

Казахский национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова

УДК: 615.322.076.011: 633.861.9

На правах рукописи

МАХАТОВА БАЛЖАН ГАЛЫМЖАНОВНА

**Разработка технологии и стандартизация лекарственных средств коровьяка
джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*)**

6D074800 – Технология фармацевтического производства

Диссертация на соискание ученой степени
доктор философии (PhD)

Научные консультанты:

Датхаев У.М., д.фарм.н., профессор

Jindra Valentova, Pharm Dr, PhD, associate professor

Кулмагамбетов И.Р., д.м.н., профессор, академик НАН РК

Республика Казахстан
Алматы, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ И СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КОРОВЯКА ДЖУНГАРСКОГО (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	10
1.1 Современное состояние и перспективы развития использования лекарственных растений в фармацевтической промышленности Республики Казахстан.....	10
1.2 Современное состояние научных исследований растений рода коровяк: фитохимическое изучение и аспекты применения.....	15
1.3 Подходы к стандартизации фитопрепаратов в свете современных требований к ним.....	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
2.1 Материалы исследований	39
2.2 Методы исследований	40
3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТРАВЫ КОРОВЯКА ДЖУНГАРСКОГО (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ)	43
3.1 Фитохимическое исследование растения Коровяк джунгарский (<i>Verbascum songaricum Schrenk</i>)	43
3.1.1 Определение фенольных соединений	43
3.1.2 Исследование качественного и количественного содержания фенолкарбоновых кислот	48
3.1.3 Определение флавоноидов	49
3.1.4 Изучение жирнокислотного состава липофильных фракций коровяка джунгарского	51
Аминокислотный состав сырья коровяка джунгарского	53
3.1.6 Изучение компонентного состава органических кислот	54
3.1.7 Определение суммы орто-дигидроксикоричных кислот в сырье коровяка джунгарского	56
3.2 Стандартизация сырья коровяка джунгарского	58
3.2.1 Изучение морфолого-анатомических признаков сырья коровяка джунгарского	58
3.2.2 Определение параметров качества сырья <i>Verbascum songaricum Schrenk</i>	63
3.2.3 Разработка методики количественного определения актеозида в сырье коровяка джунгарского	65
3.2.4 Валидация методики количественного определения	67
3.2.5 Разработка спецификации качества на сырье коровяка джунгарского	71
3.2.6 Исследование стабильности сырья коровяка джунгарского	73

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТА КОРОВЯКА ДЖУНГАРСКОГО	76
4.1. Разработка различных экстрактов коровяка джунгарского. Подбор оптимального режима экстрагирования и сушки	76
4.2 Изучение факторов, влияющих на полноту экстрагирования путем биоскрининга	80
4.3 Технология производства сухого экстракта коровяка джунгарского	87
4.4. Стандартизация сухого экстракта коровяка джунгарского	91
4.5. Изучение стабильности и определение условий хранения экстракта коровяка джунгарского	92
4.6. Техничко-экономическое обоснование производства экстракта коровяка джунгарского	95
5 ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И СПЕЦИФИЧЕСКОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ РАЗРАБОТАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ	99
5.1. Исследование острой токсичности	99
5.2. Изучение противовоспалительной активности	100
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	105
ПРИЛОЖЕНИЯ	117

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСО РК 5.04.034-2011	Государственный общеобязательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. № 1080)
ГФ РК, Т. 1, 2, 3 ГОСТ 1770-74	Государственная фармакопея РК Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки и методы испытаний.
ГОСТ 7625-86 Е ГОСТ 7933-89 Е	Бумага этикеточная. Технические условия Картон для потребительской тары. Общие технические условия
ГОСТ 7625-86 Е ГОСТ 7933-89 Е	Бумага этикеточная. Технические условия Картон для потребительской тары. Общие технические условия
ГОСТ 17768-90 Е	Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.
ГОСТ 24104-88	Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные, стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 7142-54	Определение коллоидной стабильности гетерогенных систем.
ГОСТ Р52465-2005	Масло подсолнечное. ТУ. - М., Стандарт-информ, 2006.
МУ 09140.07-2007	Методические указания. Изучение стабильности и установление сроков годности новых субстанций и готовых лекарственных средств
ГН	Гигиенические нормативы «Санитарно-эпидемиологические требования к обеспечению радиационной безопасности», Постановление Правительства Республики Казахстан от 3 февраля 2012 года № 201.
Е.Ph. 8.0	European Pharmacopoeia 8.0, 2014

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АБТС	- 2,2'-Азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты)
АО	- Акционерное общество
БАВ	- биологически активные вещества
ВАНД	- временный аналитический нормативный документ
ВОЗ	- Всемирная Организация здравоохранения
ВР	- вспомогательная работа
Вт	- Ватт
ВЭЖХ	- высокоэффективная жидкостная хроматография
г	- грамм
ГХ	- газовая хроматография
ГОСТ	- государственный стандарт
ГФ	- государственная фармакопея
ГФ РК	- государственная фармакопея Республики Казахстан
ДФП	- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
ЕФ	- европейская фармакопея
кг	- килограмм
кГц	- килогерц
ЛВ	- лекарственное вещество
ЛС	- лекарственное средство
ЛРС	- лекарственное растительное сырье
КазНМУ	- Казахский национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова
мин	- минут
мл	- миллилитр
мм	- миллиметр
мкл	- микролитр
МПА	- мегапаскаль
МУ	- методические указания
нм	- нанометр
НД	- нормативная документация
Об/мин	- оборотов в минуту
ПАВ	- поверхностно-активные вещества
РК	- Республика Казахстан
см	- сантиметр
СО	- стандартный образец
ТОО	- товарищество с ограниченной ответственностью
ТП	- технологический процесс
ТСХ	- тонкослойная хроматография
УМО	- упаковка, маркировка, отпуск
УФ	- ультрафиолетовая
ч	- часов

ЮКГФА	- Южно-Казахстанская государственная фармацевтическая академия
GMP	- Good manufacturing practice
GLP	- Good laboratory practice
IC ₅₀	- концентрация полумаксимального ингибирования
In Vitro	- выполнения эксперимента вне живого организма
In Vivo	- выполнения эксперимента на живом организме
LD ₅₀	- полуметальная доза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Лекарственная политика Республики Казахстан основывается на принципах обеспечения населения страны эффективными, качественными, безопасными и доступными лекарственными средствами. На сегодняшний день в Государственном Реестре Республики Казахстан зарегистрировано более 7000 лекарственных препаратов. Доля отечественных препаратов составляет - 30%, в стоимостном – 10%, соответственно, спрос на фармацевтические товары на 90% удовлетворяется за счет импортных лекарств. В условиях создавшейся в стране импортозависимости фармацевтического рынка создание новых лекарственных средств отечественного производства является одной из важнейших стадий в процессе становления фармацевтической промышленности Казахстана.

По материалам всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) лекарственные препараты растительного происхождения представляют значительную фрагмент объема фармацевтической индустрии. Данный масштаб оборота фитопрепаратов обусловлен рядом факторов, основными из которых являются потенциал всестороннего действия растительных лекарственных средств, возможность пролонгации действия, персональный подход, высокая безопасность при достаточной эффективности и доступность.

Территория Казахстана располагает огромным запасом лекарственных растений, которые веками широко используются в традиционной медицине, но не все еще не нашли применения в официальной медицине.

Одним из таких растений является Коровяк джунгарский (*Verbascum songaricum Schrenk*) семейства Scrophulariaceae, который используется в народной медицине разных стран на протяжении веков для лечения широкого спектра человеческих недугов, в частности в качестве противовоспалительного, противокашлевого, антимикробного, антиоксидантного и ранозаживляющего средств.

Не смотря на то что растение *Verbascum songaricum Schrenk* является перспективным источником биологически активных веществ, в настоящее время не используются в практической фармации и официальной медицине. Более того, фитохимический состав коровяка джунгарского в качестве лекарственного растительного сырья изучен недостаточно, нормы качества сырья не определены. Поэтому, комплексное фитохимическое исследование коровяка джунгарского с использованием современных методов, разработка нормативной документации, а также создания на его основе новых лекарственных средств, тем самым расширение базы данных лекарственных средств растительного происхождения является актуальным.

Цель исследования

Разработать оптимальную технологию и провести стандартизацию лекарственных средств коровяка джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*).

Задачи исследования

1. Комплексное фитохимическое исследование растения коровяк джунгарский.
2. Фармакогностическое изучение сырья *Verbascum songaricum Schrenk*.
3. Разработка оптимальной технологии экстракта на основе коровяка джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*).
4. Стандартизация и определение условий и сроков хранения экстракта на основе сырья коровяка джунгарского.
5. Исследования по изучению безопасности и специфической фармакологической активности лекарственных средств коровяка джунгарского.
6. Техничко-экономическое обоснование производства экстракта на основе коровяка джунгарского.

Объект исследования: Объектом исследования является растение коровяк джунгарский (*Verbascum songaricum Schrenk*), собранное в мае-июне 2014-2015 годов на территории Южного Казахстана. А также экстракт на основе сырья коровяка джунгарского.

Методы исследования: физические и физико-химические, методы фармакогнозии, фармако-технологические, биологические, микробиологические и статистические.

Научная новизна

Впервые проведено фармакогностическое исследование коровяка джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*), изучен химический состав растения, исследована динамика накопления биологически активных веществ, проведена стандартизация сырья коровяка джунгарского.

Впервые разработана оптимальная технология экстракта на основе коровяка джунгарского, обладающего антиоксидантной, антимикробной и противовоспалительной активностями и проведена его стандартизация.

