшие наблюдения по динамике изменения количества ЭПКГ в субстанциях для сбора информации и установления возможных пределов данного БАВ в растении и субстанциях.

3.8 Фармацевтическая разработка гелей с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* и оценка их качества

3.8.1 Обоснование выбора компонентов геля и определение их совместимости

Согласно литературным данным, приведенным в главе 3, растительные экстракты уже успешно включаются в состав различных гелевых композиций и активно исследуются ввиду перспективности их применения в медицинской практике.

Экстракты из корней и надземной части растений вида *L. gmelinii* содержит богатый набор БАВ – полифенольные соединения, флавонолы и их гликозиды, конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества, пирогаллол, галловая и эллаговая кислоты, проантоцианидины, а также ранее неописанные формы флаван-3-олов, лигнанамиды (Таблица 2), что объясняет разнообразие биологической свойств фитокомплексов данного растения. Субстанция, полученная из корней кермека Гмелина, обладающая широким спектром биологической активности является действующим веществом отечественной мази «Лимонидин», рекомендованной к применению как ранозаживляющее средство при герпесе, эрозивно-язвенных и язвенно-некротических процессов на слизистой полости рта, воспалительных и воспалительно-деструктивных заболеваний парадонта и т.д., не оказывая общего и местного токсического эффекта [7]. Мазевая основа обладает гидрофобными свойствами, в то время как полученные из растения *L. gmelinii* субстанции и выделенные из них БАВ более полярны и легкорастворимы в таких полярных растворителях, как 30.0 и 50.0 % этиловый спирт. Исходя из этого, гидрофильные гелевые основы представляются более подходящими для доставки активных субстанций из растений вида *L. gmelinii*.

Компоненты гелевой основы-носителя для субстанций из надземной части и корней растения *L. gmelinii* были подобраны согласно приведенным в главе 3 литературным источникам. В ходе работы были экспериментально исследованы формулы гелей с различным составом и соотношением активной субстанции и эксципиентов, изучены технология и порядок их смешивания в соответствие с рекомендациями “preformulation studies” ICH Q8 (рисунок 2) [21].

На первом этапе изучали совместимость субстанций с вспомогательными веществами, а именно с гидрофильным гелеобразователем карбомером, растворителями – пропиленгликолем (ПГ), полиэтиленгликолем-400 (ПЭГ-400), глицерином, которые также несут функцию хумектантов, усилителей проникновения, нейтрализатором – ТЭА, консервантом – сорбатом калия, ментол был использован в качестве отдушки, но также выступал в роли усилителя проникновения [39]. Совместимость перечисленных компонентов гелей и субстанций исследовали анализом ИК-спектров индивидуальных веществ и после их смешения с субстанциями из надземной части и корней растений вида *L. gmelinii* [40].

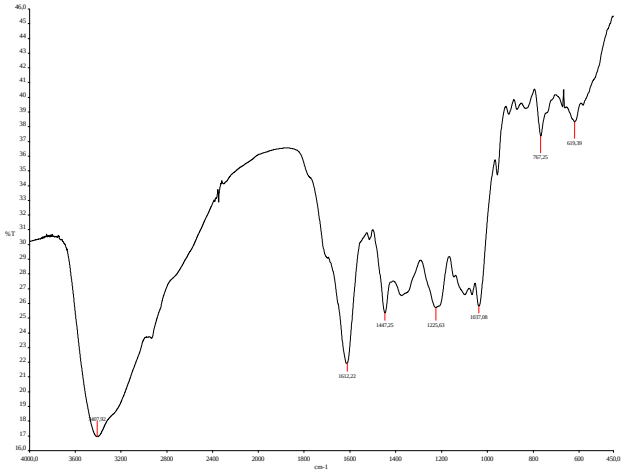
Каждое ВВ тщательно смешивали с субстанциями из корней и НЧ, растворяя их при необходимости в этиловом спирте 20.0 %, на уровне концентраций, используемых в рецептуре геля. Каждую смесь помещали в темные флаконы и хранили в течение одного месяца, наблюдая за изменениями.

После 30 дней хранения растительных субстанций в смеси с различными ВВ при комнатной температуре никаких физических изменений не наблюдалось, что свидетельствовало об их совместимости (таблица 22).

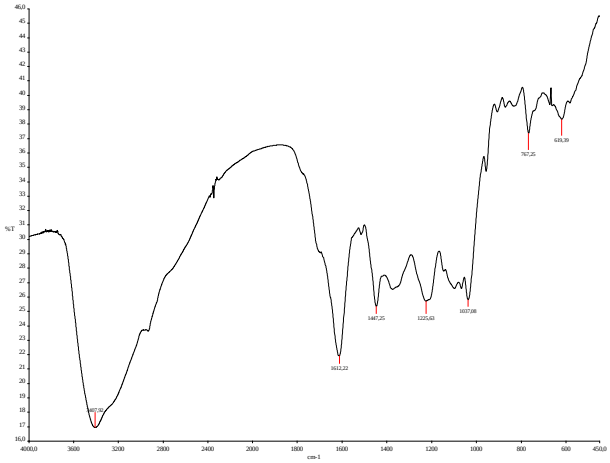
Таблица 22 – Результаты по исследованию совместимости растительных субстанций с эксципиентами геля

Смесь с ВВ	Субстанций из корней	Субстанций из НЧ
	Физические изменения	
Карбомер	-	-
Карбомер+ТЭА	-	-
Глицерин	-	-
Пропиленгликоль	-	-
ПЭГ-400	-	-
Ментол	-	-
Сорбат калия	-	-

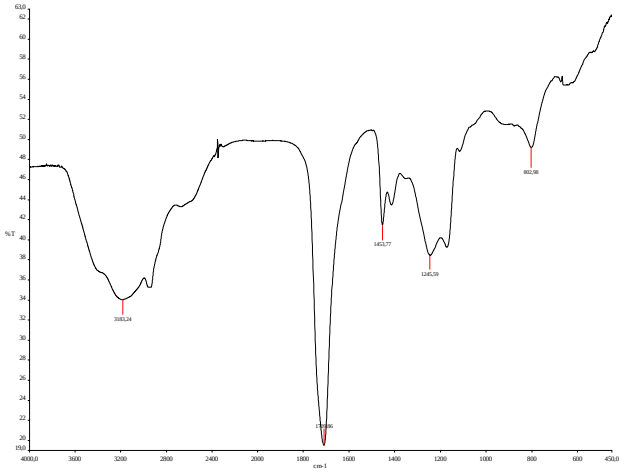
В ИК-спектрах субстанций из НЧ (рисунок 34 (а)) и корней (рисунок 34 (б)) видны широкие полосы поглощения при 3407 и 3399.1 $см^{-1}$, соответственно, характерные для -ОН групп, участвующих в образовании межмолекулярных водородных связей ди- и/или полимеров. Полосы поглощения в области 1612.22 и 1613.4 $см^{-1}$, указывают на С-С колебания ароматических атомов углерода. Пики между 700 и 1800 $см^{-1}$, называемые зоной «отпечатка пальца», могут быть также связаны с растяжением ароматического кольца С=С-С, характерное для полифенольных соединений (1450.8, 1348.43, 1035.49, 766.47 $см^{-1}$ для субстанции из корней; 1447.25, 1037.08, 767.25 $см^{-1}$ для НЧ). Пики в области 1225.63 и 1233.09 $см^{-1}$ могут также свидетельствовать о колебаниях фенольной С–О–Н группировки.



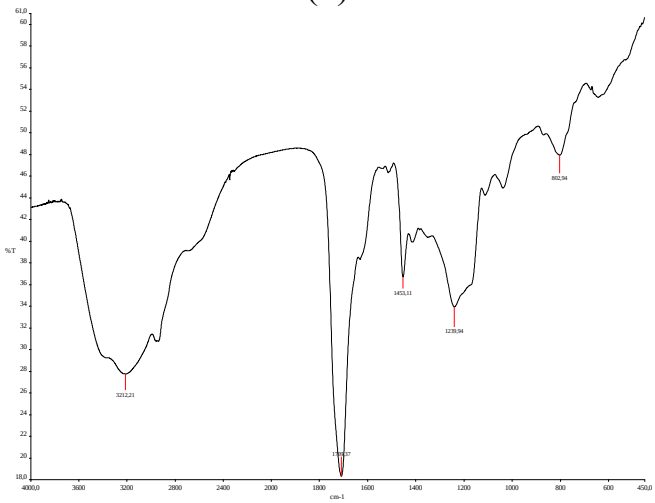
(а)



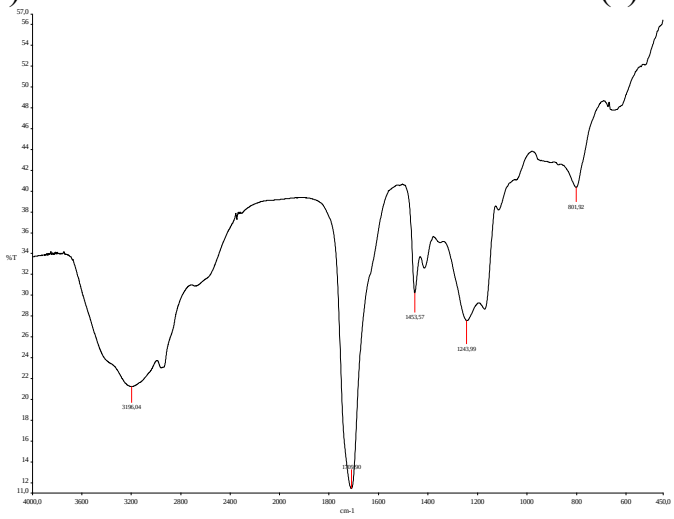
(б)



(в)



(г)



(д)

Рисунок 34 – ИК-спектры субстанции из НЧ (а), субстанции из корней (б), карбомера (в), смеси субстанции из корней с карбомером (г), смеси субстанции из НЧ с карбомером (д)

ИК-спектр карбомера (рисунок 34 (в)) характеризуется наибольшей полосой поглощения при 1709.86, характерной для валентных колебаний С=О, участвующей в образовании водородных связей.

В физической смеси карбомера и субстанций можно наблюдать присутствие характерных пиков индивидуальных компонентов, указывающих на отсутствие химического взаимодействия между ними (рисунок 34 (г, д)) [40].

Аналогично были проанализированы спектры поглощения смесей субстанций с другими ВВ и был сделан вывод о совместимости компонентов (таблица 23). ИК-спектры всех ВВ и их смесей с субстанциями представлены в Приложении Д.

Таблица 23 – Основные пики поглощения в ИК-спектрах ВВ геля и их смесей с растительными субстанциями

Вещество	Ментол	Сорбат калия
Основные пики в ИК спектре	3259.59, 2958.85, 1448.47, 1383.69, 1045.86, 1026.69, 995.60, 877.14, 845.73, 672.99, 594.99, 548.09 $см^{-1}$	3023.75, 1649.41, 1619.82, 1557.03, 1400.53, 1278.56, 1008.33, 963.19, 884.66, 710.12, 578.63 $см^{-1}$
Совместные пики в ИК спектре с субстанциями		
Субстанции	Ментол+субстанция	Сорбат калия+субстанция
Субстанция из корней (3399.1, 1613.4, 1450.8, 1348.43, 1233.09, 1035.49, 766.47 $см^{-1}$)	3624, 2929.68, 2958.1, 1619.08, 1448.75, 1368.87, 1313.34, 1226.43, 1105.44, 1045.77, 1026.7, 995.59, 919.31, 877.07, 846.69, 548.24 $см^{-1}$	3408.44, 1649.29, 1619.25, 1558.32, 1399.83, 1278.67, 1008.48, 693.38, 884.75, 710.23, 578.83 $см^{-1}$
Субстанция из НЧ (3407.92, 1612.22, 1447.25, 1225.63, 1037.08, 767.25, 619.39)	3265.05, 2957.92, 1615.94, 1448.49, 1383.71, 1226.38, 1105.27, 1045.59, 995.8, 919.25, 876.99 $см^{-1}$	3419.74, 3023.93, 1649.31, 1619.36, 1558.26, 1399.99, 1278.71, 1008.42, 963.29, 884.76, 710.24, 578.79 $см^{-1}$

Таким образом, на основании экспериментальных наблюдений, ИК-анализа делали вывод об отсутствии химического или физического взаимодействия между компонентами геля и их приемлемой совместимости.

3.8.2 Определение оптимальных концентраций компонентов гелей

3.8.2.1 Определение оптимальной концентрации гелеобразователя

После установления совместимости эксципиентов и растительных субстанций из растений вида *L. gmelinii*, исследовали различные составы гелей и получили более 50 экспериментальных образцов. Целью данного этапа был подбор оптимальных концентраций эксципиентов для получения лекарственной формы с заданными характеристиками.

Гелеобразователем, как было сказано ранее, был выбран гидрофильный полимер – карбомер, ввиду его нетоксичности, способности образовывать прозрачные и биоадгезивные гели, отсутствию раздражения на коже при многократном использовании. Технологическим преимуществом карбомеров является также возможность процесса гелеобразования при комнатной температуре, в отличие, например, от гидроксипропилметилцеллюлозы, которую необходимо растворять в горячей воде [219] .

Для загущения композиций, содержащих карбомер, использовали наиболее распространенный механизм – нейтрализацию полимера с помощью подходящего основания. В качестве нейтрализующего агента был выбран триэтаноламин. pH гелей до нейтрализации триэтаноламином составлял 3.5-4.0. Согласно рекомендациям производителя и литературным данным карбомер нейтрализовали до pH 5.5-6.0, которая считается благоприятной для местного применения на коже и не способствует аллергическим реакциям [220].

Оптимизированная технология изготовления гелей состояла из нескольких этапов:

1) стадия набухания полимера заключалась в приготовлении водной дисперсии карбомера и ее гомогенизации при постоянном перемешивании с добавлением сорастворителя для улучшения процесса смачивания полимера
2) нейтрализация основы до pH 5.5-6.0
3) получение растворов субстанций растительного происхождения и добавление к ним вспомогательных веществ до полного растворения всех компонентов;
4) постепенное смешивание гелевой основы с раствором субстанций растительного происхождения и вспомогательных веществ.
5) корректирование pH геля до pH 5.5-6.0

Концентрацию карбомера варьировали от 0,5 до 1,5 % (Таблица 24), при неизменных концентрациях других компонентов. Гели оценивали органолептически, по показателям однородности, текучести, вязкости, pH, в тесте на агрегативную и термическую стабильность.

Таблица 24 – Составы модельных образцов гелей с различной концентрацией карбомера

Компоненты геля	F1	F2	F3	F4	F5	F6
1	2	3	4	5	6	7
НЧ, %	5.0	5.0	5.0	-	-	-
Корни, %	-	-	-	5.0	5.0	5.0
Карбомер, %	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
Глицерин, %	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Продолжение таблицы 24

1	2	3	4	5	6	7
Пропиленгликоль, %	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Ментол	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Спирт этиловый 96.0 %	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Сорбат калия, %	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Триэтаноламин, %	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
Вода очищенная, %	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

Оценка органолептических свойств гелей проводилась сразу после приготовления визуально в прозрачных флаконах в проходящем или отраженном дневном свете. Все полученные образцы гелей обладали приемлемым pH, были прозрачными, гомогенными. Все составы оставались стабильными в тесте на разделение фаз при центрифугировании, при котором не наблюдалось образование осадков, разделения фаз, седиментации или коалесценции, что еще раз подтверждало совместимость субстанций и ВВ [41,42]. pH образцов гелей до нейтрализации находился в диапазоне 3.0-3.5, но далее был скорректирован до pH 5.0-6.0, соответствующего pH средств для местного применения на кожу [220]. Все описанные результаты физико-химического анализа гелей суммированы в таблице 25.

Таблица 25 – Физико-химические свойства модельных образцов гелей

Показатели	F1	F2	F3	F4	F5	F6
pH	5.67±0.03	5.74±0.05	5.81±0.02	5.66±0.03	5.95±0.02	5.82±0.05
Вязкость, Па*с	0.35±0.05	0.64±0.03	1.12±0.13	0.41±0.06	0.67±0.11	1.17±0.09
Внешний вид	Текучий, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Желеобразный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Текучий, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Гелеобразный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Желеобразный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается
Агрегативная стабильность (центрифугирование при 3000 об/мин)	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен
Термическая стабильность	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен

Структурная вязкость гелей, как и ожидалось, возрастает с увеличением концентрации карбомера (рисунок 35) и находится в диапазоне значений 0,34-108 Па*С [221], являющимся оптимальным для местного применения. Измерения проводили при скорости сдвига 100 $с^{-1}$, что соответствует примерным скоростям сдвига при выдавливании препаратов из упаковки и намазывании [222].

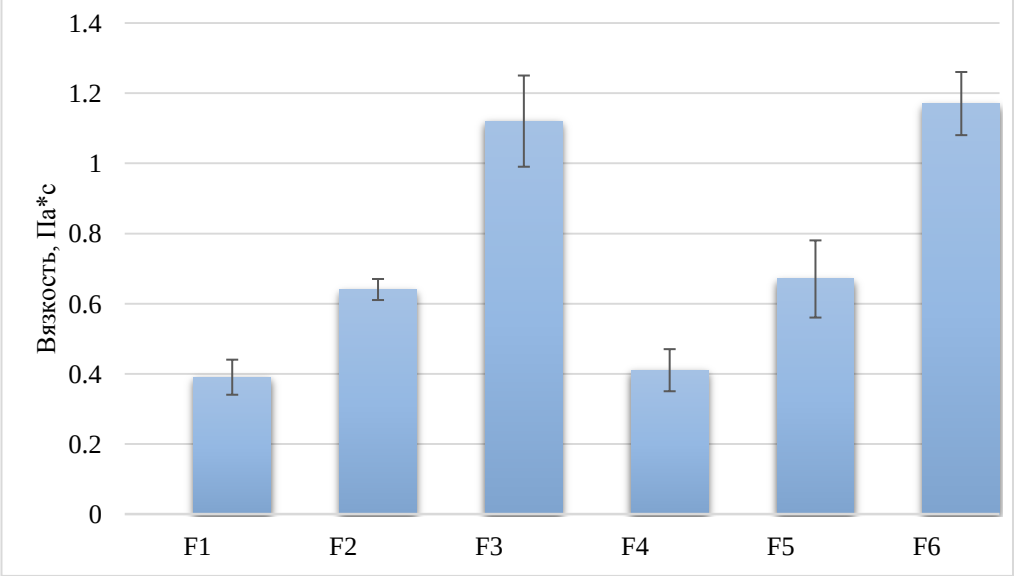


Рисунок 35 – Структурная вязкость модельных образцов гелей

Гели с концентрацией карбомера F1 и F4 0.5 % визуально были недостаточно вязкими, а образцы F3 и F6 были густыми, нетекучими и желеобразными, что представляется недостаточно удобным при использовании пациентом, а также может вызвать трудности при проведении последующих технологических операций [38]. Также гели с густой структурой ограничивают высвобождение лекарственных веществ и биоадгезивное действие [219].

На основании комплекса полученных данных гели с концентрацией карбомера 1.0 % были выбраны как наиболее оптимальные для дальнейших исследований.

3.8.2.2 Определение оптимальной концентрации вспомогательных веществ

В качестве сорастворителей, хумектантов и усилителей проникновения были протестированы глицерин, пропиленгликоль (ПГ) и полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400). Данные растворители широко используются в различных гелевых композициях и могут оказывать эффект на процесс набухания полимеров, так и на растворимость лекарственных веществ. Пропиленгликоль считается одним из лучших нетоксичных усилителей проникновения и пластификаторов, повышающий трансдермальный доступ многих ЛВ [223,224]. Кроме того, сообщается, что ПГ не только способствует

проникновению, но и увеличивает задержку в коже таких флавоноидов, как хризин и кверцетин [225]. В ряде исследований при формировании карбомерных гелей к воде часто добавляют ПЭГ-400 или глицерин, что положительно влияет на их реологические и мукоадгезивные свойства [226]. Также данные растворители способствуют лучшему растворению ментола. Составы модельных образцов гелей представлены в таблице 26. Составы гелей разрабатывали при неизменных концентрациях карбомера (1.0 %) и растительных субстанций (5.0 %).

Таблица 26 – Составы модельных образцов гелей с различной концентрацией сорастворителей

Компоненты геля, %	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
НЧ	5.0	-	5.0	-	5.0	-	5.0	5.0	-	-
Корни	-	5.0	-	5.0	-	5.0	-	-	5.0	5.0
Карбомер	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Глицерин	5.0	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-
Пропиленгликоль	-	5.0	-	-	5.0	-	10.0	15.0	10.0	15.0
ПЭГ-400	-	-	5.0	-	-	5.0	-	-	-	-
Спирт этиловый 96.0%	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Ментол	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Сорбат калия	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Триэтаноламин	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Вода очищенная	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

Физико-химические свойства гелей F7- F16 были изучены описанным ранее способом и показали удовлетворительные результаты (Таблица 27).

Таблица 27 – Физико-химические свойства модельных образцов гелей

Показатели	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
pH	5.78±0.05	5.88±0.02	5.91±0.05	5.82±0.01	5.84±0.06	5.88±0.05	5.92±0.03	5.78±0.04	5.75±0.04	5.95±0.02
Внешний вид	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается	Густой, пластичный, однородный, прозрачный образец темно-коричневого цвета, легко намазывается
Агрегативная стабильность (центрифугирование при 3000 об/мин)	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен	стабилен

В процессе приготовления лабораторных серий гелей было замечено, что времени, необходимого для перемешивания формул с ПГ и ПЭГ-400 до однородного гомогенного состояния затрачивалось меньше, чем для гомогенизации композиций с глицерином, в котором более продолжительное время оставались комки набухшего полимера. Однородные гели с ПГ и ПЭГ-400 получали в течение 3 ч, в то время как на изготовление гелей с глицерином уходило до 4.5 ч.

Однако более важно было установить и сравнить степень высвобождения субстанций из различных основ методом *in vitro*. Кинетика высвобождения напрямую влияет на терапевтический эффект МЛФ [39]. Оптимальные составы были выбраны также на основании данных изучения вязкоэластичных свойств гелей.

Исследование кинетики высвобождения из гелевой основы изучали методом оценки диффузии растительных субстанций через целлюлозную мембрану в фосфатный буферный раствор (pH=6.0-6.5).

Оценку высвобождения проводили методом УФ спектрофотометрии. Максимум поглощения обеих субстанций соответствует длине волны 268 нм (рисунки 36, 37), при которой измеряли оптическую плотность для построения градуировочных графиков.