Впервые разработаны проекты АНД (аналитический нормативный документ) и технологический регламент, а также поданы заявки на полезную модель.

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

Обоснование значимости сырья коровяка джунгарского для ее изучения.

Результаты фитохимического исследования растения *Verbascum songaricum Schrenk*.

Результаты фармакогностического изучения сырья коровяка джунгарского.

Разработка оптимальной технологии экстракта на основе коровяка джунгарского.

Стандартизация разработанного экстракта на основе коровяка джунгарского и исследование его стабильности.

Результаты изучения безопасности и специфической фармакологической активности лекарственных средств коровяка джунгарского.

Техничко-экономическое обоснование экстракта на основе коровяка джунгарского.

Практическая значимость исследования

На основании результатов исследования разработана комплексная технология лекарственного растительного сырья и экстракта коровьяка джунгарского.

Получены опытно-промышленные партии разработанных лекарственных средств (сырья и экстракта коровьяка джунгарского) на базе АО «Химфарм» (г. Шымкент).

На основе проведенных физико-химических, химических, микробиологических и других исследований разработаны нормативные документы на лекарственные средства – проекты АНД (аналитический нормативный документ), технологические регламенты и поданы две заявки на полезную модель.

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертационной работы доложены на международных конференциях в Алматы, Астане, Шымкенте, Туркестане, Санкт-Петербурге, Самарканде, Дубае, Харькове, Душанбе.

Сведения о публикациях

По результатам исследований опубликовано 25 работ, в том числе: 3 статьи в международных журналах, входящих в базу данных Thomson Reuters и Scopus; 5 статей, рекомендованных ККСОН МОН РК; 14 статей на международных научно-практических конференциях; 2 статьи в зарубежных журналах; 1 статья, в издании, входящем в базу РИНЦ.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц, 32 рисунка, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов испытаний, трех глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы, включающего 171 источников и приложения.

1 ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ И СОЗДАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КОРОВЬЯКА ДЖУНГАРСКОГО (Обзор литературы)

1.1 Современное состояние и перспективы развития использования лекарственных растений в фармацевтической промышленности Республики Казахстан

Лекарственная политика Республики Казахстан основывается на принципах также доступными лекарственными препаратами [1]. В условиях создавшейся в стране импортозависимости фармацевтического рынка, создание собственной обеспечения населения страны эффективными, качественными, безопасными, а фармацевтической промышленности является одной из важнейших стадий в процессе становления экономической независимости Казахстана [2].

На данный момент доля лекарственных препаратов растительного происхождения на мировом рынке составляет 40%. За последние десятилетия во всем мире значительно возрос интерес населения к растительным лекарственным средствам в связи с их более мягким действием, меньшим привыканием и побочными эффектами в сравнении с синтетическими средствами [3].

По данным ВОЗ, в настоящее время до восьмидесяти процентов людей во всем мире (около 5 миллиардов долларов людей) применяют лекарственные растения для лечения болезней. Примерно одна четверть всех мировых лекарств растительного происхождения либо извлечены непосредственно из растений или синтезировали на основе состава растений.

Развитие технологии фармацевтического производства в Республике Казахстан целесообразно и стратегически выгодно осуществлять посредством развития производства фитопрепаратов, что обусловлено расположением территории страны уникальными запасами лекарственного растительного сырья, значительным научно-техническим потенциалом в области создания новых лекарственных препаратов из лекарственного растительного сырья. Исходя из этого одним из основных приоритетных задач на пути развития отечественной фармацевтической промышленности является поиск новых источников лекарственных средств, фармацевтическая разработка оригинальных отечественных фитосубстанций и внедрение в практику лекарственных препаратов на их основе [4].

Природа нашей страны многолика и неповторима. На обширной территории республики встречается немало очень ценных для науки и практики своеобразных «кладовых живой природы». Согласно данным научной литературы, на территории Казахстана встречается около 250 видов лекарственных растений [5].

Лечебные свойства лекарственных растений, эмпирически заложенные в древние времена, находят научное обоснование в современной официальной медицине. В современной медицине очень широкое применение получили биологически активные вещества лекарственных растений, такие как алкалоиды,

эфирные масла, органические кислоты, фенольные соединения, дубильные вещества и др. По представлениям современных исследований, растительное лекарственное средство — это целостный биогенетически сложившийся комплекс, который включает в себя действующие вещества, а также вторичные метаболиты, протеины, хлорофилл, макро и микроэлементы, неорганические соли и т. д. [6].

Комплекс, который сформировался в живой клетке, владеет большим сходством с организмом человека, в отличие от химически изолированного активного фармацевтического компонента, легче ассимилируется, а также обладает меньшим количеством побочных эффектов. На данном этапе одной из приоритетных задач, стоящих перед научной фармацией является комплексное изучение растительных ресурсов с целью создания новых эффективных, качественных и безопасных лекарственных препаратов. Комплекс биологически активных компонентов, которые содержатся в растениях, обладают поливалентными свойствами, стимулируя при этом различные системы организма или компенсируя недостаточность их функций. Их действие, будучи при этом более мягким и пролонгированным, как правило, не вызывает аллергических взаимодействий или осложнений. Более того, лекарственные растения содержат в своем составе антиоксидантные компоненты, под действием которых выводятся из организма токсические вещества и продукты метаболизма, в частности свободные радикалы [7].

Использование растений в лечебных целях берет свое начало с глубокой древности. Древние мифы и легенды гласят, что растения применялись для приготовления настоев, отваров, которые использовались для полоскания рта, от зубной боли, для заживления ран, лечения и профилактики язвенных болезней слизистой оболочки, а также различных воспалительных процессов [8].

Сохранились сведения археологов, которые гласят о применении в лекарственных растений в древние времена. Доказательством тому являются найденные археологами среди остатков глиняных изделий материальные признаки врачебной практики наших отдаленных предков – специальная посуда, применяемая для растирания и приготовления отваров из лекарственных трав.

Древние жители Египта также использовали лечебные травы. Имеются сведения, о том, что информация о целебных свойствах растений была заимствована у вавилонян и ассирийцев, о чем свидетельствуют названия многих лекарственных растений в источниках на языке вавилонян, всего в применении у египтян насчитывалось более восьмидесяти лекарственных растений. Еще за 4000 лет до н.э. древни жители Египта сформулировали некоторое подобие фармакопеи, которая представляла собой систематическое описание лекарственных растений, применяемых в Египте. Упоминания об этих фармакопеях были найдены учеными в записях, сделанных на папирусе [9].

Лекарственные растения для лечения больных предложил использовать родоначальник медицины Гиппократ (460-377 гг. до н.э.). Он сформулировал научное обоснование применения в лечебных целях более 230 лекарственных растений. Много интересных и полезных сведений о лечебных действиях,

оказываемых растениями, содержатся в трудах великих древних мыслителей и ученых Диоскорида, Плинея, Галена [10].

Китайская медицина – второй представитель самобытной системы эмпирической медицины. Ее основоположником является Шен Нунь, который жил за 3 тыс. лет до н.э. Для лечения различных недугов он использовал в своей практике около 230 видов лекарственных и ядовитых растений [11].

В России истоки распространения лечения болезней лекарственными растениями исходят от времени правления Петра I. По его указу в 1714 г. в городе Санкт-Петербург был заложен Аптекарский огород – в настоящее время — это Ботанический сад Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН. Позже такие сады были сооружены при военных лазаретах многих крупных городов. Появилась возможность научного обоснования оказывания лечебного действия растений, путем их систематического исследования.

Великий русский ученый Ломоносов в своих записях отмечал целебное свойство соков свежих ягод и овощей предотвращать развитие цинги, а его ученик Лепехин упоминал, что также это заболевание предупреждают соки березы, сосны, а также ели.

Выдающиеся полководцы России Суворов и Кутузов во время походов, проявляя заботу о здоровье солдат, рекомендовали принимать для предупреждения цинги капусту, хрен, щавель, некоторые травы и ягоды.

Лекарственные средства растительного происхождения, оказывая фармакологическое терапевтическое (противовоспалительное, кардиотоническое, кровоостанавливающее, болеутоляющее, регенерирующее) и регуляторное (потогонное, мочегонное, успокаивающее) действия, нормализуют кровяное давление и деятельность сердечно-сосудистой системы, влияют на обменные процессы организма, повышают его защитные свойства и фагоцитарную деятельность лейкоцитов, а также подавляют ферментативную активность кокковой микрофлоры и стимулируют всасывающую функцию слизистой оболочки полости рта.

При лечении и профилактики лекарственными растениями редко наблюдаются побочное действие и аллергические реакции. Выгодно отличает их от других лекарственных средств и наличие микроэлементов, витаминов, эфирных масел, биогенных веществ [12].

Выделение индивидуальных биологически активных веществ из растений, а также синтез новых субстанций в настоящее время составляют главные направления в области создания новых лекарственных препаратов.

Лекарственные биологически активные вещества, извлекаемые из растений, обладают рядом принципиальных преимуществ в сравнении с синтетическими активными фармацевтическими компонентами. Основное их преимущество заключается в том, что эти БАВ возникают в живой клетке. Не исключая разницу между растениями и животными, их клетки, в качестве основных структурных единиц, составляющие тело и растений, и животных, имеют поразительно много общих свойств. Сущность этой аналогии сводится не только к похожему строению клеток, но сходству многих важных биохимических процессов,

которые протекают в клетках тел и других организмов. Вещества, которые образуются в растительной клетке, имеют свойство адаптироваться в жизненных отправлениях этой клетки, даже в случае их ядовитости по отношению к клеткам других организмов. Осуществление данной адаптации объясняется не только тончайшей организацией атомов в молекуле активного ингредиента, но также и присутствием в клетке других компонентов, которые усиливают или ослабляют действие химического соединения, которое используется в качестве активного ингредиента. В этом и заключается причина того, что различные биологически активные вещества, присутствующие в живой растительной клетке, даже являясь при этом ядовитыми, не оказывают значительного воздействия на всю систему химических реакций, протекающих в живой клетке высшего животного и человека, в отличие от его синтезированного аналога.

Следует отметить важное обстоятельство, которое предусматривает второе преимущество лекарственных субстанций растительного происхождения. Суть вопроса лежит в происхождении растений и животных, что это не только два пути развития на нашей планете. Эволюция животных организмов самым тесным образом связана с эволюцией растений. Организм животных не в состоянии самостоятельно строить свое тело из веществ неорганической природы, как растения, вследствие чего должны употреблять органические продукты – растения или другие животные, которые тоже, в свою очередь, питаются растениями. Следовательно, адаптация животных к веществам растительного происхождения продолжается на протяжении миллионов лет. Эта непосредственная связь между животными и растениями и является причиной тесной слаженности химического состава растений и нормальной жизнедеятельности всех органов животных и человека [13].

Лекарственные растения много тысяч лет были основным средством лечения болезней, и разные цивилизации накопили богатый опыт использования растений из всех климатических зон и континентов. В развитых странах громадные успехи химии и фармакологии двадцатого века привели к созданию высокоэффективных препаратов, лечебные дозы которых составляют всего миллиграммы и отношение к растительным лекарствам стало пренебрежительным. Однако в последнее время все большее число врачей и больных начинают отдавать предпочтение растительным лекарствам, как натуральным продуктам, более родственным человеческому организму.

Главная причина изменения отношения к растительным лекарствам состоит в том, что очень высока частота осложнений от приема химических лекарств. 58 стран создали мировую систему контроля безопасности лекарств. Выяснилось, что, например, в США вследствие развития неблагоприятных побочных реакций при использовании лекарственных средств ежегодно госпитализируются от 5 до 8,8 миллионов больных и погибает до 200000 человек. Финансовые затраты, связанные с побочными действиями лекарственных препаратов, составляют в США 76,6 млрд. долларов в год. Во Франции в 1997 г около 10% всех госпитализированных составляли больные с неблагоприятными побочными

реакциями. Всего побочные действия лекарственных средств возникли у 1317650 больных, из них у 33% серьезные и у 1,4% смертельные [14].

Как причины катастрофического неблагополучия перечисляются большое число препаратов с высокой биологической активностью, сенсibilизация населения к химическим веществам, нерациональное использование лекарств, медицинские ошибки, применение некачественных лекарственных препаратов.

В Японии с 1974 по 1989 гг., в 15 раз расширена продажа лекарственных средств из растительного сырья по сравнению с ростом в 2,6 раза продажи фармацевтических продуктов. В Китае в 1993 году продано растительных лекарств на сумму более 2,5 миллиарда долларов.

В США 25% выписываемых рецептов содержат растительные препараты, причем в последнее время все больший процент пользующихся лекарственными растениями приходится на молодых лиц. 60% опрошенных в Голландии и Бельгии и 74% в Англии высказались за то, чтобы дополнительная медицина была доступна в национальных системах [15].

По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения в мире до 80% населения, в основном из развивающихся стран, не в состоянии покупать дорогие лекарства в аптеках и продолжают пользоваться средствами народной медицины, в первую очередь лечебными травами.

В Казахстане велика потребность в лекарствах из растений, так как более 90% медикаментов поступает из-за рубежа и продается по ценам, недоступным для населения. Лекарственные препараты из растений в аптеках в основном представлены препаратами из Индии, Пакистана, Шри-Ланки, отчасти из таких растений, которых у нас нет. Но в тоже время из Украины, России, Германии, Франции импортируем сотни наименований лекарств из растений, которые не только можно культивировать у нас, но и в большом количестве собирать в природе. Из Казахстана вывозим многие тонны сырья, но не экспортируем ни одного готового растительного лекарства [16].

Интерес научного сообщества в последнее время к фитотерапии вызван также преобразованием возрастной структуры населения, что подразумевает увеличение числа лиц пожилого и старческого возраста, страдающими теми или иными заболеваниями, при которых требуется длительная терапия лекарственными средствами и риск развития побочных действий при этом должен быть минимализирован. Следует отметить особую роль фитотерапии в педиатрической практике, ввиду их мягкого терапевтического действия и редких случаев нежелательных осложнений [17].

Весьма значимым моментам важно отметить простоту и относительную дешевизну технологии получения лекарственных препаратов из растений, а также доступность лекарственного растительного сырья на территории нашей страны.

Флора Казахстана отличается большим разнообразием и насчитывает около 6000 видов растений, обладает значительными запасами высокоактивных биологических веществ. Благоприятные климатические условия создают

способствуют образованию и накоплению их в достаточном количестве [18, 19, 20].

Таким образом, препараты растительного происхождения, являясь физиологически совместимыми для организма, более предпочтительны, а при лечении некоторых заболеваний они являются наиболее эффективными и на сегодняшний день остаются незаменимыми.

1.2 Современное состояние научных исследований морфолого-анатомического строения, химического состава и биологической активности растений рода *Verbascum*

Семейство Scrophulariaceae - одно из основных семейств растений, содержащее около 360 родов и около 2500 видов. Они произрастают в основном в умеренных и субтропических регионах, и многие из них цветут необычайной красоты цветками будь то садовое растение или придорожный «сорняк». Семейство содержит такие роды, как *Mimulus*, *Penstemon*, *Digitalis*, *Veronica* и *Verbascum* [21]. Некоторые виды Scrophulariaceae ценятся за их лечебные свойства и широко используются как в народной, так и в официальной медицине. Согласно данным Нейвуд V.H. род *Verbascum* включает в себя около 360 видов, преимущественно распространенных в Азии, Европе и Северной Америке. Западная и Центральная Азия (особенно Анатолия) являются основными центрами разнообразия рода [22, 23].

Распределение видов по регионам также подробно описаны: 51 вид в России, 49 в Флора Ираника и 20 в Флора Палестина, в то время как Флора Европа включает 95 видов *Verbascum* [24, 25, 26].

Болгария находится в зоне видообразования Рода, что привело к значительному числу эндемичных видов, среди распределенных в стране 46 видов - половина являются эндемичными [27]. Род *Verbascum* несет очень сложную таксономию. По нашим сведениям, в настоящее время все еще не существует адекватной таксономической схемы, отражающей отношения между таксонами. Хубер-Морат разделил род на 13 неофициальных групп (от М), в то время как Фергюсон в Флора Европа (1972) поделил на две неформальные группы А и В [28, 29, 30].

Считается, что родовое название этого растения *Verbascum* заимствовано от *barbascum* с латинского 'barba' (Борода), ссылаясь на лохматую внешность растения. Слово "mullein" происходит от английского *moleyne* и Старофранцузского *moleine*, и первоначально от латинского *mollis*, что означает «мягкий», ссылаясь на листья [31].

Растения рода Коровяк – двухлетние растения, с глубоким стержневым корнем. Листья у основания от продолговато-обратнояцевидных до обратнояцевидных-ланцетных и длиной 10-40 см, включая черешок. Стеблевые листья эллиптические-ланцетные, избегающие, постепенно снижаются до стебля и плотно покрыты шерстистыми ветвистыми волосками [32]. Система листов расположена таким образом, что маленькие листья находятся выше, чтобы капли дождя стекали на более крупные из них, находящихся ниже,

которые направляют воду к корням. Это необходимо, так как коровяк растет в основном на сухих почвах. Звездчатые разветвленные волоски, которые покрывают листья так густо, действуют в качестве защитного слоя, тем самым уменьшая потерю влаги, а также обеспечивая защиту. Они предотвращают атаку ползучих насекомых и создают сильное раздражение в слизистой оболочке любых пастбищных животных, которые могут попытаться посмотреть на них. Волоски не ограничиваются только листьями, но также покрывают все части стебля, чашечки и внешнюю сторону венчиков, так что все растение выглядит беловатым или серым [33, 34]. Согласно данным Muzik эти эпидермальные волосы держат подальше капли с поверхности листьев таким образом, чтобы они могли защитить листья от водного раствора 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Некрасивый, но ценный 'коровяк чай', средство величайшей древности при кашле и простуде, всегда необходимо процеживать через тонкое сито, чтобы удалить все волосы, которые могут плавать в горячей воде, выливающейся на цветы или листья. Они могут привести к невыносимому зуду в полости рта [35].

Коровяк распространен в Европе и Азии. Вероятно, он был завезен в Северную Америку несколько раз в качестве лекарственной травы. Он был введен в середине 1700-х годов в Вирджинию как рыбий яд и быстро распространился [36]. В Турции коровяк широко распространен в Черноморских регионах (Кастамону, Орду, Трабзон, Риза, Чорух) и обычно встречается в прибрежных полосах, лесах, среди орешников и дубов, кустарников и вулканических туфов. Коровяк произрастает в диком виде на каменистых почвах пустырей, лесопарковых полянах и обочинах. Это происходит в мелкой, хорошо дренированной, богатой азотом почве. Он произрастает в районах, где среднее годовое количество осадков составляет 50-150 см и вегетационный период составляет не менее 140 дней [37].

Древние люди использовали эти растения для лечения респираторных заболеваний. Врачи использовали его для лечения кашля, и европейские переселенцы привезли эти растения в Америку, так как оно было полезным для лечения кашля, простуды, боли в горле и воспаления миндалин, а также диареи, геморроя и инфекции мочевыводящих путей [38].