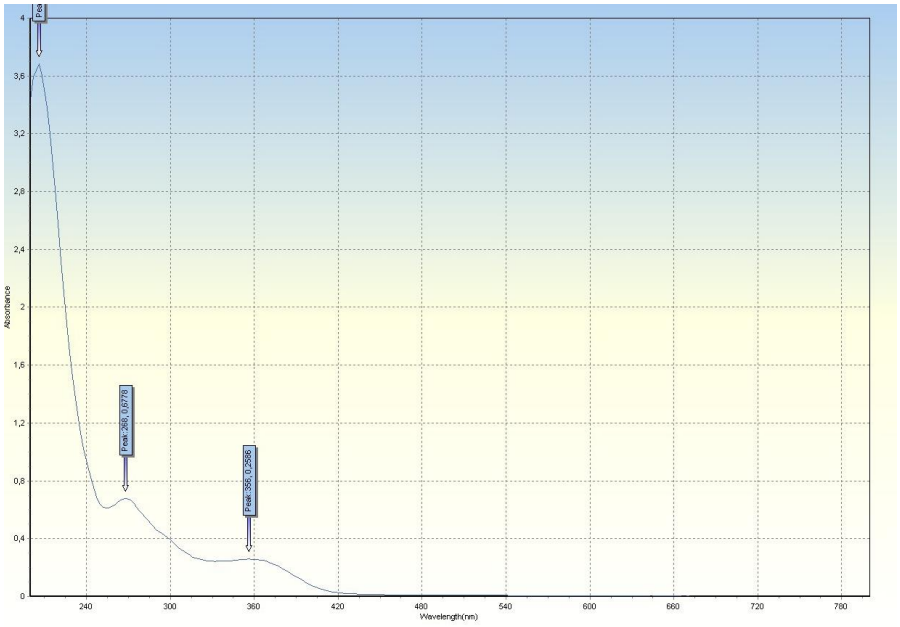


Рисунок 36 – УФ-спектр субстанции из корней растений вида *L. gmelinii*

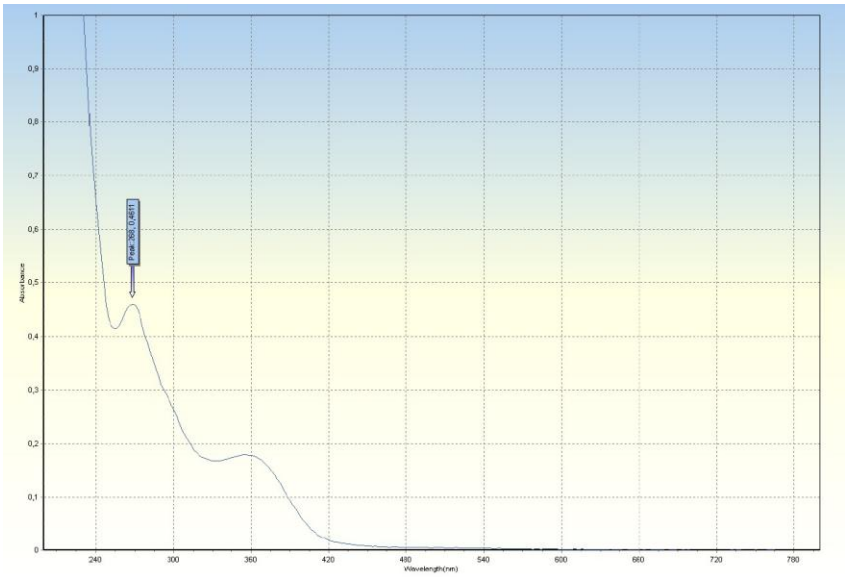


Рисунок 37 – УФ-спектр субстанции из НЧ растений вида *L. gmelinii*

Для построения градуировочных графиков зависимости оптической плотности от концентрации субстанции были приготовлены серии растворов и проведено 3 параллельных определения. Полученные градуировочные кривые носили линейный характер и описывались приемлемыми значениями коэффициента корреляции (рисунки 38, 39).

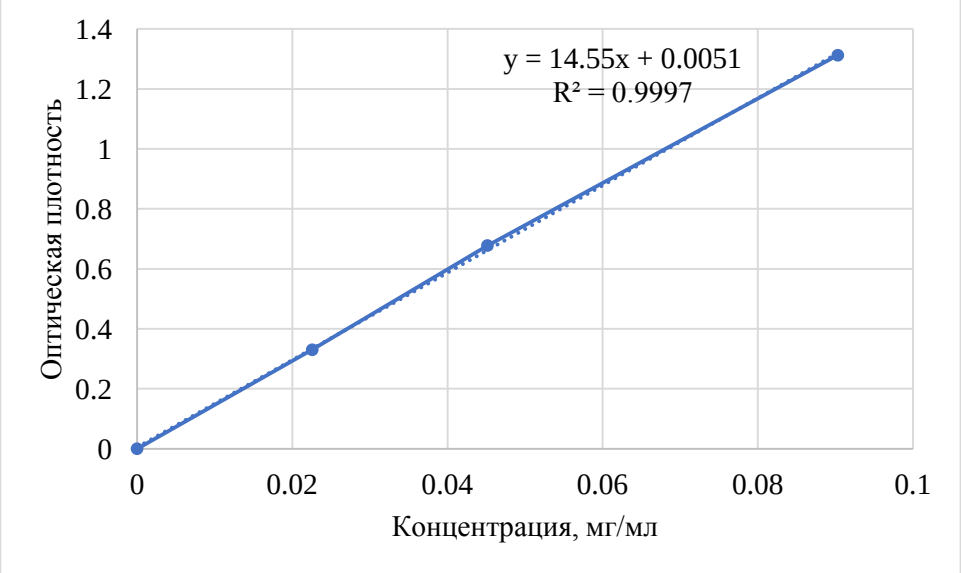


Рисунок 38 – Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации субстанции из корней растений вида *L. gmelinii*

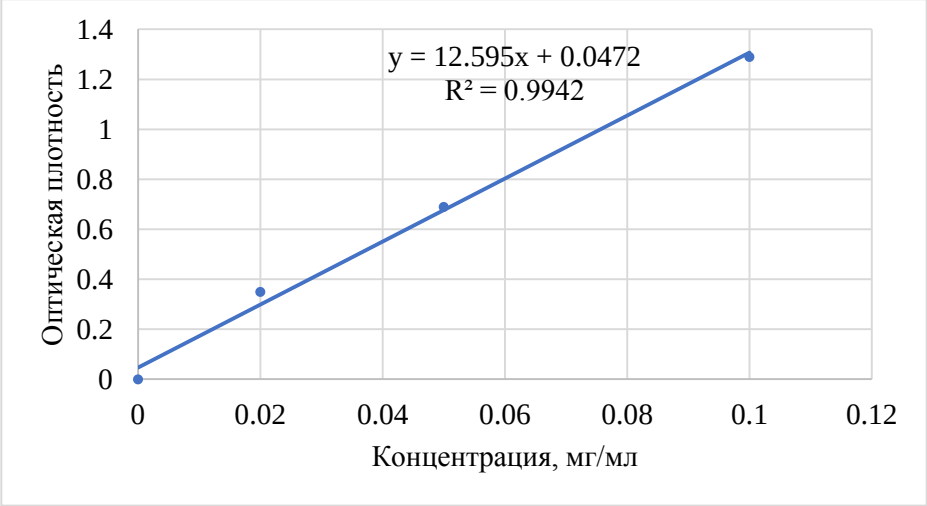


Рисунок 39 – Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации субстанции из НЧ растений вида *L. gmelinii*

После определения длины волны максимального поглощения и построения градуировочных графиков была изучена кинетика высвобождения субстанций из гелевых основ. Согласно кривым, представленным на рисунке 40, образцы F7 – F9 обладали высокими показателями высвобождения субстанций из гелевых основ. В течение 10 минут высвободившееся количество субстанции из составов F7, F8 и F9 составляло 53.4 %, 60.4 % и 42.8 %, соответственно. Максимальное высвобождение через 360 мин в количестве 81.8 % наблюдалось для F8, в составе которой использовался ПГ. Состав геля F7 с глицерином обладает скоростью высвобождения немного ниже, чем F8, с кумулятивным процентом высвобождения равным 78.2 %. Состав F9 имеет наиболее низкий показатель высвобождения субстанции из основы геля, что заметно уже после первого часа опыта с показателем 63.5 %.

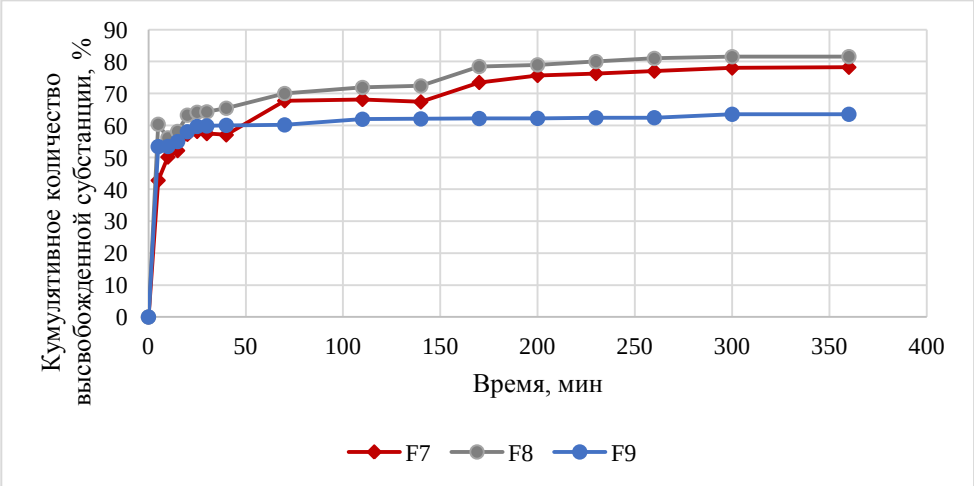


Рисунок 40 – Кривые высвобождения субстанции из корней из составов №F7–F9

Аналогичная кинетика высвобождения наблюдалась для составов F10-F12 (рисунок 41). Субстанция из НЧ диффундировала из гелевой основы F10, F11 и F12 в течение 10 минут в количестве 51.8 %, 59.6 % и 43.1 % соответственно. Наибольшее высвобождение субстанции из НЧ наблюдается в течение 360 мин из составов F10 и F11 в количестве 80.5 % и 82.3 %, соответственно.

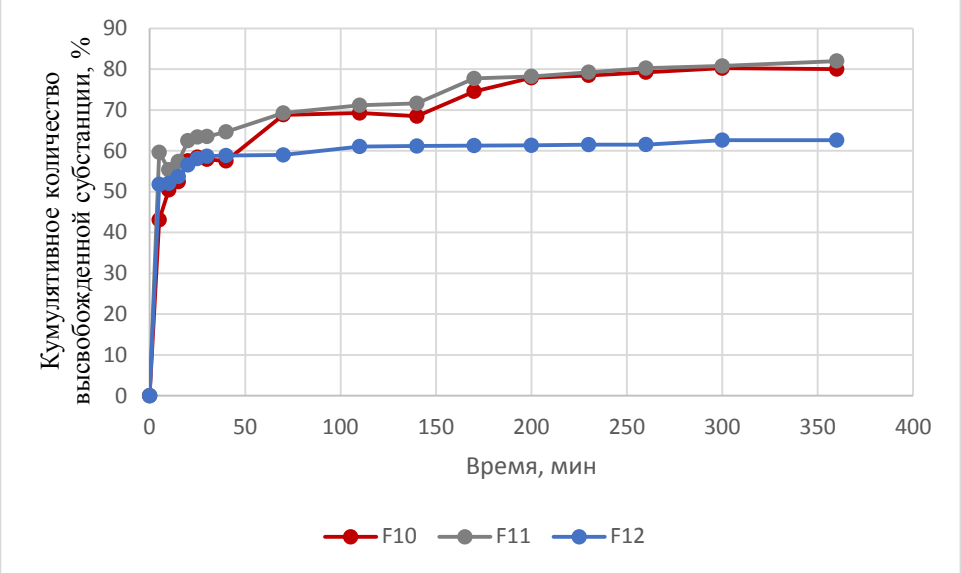


Рисунок 41 – Кривые высвобождения субстанции из НЧ из составов №F10–F12

Составы с применением ПГ демонстрируют высокий уровень высвобождения до 70 % для субстанций из корней и НЧ в первый час, указывая на их хорошую растворимость в гелевой основе. Безусловно, предварительное растворение субстанций в смеси воды и спирта, как наиболее подходящего для них растворителя, в высокой степени оказывает влияние на их последующую растворимость в гелевой основе. Но кроме того, стоит учитывать факт, что субстанции из корней и НЧ растений вида *L. gmelinii* растворимы в пропиленгликоле, умеренно растворимы в воде и нерастворимы в глицерине и ПЭГ-400. Таким образом, составы F8 и F11 содержат смесь растворителей наиболее оптимальную для высвобождения субстанций из лекарственной формы.

Следующим шагом было важно установить оптимальное количество добавляемого ПГ в состав геля. Были дополнительно приготовлены гели с концентрацией ПГ, увеличенной до 10.0 и 15.0 % и изучены их кинетики высвобождения (рисунок 42), а также реограммы течения.

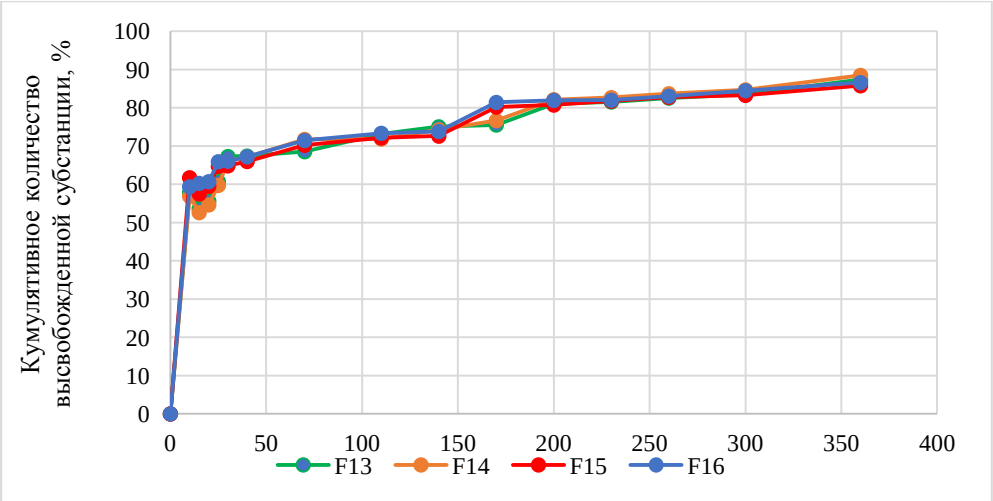
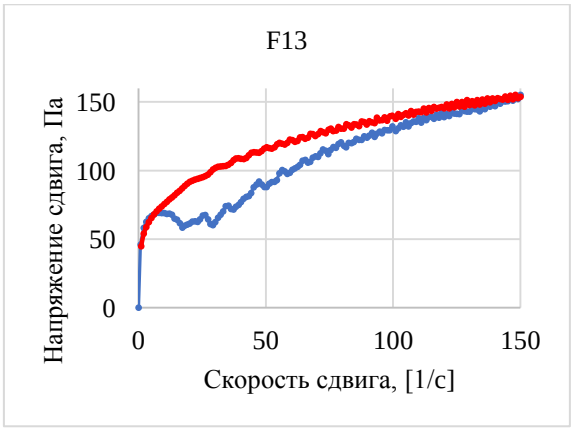


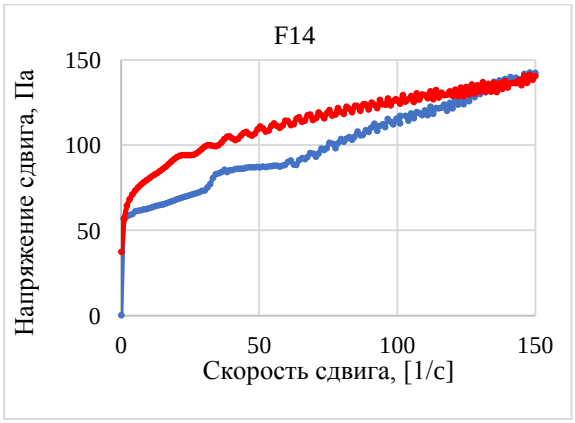
Рисунок 42 – Кривые высвобождения субстанции из корней и НЧ из составов №F13–F16

Добавление ПГ в количестве 10 % позволило увеличить процент высвобождения субстанций из НЧ и корней до 87.36 % и 85.78 % соответственно, и последующее повышение его концентрации до 15 % незначительно влияло на этот показатель, что позволило сделать вывод о том, что концентрации ПГ 10.0 % и 15.0 % являются равнозначно оптимальными для применения в составах гелей.

Определение реологических характеристик МЛФ не является обязательным согласно фармакопейным требованиям, однако, они являются важными параметрами оценки качества лекарственных форм на этапах разработки, изучения стабильности и при выборе условий производства. Для изучения вязкоэластичных свойств гелей строились кривые зависимости напряжения сдвига от градиента скорости сдвига от 0 до 150 $с^{-1}$ при 20^0 С (рисунок 43).

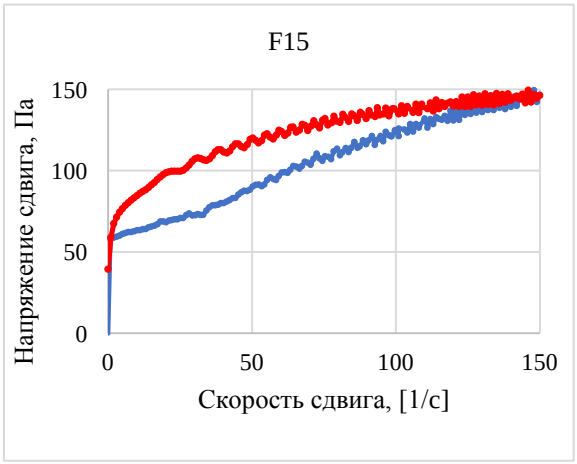


(а)

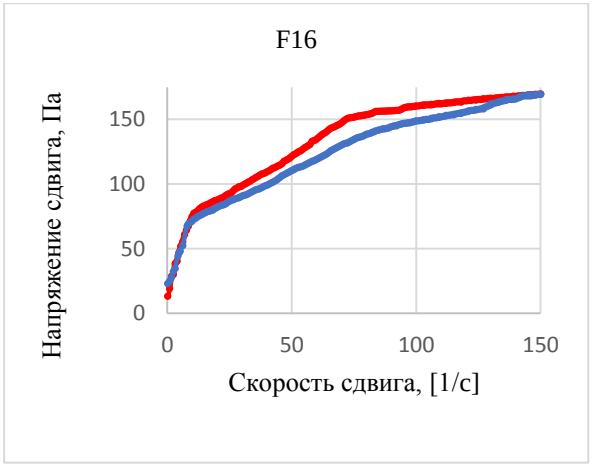


(б)

Рисунок 43 – Реограммы течения образцов гелей F13 (а), F14 (б), F15 (в), F16 (г)



(в)



(г)

Рисунок 43

Как видно из рисунка 43, кривые течения имели восходящую и нисходящую линии, образуя выраженную петлю гистерезиса, которая свидетельствовала о наличие тиксотропных свойств у полученных образцов гелей. Тиксотропия характерна для структурированных систем с пластичным типом течения, которые обладают свойством деформироваться под влиянием механической силы. Данная характеристика позволяет судить о хороших фармакотехнических и потребительских свойствах продукта, а именно, об хорошей способности к выдавливанию из туб и намазываемости, что, в свою очередь, оказывает влияние на удобство в использовании. Площадь гистерезиса образца F16 несколько меньше, чем у образцов F13-F15, а различия в реологии образцов F13 и F14 статистически незначимо.

Таким образом, на основании данных кинетики высвобождения и реологических характеристик, сорастворителем, пластификатором и усилителем проникновения для гелевой основы-носителя субстанций из растений вида *L. gmelinii* был выбран ПГ в количестве 10.0 %.

3.8.2.3 Определение оптимальной концентрации растительных субстанций и исследование стабильности гелей

Разработка составов растительных гелей далее проводилась в двух концентрациях активного ингредиента – 5.0 и 7.0 %. Ранее полученные мази на основе субстанции из корней растений вида *L. gmelinii* показали свою терапевтическую активность при концентрации 5.0 % [7]. С целью увеличения терапевтической эффективности представлялось возможным получение МЛФ с более высокой концентрацией.

На данном этапе исследований также дополнительно изучали способ приготовления гелей из густых экстрактов для упрощения технологии и сокращения времени приготовления гелей. Густые экстракты получали на стадии их концентрирования после процесса УЗ экстракции. Процентное

содержание сухого вещества в концентрированных растительных экстрактах измеряли после проведения УЗ экстракции, концентрирования и полного удаления растворителя. Процент вводимой субстанции в пересчете на сухое вещество составлял 5.0±1.05 %. Данный способ позволяет значительно сократить время, затрачиваемое на получение сухих субстанций в процессе УЗЭ, и вводить экстракты в гелевую основу уже в растворенном виде. Составы гелей отображены в таблице 28.

Таблица 28 – Составы модельных образцов гелей с различной концентрацией сорастворителей

Формула	F17	F18	F19	F20	F21	F22
Субстанция из НЧ	5.0	7.0	-	-	-	-
Субстанция из корней	-	-	5.0	7.0	-	-
Густой экстракт из НЧ (17.0 %)	-	-	-	-	30.0	-
Густой экстракт из корней (17.0 %)	-	-	-	-	-	30.0
Спирт этиловый	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Пропиленгликоль	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Карбомер	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ментол	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ТЭА	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Сорбат калия	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Вода	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

Внешний вид гелей с субстанцией из корней и НЧ не отличается и представлен на рисунке 44 – прозрачные гели коричневого цвета со специфическим запахом растения.

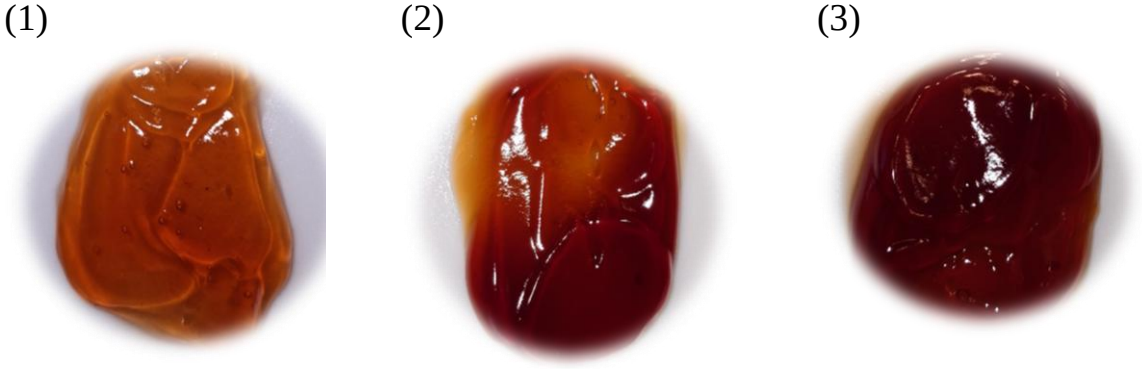


Рисунок 44 – Внешний вид гелей (1) – 5% гель, полученный из растительной субстанции; (2) – 5 %, полученный из густого экстракта; (3) 7 %, полученный их сухого экстракта

В ходе изменения процента вводимых субстанций в гелях установлено, что концентрация субстанций существенно не влияет на реологические свойства гелей и кумулятивное высвобождение из основы. Составы F17-F22 показали схожее псевдопластическое поведение и наличие петли гистерезиса, что также подтверждает их тиксотропные свойства (рисунок 45).