Исторически сложилось так, что коровяк использовался в качестве лекарственного средства для дыхательных путей, особенно в случаях раздражающих кашлей с бронхиальным затором [39]. Листья и цветы коровяка обладают отхаркивающими и успокоительными свойствами, травники применяли их для лечения респираторных заболеваний, таких как бронхит, сухой кашель, коклюш, туберкулез, астма и охриплость [40]. Цветки обладают невысокой мочегонной активностью, а также известны успокаивающим и противовоспалительным действием на мочевыводящие каналы. Листья также мочегонные, они способствуют уменьшению воспаления мочевой системы и противостоят раздражающему действию кислоты в моче. Некоторые источники о травах расширяют терапевтическое применение до пневмонии и астмы. Жаропонижающий отвар корней используют для облегчения зубной боли, а также для облегчения судорог, конвульсий и мигрени. Сок растения и порошок

из высушенных корней быстро удаляет грубые бородавки, если потереть их [41,42].

Листья, корни и цветы также обладают болеутоляющим, антисептическим, спазмолитическим, вяжущим, смягчающим, успокоительным, целительным, обезболивающим, антигистаминным, противораковым, антиоксидантным, противовирусным, бактериостатическим, кардиодепрессантным, фунгицидным, снотворным и седативным действиями [43].

Успокоительное и смягчающее свойства присущи растению благодаря слизи и смолы полисахаридов, которые успокаивают раздражение ткани. Отхаркивающее свойство является результатом работы сапонинов, которые стимулируют выработку жидкости. Противовоспалительные свойства обусловлены иридоидными гликозидами и флавоноидами, которые уменьшают воспаление. Коровяк сочетает в себе отхаркивающее действие его сапонинов и успокаивающее действие его слизей, что делает его наиболее полезной травой для лечения охриплости, кашля, бронхита, астмы и коклюши. Источники гласят, что цветы, помещенные в бутылку и продержанные в лучах солнечного света, вырабатывая жирное вещество, являются ценным лекарством от геморроя.

Доподлинно известно, что Коровяк эффективен при поносе, благодаря сочетанию его смягчительного и вяжущего свойств, эта комбинация в то же время укрепляет кишечник [44].

Масло, получаемое настаиванием цветков коровяка в оливковом масле, после хранения в закупоренной бутылке при длительном воздействии солнечных лучей, или удерживании его возле костра в течение нескольких дней, использовали в качестве местного аппликатора в сельских округах Германии от отеков и других воспалений слизистой оболочки, а также от обморожения и ушибов.

Масло коровяка рекомендуется от боли в ушах и экземы наружного уха и его каналов. Также масло коровяка является истребителем болезнетворных микробов. Известно, что свежие цветы, замоченные на 21 день в оливковом масле, обладают восхитительным бактерицидным действием [45]. Гомеопаты химики получают спиртовую настойку из свежей травы, которая доказала свою эффективность от мигрени или долгой ноющей головной боли [46].

Шведские поселенцы называли его дикий табак и завязывали листья вокруг их ног и рук при лихорадке. Из листьев готовили чай от дизентерии. Отвар корней впрыскивали в рану крупного рогатого скота, страдающего от червей, после чего черви умирали и выпадали. Также индейские племена Mohegans, Penobscots, Catawbas, Chochtaws, Creeks, Forest Potawatomis и Menominees применяли коровяк обыкновенный в качестве лекарственного сырья [47].

Племя Мохеганы курили траву коровяка для облегчения астмы и боли в горле, а Пенобскоты курили высушенные и измельченные листья для лечения астмы. Племена Катоба отваривали корень и подслащали его чтобы получить сироп от хрипа у детей. Листья измельчали и применяли в качестве припарки для лечения боли и отеков, растяжения связок, ушибов и ран. Чокто прикладывали листья на голову в качестве аппликатора от головной боли. Крики и Баттон

Уиллоу использовали отвар корней от кашля. Они купались в отваре листьев от жара. Форест Потаватомис курили сухие листья для лечения астмы, но не известно, переняли ли они эту практику у племени белых или наоборот. Чтобы оживить человека без сознания они разжигали костер из листьев. Племя меномини курили корни от легочных заболеваний. Белые курили листья для лечения астмы и бронхита, а цветы считали мочегонным средством [48].

Греки и Римляне использовали высушенные цветущие стебли, смоченные в сале, как свечку для света. Разжигая костер из коровьяка, отгоняли ведьм. Существуют доказательства того, что в свое время коровяк был «волшебным растением» древних людей.

Марк Випсаний Агриппа, полководец и сподвижник императора Октавиана Августа, утверждал, что духи из листьев коровьяка обладают подавляющим эффектом на демонов. Коровяк был ингредиентом любовных зелий и отмечался в заклинаниях ведьм в средние века. Женщины Рима смешивали раствор цветков с щелочью и использовали его при мытье волос, чтобы добиться их золотисто-желтого цвета.

Подробно описано различное применение листьев, цветов и корней растений рода *Verbascum* в традиционной турецкой медицине для лечения респираторных заболеваний, экземы, ревматизма, различных ран и анальной свищи [49,50]. Кроме того, коровяк используется в Европейской народной медицине в качестве антисептических, вяжущих и отхаркивающих средств, и часто применяется при лечении воспалений, мигрени, астмы и спазматического кашля [51]. Несмотря на то что коровяк используется в качестве лечебного средства с древних времен, его популярность в продаже возросла только в последние несколько лет. В настоящее время высушенные листья и цветы, капсулы, спиртовые экстракты и масла цветков Коровьяка обыкновенного *L.* можно найти в аптеках США [52]. В соответствии с докладом Европейского агентства по лекарственным препаратам, написанном в 2008 году на цветки *V.thapsus*, *V. densiflorum* и *V. Phlomoïdes*, применяемых в традиционной медицине, известно наличие на европейском рынке цветков *Verbascum* в сочетании с другими препаратами или в качестве монопрепарата - трава для приготовления чая, жидкие экстракты на основе этанола или сиропа [53].

Широкое использование видов *Verbascum* в традиционной медицине и интерес с таксономической точки зрения привели к углубленному исследованию рода в фитохимическом и фармакологическом направлении.

Химический состав растений рода коровяк.

В результате совместных усилий нескольких исследовательских групп в мире было идентифицировано более 200 соединений, которые могут быть классифицированы на несколько основных групп: иридоиды, фенилэтаноиды, флавоноиды и неолингнанные гликозиды наряду с сапонинами и алкалоидами спермина.

Иридоиды. Иридоиды широко распространенные вторичные метаболиты в семействе *Scrophulariaceae* и, в настоящее время самая большая по величине группа соединений, найденных в видах *Verbascum*. Более 70 иридоидных

гликозидов и несколько негликозидных соединений были выделены из цветов, листьев, корней и всего растения *Verbascum*.

Основная группа этих соединений и самые многочисленные представители, найденные в видах коровяка – это иридоиды типа С9: каталпол, аукубин и их ацилированные производные с разными положениями эфирной группы (Рис.1).

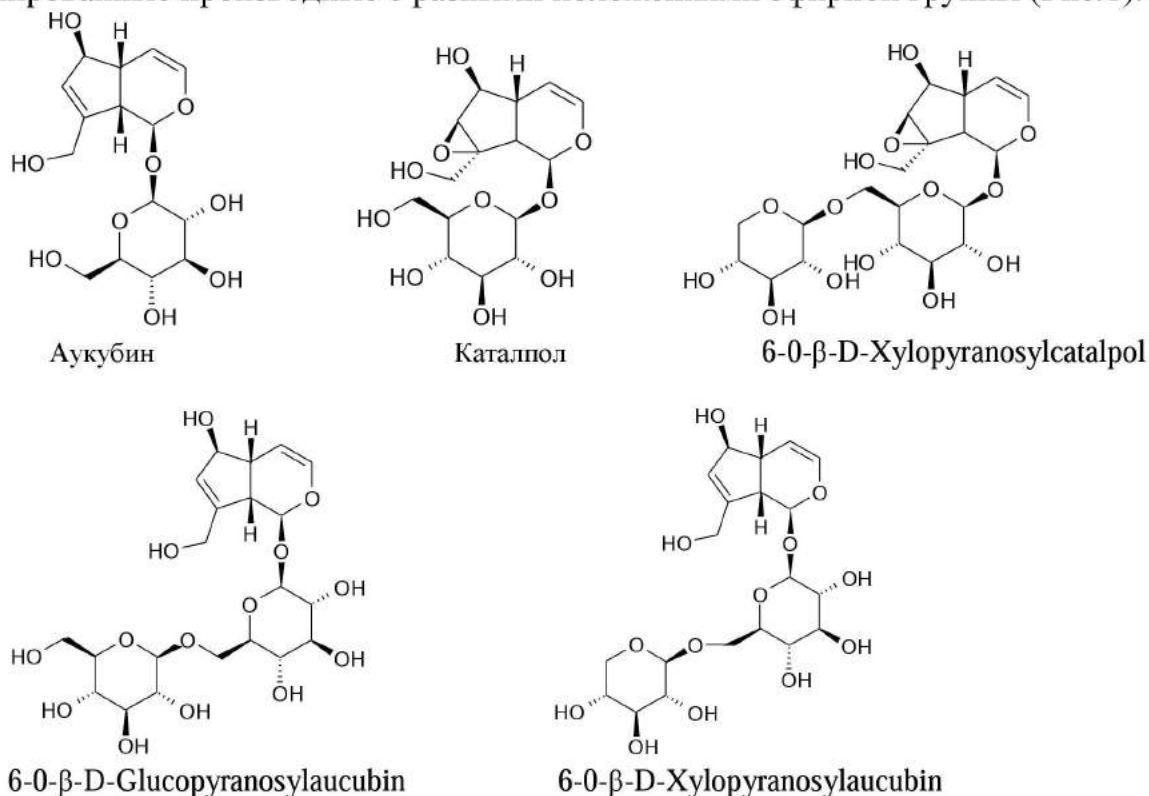


Рисунок 1 – Структурные формулы иридоидов типа С9, выделенных из растений рода *Verbascum*

Ажугол, гарпагид и их производные были также идентифицированы во многих исследованных растительных источниках (Рис.2). Гарпагозид, среди прочих, является ценной молекулой и основным компонентом фармацевтических препаратов когтя дьявола (*Harpagophytum procumbens*). Гарпагозид используется для стандартизации продуктов из когтей дьявола и в соответствии с Европейской фармакопеей эти продукты должны содержать по меньшей мере 1,2% гарпагозида [54].

Таким образом, растения рода *Verbascum*, накапливая гарпагозид, могут служить в качестве альтернативного источника этой фармацевтически важной молекулы. Только пять иридоидов типа С10: генипосидици кислоты, lychnitoside, генипин, Гардиол и β-гардиол были выделены из разных видов коровяка. Из *Verbascum wiedemannianum* были выделены rehmaglutin D и glutinoside, обладающие насыщенными D3,4 иридоидными агликонами с атомом хлора и необычной эпоксидной функцией [55].

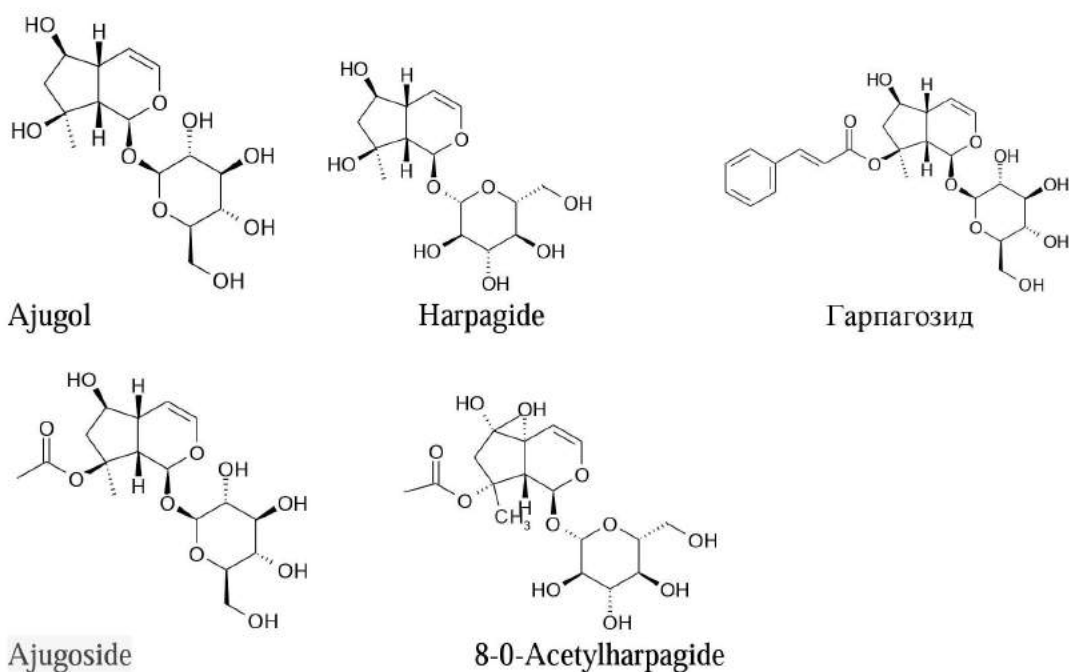


Рисунок 2 – Структурные формулы иридоидов, выделенных из растений рода *Verbascum*

Род Коровяк широко изучен относительно их иридоидных компонентов, хотя состав иридоидов некоторых видов *Verbascum* был изучен только с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) [56]. Несколько исследований было сосредоточено на *V. phlomoides*, *V. Thapsiforme* и *V. Thapsus*, источники препарата *Verbasci Flos* в соответствии с Европейской фармакопеей [57]. Среди всего, коровяк обыкновенный, наиболее изученный член рода – описано как разные части таксона различного происхождения экстрагируют с помощью различных растворителей. Например, Warashina и др. (1991) сообщили о выделении 23 иридоидов, в основном типа каталпол из водного экстракта целого растения, в то время как Pardo и др. (1998), уделяя особое внимание спиртовому экстракту корней коровяка, удалось выделить четыре иридоидных гликозида, в том числе аукубин [58,59]. Кроме того, было установлено, что источником некоторых незначительных составляющих, а также ранее описанных иридоидов является метанольный экстракт всего растения, собранного в Пакистане [60]. Несколько редких негликозидных иридоидов были выделены из 70% водно-ацетонного экстракта надземной части коровяка; образцы были собраны в Юго-Западном Китае [61]. Тем не менее, следует отметить, что наличие каталпола, аукубина, ажугола, гарпагида и их производных в *V. phlomoides* и *V. thapsiforme* было доказано, главным образом, по данным анализа ТСХ, в то время как гликозиды типа каталпол и аукубин в экстрактах были количественно определены спектрометрически (на 605 нм путем цветного образования с реагентом Эрлиха), используя в качестве стандарта аукубозид [62]. Также известно выделение *specioside*, *phlomoidoside*, *catalpol*, *saccatoside*, *aucubin* и *6-O-hylosylaucubin* из *V. phlomoides* [63]. Те же авторы выделили каталпол,

вербаскозид А, аукубин, гарпагид и ацетилгарпагид из *V. densiflorum*, синоним *V. Thapsiforme* в соответствии с Флора Европы. Научный интерес по распределению иридоидов внутри видов Scrophulariaceae привело к массовым исследованиям нескольких видов коровяка, кроме признанных источников *Verbasci Flos*. Например, сообщалось о наличии 12 иридоидных гликозидов в *V. Nigrum* и 11 иридоидов в надземной части *V. sinuatum* [64, 65]. Кроме того, 15 иридоидов было выделено из корней и цветов *V. lasianthum* [66, 67, 68] в то время как систематическое исследование *V. undulatum* привело к выделению девяти иридоидных гликозидов, главным образом, аукубинного типа [69,70].

Фенольные соединения. На данный момент в научной литературе опубликованы работы, сообщающие о присутствии трех основных групп фенольных соединений, включая фенилэтаноиды, флавоноиды и нео-лингнаны в растениях рода *Verbascum*. Более 20 фенилэтаноидных (С6-С2) и два фенилпропаноидных (С6-С3) гликозида было выделено из различных видов коровяка до сегодняшнего дня, и большинство из них являются тригликозиды, содержащие апиозу, арабинозу, глюкозу, рамнозу и ксилозу в качестве третьей гликозидной части в молекулах, прикрепленные к С-6 сердечника глюкозы (рисунок 3). Согласно опубликованным данным вербаскозид (актеозид) широко распространенный компонент в группе, он был выделен почти из всех изученных видов *Verbascum*, а затем *poliumoside* и *forsythoside* В. С недавних времен известно, что вербаскозид обладает инсектицидной активностью против чернотелки дрозофилы и совки *Spodoptera frugiperda* [71].

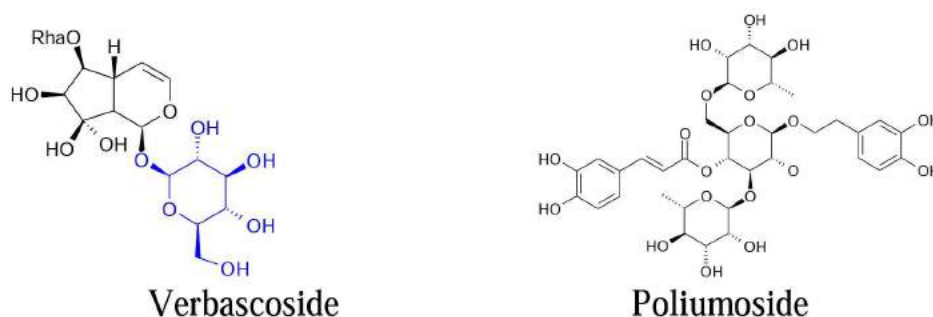


Рисунок 3 - Структурные формулы вербаскозида и полиумозида

Очевидно, *Verbascum Thapsus* и *Verbascum wiedemannianum* являются наиболее всесторонне исследованными видами в отношении содержания фенолов. Наличие фенилпропаноидных гликозидов кониферина и сирингина в *V. letourneuxii* стало известно только в последнее время [72].

Род *Verbascum* также представляет собой богатый источник различных флавоноидов, были определены несколько флаванонов, флавонов и флавонолов и их О-гликозиды. К тому же, четыре изофлавоноида в *V. sinaiticum*, два С-гликозида в *V. cheirantifolium* и бисфлавоноид, именуемый аментофлавоном в *V. Thapsus* были обнаружены (рисунок 4).