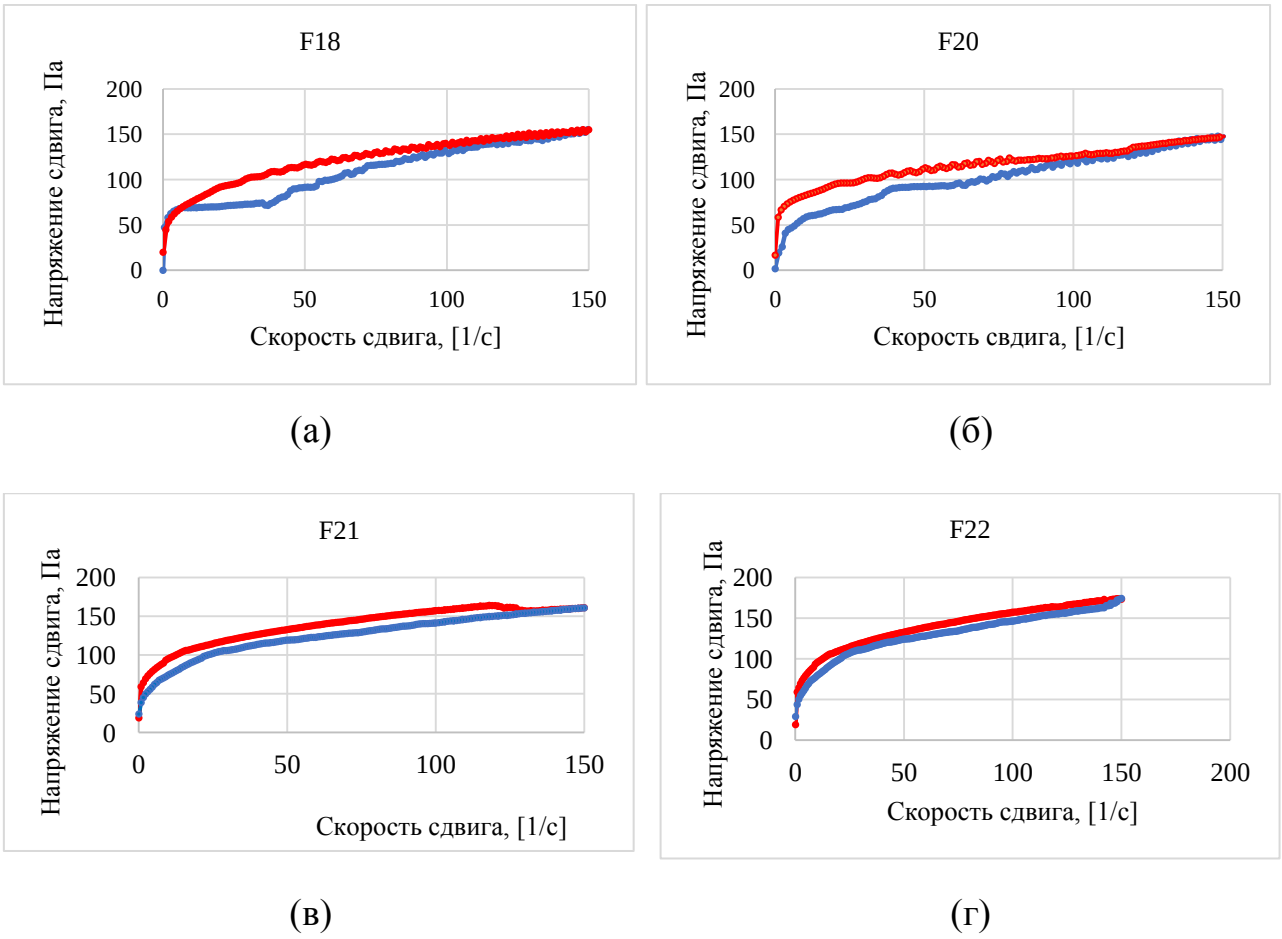


Рисунок 45 – Реограммы течения образцов гелей F18 (а), F20 (б), F21 (в), F22 (г)

Полученные данные еще раз показали, что приготовленные гели способны деформироваться под действием механической силы и течения, что положительно влияет на фармакотехнические характеристики и позволяют основе легко распределяться по коже [227]. Высвобождение из составов F17-F22 также продемонстрировало удовлетворительные результаты в диапазоне от 84.25 % для F22 до 88.49 % для F18 (рисунок 46).

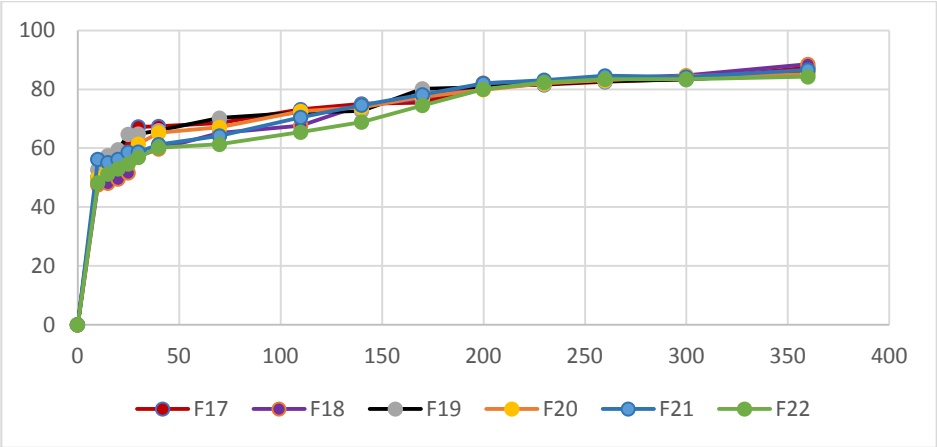


Рисунок 46 – Кинетика высвобождения субстанций из модельных образцов гелей F17-F22

Последующую оценку гелей с разной концентрацией активной субстанции проводили комплексом физико-химических методов, предусмотренных требованиями по качеству ГФ РК [192]. Полученные образцы гелей подвергали исследованиям на стабильность при хранении в течение 1 года. В течение этого периода изучали количественное содержание активной субстанции в образцах гелей.

Действующим началом субстанций являются разнообразные полифенольные соединения, которые как отмечалось выше, являются сильными противовоспалительными агентами. Тест Фолина-Чокальтеу на сумму полифенолов показал их высокое содержание в сухих экстрактах из растений вида *L. Gmelinii* – 32.5±1.2 % и 44.7±2.5 % в надземной части и корнях соответственно. Данная методика была также использована для количественной измерения суммы полифенолов в гелях, и была подтверждена прямо пропорциональная зависимость от введенного количества субстанции и найденного количества аналитического маркера (таблица 29). Ранее описанная методика ВЭЖХ количественного определения ЭПКГ не показала сходимых стабильных результатов вычислений и не подходила для оценки гелей.

Таблица 29 – Физико-химические свойства модельных образцов гелей

Показатели	F17	F18	F19	F20	F21	F22
1	2	3	4	5	6	7
Описание	Однородный прозрачный густой гель мягкой консистенции, коричневого цвета, хорошо втирается					
pH	5.98±0.02	6.35±0.04	6.40±0.02	5.99±0.01	6.21±0.01	6.35±0.02
Идентификация -дубильные вещества	+	+	+	+	+	+

Продолжение таблицы 29

1	2	3	4	5	6	7
Однородность	однородный					
Количественное определение - дубильные вещества (не менее 1.0 %) - сумма полифенолов (не менее 1.50 %)	 1.15±0.05 1.59±0.03	 1.60±0.02 2.20±0.05	 1.52±0.04 2.15±0.04	 2.01±0.05 2.88±0.04	 1.25±0.02 2.19±0.01	 1.62±0.04 2.85±0.04
Агрегативная стабильность	стабилен					

3.8.3 Разработка технологической схемы получения гелей на основе растительных субстанций из растений вида L. gmelinii и их спецификаций

Проведенное комплексное исследование характеристик гелей позволило разработать оптимальную технологию получения, учитывая критические параметры технологических операций [21], [47]. Схема получения гелей представлена на рисунке 47 и включает следующие этапы: подготовка сырья, помещений и оборудования для технологического процесса; подготовка активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) и вспомогательных веществ (ВВ); приготовление раствора консерванта; создание основы геля путем добавления карбомера в раствор консерванта; растворение ментола и его добавление в гелевую основу; нейтрализация основы; растворение субстанций; смешивание растворов субстанций с гелевой основой и гомогенизация; упаковка и маркировка: первичная упаковка, вторичная упаковка и транспортная упаковка (рисунок 47).

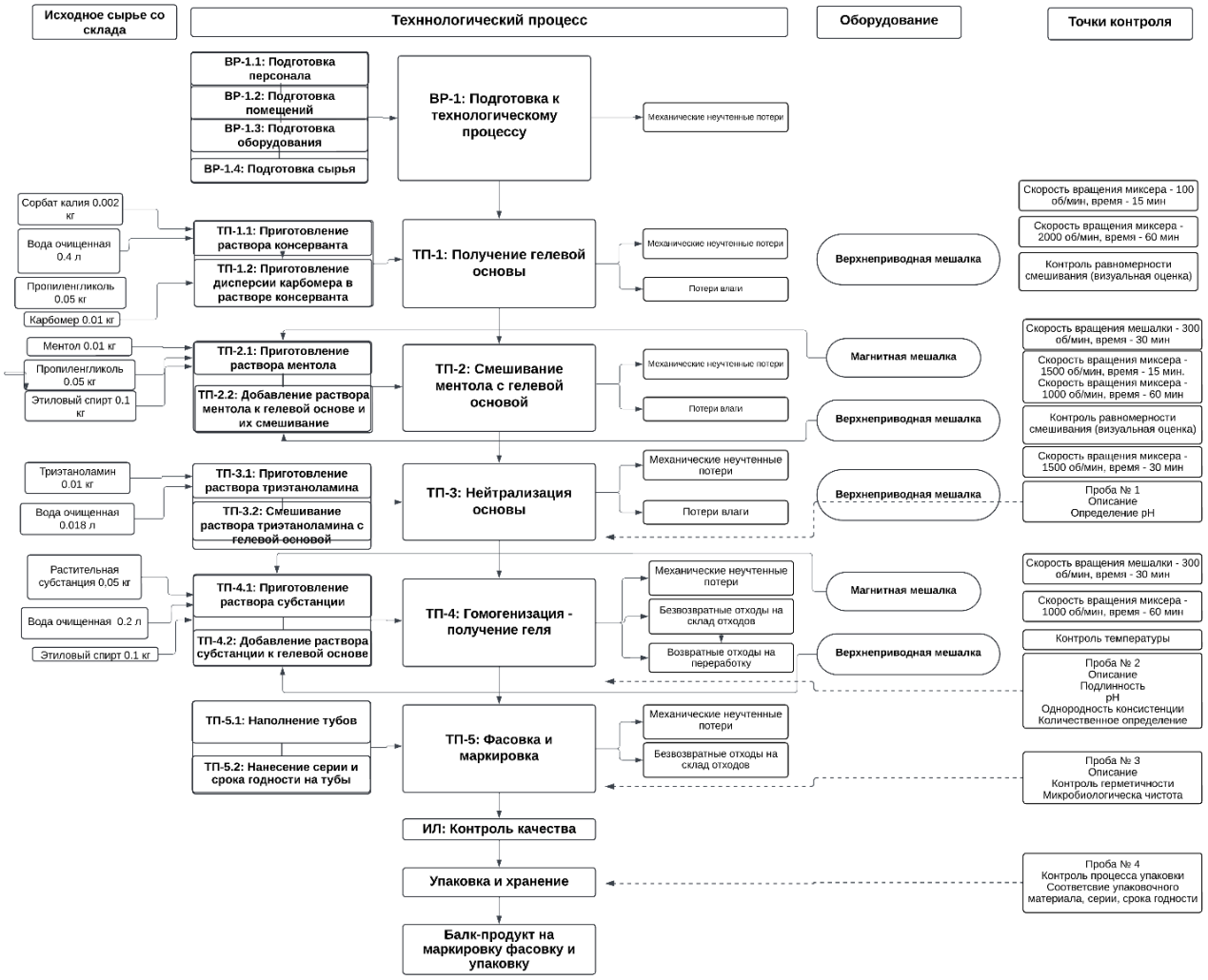


Рисунок 47 – Технологическая схема производства гелей на основе субстанций из растений вида *L. gmelini*

Изложение технологического процесса.

ВР-1 Подготовка к технологическому процессу

Подготовка к технологическому процессу включает в себя подготовку персонала, помещений, оборудования и сырья согласно соответствующим инструкциям. Подготовка сырья включает в себя его входной контроля качества с отбором средней пробы. Все виды сырья должны соответствовать требованиям ГФ РК или соответствующим сертификатам качества (таблица 30).

Таблица 30 – Входной контроль качества АФИ и ВВ

Наименование	Показатели	Требование
Субстанция из корней Субстанция из НЧ	Идентификация	Должна соответствовать требованиям НД
	Количественное содержание ДВ, % (в пересчете на сухое вещество)	Не менее 15.0 %
	Потери в массе при высушивании, %	Не более 12%
Карбомер	Согласно НД	Должна соответствовать требованиям спецификации (Приложение Е)
Пропиленгликоль	Согласно НД	Должна соответствовать требованиям спецификации (Приложение Ж)
Калия сорбат	Согласно НД	Должна соответствовать требованиям спецификации (Приложение З)
Спирт этиловый	Согласно НД	Должна соответствовать требованиям спецификации (Приложение И)
Ментол	Согласно НД	Должна соответствовать требованиям спецификации (Приложение К)
ТЭА	Согласно НД	Должна соответствовать требованиям спецификации (Приложение Л)
Вода очищенная	Согласно НД	Должна соответствовать требованиям спецификации (Приложение М)

ТП-1 Получение гелевой основы

Получение гелевой основы начинается со взвешивания на настольных весах воды очищенной, пропиленгликоля, сорбата калия и карбомера в заранее пронумерованные емкости. В гомогенизатор загружают вручную воду очищенную и пропиленгликоль. Включают верхнеприводную мешалку и смесь

хорошо перемешивают при скорости мешалки 300 об/мин. Затем прибавляют сорбат калия и перемешивают до образования прозрачного раствора. Далее мешалку переключают на скорость гомогенизатора 2000 об/мин и постепенно присыпают карбомер в течении 60 минут до получения прозрачного геля.

ТП-2 Смешивание ментола с гелевой основой

На настольных весах взвешиваются ментол, пропиленгликоль и этиловый спирт в заранее пронумерованные емкости. В отдельной емкости с помощью магнитной мешалки смешиваются ПГ и спирт этиловый, в смесь которых далее вносят ментол до полного его растворения при скорости смешивания 300 об/мин в течение 30 минут.

При скорости гомогенизатора 1500 об/мин к полученному гелю порциями добавляют раствор ментола в течение 15 минут. Далее снижают скорость гомогенизатора до 1000 об/мин и продолжают перемешивание в течение 60 минут до получения прозрачного однородного геля.

ТП-3 Нейтрализация основы

Операция начинается со взвешивания на настольных весах в две отдельных емкости триэтаноламина и воды очищенной. В отдельной емкости вручную смешиваются ТЭА и вода очищенная для приготовления раствора нейтрализатора.

При скорости гомогенизатора 1500 об/мин к полученному гелю порциями добавляют раствор ТЭА. Массу перемешивают в течении 30 минут до загущения геля. На этой стадии методом отбора проб определяют pH гелевой основы и корректируют его до 5.5-6.5 при необходимости, добавляя небольшие порции ТЭА. Гелевую массу оставляют для полного набухания карбомера и стабилизации массы на 60 минут.

ТП-4 Получение геля

ТП-4.1 Приготовление раствора субстанции

Операция начинается со взвешивания на настольных весах в три отдельных контейнера растительной субстанции, воды очищенной и спирта этилового. Используя магнитную мешалку, перемешивают воду с этиловым спиртом, и далее к водно-этиловому раствору добавляют растительную субстанцию и полученную смесь перемешивают при скорости смешивания 300 об/мин в течение 30 минут до получения прозрачного раствора.

ТП 4.2 Смешивание гелевой основы с АФИ

При скорости гомогенизатора 1500 об/мин к гелевой массе порциями добавляют раствор субстанции в течение 15 минут. Далее снижают скорость гомогенизатора до 1000 об/мин и продолжают перемешивание в течение 60 минут до получения прозрачного однородного геля.

Проводят промежуточный контроль качества геля по показателям pH, количественного содержания растительной субстанции.

При получении положительных результатов анализа производятся дальнейшие операции по фасовке и упаковке геля (ТП-5).

Материальный баланс рассчитан на 1.0 кг согласно составу геля на 100.0 г и представлен в таблице 31.

Таблица 31 – Материальный баланс производства геля с растительной субстанцией из корней растений вида *L. gmelinii*

Загружено			Получено		
1	2	3	4	5	6
Наименование сырья	Расход, кг	В 100 % исчислении	Наименование продукта, отходов и потерь	Приход, кг	В 100 % исчислении
Действующее вещество: Субстанция из корней	0.05	5.0	Гель с растительной субстанцией из корней	0.948	94.8
Вспомогательные вещества: *Карбомер* *Ментол* *Пропиленгликоль*	 0.01 0.01 0.10	 1.0 1.0 10.0	Потери: ТП-1 ТП-2 ТП-3	0.052 0.011 0.015 0.026	5.2 1.05 1.47 2.58
Спирт этиловый 96.0 % *ТЭА* *Сорбат калия* *Вода очищенная*	0.20 0.01 0.002 0.618	20.0 1.0 0.2 61.8			
Итого	1.0	100		1.0	100

Таблица 32 – Материальный баланс производства геля с растительной субстанцией из НЧ растений вида *L. gmelinii*

Загружено			Получено		
Наименование сырья	Расход, кг	В 100 % исчислении	Наименование продукта, отходов и потерь	Приход, кг	В 100 % исчислении
Действующее вещество: Субстанция из НЧ	0.05	5.0	Гель с растительной субстанцией из НЧ	0.944	94.4
Вспомогательные вещества: *Карбомер* *Ментол* *Пропиленгликоль* *Спирт этиловый 96.0 %* *ТЭА* *Сорбат калия* *Вода очищенная*	 0.01 0.01 0.10 0.20 0.01 0.002 0.618	 1.0 1.0 10.0 20.0 1.0 0.2 61.8	Потери: ТП-1 ТП-2 ТП-3	0.056 0.014 0.010 0.032	5.60 1.40 1.00 3.20
Итого	1.0	100		1.0	100

Целью валидации технологии являлось документальное подтверждение того, что технологический процесс препарата в виде геля с субстанциями из растений вида *L. gmelinii* соответствует предъявляемым к нему требованиям и качественным характеристикам и является воспроизводимым.

Валидация лабораторных серий согласно требованиям международных стандартов проводится для оценки и определения критических характеристик продукта [10,218]. Валидация на данном этапе позволяет тщательно проанализировать все аспекты технологического процесса, выявлять ключевые параметры, которые могут повлиять на качество конечного продукта, и в дальнейшем выбирать наиболее приемлемый и стабильный производственный процесс. Таким образом, валидация обеспечивает уверенность в том, что продукт будет соответствовать установленным спецификациям и требованиям качества на всех этапах производства. Лабораторные серии производятся на этапе фармацевтической разработки и их объем составляет в 100-1000 раз меньше, чем промышленные партии [218].

Валидационные испытания проводились на трех последовательных лабораторных сериях препарата согласно протоколу валидации процесса.

Проведен анализ критических стадий технологического процесса и оценены необходимые мероприятия по их контролю в соответствии с регламентируемыми нормами (таблица 33).

Таблица 33 – Результаты валидации технологического процесса

Стадии процесса	Параметры	Регламентируемые нормы	Кол-во отбора проб в одной серии	Результаты исследования
1	2	3	4	5
Стадия ВР-1. Подготовка сырья: растительные субстанции, вспомогательные вещества	Качество исходного сырья	В соответствии с НТД: тех.регламент	3	Соответствует
Стадия ТП-1.1. Приготовление раствора консерванта	Масса используемого сырья, кг	± 2 %	-	Соответствует
	Время перемешивания, минут	15	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	300	-	Соответствует
	Визуальная оценка раствора	Прозрачный раствор	3	Соответствует
Стадия ТП-1.2. Приготовление дисперсии карбомера в растворе консерванта	Масса используемого сырья, кг	± 2 %	-	Соответствует
	Время перемешивания, минут	60	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	2000	-	Соответствует
	Визуальная оценка гелевой основы	Прозрачная однородная масса	3	Соответствует

Продолжение таблицы 33

1	2	3	4	5
Стадия ТП-2.1 Приготовление раствора ментола	Масса используемого сырья, кг	± 2 %	-	Соответствует
	Время перемешивания, минут	30	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	300	-	Соответствует
	Визуальная оценка раствора	Прозрачный раствор с запахом ментола	3	Соответствует
Стадия ТП-2.2. Смешивание ментола с гелевой массой	Масса используемого сырья, кг	± 2 %	-	Соответствует
	Время перемешивания, минут	15 60	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	1500 1000	-	Соответствует
	Визуальная оценка гелевой основы	Прозрачная однородная масса	3	Соответствует
Стадия ТП-3.1 Приготовление раствора ТЭА	Масса используемого сырья, кг	± 2 %	-	Соответствует
	Время перемешивания	15'	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	15	-	Соответствует

Продолжение таблицы 33

1	2	3	4	5
Стадия ТП-3.2 Нейтрализация	Время перемешивания	30'	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	1500	-	Соответствует
	Внешний вид гелевой массы	Прозрачная однородная густая масса	9	Соответствует
	pH	5.75-6.75	9	Соответствует
Стадия ТП-4.1. Приготовление раствора субстанции	Масса используемого сырья, кг	± 0.05	-	Соответствует
	Время перемешивания	30'	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	300	-	Соответствует
	Прозрачность раствора	Прозрачный раствор коричневого цвета	3	Соответствует
Стадия ТП-4.2 Смешивание гелевой основы с АФИ и ВВ	Время перемешивания, минут	60'	-	Соответствует
	Скорость смешивания, об/мин	1000	-	Соответствует
	Контроль качества	В соответствии с НТД: тех.регламент	9	Соответствует
* Отбор проб осуществляли с верхней, средней частей и со дна емкости СП-спецификация качества фирмы НТД- нормативный технически документ Тех. регламент – технологический регламент				

Диаграмма Шухарта и анализ возможностей процесса для данных объединенных серий (рисунок 48) были проанализированы для заключительной стадии технологического процесса ТП-4 «Получение геля» по показателю «Количественное определение дубильных веществ».