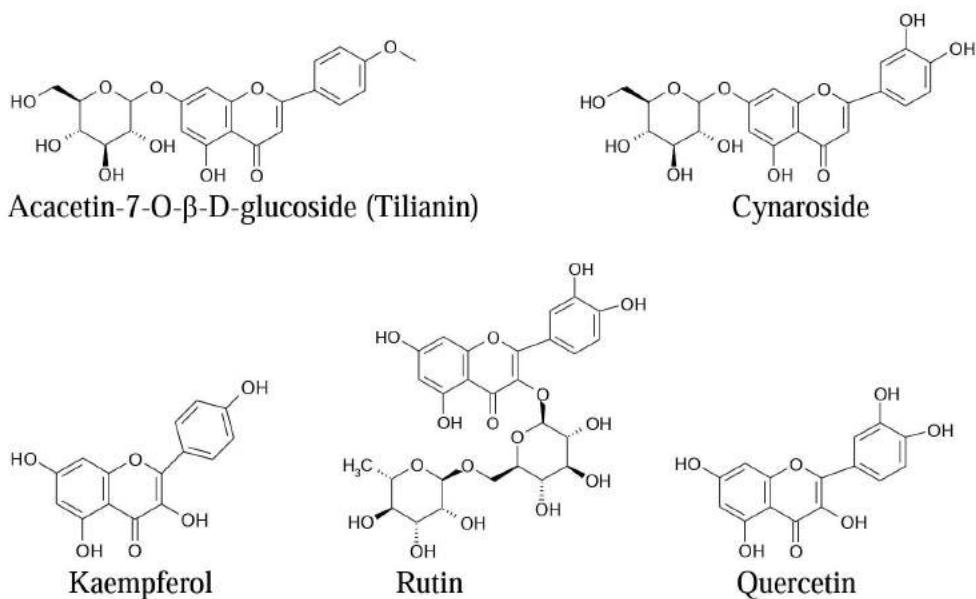


Рисунок 4 – Флавоноиды, выделенные из растений рода *Verbascum*

Апигенин, лютеолин и их 7-О-гликозиды и являются общими флавонами рода (рисунок 5). Сообщалось наличие нескольких неолигнанных гликозидов со скелетом дегидрокониферулового спирта только в *V. Thapsus*, *V. salviifolium* и *V. letourneuxii* [73,74].

Для извлечения фенольных соединений из сырья растений рода *Verbascum* использовались разные методы. Выделение флавоноидов чаще проводилось с применением экстракции низкомолекулярными спиртами различной концентрации, таких как метанол, этанол, в то время как фенолкарбоновые и органические кислоты извлекались

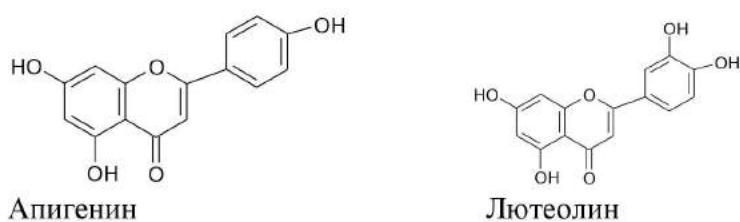
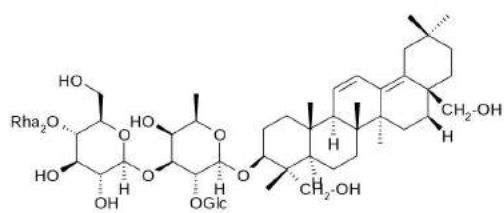
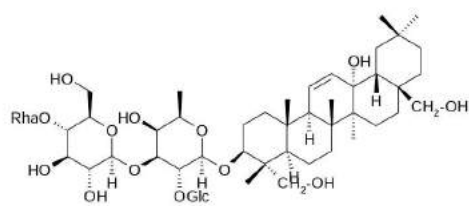


Рисунок 5 – Структурные формулы апигенина и лютеолина

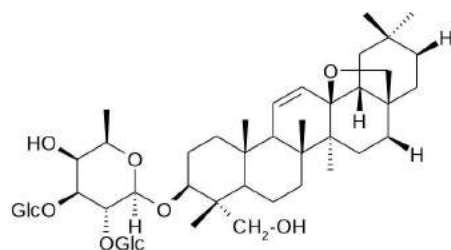
Сапонины. Имеются сведения о присутствии в коровьяках тритерпеновых сапонинов в основном типа олеанана (рисунок 6). Согласно данным надземные части турецкого эндемичного *V. wiedemannianum* являются единственным источником сапонинов урсанного типа розамутин и nigaichigoside F1 [75]. Пwensisaponin и ilwesisaponin С являются наиболее часто обнаруживаемыми соединениями этой группы. Надземные части *V. Songaricum*, *V. sinaiticum* и *V. Thapsifrome* оказались наиболее распространенным источником сапонинов [76-79].



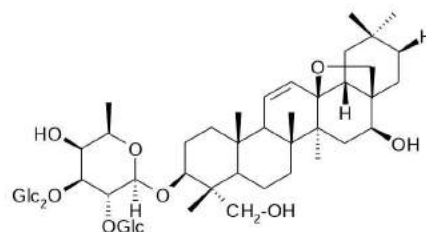
Songarosaponin A



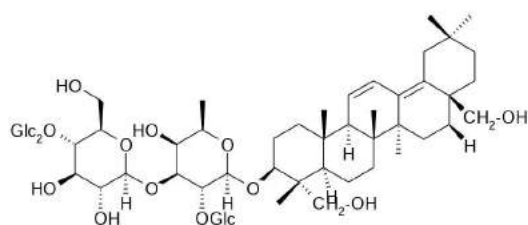
Songarosaponin B



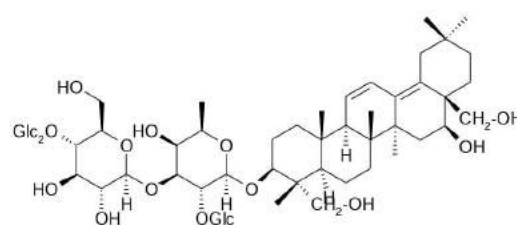
Songarosaponin C



Songarosaponin D



Songarosaponin E



Songarosaponin F

Рисунок 6 – Сапонины рода Коровяк

Алкалоиды. Распределение алкалоидов в видах коровяка ограничивается несколькими видами. О наличии алкалоидов в *V. Nobile* и *V. songoricum* сообщалось впервые в начале 70-ых [80, 81]. Хотя гипотензивное и спазмолитическое действие суммы алкалоидов, содержащихся в экстракте *V. pseudonobile* *Stoj et Stef* было установлено в 1960-х годах, выделение и структурный анализ алкалоидов этих видов были опубликованы значительно позже, а затем выделение, разделение EZ изомеров и синтез макроциклических алкалоидов спермина из *V. Pseudonobile* и *V. phoeniceum* [82-85].

Метаболомика растений рода коровяка.

Несмотря на все приложения знания о метаболитах, накопленных в тех или иных видах *Verbascum*, можно рассматривать как еще ограниченные и основанные, в основном, на определении основных компонентов. Кроме того, чтобы исследовать разнообразие рода, для того чтобы отличить виды и установить различия в профилях метаболитов и химические отпечатки пальцев, применение новых всеобъемлющих аналитических платформ (например, метаболомика) может быть очень полезно. Метаболомика является целостным подходом, определяется как систематическая идентификация и количественное определение всех метаболитов в организме [86], в данных условиях. За последние 15 лет было разработано несколько платформ и методов анализа

целевых молекул с высокой пропускной способностью (в основном масс-спектрометрии и спектроскопия ядерного магнитного резонанса). Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) уже зарекомендовал себя как вполне подходящий и адекватный способ выполнения метаболомики, так как он обеспечивает одновременное обнаружение богатых первичных метаболитов наряду с различными группами вторичных метаболитов [87]. Более того, ^1H ЯМР-спектроскопия имеет большое преимущество над другими аналитическими платформами (например, масс-спектрометрия), а интенсивность сигнала зависит только от молярной концентрации в растворе, что позволяет прямое сравнение концентраций всех соединений, которые присутствуют в конкретном образце [88]. Подход метаболомики на основе ЯМР был применен для изучения метаболических дифференциаций пяти видов *Verbascum* [89]. ^1H ЯМР отпечатки пальцев в сочетании с многомерным анализом данных (например, анализ главных компонентов, СПС) позволяет классифицировать виды *Verbascum* на две группы: группа А (*V. Phlomoides* сорта и *V. densiflorum*) и группа В (*V. xanthophoeniceum*, *V. nigrum* и *V. phoeniceum*). Кроме того, было обнаружено, что растения в группе В синтезируют большие количества биологически активные иридоидные гликозиды (например, фармацевтически важный гарпагозид (0,5% в пересчете на сухое вещество) 70) и фенилэтаноидные гликозиды (в общей сложности около 6% в пересчете на сухое вещество) - вербаскозид, форцитозид В и leucosceptoside В. ^1H ЯМР данные метаболомики и иерархический анализ кластеризации показал, что виды *V. Xanthophoeniceum* и *V. Nigrum* имеют аналогичную метаболому листа, который довольно сильно отличается от других видов коровяка, признанных Европейской Фармакопеей. Было отмечено, что ЯМР спектроскопия может быть использована для быстрого количественного из фармацевтически важного гарпагозида в растительных образцах, например, для контроля качества лекарственных средств или биологически активных добавок [90].

Фармакологические исследования растений рода *Verbascum*

Согласно данным научной литературы, растений рода *Verbascum* обладают различными биологическими активностями. Эта глава состоит из описаний фармакологических свойств видов коровяка, найденных из обзора литературы в базах данных PubMed и Scopus.

Противовоспалительная активность. Противовоспалительный эффект различных видов коровяка – традиционно используемых против воспалительных заболеваний, астмы, кашля, диареи и проблем легких достаточно изучена [91, 92]. Ранние исследования *V. thapsiforme* показали, что водный экстракт растения обладает сильным противовоспалительным действием, путем ингибирования стадии элонгации биосинтеза белка в печени крыс, и было установлено, что сапонинная фракция несет ответственность за противовоспалительный эффект [93]. Метанольный экстракт из цветов *V. lasianthum*, подвергавшийся каррагинан-индуцированному отеку задней лапы и р-бензохинон-индуцированной модели корчей у мышей, продемонстрировал значительный противовоспалительный и антиноцицептивный эффект. Биопроб

наведением фракционирование экстракта привело к выделению восьми индивидуальных соединений, из которых аукубин и илвенсисапонин показали противовоспалительное и антиноцицептивное свойства. Экстракт цветов *V. pterocalycinum* var. *mutense*, изученный той же исследовательской группой на моделях каррагенинового и PGE 1-индуцированного отека лапы, а также 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТРА) - индуцированных моделях отека уха, показал активность только в отношении каррагинан и PGE1-индуцированной модели отека лапы, что привело к выводу, что экстракт может действовать посредством ингибирования активности циклооксигеназы (ЦОГ). Было доказано, что Илвенсисапонин А и Илвенсисапонин являются основными активными компонентами этого вида исследуемого растения [94]. Надземные части *V. Salviifolium* были подвергнуты аналогичным исследованиям той же исследовательской группой, и было выяснено, что гидроксиактеозид, апигенин-7-О-глюкозид, лютеолин 7-О-глюкозид, лютеолин и 30-О-Глюкозид являются активными составляющими в каррагинан и PGE1-индуцированной моделях отека лапы у мышей [95]. В другом исследовании с применением тех же экспериментальных моделей авторы отметили значительное противовоспалительное действие цветочного экстракта *V. mucronatum* [96]. Метанольный экстракт, иридоид- и фенилэтаноид содержащие фракции, и выделенные индивидуальные соединения *V. Xanthophoeniceum* (собранного в Болгарии) были изучены на их противовоспалительный эффект методами *in vitro* на оксиде азота и продукции цитокинов перитонеальных макрофагов, сопровождающихся COX-1 и COX-2 экспрессиями и методом *in vivo* с использованием коэффициента кобры (CVF) -индуцированного отека у мышей [97]. Экстракт уменьшал отек лапы в дозах 40 и 200 мг / кг, в то время как форцитозид показал наиболее значительное ингибирование в альтернативном методе (CVF) -индуцированной модели отека. Среди экстрактов листьев и волосатых корней, полученных из нескольких видов *Verbascum* (*V. nigrum*, *V. densiflorum*, *V. phoeniceum* и *V. phlomoides*), выращенных в условиях зеленой сыворотки, Димитрова и др. сообщили, что примечательно противовоспалительную особенность *V. phoeniceum* в естественных условиях каррагинан-индуцированного отека модели путем ингибирования ЦОГ-1 и ЦОГ-2 ферментов. Чистый гарпагозид улучшил развитие зимозан-индуцированного артрита и снизил патологические изменения в суставах, как показано с уменьшением гистологического счета для клеточной инфильтрации в синовиальной полости, потеря хряща и резорбции костей. Кроме того, молекулярный докинг моделирования гарпагозида предположил, что он может функционировать с повышенным удельным сродством к ЦОГ-1, чем ЦОГ-2 [98].

В другом исследовании сырой метанольный экстракт, его фракции, а также несколько отдельных компонентов - иридоидного и фенилэтаноидного происхождения *V. xanthophoeniceum* были подвергнуты первичным культурам нормальных человеческих кератиноцитов вместе с тщательным исследованием их влияния на провоспалительных хемокинов (IL-8, MCP-1 и IP-10) и экспрессия генов для возможного противовоспалительного эффекта. Было определено, что

среди испытанных образцов, вербаскозид и форцитозид В являются эффективными ингибиторами экспрессии ген в зависимости от дозы и *de novo* синтез выше упомянутых хемокинов. Таким образом, фенолэфрангликозиды *V. xanthophoeniceum* могут рассматриваться как потенциальные активные компоненты для местных композиций, направленных на регулирование хронических воспалительных расстройств кожи, таких как псориаз и атопический дерматит (Характеризуются сверхэкспрессии IL-8, MCP-1, и IP-10 [99]).

Противовоспалительную активность водного экстракта цветков *V. phlomoides* недавно методами In Vitro и In Vivo. Результаты этого исследования показывают, что экстракт значительно ингибирует TNF-индуцированную ICAM-1 экспрессию уф 55-59% на эндотелиальные клетки пупочной вены человека в концентрации 100 и 200 LG / мл, однако, он не показал никакого действие в модели отека лапы крысы, индуцированной яичным белком. Авторы пришли к выводу, что In Vitro противовоспалительная активность экстракта может быть связана с его иридоидным и фенолэфрангликозидным содержанием, а не полифенольных компонентов[100].

С другой стороны, Сперанса и др. (2009) исследовали противовоспалительное действие вербаскозид (основной фенолэфрангликозид) - содержащего экстракта *V. mallophorum* и сообщили, что вербаскозид как таковой, оказывает значительное противовоспалительное действие, вызывая существенное уменьшение в экспрессии и активности COX-2 и внеклеточного O_2 . Сильное противовоспалительное действие вербаскозида также сообщалось в раннем исследовании по ингибированию каррагинан-индуцированного отека и гистамин и брадикинин индуцированных сокращений в подвздошной кишке морской свинки [101].

Ранозаживляющая активность. Сунтар и др. (2010) провели скрининг метанольных экстрактов тринадцати видов *Verbascum* (*V. chionophyllum*, *V. cilicicum*, *V. dudleyanum*, *V. lasianthum*, *V. latisepalum*, *V. mucronatum*, *V. olympicum*, *V. pterocalycinum* var. *mutense*, *V. pycnostachyum*, *V. salviifolium*, *V. splendidum*, *V. stachydifolium*, и *V. uschackense*), выращенных в Турции, для определения их ранозаживляющего действия методом in vivo путем заживления линейных и круговых надрезов экспериментальной моделей, сопровождающихся гистопатологическими анализами. Среди них *V. olympicum*, *V. stachydifolium* и *V. uschackense* показали перспективную ранозаживляющую активность [102]. В другом исследовании Коркина и др. (2007) сообщили, что вербаскозид (56%) -содержащий экстракт оказал замечательное ранозаживляющее действие по всей толщине выреза модели раны, которое было связано с его ингибирующей способностью выделять активные формы кислорода (АФК) из цельной крови гранулоциты и моноциты, а также его металлохелатирующей способностью (с ионами Fe^{2+}) [103]. В некоторых более поздних исследованиях (Mehdinezhad и др. 2011, 2012) было установлено, что экстракт цветков *V. Thapsus* оказывают заметное заживляющее действие на

экспериментальные синхронные модели ран оксида цинка посредством местного применения экстракта [104, 105].

Противовирусная и антимикробная активность. Растения рода *Verbascum* широко изучены на их антимикробную активность. Среди них, несколько видов продемонстрировали замечательную противовирусную активность. Лиофилизированный настой цветков *V. thapsus* оказал значительное ингибирующее действие против вируса *Herpes simplex* (тип 1), методом теста снижения текучести [106]. С другой стороны, комбинация адамантанамина глюкуроида и лиофилизированный настой цветков *V. thapsiforme* показала заметный эффект против вируса гриппа в курином эмбрионе фибробластов клеточных культур [107]. Также было установлено, что метанольный экстракт *V. thapsus* из Непала обладает действием против гриппа [108].

В скрининге исследований видов коровьяка из Аргентины (Zanon др., 1999), *V. thapsus* показал сильный ингибирующий эффект против штамма вируса *Pseudorabies RC / 79 (Herpes suis)* в Vero клетках и в последующем исследовании этого же вида было установлено, что он ингибирует 50% образования бляшек, вызванных вирусом *Pseudorabies* при концентрации 35 LG / мл, в то время как инкубация вируса с растительным экстрактом привело к 99% ингибирования на этапе адсорбции [109, 110]. Кроме того, некоторые ранние исследования показали, антибактериальные свойства некоторых видов коровьяка. Например, было установлено, что вербалактон - производное макроциклического димера лактона – выделенный из *V. undulatum* показал заметное антибактериальное действие [111]. Ученые из Турции установили сильное антибактериальное действие водных экстрактов различных видов Коровьяка против *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, и *Escherichia coli* [112]. В то время как полярные экстракты *V. sinuatum*, *V. gypsicola*, *V. georgicum*, *V. antiochium* (Озджан и другие 2010), *V. pinetorum* (Озджан др. 2011) показали значительную активность по отношению к ряду грамположительных и грамотрицательных бактерий [113-118]. Несколько видов коровьяка были протестированы в отношении *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, а также грибковых штаммов *Candida albicans*, *C. parapsilosis* и *C. krusei* методами диск диффузии, в результате чего *V. mucronatum* и *V. olympicum* продемонстрировали антибактериальную активность против Грамм (+) Бактерии и *S. aureus* и вместе с *V. latisepalum*, показывая заметное противогрибковую активность против *C. Krusei* [119].

Глистогонная активность. До настоящего времени только несколько исследований сообщали глистогонную активность коровьяка. Метанольный экстракт *V. thapsus* был подвергнут глистогонным анализам, используя взрослые круглые черви (*Ascaridia galli*) и ленточные черви (*Raillietina spiralis*), в которых время паралича и смерть сравнивали с альбендазолом в качестве эталонного препарата. Результаты показали, что метанольный экстракт имеет превосходный эффект против *P. spiralis*, чем препарат сравнения [120]. В исследовании скрининга экстракты *V. lasianthum*, *V. latisepalum*, *V. mucronatum* и *V. salviifolium*

оказали мощное глистогонное влияние против *Aspicularis tetraptera* в дозе 100 мг / кг у мышей [121].