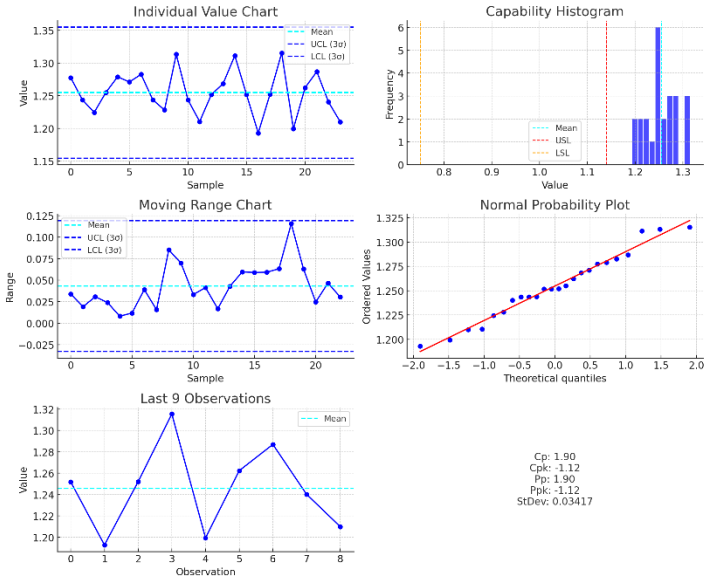


Рисунок 48 – Контрольные карты процесса получения гелей с растительными субстанциями из корней растений вида *L. gmelinii* на стадии ТП-4 «Получение геля», параметр – количественное содержание ДВ

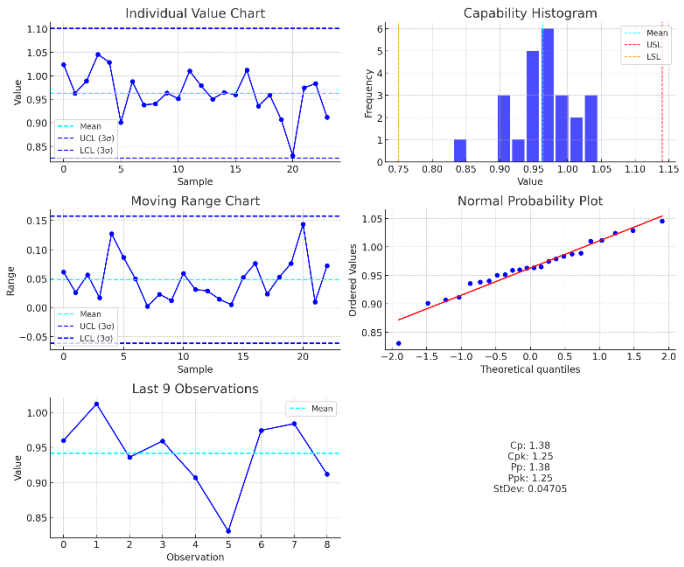


Рисунок 49 – Контрольные карты процесса получения гелей с растительными субстанциями из НЧ растений вида *L. gmelinii* на стадии ТП-4 «Получение геля», параметр – количественное содержание ДВ

Исходя из данных на рисунках 48–49, значения Ср и Рр значительно превышали минимально допустимое значение ≥ 1.33, что указывает на

высокую способность процесса удовлетворять спецификационные требования при отсутствии влияния систематических ошибок [82,214]. Значения Cpk и Ppk были рассчитаны для оценки воспроизводимости процесса относительно нижнего спецификационного предела и имели отрицательные значения, что демонстрирует недостаточно высокую стабильность технологического процесса и указывает на то, что процесс не центрирован относительно средних значений спецификаций [82,214]. Однако, как было отмечено ранее, в случае фитопрепаратов это часто представляет затруднение, поскольку имеются только нижние спецификационные пределы, и оценка стабильности требует сбора большего количества данных. Нормальное распределение данных подтверждается нормальным вероятностным графиком и гистограммой распределения, т.е. большинство значений находится в пределах допуска, а отклонения могут свидетельствовать о наличии аномальных точек или систематических ошибок.

Таким образом, валидация технологии получения лабораторных серий геля с субстанциями из растений вида *L. gmelinii* подтвердила соответствие технологического процесса международным стандартам, его контролируемость и потенциальную возможность успешного масштабирования. Несмотря на высокую способность процесса, подтвержденную значениями Cp и Pp, результаты также показали необходимость дальнейшего мониторинга и оптимизации для обеспечения стабильности и воспроизводимости при переходе к производству больших объемов. Валидация технологии получения геля с субстанциями из растений вида L. gmelinii демонстрирует высокий потенциал для масштабирования и внедрения на производственные мощности. Однако для обеспечения стабильности и воспроизводимости процесса на больших объемах необходимо продолжить работу над центровкой процесса, уменьшением его вариабельности и регулярным мониторингом. Эти действия позволят достичь контроля и соответствия требованиям фармацевтического производства, обеспечивая качество и безопасность готовой продукции.

3.9 Разработка спецификаций качества гелей с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* и исследование их стабильности

Оценка качества полученных гелей была проведена согласно требованиям монографии «Мягкие лекарственные формы» ГФ РК. Разработанные гели соответствуют регламентируемым нормам, спецификация качества представлена в Приложениях Н, О.

Описание. Прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола.

Подлинность. Дубильные вещества - на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание.

Флавоноиды – к спиртовому раствору препарата прибавляют кислоту *хлороводородную Р, магний Р*, нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-оранжевое окрашивание.

Средняя масса содержимого тубов. Определение проводят на 10 образцах геля в тубах. Каждый туб очищают снаружи, высушивают поверхность и взвешивают с точностью до 0,01 г. Удаляют содержимое, промывают горячей *водой Р,* удаляют остатки растворителя бумагой фильтровальной, сушат и взвешивают с точностью до 0.01 г. По разности масс туба с препаратом и пустого определяют массу содержимого и вычисляют среднюю массу для 10 тубов.

Однородность консистенции. Препарат должен быть однородным (ГФ РК I, т. 1, общая статья «*Мягкие лекарственные средства для местного применения», Приложение I*). Образцы из полученных гелей по 0,02 г помещают по две пробы на предметное стекло. Затем накрывают вторым предметным стеклом и плотно прижимают до образования пятен диаметром около 2 см.

pH. От 5.5 до 6.75 (Потенциометрически), ГФ РК I, т. *1, 2.2.3*).

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, *2.6.12,* т.2, *.2.6.13.*

Препарат в условиях испытания не обладает антибактериальным действием.

В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и 10 грибов (суммарно).

В 1 г препарата не допускается наличие *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa.*

Количественное определение. Заложен фармакопейный метод комплексонометрического титрования, который основан на осаждении дубильных веществ в виде комплекса с цинком и определения количества цинка, израсходованного на осаждение дубильных веществ, последующим титрованием раствором динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты (ЭДТА - комплексон III). При комплексонометрическом титровании наблюдается четкое изменение окраски индикатора, что обеспечивает хорошую сходимость результатов.

Упаковка. По 50 г в тубу алюминиевую с защитной алюминиевой мембраной, укупоренную завинчивающейся крышкой из пластмассы с приспособлением для прокалывания мембраны.

Маркировка. На этикетке указывают страну-производитель, наименование предприятия – изготовителя, адрес, наименование препарата на государственном и русском языках, условия хранения, условия отпуска из аптек, номер серии, срок годности, предупредительные надписи: «Беречь от детей», «Не применять по истечении срока годности», «Применять по назначению врача».

Стабильность выбранного состава подтверждена в течение долгосрочного хранения в течение 12 месяцев (Приложение П, Р).

Органолептические свойства, pH, данные теста на количественное определение не изменялись. Структурные свойства и внешний вид гелей после 12 месяцев хранения также не менялись после испытания на центрифуге, при охлаждении и нагревании, замораживании и оттаивании. Во время испытаний продукция находилась в стабильном состоянии.

3.10 Исследование противовоспалительной активности гелей с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii*

Противовоспалительные свойства растительных препаратов F17-F22 были изучены на модели формалин-индуцированного отека лап у мышей, который является одной из наиболее приближенных моделей к человеческому артриту [228]. Активность разработанных гелей сравнивали с терапевтическим эффектом классического нестероидного противовоспалительного средства «Диклофенак 1%» в тестах *in vivo*.

Мыши были разделены на восемь групп: контрольная группа 1 (инъекция фосфатного буфера) получала местное нанесение гелевой основы без активной субстанции, контрольная группа 2 (инъекция формалина) без лечения, группы № 3-6 с формалиновым отеком получали местное лечение гелями F18-F22, группа №7 получала лечение диклофенаком. В течение экспериментального периода массу тела и объем лапы крыс контрольных и экспериментальных групп измеряли на каждый день с помощью цифрового штангенциркуля.

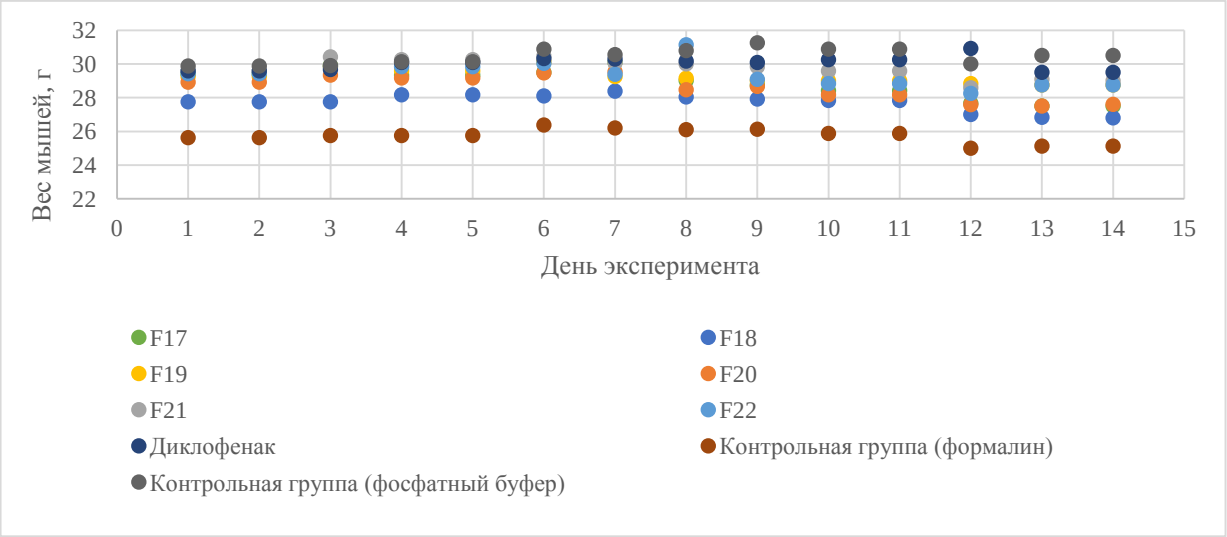
После введения первой инъекции формалина у испытуемых мышей наблюдали выраженные отек и покраснение, которые значительно возросли после второй инъекции на третий день эксперимента (рисунок 50). Подопытные мыши, согласно наблюдениям, минимально использовали при движении отекшую лапку, перемещаясь на трех, что может свидетельствовать о развитии нейрогенной боли. Инъекция и наружное применение геля не влияли на средний вес мышей в каждой из групп (рисунок 5). Пиковое увеличение объема лап наблюдалось на 6-й день эксперимента.

(1) (2) (3)



Рисунок 50 – Фотографии формалинового отека лапы: (1) – до инъекции, (2) – после 2-й инъекции формалина; (3) – после применения экспериментального геля

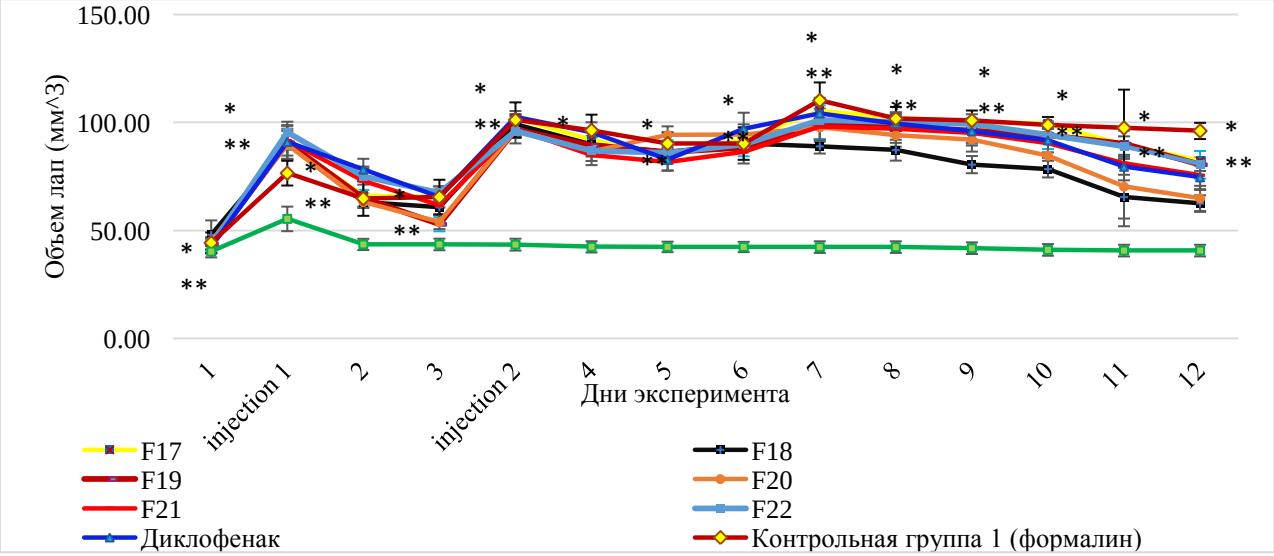
В течение 12 дней эксперимента не было зафиксировано значительного изменения среднего веса мышей. Инъекция формалина в 1-й и 3-й дни в правую заднюю лапу мышей не повлияла на их средний вес, как и применение геля с субстанциями из растения вида *L. gmelinii* не вызвало изменений средней массы ни в одной из исследуемых групп (рисунок 51). В течение этого периода также не было зарегистрировано ни гибели мышей, ни значительных изменений в поведении мышей.



Примечание: * P <0,05 по сравнению с положительным контролем (формалин), ** P <0,05 по сравнению с отрицательным контролем

Рисунок 51 – Изменения веса мышей после субапоневротической инъекции формалина, ср. ± СО

Средний объем лап мышей по группам был подобран приблизительно равным и составлял 43.78±1.74 мм^3. Введение инъекции формалина в заднюю правую лапу вызвало значительный отек в сравнение с контрольной группой 2 с увеличением объемов лап до размеров 98.86±2.73 мм^3 (рисунок 52). На графике 50 показана динамика изменения объема лап с их максимальным увеличением на 6-й день эксперимента до 100.76±6.3 мм^3, после чего следовало постепенное уменьшение их размеров у всех мышей.



Примечание: * P <0,05 по сравнению с положительным контролем (формалин), ** P <0,05 по сравнению с отрицательным контролем

Рисунок 52 – Динамика изменения объёма лап мышей после субапоневротической инъекции формалина, ср. ± СО

На диаграмме, представленной на рисунке 53, изображена разность в объеме лап мышей в первый и последний дни эксперимента.

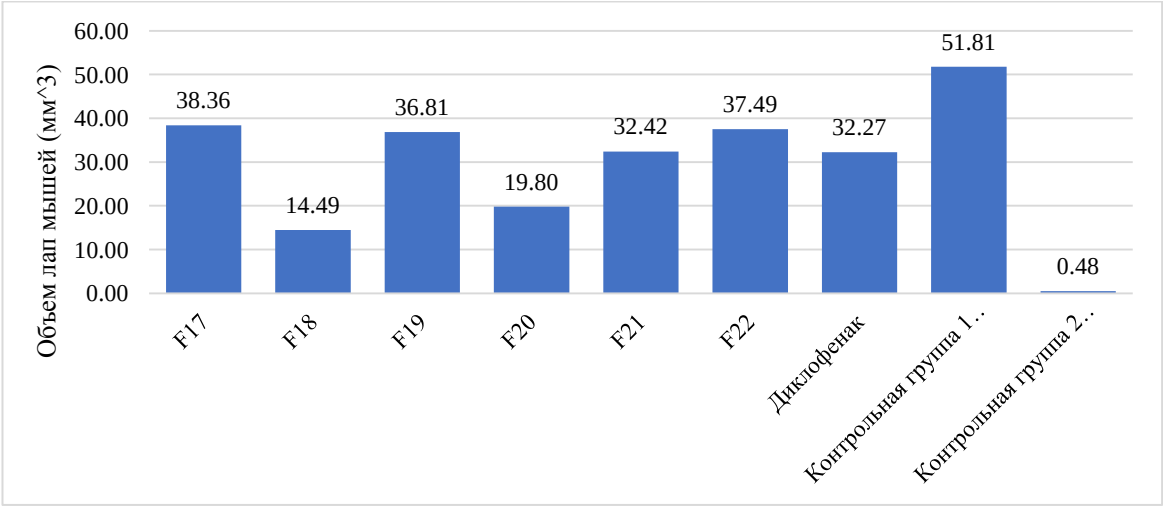
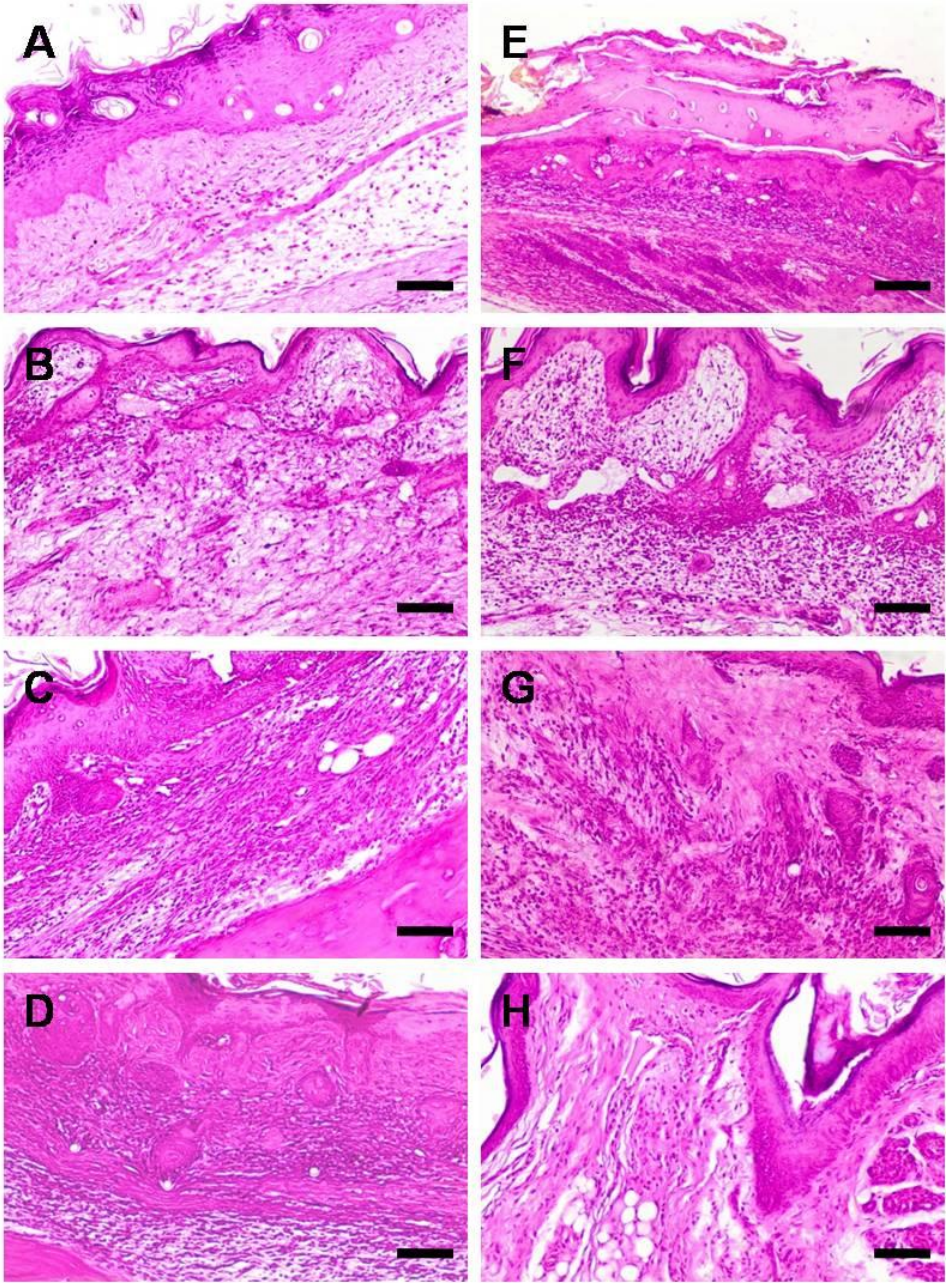


Рисунок 53 – Разность объёма лап мышей (V-V_0) в начале эксперимента (V_0) и в конце эксперимента (V), ср. ± СО

Согласно рисунку 53 разность в объеме была наименьшей для групп, где применялись гели F18 и F20, т.е. намазывание больных лап данными образцами приводило к наилучшему заживлению и уменьшению отека. Гели F18 и F20 с концентрациями субстанций 7.0 % показали противовоспалительный эффект, превосходящий действие геля «Диклофенак» (рисунок 53). Образец геля F21 с концентрацией 5.0 %

субстанций из НЧ проявлял эффект, сравнимый с действием препарата сравнения «Диклофенак», разность объема 32.42 и 32.27 мм^3, соответственно. Эффективность гелей F17, F19, F22 была приблизительно одинаковой.

Гистопатологический анализ также показал количественное увеличение толщины кожи задних лап в контрольной группе, индуцированной формалином, в результате субэпидермального отека и расширения кровеносных сосудов, которые развились после инъекции формалина (рисунок 54).



Примечание: Масштабная линейка 50 мкм.

Рисунок 54 – Гистопатологические изменения, наблюдаемые в задних лапах после обработки гелями с субстанциями из надземной части F17 (A), F18 (B), F21 (C); гелями с субстанциями из корней F19 (D), F20 (E), F22 (F); 1% диклофенаком (G) и формалин-индуцированным контролем (H).

Увеличение толщины кожи было статистически значимым по сравнению с отрицательным контролем. Толщина кожи положительного контроля, индуцированного формалином, показала образование фиброза и смешанной воспалительной клеточной инфильтрации, которая была более интенсивна в дермальном и мышечном слое. По сравнению с контрольной группой, индуцированной формалином, в группах, обработанных диклофенаком и образцами исследуемых гелей, наблюдалось уменьшение толщины кожи задних лап мышей. Однако статистически значимый противовоспалительный эффект испытуемых гелей по сравнению с положительным контролем и гелем диклофенака был обнаружен после введения геля F18, содержащий 7% экстракта из надземной части растений вида *L. gmelinii*. Гистопатологическая оценка показала, что применение данного геля приводит к подавлению воспаления тканей, незначительной воспалительной клеточной инфильтрации, утолщению эпидермиса и уменьшению участков фиброза.

Таким образом, фитогели с растительными субстанциями из растений вида *L. gmelinii* обладали умеренной противовоспалительной активностью. Выявленный эффект исследуемого вещества оказался сравним с действием НПП диклофенака натрия. Местное применение гелей с исследуемыми растительными субстанциями имело дозозависимый противовоспалительный эффект у больных мышей, т.е. чем выше концентрация субстанций, тем лучше терапевтическое действие. Также стоит отметить, что активность гелей с субстанциями из надземной части была выше активности гелей с субстанциями из корней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного диссертационного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Проведена сравнительная оценка методов получения субстанций (УЗЭ, КМ, СФЭ) из корней и надземной части *L. gmelinii*, определены оптимальные условия экстракции, подтверждена их идентичность химического состава и антибактериальная активность. Методом LC-QToF-MS анализа исследован компонентный состав и идентичность химических составов растительных субстанций, полученных методами КМ и УЗЭ, с идентификацией 62 соединений. Установлено, что субстанции, полученные из корней, содержали большее количество сульфатированных производных фенольной кислоты. Установлено, что субстанции, полученные из надземной части, содержали больше флавоноидов, и в отличии от субстанций из корней в них найдены лигнанамиды и N-трансферулоилтирамин.
2. Изучен моносахаридный состав полисахаридного комплекса, полученных после дериватизации моносахаридов как ацетилированных метилгликозидов и установлены их положения связей путем анализа частично метилированных ацетатов альдитола. Во всех субстанциях, полученных из корней и НЧ, присутствовали рамноза (Rha-терминальная и Rha-3,4), арабиноза (Ara-терминальная), глюкуроновая кислота (GlaA), манноза (Man), галаткоза (Gal), и глюкоза (Glc). В полисахаридном комлексе из НЧ также была найдена ксилоза (Xyl-теримнальная) и галактуроновая кислота (GalA).
3. Исследованы иммуномодулирующие эффекты субстанций, показавшие как стимулирующее, так и ингибирующее действие на провоспалительные медиаторы TNF-α и IL-6, что подтверждает возможность их применения как для подавления воспаления, так и для повышения иммунитета.
4. Выполнен перенос и валидация технологии получения субстанций методом УЗЭ в опытно-промышленных условиях, установлена стабильность технологического процесса и соответствие критериям выхода субстанций и содержания полифенолов.
5. Разработаны гели на основе карбомера и пропиленгликоля с растительными субстанциями, установлены их тиксотропные свойства и противовоспалительная активность, сравнимая с 1% гелем Диклофенак, проведена валидация технологии получения гелей в лабораторных условиях и подтверждена стабильность гелей в процессе хранения.
6. Проведена валидация метода ВЭЖХ для количественного определения эпигаллокатехин-3-галлата в субстанциях из *L. gmelinii*, подтверждена его пригодность по критериям специфичности, воспроизводимости и стабильности.

Оценка полноты решения поставленных задач. Цели и задачи, поставленные в диссертационной работе, решены полностью. Полнота

решения достигнута путем разработки оптимальных режимов получения субстанций из растений вида *L. gmelinii* и сравнительного анализа эффективности различных методов экстракции по показателям выхода субстанций, их компонентному составу и биологической активности; валидации технологии получения субстанций в соответствии с рекомендациями GMP; разработки технологии получения гелей на основе полученных растительных субстанций в соответствии с рекомендациями ICH Q8 и установлению их противовоспалительной активности *in vivo*.

Рекомендации и исходные данные по конкретному использованию результатов исследования. Полученные субстанции и гели на их основе могут быть использованы в медицине в качестве иммуномодулирующих и противовоспалительных средств для подавления воспалений, так и для повышения иммунитета у людей с ослабленной иммунной системой.

Оценка технико-экономической эффективности внедрения. Полученные результаты характеризуются высоким научным и практическим уровнем. Разработанные субстанции, фитогели и предложенные технологические схемы их получения могут быть внедрены в фармацевтическое производство для создания иммуномодулирующих и противовоспалительных лекарственных средств.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области. В результате проведенных исследований в рамках диссертационной работы было опубликовано в соавторстве 7 научных работ, в том числе 2 статьи в международных рецензируемых журналах Plants (Q1, процентиль 90 %), Antioxidants (Basel) (Q2, процентиль 90 %), 1 статья в журнале «International Journal of Biology and Chemistry», входящий в перечень журналов, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан, а также материалы и тезисы 4 докладов на международных научных конференциях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Кодекс Республики Казахстан «О Здоровье Народа и Системе Здравоохранения»: утв. 7 июля 2020 года, № 360-VI ЗРК.

2 Национальный проект до 2025 года: утв. Постановлением Правительства Республики Казахстан от 12 октября 2021 года № 725 // https://adilet.zan.kz. 21.10.2021.

3 World Health Organization (WHO) Traditional Medicine Strategy until 2023: WHO dated December 14, 2022 № WHA62.13 // https://www.who.int. 15.05.2013.

4 Жусупова Г.Е. Состав растений Рода *Limonium Mill* и создание препаратов на их основе. автореф. … док. хим. наук: 02.00.10. – Алматы: КазНУ, 2007. – 36 с.

5 Жусупова Г.Е. Лекарственные средства, полученные на основе растений вида *Limonium Gmelinii* // Вестник медицинского университета. – Алматы, 2009. – № 1. – С.105–112.

6 Пат. 17516 РК. Способ получения сиропа на основе субстанции, выделяемой из корней Кермека Гмелина / К.Д. Рахимов; опубл. 14.07.2006.

7 Пат. 14987 РК. Способ получения противовоспалительной, ранозаживляющей мази на основе растительного сырья / Г.Е. Жусупова, А.А. Рыжиков, А.Ж. Абилов, К.Д. Рахимов; опубл. 15.11.2004, Бюл. № 11. – 3 с.

8 Пат. 19031 РК. Настойка из корней кермека Гмелина, обладающая противовоспалительной активностью / Л.М. Корулькина, Г.Е. Жусупова, А.Ж. Абилов, К.Д. Рахимов; опубл. 15.01.2008.

9 Cañigueral S., Tschopp R., Ambrosetti L., Vignutelli A., Scaglione F., Petrini O. The Development of Herbal Medicinal Products // Pharmaceut Med. – 2008. – Vol. 22. – P. 107–118.

10 World Health Organization (WHO) Annex 3 Good Manufacturing Practices: Guidelines on Validation: dated January 25, 2019 // https://www.who.int.

11 Указ Президента Республики Казахстан. О ратификации Договора о Евразийском экономическом союзе: утв. 14 октября 2014 года, № 240-V ЗРК.

12 European Pharmacopoeia. – 8th ed. // Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2014. – Vol. 1. – 1380 pp.

13 The International Pharmacopoeia. – 3rd ed. // Geneva: World Health Organization, 1994. – Vol. 4. – 362 pp.

14 Государственная Фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2009. – Т. 1. – 592 с.

15 Государственная Фармакопея Республики Беларусь. – Молодечно: Типография «Победа», 2012. – Т. 1. – 1220 с.

16 Государственная Фармакопея Российской Федерации. – М.: 2015. – Т. 2. – 1004 с.

17 Краснюк И. И. Фармацевтическая Технология: Технология Лекарственных Форм: учебник / под ред. И.И. Краснюка. – М.: Академия, 2015. – 656 с.

18 Чуешов В.И., Гладух Е.В., Сайко И.В. и др. Технология промышленного производства: учебник для студ. высш. учеб. завед. / пер. с укр.: в 2 ч. – Винница: Нова Книга, 2014. – Ч. 2. – 664 с.

19 Ергеш Ә.Б. Обзор рынка лекарственных препаратов Республики Казахстан // Вестник КазНМУ. – Алматы, 2019. – № 2. – С.187–189.

20 Перцев И.М. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств: учебник для студ. высш. учеб. завед. / под ред. И. М. Перцева, И. А. Зупанца. – Харьков: Издательство НФАУ, 1999. – Т. 2. – 442 с.

21 European Medicines Agency ICH Guideline Q8 (R2) on Pharmaceutical Development: dated June 22d, 2017 // https://www.ema.europa.eu. 01.06.2009.

22 ICH Q10: Фармацевтическая система качества / пер. с англ. – К.: Виалек, 2008 – 34 с.

23 ICH Q9: Управление рисками по качеству / пер. с англ. – К.: Виалек, 2008 – 38 с.

24 Гильдеева Г.Н., Белостоцкий А.В. Концепция Quality-by-Design как ключевой элемент в обеспечении качества лекарственных препаратов // Ремедиум. – 2017. – № 3. – С. 54–58.

25 Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П. Современная методология фармацевтической разработки лекарственных препаратов // Фармацевтическая отрасль. – 2013. – № 1. – С. 22–30.

26 Георгиянц В.А. Концепция quality by design в производстве активных фармацевтических ингредиентов. Анализ факторов, влияющих на качество при планировании производства (синтеза) субстанции амизон // Вестник Таджикского национального университета. – 2013. – № 3. – С. 81–84.

27 Николаева О.М. Информационная и алгоритмическая поддержка химической технологии получения лекарственных средств. автореф. … канд. тех. наук: 05.13.01. – Иваново, 2020. – 17 с.

28 Golubev A.N., Nguyen T.Sh., Basevich A. V., Sorokin V.V., Kaukhova I.E., Marchenko A.L., Smirnova E.M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design // Drug development & registration. – 2019. – Vol. 8. – P. 45–48.

29 Namjoshi, S.; Dabbaghi, M.; Roberts, M.S.; Grice, J.E.; Mohammed, Y. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 12.

30 Промышленная фармация. Путь создания продукта: монография / под ред. А.Л. Хохлова, Н.В. Пятигорской Ж.И. Аладышева и др. – М.: РАН, 2019. – 394 с.

31 Василькин Д.А., Поцелуева Л.А., Литвинов И.А. Фармакотерапевтическая эффективность лекарственных веществ во

взаимосвязи с их полиморфизмом как фармацевтическим фактором // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. – 2010. – № 1. – С. 166–174.

32 Du, Y., Xue J. Investigation of polymorphism and cocrystallization of active pharmaceutical ingredients using vibrational spectroscopic techniques // Curr Pharm. – 2016. – Vol. 22. – P. 4917–4928.

33 Byrne J., Reinhardt R., Velasco-Torrijos T. Polymorphism in commercial sources of fusidic acid: a comparative study of the *in vitro* release characteristics of forms i and iii from a marketed pharmaceutical cream // Journal of analytical methods in chemistry. – 2017. – Vol 2017. – P. 1–7.

34 Просеков А.Ю., Ульрих Е.В., Бабич О.О., Сухих С.А. Реологические свойства растительных аналогов фармацевтического желатина // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (Ч. 15). – С. 3384–3388.

35 ICH Q3: Стандартизация примесей / пер. с англ. – К.: Виалек, 2008 – 15 с.

36 Olsen, B.A., Sreedhara A., Baertschi S.W. Impurity investigations by phases of drug and product development // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2018. – Vol. 101. – P. 17–23.

37 Maia Campos, Melo Maísa, Junior Flávio. Effects of Polysaccharide-Based Formulations on Human Skin // Polysaccharides. – 2014. – P. 1–18.

38 Gupta P., Garg S. Recent Advances in Semisolid Dosage Forms for Dermatological Application // Pharmaceutical Technology. – 2002. – Vol. 26. – P. 144–162.

39 Leon Lachman. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. New Delhi: CBS Publishers & Distributors, 2009. – 2622 pp.

40 Федосов П.А., Провоторова С.И., Сливкин А.И. и др. Обоснование выбора компонентов и их совместимости для разработки ранозаживляющего геля на основе хитозана // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – № 9 (40). – С. 83–85.

41 Анурова М. Н., Лапик И. В., Бахрушина Е. О., Кречетов С. П., Краснюк И. И. Технологические аспекты фармацевтической разработки офтальмологического геля эмоксипина // ВЕСТНИК ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – № 4. – С. 117–123.

42 Аюпова Г.В., Лукманова К.А., Федотова А.А., Катаев В.А., Валеева Л.А. Разработка состава и технологии ранозаживляющего биопрепарата в виде геля // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – №5 (65). – С. 87–90.

43 Дзюба В. Ф., Сафонова Е. Ф., Коренская И. М., Свешникова И. А. Биофармацевтические аспекты разработки мази с маслом амаранта для лечения ожоговых и инфицированных ран // ВЕСТНИК ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2007. – № 1. – С. 142–146.

44 Jamadar M.J., Husen Shaikh R. Preparation and evaluation of herbal gel formulation // Journal of Pharmaceutical Research. – 2017. – Vol. 1 (2). – P. 201–224.

45 Partha N., Snigdha P., Laxmidhar M. Formulation Development and in Vitro Evaluation of Dental Gel Containing Ethanol Extract of Tephrosia Purpurea Linn // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 8 (8). – P. 132 – 141.

46 Munro G. ICH Q7 Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) // In ICH Quality Guidelines / ed. by Andrew Teasdale, David Elder, Raymond W. Nims. N.Y.: Wiley, 2017. – 509–534 pp.

47 Pharm Nwoko V. Semi solid dosage forms manufacturing: tools, critical process parameters, strategies, optimization and validation // Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP). – 2014. – № 3 (2). – P. 153–161.

48 Lowenborg M. A Troubleshooting Guide for Topical Drug Manufacturing // Pharmaceutical Technology. – 2012. – Vol. 36. – № 11 // https://www.pharmtech.com/view/troubleshooting-guide-topical-drug-manufacturing.

49 Корянова К.Н. Разработка состава и технологические исследования наружных лекарственных форм с димебоном: автореф. дисс. … канд. фарм. наук: 14.04.01. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2013. – 24 с.

50 Langley Nigel, Michniak-Kohn, Bozena Osborne David. The Role of Microstructure in Topical Drug Product Development. Berlin: Springer Nature, 2019; Vol. – 195 pp.

51 Veljanoska V., Tomovska E., Gligorova M. Critical Process Parameters during Semisolid Manufacturing // Macedonian Pharmaceutical Bulletin. – 2020. – Vol. 66 (1). – P. 119–120.

52 WHO Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP) for Herbal Medicines. – Geneva: World Health Organization, 2003. – 92 pp.

53 Ekor M. The Growing Use of Herbal Medicines: Issues Relating to Adverse Reactions and Challenges in Monitoring Safety // Front Pharmacol. – 2014. – Vol. 4. – P. 1–10.

54 Kaggwa B., Kyeyune H., Munanura E.I., Anywar G., Lutoti, S. Aber J., Bagoloire L.K., Weisheit A., Tolo C.U., Kamba P.F. et al. Safety and Efficacy of Medicinal Plants Used to Manufacture Herbal Products with Regulatory Approval in Uganda: A Cross-Sectional Study // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2022. – Vol. 2022. – P. 1–21.

55 Sahoo N., Manchikanti P., Dey S. Herbal Drugs: Standards and Regulation // Fitoterapia. – 2010. – Vol. 81. – P. 462–471.

56 GMP Requirements Applicable to the Early Manufacturing Steps for Comminuted Plants and Herbal Extracts Used as Active Substances. – Amsterdam: European Medicines Agency, 2021. – 2 pp.

57 Cañigueral S., Tschopp R., Ambrosetti L., Vignutelli A., Scaglione F., Petrini O. The Development of Herbal Medicinal Products // Pharmaceut Med. – 2008. – Vol. 22. – P. 107–118.

58 Ghosh, D. Quality Issues of Herbal Medicines: Internal and External Factors // Int J Complement Altern Med. – 2018. – Vol. 11. – P. 67–69.

59 Указ Президента Республики Казахстан. О подписании соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского Экономического союза: утв. 19 декабря 2014 года. – № 981.

60 WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants. – Geneva: World Health Organization, 2003. – 80 pp.

61 Решение Совета Евразийской экономической комиссии. Правила Надлежащей Практики Выращивания, Сбора, Обработки и Хранения Растительного Сырья Растительного Происхождения: утв. 26 января 2018 года, № 15.

62 Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии. О руководстве по контролю рисков микробной контаминации лекарственного растительного сырья, растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственных растительных препаратов: утв. 6 августа 2019 года, № 24.

63 The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. – Brussels: European commission health and consumers directorate-general, 2010. – Vol. 4 // https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en.

64 Евразийская экономическая комиссия коллегия. Рекомендация «О руководстве по качеству лекарственных растительных препаратов»: утв. 10 мая 2018 года, № 6.

65 Fifty-second report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. – Geneva: WHO Technical Report Series, 2018, No. 1010. – 424 pp.

66 Коллегия Евразийской экономической комиссии. Рекомендация «О руководстве по производству готовых лекарственных форм лекарственных препаратов»: утв. 21 мая 2020 года, № 9.

67 Коллегия Евразийской экономической комиссии. Рекомендация «О руководстве по оценке качества лекарственных препаратов на основе комбинаций лекарственного растительного сырья и (или) растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья)»: утв. 25 мая 2021 года, № 8.

68 Коллегия Евразийской экономической комиссии. Рекомендация «О руководстве по выбору тестов и критериев приемлемости для составления спецификаций на лекарственное растительное сырье, растительные фармацевтические субстанции (препараты на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственные растительные препараты»: от 12 февраля 2019 года, № 6.

69 Евразийская экономическая комиссия коллегия. Решение «Об утверждении требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций»: утв. 10 мая 2018 года, № 69.

70 Guide to Good Manufacturing Practice for medicinal products. – Geneva: Pharmaceutical Inspection Convention, 2014. – 281 pp.

71 Пятигорская Н.В. GMP для производства лекарственных препаратов из растительного сырья // Фармация. – 2010. – С. 34–37.

72 Zhang L., Zhang X., Begum N., Xia P., Liu J., Liang Z. Effects of Different Processing Methods Based on Different Drying Conditions on the Active Ingredients of Salvia Miltiorrhiza Bunge // Molecules. – 2022. – Vol 27(15). – P. 1–16.

73 Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. – Geneva: World Health Organization, 1998. – 122 pp.

74 Noviana E., Indrayanto G., Rohman A. Advances in Fingerprint Analysis for Standardization and Quality Control of Herbal Medicines // Front Pharmacol. – 2022. – Vol. 13. – P. 1–21.

75 Abubakar A., Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2020. – Vol. 12(1). – P. 1–10.

76 Donno D., Boggia R., Zunin P., Cerutti A.K., Guido M., Mellano M.G., Prgomet Z., Beccaro G.L. Phytochemical Fingerprint and Chemometrics for Natural Food Preparation Pattern Recognition: An Innovative Technique in Food Supplement Quality Control // J Food Sci Technol. – 2016. – Vol. 53. – P. 1071–1083.

77 Келеке А.С., Орал О.Ж., Даулетханов Ж.Д., Ибрагимова Л.Н., Сакипова З.Б., Сермухамедова О.В. ВАЛИДАЦИЯ процесса получения экстракта Inula Macrophylla Kar. et Kir. in Bull. жидкого // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2019. – № 2. – С. 451–456.

78 Бекболатова Э.Н., Сакипова З.Б., Ибрагимова Л.Н., Келеке А.С., Икласова А.Ш., Турдиева К.А., Жумагалиев А.Н. Валидация процесса получения жидкого экстракта из плодов боярышника алмаатинского (Crataegus Almaatensis Pojark) // Медицинский вестник Башкортостана. – 2018. – № 2 (74). – С. 60-63.

79 Indrayanto G. The Importance of Method Validation in Herbal Drug Research // J Pharm Biomed Anal. – 2022. – Vol. 214.

80 Reich E, Schibli A. Validation of High-Performance Thin-Layer Chromatographic Methods for the Identification of Botanicals in a CGMP Environment // J AOAC Int. – 2008. – Vol. 91(1). – P. 13–20.

81 Сермухамедова О.В., Сакипова З.Б., Ибрагимова Л.Н., Гладух Е.В., Степаненко С.В. Валидационная оценка технологического процесса производства экстракта жидкого пустырника туркестанского // ScienceRise. – 2016. – № 4 (18). – С. 52-62.

82 Яковенко В. К., Вишневский И. А., Георгиянц В. А., Вишневская Л. И. Валидация процесса производства жидких

экстракционных препаратов из растительного сырья // Вестник фармации. – 2013.– №1 (59). – С. 37–43.

83 Manufacture of Herbal Medicinal Products. – Brussels: European commission, 2008. – Vol. 4, Annex 7. – 6 pp.

84 WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine. – Luxembourg: World Health Organization, 2019. – 228 pp.

85 Wegener T. Patterns and Trends in the Use of Herbal Products, Herbal Medicine and Herbal Medicinal Products // Int J Complement Altern Med. – 2017. – Vol. 9 (6). – P. 1–4.

86 Dapar M.L.G., Alejandro G.J.D., Meve U., Liede-Schumann S. Quantitative Ethnopharmacological Documentation and Molecular Confirmation of Medicinal Plants Used by the Manobo Tribe of Agusan Del Sur, Philippines // J Ethnobiol Ethnomed. – 2020. – Vol. 16. – №14.

87 Wink M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites // Medicines. – 2015. – Vol. 2 (3). – P. 251-286.

88 Joshi V., Yashaswini G., Acharya A., Bheemachari Annegowda H. V., Niraula B. Formulation and Evaluation of Semisolid Dosage Forms of an Anti-Inflammatory Drug // Biotech. – 2019. – Vol. 9 (7).

89 Javadzadeh Y., Azharshekoufeh Bahari, L. Therapeutic Nanostructures for Dermal and Transdermal Drug Delivery // Nano- and Microscale Drug Delivery Systems / ed. by Grumezescu. Amsterdam: Elsevier, 2017. –131–146 pp.

90 Sitarek P., Merecz-Sadowska A., Kowalczyk T., Wieczfinska J., Zajdel R., Śliwiński T. Potential Synergistic Action of Bioactive Compounds from Plant Extracts against Skin Infecting Microorganisms // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21 (14). – P. 1–25.

91 Chu M., Tsang M.S., Lam C.W.-K., Quan Z.B., Wong C.K. The Active Compounds and Therapeutic Mechanisms of Pentaherbs Formula for Oral and Topical Treatment of Atopic Dermatitis Based on Network Pharmacology // Plants. – 2020. – Vol. 9 (9). – P. 1–19.

92 Thandar Y., Gray A., Botha J., Mosam A. Topical Herbal Medicines for Atopic Eczema: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials // British Journal of Dermatology. – 2017. – Vol. 176. – P. 330–343.

93 Herman, A. Topically Used Herbal Products for the Treatment of Psoriasis – Mechanism of Action, Drug Delivery, Clinical Studies // Planta Med. – 2016. – Vol. 82. – P. 1447–1455.

94 Choo W.T., Teoh M.L., Phang S.M., Convey P., Yap W.H., Goh B.H., Beardall J. Microalgae as Potential Anti-Inflammatory Natural Product Against Human Inflammatory Skin Diseases // Front Pharmacol. – 2020. – Vol. 11: 1086.

95 Gianfaldoni S., Wollina U., Tirant M., Tchernev G., Lotti J., Satolli F., Rovesti M. França K., Lotti T. Herbal Compounds for the Treatment of Vitiligo: A Review // Maced J Med Sci. – 2018. – Vol. 6 (1). – P. 203–207.

96 Gunsuang S., Jaipakdee N., Mahakunakorn P., Limpongsa E. Development of Semisolid Preparations Containing Extract of Thai Polyherbal Recipe for Anti-Inflammatory Effect // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2019. – Vol. 11 (14). – P. 345–353.

97 Aiyalu R., Govindarjan A., Ramasamy A. Formulation and Evaluation of Topical Herbal Gel for the Treatment of Arthritis in Animal Model // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 52 (3). – P. 493–507.

98 Bao Y., Li H., Li Q.Y., Li Y., Li F., Zhang C.F., Wang, C.Z., Yuan C.S. Therapeutic Effects of Smilax Glabra and Bolbostemma Paniculatum on Rheumatoid Arthritis Using a Rat Paw Edema Model // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 108. – P. 309–315.

99 Cameron M., Chrubasik S. Topical Herbal Therapies for Treating Osteoarthritis // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2013. – Vol. 2013 (5). – P. 1–70.

100 Aslani A., Zolfaghari B., Fereidani Y. Design, Formulation, and Evaluation of a Herbal Gel Contains Melissa, Sumac, Licorice, Rosemary, and Geranium for Treatment of Recurrent Labial Herpes Infections // Dent Res J (Isfahan). – 2018. – Vol. 15 (3). – P. 191–200.

101 Xavier-Santos J.B., Félix-Silva J., Passos J.G.R., Gomes J.A.S., Fernandes J.M., Garcia V.B., de Araujo-Junior R.F., Zucolotto S.M., Silva-Junior A.A., Fernandes-Pedrosa M.F. Development of an Effective and Safe Topical Anti-Inflammatory Gel Containing Jatropha Gossypiifolia Leaf Extract: Results from a Pre-Clinical Trial in Mice // J Ethnopharmacol. – 2018. – Vol. 227. – P. 268-278.

102 Marchianti A.C.N., Sakinah E.N., Elfiah U., Putri N.K.S., Wahyuliswari D.I., Maulana M., Ulfa E.U. Gel Formulations of Merremia Mammosa (Lour.) Accelerated Wound Healing of the Wound in Diabetic Rats // J Tradit Complement Med. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 38–45.

103 Wen M.M., Abdelwahab I.A., Aly R.G. El-Zahaby S.A. Nanophyto-Gel against Multi-Drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa Burn Wound Infection // Drug Deliv. – 2021. – Vol. 28(1). – P. 463-477.

104 Pelkonen O., Xu Q., Fan T.-P. Why Is Research on Herbal Medicinal Products Important and How Can We Improve Its Quality? // J Tradit Complement Med. – 2014. – Vol. 4. – P. 1–7.

105 Marshall J.S, Warrington Rıo, Watson W., Kim H.L. An introduction to immunology and immunopathology // Allergy Asthma Clin Immunol. – 2018. – Vol. 14 (2). – № 49.

106 Bindu S., Mazumder S., Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective // Biochem Pharmacol. – 2020. – Vol. 180. – № 114147.

107 Barnes P.J. Glucocorticosteroids: Current and Future Directions // Br J Pharmacol. – 2011. – Vol. 163. – P. 29–43.

108 Steen-Louws C., Popov-Celeketic J., Mastbergen S.C., et al. IL4-10 fusion protein has chondroprotective, anti-inflammatory and potentially analgesic

effects in the treatment of osteoarthritis // Osteoarthritis Cartilage. – 2018. – Vol. 26(8). – P. 1127-1135.

109 Armuzzi A., Bouhnik Y., Cummings F., Bettey M., Pieper B., Kang T. Enhancing treatment success in inflammatory bowel disease: Optimising the use of anti-TNF agents and utilising their biosimilars in clinical practice // Dig Liver Dis. – 2020. – Vol. 52(11). – P. 1259-1265.

110 Durham A.L., Caramori G., Chung K.F., Adcock I.M. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease // Transl Res. – 2016. – Vol. 167(1). – P. 192-203.

111 Perera A.P., Kunde D., Eri R. NLRP3 Inhibitors as Potential Therapeutic Agents for Treatment of Inflammatory Bowel Disease // Curr Pharm Des. – 2017. – Vol. 23(16). – P. 2321-2327.

112 Shen H.H., Yang Y.X., Meng X., et al. NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases // Autoimmun Rev. – 2018. – Vol. 17(7). – P. 694-702.

113 Dekker F.J., van den Bosch T., Martin N.I. Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases and deacetylases are potential drugs for inflammatory diseases // Drug Discov Today. – 2014. – Vol. 19(5) – P. 654-660.

114 Kishore, N., Kumar P., Shanker K., Verma A.K. Human Disorders Associated with Inflammation and the Evolving Role of Natural Products to Overcome // Eur J Med Chem. – 2019. – Vol. 179. – P. 272–309.

115 Nunes C. dos R., Arantes M.B., de Faria Pereira S.M., da Cruz L.L., de Souza Passos M., de Moraes L.P., Vieira I.J.C., de Oliveira D.B. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents // Molecules. – 2020. – Vol. 25 (16). – № 3726.

116 Bai, Jinrong et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases // Biomedicine & pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 133. – № 110985.

117 Fikry Ebtehal Mohammad et al. Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis // Biomedicine & pharmacotherapy. – 2019. – Vol. 110. – P. 878-886.

118 Kong Mengjie et al. Anti-inflammatory phytochemicals for the treatment of diabetes and its complications: Lessons learned and future promise // Biomedicine & pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 133. – № 110975.

119 Bai Renren et al. Discovery of natural anti-inflammatory alkaloids: Potential leads for the drug discovery for the treatment of inflammation // European journal of medicinal chemistry. – 2013. – Vol. 213. – № 113165.

120 Yuan Renyikun et al. Novel compounds in fruits of coriander (Coşkuner & Karababa) with anti-inflammatory activity // Journal of Functional Foods. – 2020. – Vol. 73. – № 104145.

121 Al-Khayri J.M., Sahana G.R., Nagella P., Joseph B. V., Alessa F.M., Al-Mssallem M.Q. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – № 2901.

122 Xu Dong-Ping et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources // International journal of molecular sciences. – 2017. – Vol. 18 (1). – № 96.

123 Alkilani, A.Z.; McCrudden, M.T.C.; Donnelly, R.F. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. Pharmaceutics 2015, 7.

124 Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame // Cell. – 2010. – Vol. 140. – P. 771–776.

125 Michalak M. Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – № 585.

126 Pang Y., Wu S., He Y., Nian Q., Lei J., Yao Y., Guo J., Zeng J. Plant-Derived compounds as promising therapeutics for vitiligo // Front Pharmacol. – 2021. – Vol. 12. – № 685116.

127 Jantan I., Ahmad W., Bukhari S.N.A. Plant-Derived Immunomodulators: An Insight on Their Preclinical Evaluation and Clinical Trials // Front Plant Sci. – 2015. – Vol. 6. – № 655.

128 Mohamed N. Boukhatem, Mohamed A. Ferhat, Kebir H.T. Lemon Grass (Cymbopogon Citratus) Essential Oil as a Potent Anti-Inflammatory and Antifungal Drugs // Libyan Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 9. – № 25431.

129 Dawid-Pać R. Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin diseases // Advances in Dermatology and Allergology. –2013. – Vol. 30. – P. 170–177.

130 Food factors for cancer prevention / ed. by Hajime Ohigashi et al. Tokyo: Springer Japan, 1997. – 660 pp.

131 Yahfoufi, Nour et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols // Nutrients. – 2018. – Vol. 10 (11). – № 1618

132 Xagorari A., Roussos C., Papapetropoulos A. Inhibition of LPS- stimulated Pathways in Macrophages by the Flavonoid Luteolin // Br J Pharmacol. – 2002. – Vol. 136. – P. 1058–1064.

133 Okuda T. Structure-Activity Relationship of Antioxidant and Antitumor Polyphenols // Food Factors for Cancer Prevention / ed. by Hajime Ohigashi et al. Tokyo: Springer Japan, 1997. – P. 280–285.

134 Behl T., Kumar K., Brisc C. et al. Exploring the Multifocal Role of Phytochemicals as Immunomodulators // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2021. – Vol. 133. –№ 110959.

135 Campos Patricia, Melo Maísa, Junior Flávio. Effects of Polysaccharide-Based Formulations on Human Skin // Polysaccharides / ed. by Kishan Gopal Ramawat, Jean-Michel Mérillon. Cham: Springer Cham, 2014. – P. 1–18.

136 Pires Patrícia Mascarenhas-Melo, Filipa Pedrosa et al. Polymer-based biomaterials for pharmaceutical and biomedical applications: A focus on topical drug administration // European Polymer Journal. – 2023. – Vol. 187, 111868.

137 Chen Y., Huang W., Chen Y., Wu M., Jia R., You L. Influence of Molecular Weight of Polysaccharides from Laminaria japonica to LJP-Based

Hydrogels: Anti-Inflammatory Activity in the Wound Healing Process // Molecules. – 2022. – Vol. 27(20). – № 6915.

138 Huo J., Wu Z., Zhao H. et al. Structure-Activity Relationship of Antioxidant Polysaccharides from Huangshui Based on the HPLC Fingerprint Combined with Chemometrics Methods // LWT. – 2022. – Vol. 159. – № 113201.

139 Jin W., Zhang W., Liu G. et al. The structure-activity relationship between polysaccharides from Sargassum thunbergii and anti-tumor activity // Int J Biol Macromol. – 2017. – Vol. 105 (Pt 1). – P. 686–692.

140 Bi Decheng et al. Immune Activation of RAW264.7 Macrophages by Low Molecular Weight Fucoidan Extracted from New Zealand Undaria pinnatifida // Journal of agricultural and food chemistry. – 2018. – Vol. 66 (41). – P. 10721–10728.

141 Shi J., Guo, J., Chen, L., Ding L. et al. Characteristics and Anti-Radiation Activity of Different Molecular Weight Polysaccharides from Potentilla Anserina L // J Funct Foods. – 2023. – Vol. 101. – № 105425.

142 Wang Bei et al. Structural Elucidation, Modification, and Structure-Activity Relationship of Polysaccharides in Chinese Herbs: A Review // Frontiers in nutrition. – 2022. – Vol. 9. – № 908175.

143 Qu, J., Huang P., Zhang L. et al. Hepatoprotective Effect of Plant Polysaccharides from Natural Resources: A Review of the Mechanisms and Structure-Activity Relationship // Int J Biol Macromol. – 2020. – Vol. 161. – P. 24–34.

144 Wu D.-T., Meng L.-Z., Wang L.-Y. et al. Chain Conformation and Immunomodulatory Activity of a Hyperbranched Polysaccharide from Cordyceps Sinensis // Carbohydr Polym. – 2014. – Vol. 110. – P. 405–414.

145 Li B., Zhang N., Feng, Q. et al. The Core Structure Characterization and of Ginseng Neutral Polysaccharide with the Immune-Enhancing Activity // Int J Biol Macromol. – 2019. – Vol. 123. – P. 713–722,

146 Bahú J.O., de Andrade L.R.M., de Melo Barbosa R et al. Plant Polysaccharides in Engineered Pharmaceutical Gels // Bioengineering. – 2022. – Vol. 9 (8). – № 376.

147 Quraishi S., Martins, M., Barros A.A. et al. Novel Non-Cytotoxic Alginate–Lignin Hybrid Aerogels as Scaffolds for Tissue Engineering // J Supercrit Fluids. – 2015. – Vol. 105. – P. 1–8.

148 Aragão-Neto A.C., Soares P.A.G., Lima-Ribeiro M.H.M. et al. Combined Therapy Using Low Level Laser and Chitosan-Policaju Hydrogel for Wound Healing // Int J Biol Macromol. – 2017. – Vol. 95. – P. 268–272.

149 Koutroumpa, K., Theodoridis S., Warren B.H. et al. An Expanded Molecular Phylogeny of Plumbaginaceae, with Emphasis on Limonium (Sea Lavenders): Taxonomic Implications and Biogeographic Considerations // Ecol Evol. – 2018. – Vol. 8. – P. 12397–12424.

150 Palacios C., Rosselló J.A., González-Candelas F. Study of the Evolutionary Relationships among Limonium Species (Plumbaginaceae) Using

Nuclear and Cytoplasmic Molecular Markers // Mol Phylogenet Evol. – 2000. – Vol. 14 (2). – P. 232-249.

151 Grigore M.N., Toma Constantin. Structure of salt glands of Plumbaginaceae: rediscovering old findings of the 19 th century: “Mettenius” or “Licopoli' organs” // Journal of Plant Development. – 2016. – Vol. 23 (2016). – P. 37-52.

152 González-Orenga S., Grigore M.-N., Boscaiu M., Vicente O. Constitutive and Induced Salt Tolerance Mechanisms and Potential Uses of Limonium Mill. Species // Agronomy. – 2021. – Vol. 11. – № 413.

153 Medini F., Fellah H., Ksouri R., Abdelly C. Total Phenolic, Flavonoid and Tannin Contents and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Organic Extracts of Shoots of the Plant Limonium Delicatulum // Journal of Taibah University for Science. – 2014. – Vol. 8(3). – P. 216-224

154 Ruiz-Riaguas A., Zengin G., Sinan K.I., Salazar-Mendías C., Llorent-Martínez E.J. Phenolic Profile, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibitory Properties of Limonium Delicatulum (Girard) Kuntze and Limonium Quesadense Erben // J Chem. – 2020. – Vol. 2020. –№ 1016208.

155 Bakhouche I., Aliat T., Boubellouta T., Gali L., Şen A., Bellik Y. Phenolic Contents and in Vitro Antioxidant, Anti-Tyrosinase, and Anti-Inflammatory Effects of Leaves and Roots Extracts of the Halophyte Limonium Delicatulum // South African Journal of Botany. – 2021. – Vol. 139(3). –P. 42-49

156 Medini F., Bourgou S., Lalancette K.G., Snoussi M. et al. Phytochemical Analysis, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activities of the Halophyte Limonium Densiflorum Extracts on Human Cell Lines and Murine Macrophages // South African Journal of Botany. – 2015. – Vol. 99(2). – P. 158-164.

157 Medini F., Megdiche W., Mshvildadze, V. et al. Antiviral-Guided Fractionation and Isolation of Phenolic Compounds from Limonium Densiflorum Hydroalcoholic Extract // Comptes Rendus Chimie. – 2016. – Vol. 19 (6). – P. 726-732.

158 Mazouz W., Haouli N.E.H., Gali L. et al. Antioxidant, Anti-Alzheimer, Anti-Diabetic, and Anti-Inflammatory Activities of the Endemic Halophyte Limonium Spathulatum (Desf.) Kuntze on LPS-Stimulated RAW264 Macrophages // South African Journal of Botany. – 2020. – Vol. 135(2020). – P. 1–8.

159 Geng D., Chi X., Dong Q., Hu F. Antioxidants Screening in Limonium Aureum by Optimized On-Line HPLC-DPPH Assay // Ind Crops Prod.– 2015. – Vol. 67. – P. 492–497.

160 Rodrigues M.J., Neves V., Martins A. et al. In Vitro Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Limonium Algarvense Flowers Infusions and Decoctions: A Comparison with Green Tea (Camellia Sinensis) // Food Chem. – 2016. – Vol. 200. – P. 322-329.

161 Tang X.H., Yan L.F., Gao J., Yang X.L., Xu Y.X., Ge H.Y., Yang H.D. Antitumor and Immunomodulatory Activity of Polysaccharides from the

Root of Limonium Sinense Kuntze // Int J Biol Macromol. – 2012. – Vol. 51(5). – P. 1134-1139

162 Chaung S.-S., Lin C.-C., Lin J., Yu K.-H., Hsu Y.-F., Yen M.-H. The Hepatoprotective Effects OfLimonium Sinense against Carbon Tetrachloride and -D-Galactosamine Intoxication in Rats // Phytother Res. –2003. – Vol. 17. –P. 784–791.

163 Lin L.C., Kuo Y.C., Chou C.J. Anti-Herpes Simplex Virus Type-1 Flavonoids and a New Flavanone from the Root of Limonium Sinense // Planta Med. – 2000. – Vol. 66(4). – P. 333-336.

164 Rodriguez S.A., Murray A.P., Leiro J.M. Xanthine Oxidase Inhibition by Aqueous Extract of Limonium Brasiliense (Plumbaginaceae) // Chemistry Proceedings. – 2020. – Vol. 3 (1). – № 123.

165 Blainski Andressa et al. Antibacterial activity of Limonium brasiliense (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design // Journal of ethnopharmacology. – 2017. – Vol. 198. – P. 313-323.

166 Lee Jae Sun et al. Identification of Hepatoprotective Constituents in Limonium tetragonum and Development of Simultaneous Analysis Method using High-performance Liquid Chromatography // Pharmacognosy magazine. – 2017. – Vol.13 (52). – P. 535-541.

167 Gadetskaya A. V., Tarawneh A.H., Zhusupova G.E., Gemejiyeva N.G., Cantrell C.L., Cutler S.J., Ross, S.A. Sulfated Phenolic Compounds from Limonium Caspium: Isolation, Structural Elucidation, and Biological Evaluation // Fitoterapia. – 2015. – Vol. 104. – P. 80-85.

168 Gadetskaya A. V., Mohamed S.M., Tarawneh A.H., Mohamed N.M., Ma G., Ponomarev B.N., Zhusupova G.E., Cantrell C.L., Cutler S.J., Ross S.A. Phytochemical Characterization and Biological Activity of Secondary Metabolites from Three Limonium Species // Medicinal Chemistry Research. – 2017. – Vol. 26. – P. 2743–2750.

169 Zhusupova G.E., Shalakhmetova T.M., Askarova Sh.N. Hepatoprotective Action of Phytopreparation from Limonium Gmelinii // Eurasian Chemico-Technological Journal. – 2002. – Vol. 4. – P. 67–71.

170 Zhusupova G., Rachimov K., Shalakhmetova T., Abilov Z.H. Phytopreparations from the Species of Limonium Mill // Biodiversity / ed. by Şener B. Boston: Springer, 2002. – P. 367–369.

171 Nurkenov T., Tsoy A., Olzhayev F., Abzhanova E., Turgambayeva A., Zhussupova A., Avula B., Ross S., Kassymova D., Aituarova A.; et al. Plant Extract of Limonium Gmelinii Attenuates Oxidative Responses in Neurons, Astrocytes, and Cerebral Endothelial Cells in Vitro and Improves Motor Functions of Rats after Middle Cerebral Artery Occlusion // Antioxidants. – 2021. – Vol. 10 (11). – № 1814.

172 Tuohongerbieke A., Li J., Sabir G., Xin X., Hu M., Duan X., Liu L., Tang D., Zhu J., Aisa H.A. Lignanamides from the Roots of Limonium Gmelinii (Willd.) Kuntze and Their Anti-Diabetic, Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities // Phytochemistry. – 2021. – Vol. 184. – № 112648.

173 Tuohongerbieke A., Kaiyrkulova A., Guan Y.Q., Zhu J., Shi L.L., Sabir G., Aisa H.A. Chemical Constituents of Limonium Gmelinii Roots // Chem Nat Compd. – 2019. – Vol. 55. – P. 734–735.

174 Korul'kina L.M., Shul'ts E.E., Zhusupova G.E. Abilov Zh.A., Erzhanov K.B., Chaudri M.I. Biologically Active Compounds from Limonium Gmelinii and L. Popovii // I Chem Nat Compd. – 2004. – Vol. 40. – P. 465–471.

175 Kozhamkulova M.M., Zhusupova G.E., Abilov Z.Z., Rahadilova S.N., Ross S.A. A New Flavonol Glycoside from Limonium Gmelinii // Planta Med. – 2010. – Vol. 5 (7). – P. 1061-1062.

176 Kozhamkulova Zh., Gadetskaya A., Nurbossynova S., Abilova Zh., Zhussupova G., Ross S. Biologically Active Compounds of Aboveground Part of Limonium Gmelinii // Chemical Bulletin of Kazakh National University. – 2011. – Vol. 61(1). – P. 125-129.

177 Zhusupova G., Abilov Zh., Abdraimova Zh., Gadetskaya A., Kozhamkulova Zh., Seilgazy M., Aibulatova C., Shingisbaeva M. Standardization, Biological Activity and Application of Medicines from Plants Limonium Gmelinii // Chemical Bulletin of Kazakh National University. – 2012. – Vol. 65. – P. 1257–1261.

178 Zhusupova G., Abil'kaeva S. Dimeric Prodelphinidins from Limonium Gmelinii Roots // Chemistry of Natural Compounds. – 2006. – Vol. 42. – P. 164–168.

179 Zhusupova G.E. Amino-Acid and Mineral Composition of Substances from the Aerial Part and Roots of Limonium Gmelinii // Chem Nat Comp. – 2006. – Vol. 42. – P. 164 – 168.

180 Zhussupova A.I., Ikhsanov, Y.S., Mamutova, A.A., Zhusupova, G.E. Comparative analysis of the nonpolar fraction of the aerial and underground parts of the Limonium Gmelinii plants by the GC-MS method // Series Chemistry and Technology. – 2019. – Vol. 2.

181 Ikhsanov, Y.S., Zhussupova A.I., Kasymova D.T., Ross S.A., Zhusupova G.E. Study of the Hexane Fraction Isolated from the Substance Obtained from the Roots Limonium Gmelinii by GC-MS // International Journal of Biology and Chemistry. – 2019. – 12. – P. 159–163.

182 Simpson, M.G. Plant Systematics: An Overview / M.G. Simpson. – NY: Academic Press, 2019. – 174 p.

183 Zheng, W., Wang, S.Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs // J Agric Food Chem. – 2001. – Vol. 49.

184 Kupina S., Fields C., Roman M.C., Brunelle S.L. Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13 // J AOAC Int. – 2019. – Vol. 101. – P. 1466–1472.

185 Пат. RU2530501C1. Способ получения водорастворимых полисахаридов из листьев подорожника большого / Н.А. Великанова, С.П. Гапонов, А.И. Сливкин; опубл. 10.10.2014, Бюл. № 28. – 6 с.

186 Casillo, A., Fabozzi A., Russo Krauss I., Parrilli E., Biggs C.I., Gibson M.I., Lanzetta R., Appavou M.-S., Radulescu A., Tutino M.L. et al.

Physicochemical Approach to Understanding the Structure, Conformation, and Activity of Mannan Polysaccharides // Biomacromolecules. – 2021. – Vol. 22. – P. 1445–1457.

187 ICH Q2: Валидация аналитических методик: текст и методология / пер. с англ. – PharmAdvisor, 2020. – 16 с. // https://pharmadvisor.ru/document/tr3569/. 17.11.2020.

188 Casciaro B., Ghirga F., Cappiello F. et al. The Triprenylated Anthranoid Ferruginin A, a Promising Scaffold for the Development of Novel Antibiotics against Gram-Positive Bacteria // Antibiotics. – 2022. – Vol. 11. – № 84.

189 Lim J.F., Berger H., Su I. Isolation and Activation of Murine Lymphocytes // Journal of Visualized Experiments. – 2016.

190 Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages // Curr Protoc Immunol. – 2008. – Vol. 83.

191 Cho, Y.H., Chung, I.K., Cheon, W.H., Lee, H.S., Ku, S.K. Effect of Dhu001, a Polyherbal Formula on Formalin-Induced Paw Chronic Inflammation of Mice // Toxicol Res. – 2011. – Vol. 27.

192 Государственная Фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2009. – Т. 2. – 804 с.

193 Жусупова Г. Е., Шалахметова Т.М., Мурзахметова М. К., Гадецкая А. В., Жусупова А. И. Антиоксидантная активность некоторых препаратов, полученных на основе растений Казахстана // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2013. – Т. 5. – С. 43–65.

194 Пат. 14418 РК. Способ получения суммарного полифенольного комплекса из корней кермека Гмелина / К.Д. Рахимов, Г.Е. Жусупова, Абилов; опубл. 15.10.2007, Бюл. № 6. – 5 с.

195 Savic Gajic I., Savic I., Boskov I., Žerajić S., Markovic I., Gajic D. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Black Locust (Robiniae Pseudoacaciae) Flowers and Comparison with Conventional Methods // Antioxidants (Basel). – 2019. – Vol. 8(8). – № 248.

196 Surin S., You S.G., Seesuriyachan, P.; Muangrat, R.; Wangtueai, S.; Jambrak, A.R.; Phongthai, S.; Jantanasakulwong, K.; Chaiyaso, T.; Phimolsiripol, Y. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharides from Purple Glutinous Rice Bran (Oryza Sativa L.) and Their Antioxidant Activities // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10 (1). – № 10410.

197 Albuquerque B.R., Prieto M.A., Barreiro M.F., Rodrigues A.E., Curran T.P., Barros L., Ferreira I.C.F.R. Catechin-Based Extract Optimization Obtained from Arbutus Unedo L. Fruits Using Maceration/Microwave/Ultrasound Extraction Techniques // Ind Crops Prod. – 2017. – Vol. 95. – P. 404–415.

198 Ahmad Tariq Masoodi, F.A. Rather, Sajad Wani, Sajad Gull Amir. Supercritical Fluid Extraction: A Review // Journal of Biological and chemical Chronicles. – 2019. – Vol. 5(1). – P.114-122

199 Farías -Campomanes A.M., Rostagno M.A., Coaquira-Quispe J.J., Meireles M.A.A. Supercritical Fluid Extraction of Polyphenols from Lees: Overall Extraction Curve, Kinetic Data and Composition of the Extracts // Bioresour Bioprocess. – 2015. – Vol. 2 (1). – № 45.

200 Phan L.T.M., Nguyen K.T.P., Vuong H.T., Tran D.D., Nguyen T.X.P., Hoang M.N., Mai T.P., Nguyen H.H. Supercritical Fluid Extraction of Polyphenols from Vietnamese Callisia Fragrans Leaves and Antioxidant Activity of the Extract // J Chem. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–7. 7 pages

201 Kassymova, D., Zhusupova, G., Ogay, V., Zhussupova A., Katragunta K., Avula, B., Khan, I.A. Phytochemical Profiles and In Vitro Immunomodulatory Activities of Extracts Obtained from Limonium Gmelinii Using Different Extraction Methods // Plants. – 2023. – Vol. 12. – № 4019.

202 Gancedo N.C. Isolani R., de Oliveira N.C., Nakamura C.V., de Medeiros Araújo D.C., Sanches A.C.C., Tonin F.S., Fernandez-Llimos F., Chierrito D., de Mello J.C.P. Chemical Constituents, Anticancer and Anti-Proliferative Potential of Limonium Species: A Systematic Review // Pharmaceuticals. – 2023. – Vol. 16(2). – № 293.

203 Dang, Y., Lin, G., Xie Y., Duan, J., Ma, P., Li, G., Ji G. Quantitative Determination of Myricetin in Rat Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Its Absolute Bioavailability // Drug Res. – 2013. – Vol. 64. – P. 516–522.

204 Hamadou M.H., Kerkatou M., Zucal C., Bisio A., Provenzani A., Inga A., Menad A., Benayache S., Benayache F., Ameddah S. Limonium Duriusculum (de Girard) Kuntze Exhibits Anti-Inflammatory Effect Via NF-KB Pathway Modulation // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2021. – Vol. 64. – P. 1–15.

205 Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrew H., Sánchez-Contreras A., Pacheco N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources // Agronomy. – 2017. – Vol. 7. – № 47.

206 María R., Shirley M., Xavier C., Jaime S., David V., Rosa S., Jodie D. Preliminary Phytochemical Screening, Total Phenolic Content and Antibacterial Activity of Thirteen Native Species from Guayas Province Ecuador // J King Saud Univ Sci. – 2018. – Vol. 30(4). – P. 500–505.

207 Kozhamkulova, Z.A., Radwan M.M., Zhusupova G.E., Abilov Z.Z., Rahadilova S.N., Ross S.A. Gmelinoside I, a New Flavonol Glycoside from Limonium Gmelinii // Nat Prod Commun. – 2010. – Vol. 5 (7). – P. 1061–1063.

208 Herath K.H.I.N.M., Kim H.J., Lee J.H., Je J.G., Yu H.S., Jeon Y.J., Kim H.J., Jee Y. Sargassum Horneri (Turner) C. Agardh Containing Polyphenols Attenuates Particulate Matter-Induced Inflammatory Response by Blocking TLR-Mediated MYD88-Dependent MAPK Signaling Pathway in MLE-12 Cells. // J Ethnopharmacol. – 2021. – Vol. 265. –№ 113340.

209 Uttra A.M., Alamgeer Shahzad M., Shabbir A., Jahan S., Bukhari I.A., Assiri A.M. Ribes Orientale: A Novel Therapeutic Approach Targeting

Rheumatoid Arthritis with Reference to pro-Inflammatory Cytokines, Inflammatory Enzymes and Anti-Inflammatory Cytokines // J Ethnopharmacol. – 2019. – Vol. 237. – P. 92-107.

210 George G., Shyni G.L., Abraham B., Nisha P., Raghu K.G. Downregulation of TLR4/MyD88/P38MAPK and JAK/STAT Pathway in RAW 264.7 Cells by Alpinia Galanga Reveals Its Beneficial Effects in Inflammation: Immunomodulatory Effect of Alpinia Galanga // J Ethnopharmacol. – 2021. – Vol. 275. – № 114132.

211 Chan-Zapata I., Canul-Canche J., Fernández-Martín K., Martín-Quintal Z., Torres-Romero J.C., Lara-Riegos J.C., Ramírez-Camacho M.A., Arana-Argáez V.E. Immunomodulatory Effects of the Methanolic Extract from Pouteria Campechiana Leaves in Macrophage Functions // Food Agric Immunol. – 2018. – Vol. 29. – P. 386-399.

212 Parveen A., Zahiruddin S., Agarwal N., Akhtar Siddiqui M., Husain Ansari S., Ahmad S. Modulating Effects of the Synergistic Combination of Extracts of Herbal Drugs on Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressed Mice // Saudi J Biol Sci. – 2021. – Vol. 28 (11). – P. 6178-6190.

213 Sheu T.T., Chiang B.L. Lymphopenia, Lymphopenia- induced Proliferation, and Autoimmunity // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol.22 (8). – № 4152.

214 Mahapatra A.P.K., Song J., Shao Z., Dong T., Gong Z., Paul B., Padhy I. Concept of Process Capability Indices as a Tool for Process Performance Measures and Its Pharmaceutical Application // Journal of Drug Delivery and Therapeutics. – 2020. – Vol. 10. – P. 333–344.

215 Rodrigues M.J., Soszynski A., Martins A., Rauter A.P., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Varela J., Barreira L., Custódio L. Unravelling the Antioxidant Potential and the Phenolic Composition of Different Anatomical Organs of the Marine Halophyte Limonium Algarvense // Ind Crops Prod. – 2015. – Vol. 77. – P. 315–322.

216 Abdel-Sattar E., Shams M.M., Abd-Rabo M.M., Mahmoud N., Mahrous E.A. Chemical and Biological Investigations of Limonium Axillare Reveal Mechanistic Evidence for Its Antidiabetic Activity // PLoS One. – 2021. – Vol. 16 (8). – P. 1–16.

217 Blainski A., Gionco B., Oliveira A.G., Andrade G., Scarminio I.S., Silva D.B., Lopes N.P., Mello J.C.P. Antibacterial Activity of Limonium Brasiliense (Baicuru) against Multidrug-Resistant Bacteria Using a Statistical Mixture Design // J Ethnopharmacol. – 2017. – Vol. 198. – P. 313–323.

218 FDA Guidance for Industry Process Validation: General Principles and Practices Guidance for Industry Process Validation. – Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2011. – 22 pp.

219 Safitri F.I., Nawangsari D., Febrina D. Overview: Application of Carbopol 940 in Gel // International Conference on Health and Medical Sciences (AHMS 2020). – Paris: Atlantis Press, 2021. – Vol. 34. – P. 5.

220 Nurman S., Yulia R., Irmayanti, Noor E., Candra Sunarti T. The Optimization of Gel Preparations Using the Active Compounds of Arabica Coffee Ground Nanoparticles // Sci Pharm. – 2019. – Vol. 87 (4). – № 32.

221 Перцев И.М. и др. Контроль качества и производство мягких лекарственных средств в свете требований государственной фармакопеи Украины // Технология лекарств. – 2002. – № 8. – С. 29–31.

222 Khachatryan G., Khachatryan L., Krystyjan M., Lenart-Boroń A., Krzan M., Kulik K., Białecka A., Grabacka M., Nowak N., Khachatryan K. Preparation of Nano/Microcapsules of Ozonated Olive Oil in Hyaluronan Matrix and Analysis of Physicochemical and Microbiological (Biological) Properties of the Obtained Biocomposite // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – № 14005.

223 Budi H.S., Anitasari S., Ulfa N.M., Juliastuti W.S., Aljunaid M., Ramadan D.E., Muzari K., Shen Y.-K. Topical Medicine Potency of Musa Paradisiaca Var. Sapientum (L.) Kuntze as Oral Gel for Wound Healing: An In Vitro, In Vivo Study // Eur J Dent. – 2022. – Vol. 16. – P. 848–855.

224 Aiyal R., Govindarjan A., Ramasamy A. Formulation and Evaluation of Topical Herbal Gel for the Treatment of Arthritis in Animal Model // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 52. –P. 493–507.

225 Dyja R., Jankowski A. The Effect of Additives on Release and in Vitro Skin Retention of Flavonoids from Emulsion and Gel Semisolid Formulations // Int J Cosmet Sci. – 2017. – Vol. 39. – P. 442–449.

226 Slavkova M., Tzankov B., Popova T., Voycheva C. Gel Formulations for Topical Treatment of Skin Cancer: A Review // Gels. – 2023. – Vol. 9. – № 352.

227 Jurca T., Józsa L., Suciu R., Pallag A., Marian E., Bácskay I., Mureșan M., Stan R.L., Cevei M., Cioară F. et al. Formulation of Topical Dosage Forms Containing Synthetic and Natural Anti-Inflammatory Agents for the Treatment of Rheumatoid Arthritis // Molecules. – 2020. – Vol. 26 (1). – № 24.

228 Arulselvan, P., Fard, M.T., Tan, W.S., Gothai, S., Fakurazi S., Norhaizan M.E., Kumar, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation // Oxid Med Cell Longevю – 2016. – Vol. 2016.

Приложение А

Таблица 1 – Спецификация качества на растительную субстанцию из корней растений вида *L. gmelinii*

Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	В соответствии с НД
Идентификация - гидролизуемые дубильные вещества - конденсированные дубильные вещества	- при добавлении раствора *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества) - при добавлении 1 % раствора *ванилина Р* в *кислоте хлороводородной Р* появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	Качественная реакция в соответствии с НД
Потеря в массе при высушивании	Не более 12%	ГФ РК I, т. 1, *2.2.32*
Количественное определение - содержание дубильных веществ	не менее 15.0 %	В соответствии с НД
Микробиологическая чистота	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.	ГФ РК I, т. 1, *2.6.12* ГФ РК I, т. 1, *2.6.13*
Упаковка	полиэтиленовые пакеты по 100.0 г	В соответствии с НД
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Хранение	В прохладном, защищенном от света месте при температуре не выше 25 0С.	В соответствии с НД
Транспортирование	ГОСТ 17768-90	В соответствии с ГОСТ 17768-90

Приложение Б

Таблица 2 – Спецификация качества на растительную субстанцию из надземной части растений вида *L. gmelinii*

Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	В соответствии с НД
Идентификация - гидролизуемые дубильные вещества - конденсированные дубильные вещества	- при добавлении раствора *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества) - при добавлении 1 % раствора *ванилина Р* в *кислоте хлороводородной Р* появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	Качественная реакция в соответствии с НД
Потеря в массе при высушивании	Не более 12%	ГФ РК I, т. 1, *2.2.32*
Количественное определение - содержание дубильных веществ	не менее 15.0 %	В соответствии с НД
Микробиологическая чистота	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.	ГФ РК I, т. 1, *2.6.12* ГФ РК I, т. 1, *2.6.13*
Упаковка	полиэтиленовые пакеты по 100.0 г	В соответствии с НД
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Хранение	В прохладном, защищенном от света месте при температуре не выше 25 0С.	В соответствии с НД
Транспортирование	ГОСТ 17768-90	В соответствии с ГОСТ 17768-90

Приложение В

Таблица 3 – Результаты долгосрочных испытаний стабильности растительной субстанции из корней растений вида *L. gmelinii*

Первичная упаковка: пластиковый контейнер из полиэтилена высокой плотности (HDPE) Вторичная упаковка: Картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 030423 Дата начала испытания: 03.04.2023 Дата окончания испытания: 03.04.2024				
1	2	3	4	5	6	7
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация	- при добавлении раствора *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- при добавлении 1 % раствора *ванилина Р* в *кислоте хлороводородной Р* появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	9.28±1.31	9.95±1.10	10.22±0.56	10.05±1.21	9.97±1.76
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 15.0 %	27.22±0.91	27.47±1.05	27.31±1.12	26.98±0.95	26.84±0.56

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
Микробиологическая чистота*	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает
Первичная упаковка: пластиковый контейнер из полиэтилена высокой плотности (HDPE) Вторичная упаковка: Картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 040423 Дата начала испытания: 04.04.2023 Дата окончания испытания: 04.04.2024				
Показатели	Нормы отклонения	0	3	6	9	12
1	2	3	4	5	6	7
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация	- при добавлении раствора железа хлорида (III) Р2 появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- при добавлении 1 % раствора ванилина Р в кислоте хлороводородной Р появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	8.8±0.92	9.52±1.16	9.47±0.98	10.66±1.23	9.99±0.78
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 15.0 %	26.15±1.24	27.11±1.75	26.44±1.63	26.74±0.98	27.84±1.69
Микробиологическая чистота*	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает
Первичная упаковка: пластиковый контейнер из полиэтилена высокой плотности (HDPE) Вторичная упаковка: Картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 050423 Дата начала испытания: 05.04.2023 Дата окончания испытания: 05.04.2024				
Показатели	Нормы отклонения	0	3	6	9	12
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация	- при добавлении раствора *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
	- при добавлении 1 % раствора ванилина Р в кислоте хлороводородной Р появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	9.05±1.91	10.33±0.88	10.39±1.27	10.13±1.04	10.00±1.63
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 15.0 %	28.36±1.02	28.39±1.08	27.32±1.94	27.45±0.96	27.05±1.75
Микробиологическая чистота*	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает

Приложение Г

Таблица 4 – Результаты долгосрочных испытаний стабильности растительной субстанции из надземной растений вида *L. gmelinii*

Первичная упаковка: пластиковый контейнер из полиэтилена высокой плотности (HDPE) Вторичная упаковка: Картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 060423 Дата начала испытания: 06.04.2023 Дата окончания испытания: 06.04.2024				
1	2	3	4	5	6	7
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация	- при добавлении раствора *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- при добавлении 1 % раствора *ванилина Р* в *кислоте хлороводородной Р* появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	6.28±0.61	6.45±1.05	7.52±0.87	7.52±1.32	7.55±1.64

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 15.0 %	24.14±0.66	24.32±1.19	23.31±0.47	24.06±1.00	24.36±0.78
Микробиологическая чистота*	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает
Первичная упаковка: пластиковый контейнер из полиэтилена высокой плотности (HDPE) Вторичная упаковка: Картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 070423 Дата начала испытания: 07.04.2023 Дата окончания испытания: 07.04.2024				
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация	- при добавлении раствора *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7
	- при добавлении 1 % раствора ванилина Р в кислоте хлороводородной Р появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	8.28±0.84	8.45±1.47	8.00±0.84	9.22±0.44	9.12±1.02
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 15.0 %	25.15±0.66	25.32±1.23	23.31±0.98	25.06±1.58	25.36±1.77
Микробиологическая чистота*	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает

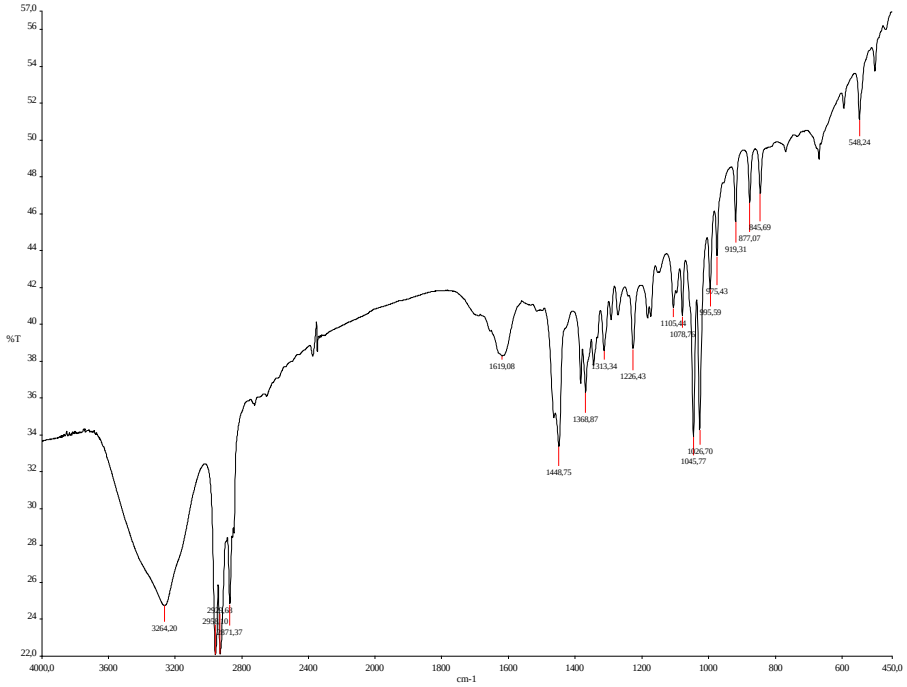
Первичная упаковка: пластиковый контейнер из полиэтилена высокой плотности (HDPE) Вторичная упаковка: Картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %	Серия: 100423 Дата начала испытания: 10.04.2023 Дата окончания испытания: 10.04.2024

1	2	3	4	5	6	7
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12

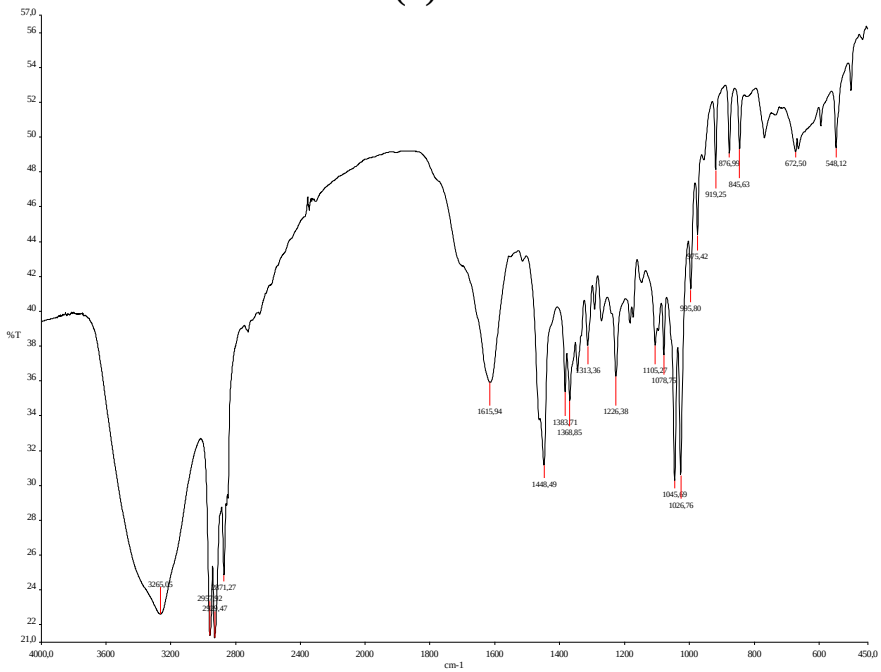
Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7
Описание	буровато-коричневый аморфный порошок со специфическим запахом растения	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Идентификация	- при добавлении раствора *железа хлорида (III) Р2* появляется черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- при добавлении 1 % раствора *ванилина Р* в *кислоте хлороводородной Р* появляется оранжево-красное окрашивание (конденсированные дубильные вещества)	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Потеря в массе при высушивании	Не более 12.0 %	6.28±0.61	6.85±1.05	7.52±0.87	7.52±1.32	7.55±1.68
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 15.0 %	24.14±1.22	22.32±1.44	23.31±1.65	22.06±0.36	22.61±0.72
Микробиологическая чистота*	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus*	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает	выдерживает

Приложение Д

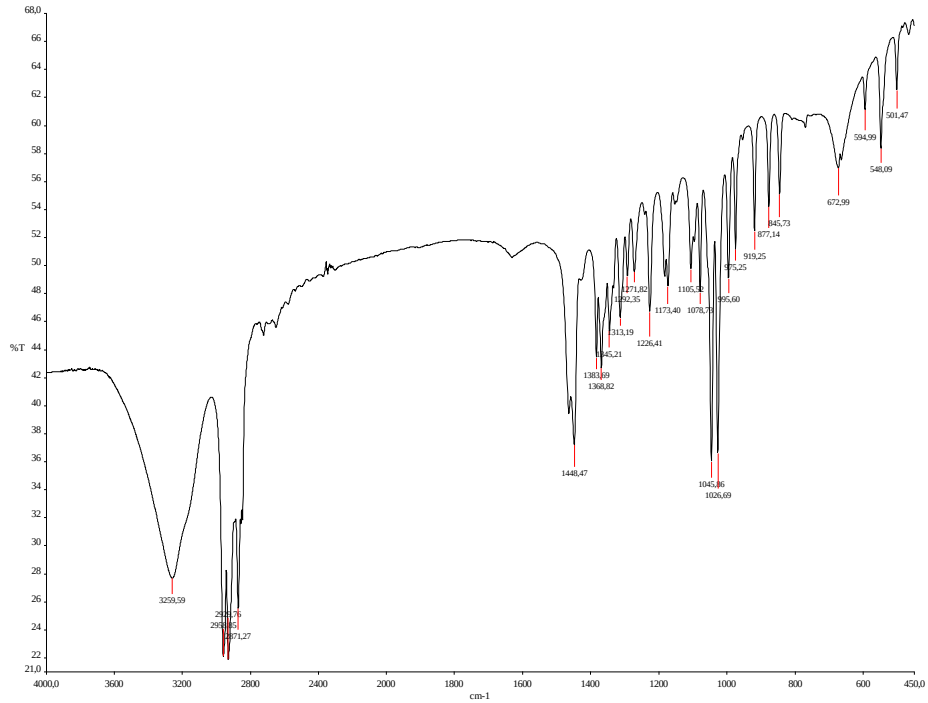


(1)

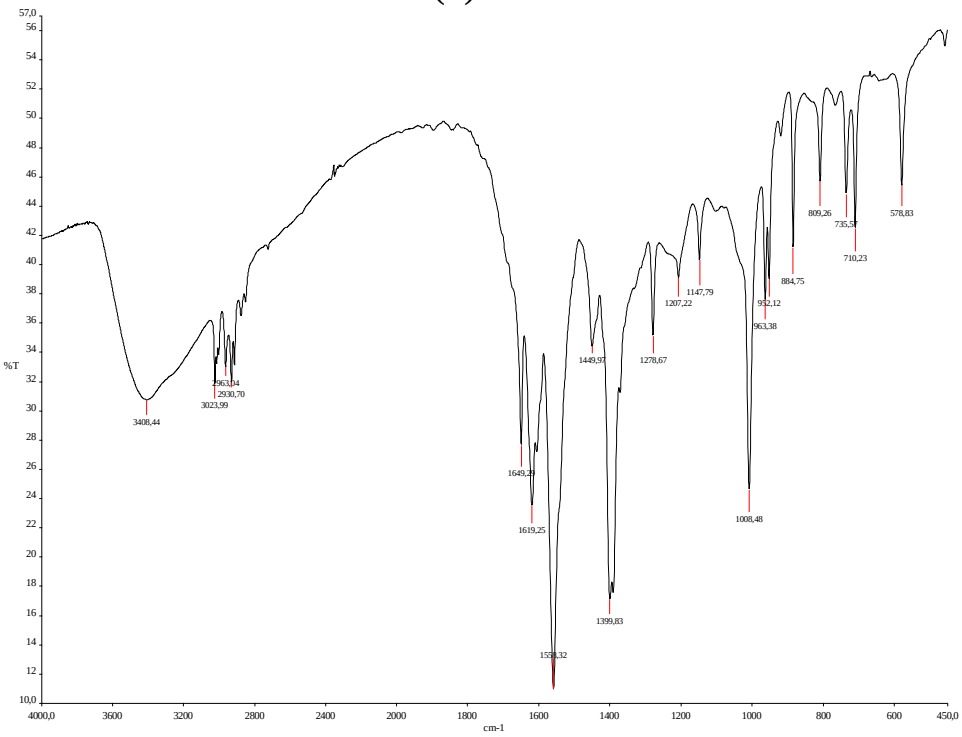


(2)

Рисунок 1 – ИК-спектры смеси субстанции из корней и ментола (1); смеси субстанции из НЧ и ментола (2); ментола (3); смеси субстанции из корней и сорбата калия (4); смеси субстанции из НЧ и сорбата калия (5); сорбата калия (6)

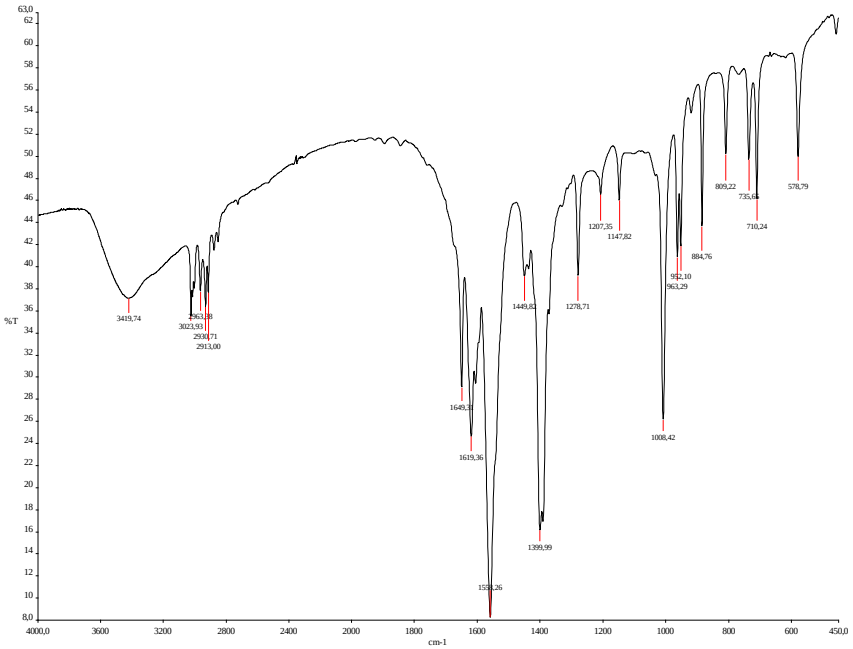

%T
cm-1
3259,59
2931,76
2871,27
1448,47
1383,69
1368,82
1345,21
1313,19
1292,35
1271,82
1226,41
1173,40
1105,32
1078,75
1045,86
1026,69
995,60
975,25
919,25
877,14
845,73
672,99
594,99
548,09
501,47

(3)

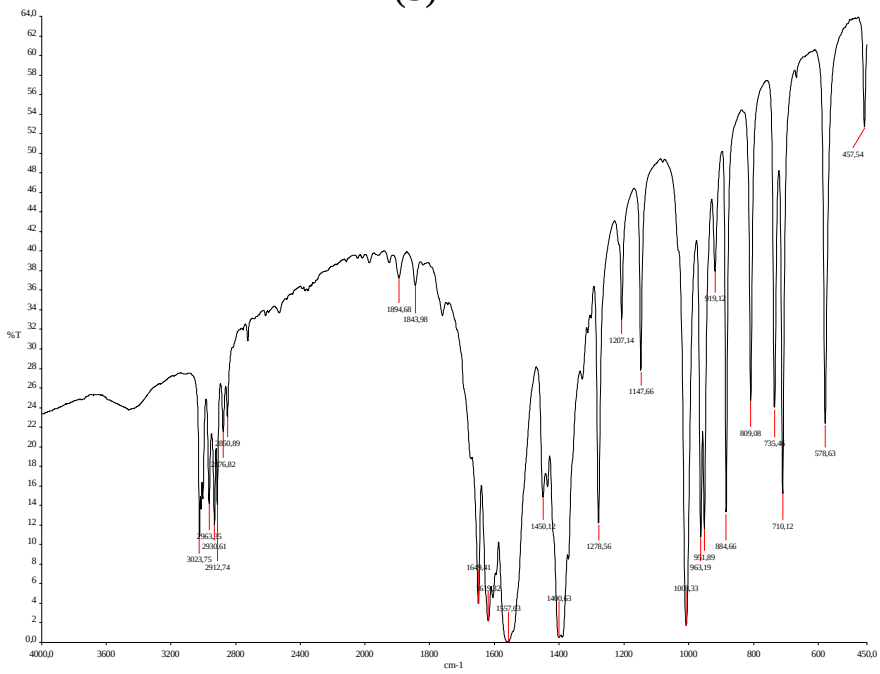

%T
cm-1
3408,44
3023,99
2963,04
2930,70
1649,29
1619,25
1559,32
1449,97
1399,83
1278,67
1207,22
1147,79
1008,48
963,38
952,12
884,75
809,26
735,57
710,23
578,83

(4)

Рисунок 1


%T
cm-1
4000,0
3600
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
450,0
3419,74
3023,93
2963,08
2930,71
2913,00
1649,31
1619,36
1557,26
1449,85
1399,99
1278,71
1207,35
1147,82
1008,42
963,29
932,10
884,76
809,22
735,63
710,24
578,79

(5)


%T
cm-1
4000,0
3600
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
450,0
1894,68
1843,98
2963,25
2930,61
3023,75
2912,74
1649,91
1557,03
1450,12
1400,63
1278,56
1207,14
1147,66
1000,33
963,19
951,89
919,12
884,66
809,08
735,46
710,12
578,63
457,54

(6)

Рисунок 1

Приложение Е

Таблица 5 – Спецификация качества на карбомер AQUPEC HV-505E

1	2	3
Общая информация	Химическое наименование: Сшитый акриловый полимер Производитель: SUMITOMO SEIKA CHEMICALS CO.	
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Белый или почти белый порошок	В соответствии с НД
Вязкость (0.5% раствор)	40,000–60,000 мПа*с	В соответствии с НД
Содержание влаги	≤ 2.0%	В соответствии с НД
pH (0.5% водный раствор)	2.7 - 3.3	В соответствии с НД
Содержание остаточного мономера (акриловая кислота)	≤ 0.2%	В соответствии с НД
Упаковка	Полиэтиленовые мешки, картонные коробки или барабаны	В соответствии с НД
Маркировка	Указаны название продукта, партия, дата производства, срок годности и условия хранения	В соответствии с НД
Температура хранения	15-25°C	В соответствии с НД
Условия хранения	Хранить в сухом, прохладном месте, защищенном от прямого солнечного света и влаги	В соответствии с НД

Приложение Ж

Таблица 6 – Спецификация качества на пропиленгликоль

1	2	3
Общая информация	Химическое наименование: Пропан-1,2-диол Производитель: Dow	
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Прозрачная, бесцветная, вязкая жидкость	В соответствии с НД
Идентификация	Соответствует требованиям Инфракрасная спектроскопия (ИК)	В соответствии с НД
Содержание пропиленгликоля	≥ 99.5%	В соответствии с НД
Кислотность	≤ 0.01%	В соответствии с НД
Содержание воды	≤ 0.2%	В соответствии с НД
Цветность (Pt-Co)	≤ 10	В соответствии с НД
Плотность	1.035 - 1.037 г/мл при 20°C	В соответствии с НД
Упаковка	Пластиковые или стальные бочки, канистры, флаконы	В соответствии с НД
Маркировка	Указаны название продукта, партия, дата производства, срок годности и условия хранения	В соответствии с НД
Температура хранения	15-25°C	В соответствии с НД
Условия хранения	Хранить в сухом, прохладном месте, защищенном от прямого солнечного света и влаги	В соответствии с НД

Приложение З

Таблица 7 – Спецификация качества на сорбат калия

1	2	3
Общая информация	Химическое наименование: Сорбат калия Производитель: Sigma-Aldrich	
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Белый или почти белый кристаллический порошок	В соответствии с НД
Идентификация	Структура соответствует ИК спектру	В соответствии с НД
Растворимость	Растворим в воде, этаноле	В соответствии с НД
Количественное содержание	≥ 99.0%	В соответствии с НД
Температура плавления	132-135°C	В соответствии с НД
Влажность	≤ 1.0%	В соответствии с НД
Упаковка	Стеклянные или пластиковые контейнеры	В соответствии с НД
Маркировка	Указаны название продукта, партия, дата производства, срок годности и условия хранения	В соответствии с НД
Температура хранения	15-30°C	В соответствии с НД
Условия хранения	Хранить в плотно закрытой таре, в сухом и прохладном месте, защищенном от света	В соответствии с НД

Приложение И

Таблица 8 – Спецификация качества на спирт этиловый

1	2	3
Общая информация	Химическое наименование: этанол Производитель: Талгар спирт	
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Прозрачная бесцветная жидкость	В соответствии с НД
Идентификация	Соответствует требованиям Инфракрасная спектроскопия (ИК)	В соответствии с НД
Запах	Характерный спиртовой, без посторонних запахов	В соответствии с НД
Количественное содержание	≥ 92.0 %	В соответствии с НД
Кислотность	≤ 0.01%	В соответствии с НД
Содержание воды	≤ 8.0 %	В соответствии с НД
Температура кипения	78.1°C	В соответствии с НД
Массовая доля ацетона и метанола	≤ 0.005%	В соответствии с НД
Массовая доля сивушных масел	≤ 0.003%	В соответствии с НД
Плотность (20°C)	0.808 - 0.812 г/мл	В соответствии с НД
Упаковка	Стеклянные или пластиковые бутылки, бочки, канистры	В соответствии с НД
Маркировка	Указаны название продукта, партия, дата производства, срок годности и условия хранения	В соответствии с НД
Температура хранения	15-25°C	В соответствии с НД
Условия хранения	Хранить в сухом, прохладном месте, защищенном от прямого солнечного света и влаги	В соответствии с НД

Приложение К

Таблица 9 – Спецификация качества на ментол

Общая информация	Химическое наименование: L-ментол Производитель: Sigma-Aldrich	
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Бесцветные или белые кристаллы	В соответствии с НД
Идентификация	Инфракрасный спектр соответствует структуре	В соответствии с НД
Оптическое вращение:	от -45 до -51 градусов	В соответствии с НД
Количественное содержание	≥ 97.0%	В соответствии с НД
Температура плавления	41 - 44 ^{0}C	В соответствии с НД
Влажность	≤ 1.0%	В соответствии с НД
Упаковка	Стеклянные или пластиковые контейнеры	В соответствии с НД
Маркировка	Указаны название продукта, партия, дата производства, срок годности и условия хранения	В соответствии с НД
Температура хранения	15-30°C	В соответствии с НД
Условия хранения	Хранить в плотно закрытой таре, в сухом и прохладном месте, защищенном от света	В соответствии с НД

Приложение Л

Таблица 10 – Спецификация качества на триэтаноламин

Общая информация	Химическое наименование: 2,2',2"-нитрилотрисэтанол Производитель: Sigma-Aldrich **CAS-номер**: 102-71-6	
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Прозрачная бесцветная жидкость	В соответствии с НД
Количественное содержание	≥ 99 %	В соответствии с НД
Содержание воды	≤ 0.5 %	В соответствии с НД
Плотность	1.124 г/мл	В соответствии с НД
Упаковка	Стеклянные или пластиковые контейнеры	В соответствии с НД
Маркировка	Указаны название продукта, партия, дата производства, срок годности и условия хранения	В соответствии с НД
Температура хранения	15-30°C	В соответствии с НД
Условия хранения	Хранить в плотно закрытой таре, в сухом и прохладном месте, защищенном от света	В соответствии с НД

Приложение М

Таблица 11 – Спецификация качества на вода очищенная

Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	Прозрачная бесцветная жидкость	В соответствии с НД
pH	5.0 - 7.0	В соответствии с НД
Запах	Без запаха	В соответствии с НД
Сухой остаток	≤ 1 мг/л	В соответствии с НД
Общее количество аэробных микроорганизмов	≤ 10 КОЕ/100 мл	В соответствии с НД
Патогенные микроорганизмы (E. coli, S. aureus, P. aeruginosa)	Отсутствие	В соответствии с НД
Пирогены	Отсутствие	В соответствии с НД

Приложение Н

Таблица 10 – Спецификация качества на гель с растительной субстанцией из корней растений вида *L. gmelinii*

1	2	3
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	В соответствии с НД
Подлинность - дубильные вещества - флавоноиды	- на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание - к спиртовому раствору препарата прибавляют кислоту хлороводородную Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане, появляется красно-оранжевое окрашивание.	Качественная реакция в соответствии с НД
Однородность	Препарат должен быть однородным	ГФ РК I, т. 1, общая статья «Мягкие лекарственные средства для местного применения», Приложение I
pH	От 5.5 до 6.75	ГФ РК I, т. 1, 2.2.3
Количественное определение - содержание дубильных веществ	не менее 0.75 %	В соответствии с НД
Микробиологическая чистота	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.*	ГФ РК I, т. 1, *2.6.12* ГФ РК I, т. 1, *2.6.13*
Упаковка	По 50 г в тубу алюминиевую с защитной алюминиевой мембраной, укупоренную завинчивающейся крышкой из пластмассы с приспособлением для прокалывания мембраны	В соответствии с НД

Продолжение таблицы 5

1	2	3
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Хранение	В прохладном, защищенном от света месте при температуре не выше 25 0С.	В соответствии с НД
Транспортирование	ГОСТ 17768-90	В соответствии с ГОСТ 17768-90

Приложение О

Таблица 11 – Спецификация качества на гель с растительной субстанцией из надземной части растений вида *L. gmelinii*

1	2	3
Спецификация	Нормы отклонений	Методы испытаний
Описание	прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	В соответствии с НД
Подлинность - дубильные вещества - флавоноиды	- на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание - к спиртовому раствору препарата прибавляют кислоту хлороводородную Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане, появляется красно-оранжевое окрашивание.	Качественная реакция в соответствии с НД
Однородность	Препарат должен быть однородным	ГФ РК I, т. 1, общая статья «Мягкие лекарственные средства для местного применения», Приложение I
pH	От 5.5 до 6.75	ГФ РК I, т. 1, 2.2.3
Количественное определение - содержание дубильных веществ	не менее 0.75 %	В соответствии с НД
Микробиологическая чистота	В 1 г препарата допускается наличие не более 100 аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (суммарно). Отсутствуют бактерии семейства *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosae, Staphylococcus aureus.*	ГФ РК I, т. 1, *2.6.12* ГФ РК I, т. 1, *2.6.13*
Упаковка	По 50 г в тубу алюминиевую с защитной алюминиевой мембраной, укупоренную завинчивающейся крышкой из пластмассы с приспособлением для прокалывания мембраны	В соответствии с НД

Продолжение таблицы 6

1	2	3
Маркировка	См. утвержденный макет упаковки	В соответствии с НД
Хранение	В прохладном, защищенном от света месте при температуре не выше 25 0С.	В соответствии с НД
Транспортирование	ГОСТ 17768-90	В соответствии с ГОСТ 17768-90

Приложение П

Таблица 12 – Результаты долгосрочных испытаний стабильности гелей с растительными субстанциями из корней растений вида *L. gmelinii*

Первичная упаковка: алюминиева туба Вторичная упаковка: картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 060323 Дата начала испытания: 06.03.2023 Дата окончания испытания: 06.03.2024				
1	2	3	4	5	6	7
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	Прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Подлинность	- дубильные вещества на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- флавоноиды к спиртовому раствору препарата прибавляют *кислоту хлороводородную* Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-оранжевое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	
Однородность	препарат должен быть однородным	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
pH	От 5.5 до 6.75	5.89±0.01	5.86±0.01	5.80±0.02	5.97±0.03	6.12±.02
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 0.75 %	1.32±0.21	1.32±0.28	1.24±0.15	1.21±0.15	1.14±0.26
Первичная упаковка: алюминиева туба Вторичная упаковка: картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 070323 Дата начала испытания: 07.03.2023 Дата окончания испытания: 07.03.2024				
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	Прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	7
Подлинность	- дубильные вещества на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- флавоноиды к спиртовому раствору препарата прибавляют *кислоту хлороводородную* Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-оранжевое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Однородность	препарат должен быть однородным	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
pH	От 5.5 до 6.75	5.88±0.02	5.80±0.01	5.84±0.02	5.86±0.01	5.99±0.02
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 0.75 %	1.12±0.10	1.12±0.21	1.10±0.09	1.11±0.10	1.02±0.14

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	7
Первичная упаковка: алюминиева туба Вторичная упаковка: картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 090323 Дата начала испытания: 09.03.2023 Дата окончания испытания: 09.03.2024				
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	Прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Подлинность	- дубильные вещества на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- флавоноиды к спиртовому раствору препарата прибавляют кислоту хлороводородную Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-оранжевое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6	7
Однородность	препарат должен быть однородным	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
pH	От 5.5 до 6.75	5.75±0.01	5.72±0.01	5.70±0.02	5.69±0.02	5.70±0.01
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 0.75 %	1.22±0.08	1.22±0.06	1.11±0.04	1.14±0.08	1.10±0.05

Приложение Р

Таблица 13 – Результаты долгосрочных испытаний стабильности гелей с растительными субстанциями из надземной части растений вида *L. gmelinii*

Первичная упаковка: алюминиева туба Вторичная упаковка: картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 130323 Дата начала испытания: 13.03.2023 Дата окончания испытания: 13.03.2024				
1	2	3	4	5	6	7
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	Прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Подлинность	- дубильные вещества на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- флавоноиды к спиртовому раствору препарата прибавляют *кислоту хлороводородную* Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-оранжевое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6	7
Однородность	препарат должен быть однородным	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
pH	От 5.5 до 6.5	5.99±0.01	5.95±0.01	5.90±0.03	5.95±0.01	5.92±0.02
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 0.75 %	1.12±0.06	1.12±0.09	1.10±0.11	1.08±0.05	1.09±0.08
Первичная упаковка: алюминиева туба		Серия: 140323 Дата начала испытания: 14.03.2023 Дата окончания испытания: 14.03.2024				
Вторичная упаковка: картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Периоды контроля, мес.				
Показатели	Нормы отклонения	0	3	6	9	12
Описание	Прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6	7
Подлинность	- дубильные вещества на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- флавоноиды к спиртовому раствору препарата прибавляют *кислоту хлороводородную* Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-оранжевое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Однородность	препарат должен быть однородным	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
pH	От 5.5 до 6.5	6.10±0.01	5.99±0.01	5.98±0.01	6.01±0.01	5.96±0.02
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 0.75 %	1.02±0.02	1.03±0.04	1.00±0.07	1.00±0.05	0.99±0.10

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6	7
Первичная упаковка: алюминиевая туба Вторичная упаковка: картонная коробка Температура: (25±2) °С Относительная влажность: (60±5) %		Серия: 150323 Дата начала испытания: 15.03.2023 Дата окончания испытания: 15.03.2024				
Показатели	Нормы отклонения	Периоды контроля, мес.				
		0	3	6	9	12
Описание	Прозрачный гель темно-коричневого цвета с запахом ментола	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
Подлинность	- дубильные вещества на фильтровальную бумагу наносят несколько капель спиртового раствора препарата, подсушивают и опрыскивают 1 % раствором железа аммония сульфата или 2 % раствором железа хлорида, появляется серое или голубовато-серое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
	- флавоноиды к спиртовому раствору препарата прибавляют кислоту хлороводородную Р, магний Р, нагревают на кипящей водяной бане. Появляется красно-оранжевое окрашивание	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5	6	7
Однородность	препарат должен быть однородным	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	соответствует
pH	От 5.5 до 6.5	6.34±0.01	6.30±0.01	6.20±0.02	6.21±0.01	6.29±0.02
Количественное определение - содержание дубильных веществ	Не менее 0.75 %	0.96±0.02	0.96±0.04	0.95±0.07	0.95±0.05	0.94±0.06