Принимая во внимание все представленные данные, можно сказать что несколько групп биологически активных метаболитов *V. lychnitis*, *V. Nigrum*, *V. Phlomoïdes*, *V. Thapsiforme* и *V. Thapsus* были исчерпывающе изучены. Другие систематически исследованные виды, как *V. salviifolium*, *V. lasianthum*, *V. mucronatum* и *V. Wiedemannianum* можно также рассматривать как достаточно хорошо изученные виды. Но, тем не менее, информация о *V. songaricum* является относительно ограниченной. Таксон был детально изучен относительно содержания сапонинов в надземной части и флавоноидов в корнях и наличие иридоидов было доказано только с помощью ТСХ [122]. Gruhi и др. (2007) при изучении его, сделали вывод, что сапонины этого вида являются эффективными при выпадении волос. Кроме того, Azadshahraki и другие. (2008) при исследовании *Verbascum songaricum* Schrenk обнаружили, что он обладает способностью абсорбировать тяжелые металлы.

Таким образом, обобщая данные всей мировой научной литературы можно сделать вывод, что коровяк джунгарский – это перспективный источник лекарственных средств [123], а полное фитохимическое, морфолого-анатомическое, фармакологическое исследование коровяка джунгарского и разработка аналитических методик и нормативной документации лекарственных средств его является актуальной задачей.

1.3 Подходы к стандартизации фитопрепаратов в свете современных требований к ним

Стандартизация лекарственных средств есть подтверждение идентичности и определение его качества и чистоты. Фитотерапевтические агенты или фитопрепараты - это стандартизированные растительные препараты, состоящие из сложных смесей одного или нескольких растений, которые используются во многих странах для лечения различных заболеваний. Согласно определению ВОЗ, растительные препараты содержат в качестве активных ингредиентов части растения или все растение, или в обработанном виде с определенными наполнителями [124].

Существуют факторы, которые могут повлиять на качество лекарственных средств растительного происхождения:

- Растительные препараты, как правило, смеси нескольких ингредиентов
- Активные вещества, в большинстве случаев неизвестны
- Селективные аналитические методы или контрольные соединения могут быть коммерчески недоступны
- Природа и химический состав растительного сырья варьируются
- Имеют влияние методы сбора, сушки, хранения, транспортировки и обработки сырья (напр., условия экстрагирования и полярность экстрагирующего растворителя, нестабильность компонентов, и т.д.) [125].

Факторы, влияющие на фитохимический состав лекарственных растений:

- Генетические варианты (на генном уровне), что приводит к изменению химического состава.
- Географические и пищевые факторы, состав почвы, микробная нагрузка, климат, температура и т.д.
- Сезонные изменения (количество осадков, засуха, нехватка воды, и т.д.)
- Сезонные колебания (состав алкалоидов в листьях *Adhatoda vasica* ниже в феврале-марте и самый высокий в августе-сентябре).
- Характер общества, включая животных и насекомых.

Необходимость стандартизации:

Современная система медицины основана на звуковых экспериментальных данных, исследованиях токсичности и клинических исследованиях человека.

Но, фармакопейные стандарты на лекарственное растительное сырье и готовую продукцию не доступны.

Правила GMP для производства растительных средств не определены и не регулируются насущные минимальные стандарты лекарственных растительных препаратов.

Отсутствие стандартов качества приводит от легких к серьезным побочным эффектам, начиная от гепатотоксичности до летального исхода. Следовательно, растительные ингредиенты требуют инструментов для определения их идентичности, чистоты и качества, и инструменты должны быть технически достаточными, быстрыми, а также соответствовать требованиям GMP.

Всемирная организация здравоохранения поставила конкретные руководящие принципы для оценки безопасности, эффективности и качества растительных лекарственных средств [126]. Стандартизация ЛРС не является простой задачей, так как многочисленны факторы, влияющие на эффективность и био воспроизводимый терапевтический эффект. Для того, чтобы получить качественные препараты растительного происхождения, необходимо провести правильную идентификацию растений, выбрать наиболее подходящий сезон и место сбора растений, подобрать оптимальные условия экстрагирования и очистки, а также подобрать рациональную комбинацию в случае смесей [127].

Растительные средства являются препаратами выбора в лечении многих патологий в педиатрической и гериатрической практиках, а также профилактической медицине, поэтому увеличение доли фитопрепаратов в номенклатуре фармацевтического производства является закономерной реальией. Актуальной проблемой современного фитохимического производства является выбор критериев стандартизации ЛРС, которые будут с одной стороны, учитывать подходы к контролю качества национальных нормативных документов (фармакопейных статей и нормативов предприятий), а с другой, гармонизированы с требованиями последних редакций мировых фармакопей [128]. Внедрение принципов GMP и GLP на фармацевтических предприятиях также способствует ужесточению требований к контролю качества ЛРС и усовершенствованию подходов к стандартизации. Методики, которые рекомендованы для определения показателей качества ЛРС должны быть валидированы и учитывать современные тенденции фитохимического анализа:

определение числовых показателей при микроскопическом анализе, использование хроматографических методов в идентификации и количественном определении биологически активных веществ (БАВ), введение показателей горечи и набухания (для отдельных растений), а также определение воды в эфиромаслянистом растительном сырье. Первоочередное внимание привлекают растения, которые пользуются исторически сложившейся популярностью у населения и, как следствие, широко используются для производства фитопрепаратов [129]. Усовершенствование подходов к стандартизации таких растений, гармонизация показателей их качества с требованиями мировых стандартов с разработкой критериев, учитывающих национальные особенности фитохимического анализа, является актуальной задачей.

В последние годы возник большой спрос на продукты растительного происхождения в развитых странах. Эти продукты все больше и больше распространяются как лекарственные средства, биологически активные добавки и косметические средства. Стандартизация лекарственного растительного сырья осуществляется аутентификацией: -Период сбора, используемые части растения, идентификация как фитоморфология, микроскопические и гистологические анализы (характеристика клеточных стенок, содержание клеток, наличие зерен, кристаллы оксалата кальция, трихомы, волокна, сосуды и т.д.), Характеристика листа: - форма листа, характер жилкования, край листа, количество и характер устьиц. Другие гистологические признаки - волоски, устьицы, количественная микроскопия, таксономическая идентичность, посторонние примеси, органолептические показатели, значения золы и содержание экстрактивных веществ, определение влажности, хроматографический и спектроскопический анализы, определение тяжелых металлов, содержание пестицидов, радионуклеидов и микробиологическая чистота. Стандартизация травяного препарата может быть осуществлена схематически чтобы сформулировать медикамент, полученный из лекарственного растительного сырья, собранного в различных населенных пунктах и необходимо провести сравнительную характеристику химической эффективности разных партий препарата. Препараты с лучшей клинической эффективностью должны быть выбраны. Далее проводят проверку всех рутинных физических, химических и фармакологических параметров всех партий, чтобы выбрать конечный готовый продукт и провести валидацию всего производственного процесса [130].

Растительные лекарственные препараты должны соответствовать физическим, химическим и микробиологическим параметрам стабильности. Физические параметры включают в себя цвет, запах, внешний вид, четкость, вязкость, содержание влаги, рН, время дезинтеграции, хрупкость, твердость, текучесть, флокуляция, седиментация, скорость осаждения и значения золы. Химические параметры включают в себя химические предельные тесты, химические тесты, химические анализы и т.д. Хроматографический анализ лекарственных растений может осуществляться с помощью ТСХ, ВЭЖХ, ВЭТСХ, ГХ, УФ, ГХ-МС, флуориметрии и т.д. Микробиологические параметры

включают в себя общее число жизнеспособных микроорганизмов, грибов и энтеробактерий. Ограничители могут быть использованы в качестве количественных или полуколичественных инструментов для установления и контроля количества примесей, таких как реагентов, используемых при отклонении растительного препарата, примеси, непосредственно из производственных сосудов и из растворителей и т.д.

Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) подчеркивает важность качественных и количественных методов определения характеристик образцов, количественное определение биомаркеров и / или химических маркеров и отпечаток профайлы. Подлинность, качество и чистота растительных препаратов устанавливаются путем ссылки, приведенной в фармакопее. Фармакопея предписывает (численное значение) как структурные, аналитические, физические стандарты для лекарственных средств. Основные стандарты приведены в фармакопее [131].

Поддержание качества растительных препаратов является сложной задачей и включает в себя строгий набор процессов, которые помогают поддерживать согласованность в указанные пределы. Стандартизация является процессом, который поддерживает консистенцию в заявленной эффективности препарата и его воспроизводимость от серии к серии. Стандартизацию растительных препаратов можно разделить на две категории, во-первых, активный компонент экстракта, где биохимические принципы известны и имеют терапевтические значения, и во-вторых, маркерный экстракт, где активное начало не известно, и характерное соединение используют в качестве маркера для оценки наличия других терапевтических биохимических соединений [132].

Стандартизация имеет ограничения, потому что только выделенные соединения считаются, игнорируя целые компоненты трав, которые могут иметь синергетические или буферные активности по снижению побочных эффектов.

В маркерном экстракте, где активное начало не известно, частично известно или препарат содержит 2 и более количество лекарственного сырья или экстрактов, весь препарат считают активным в присутствии всех компонентов растений. В этом случае, одно выделенное соединение не будет использоваться в качестве маркера, поскольку он не является уникальным для любого одного растения. Ввиду чего, справедливо предположить, что стандартизация растительных препаратов - это не просто аналитическая операция, которая заканчивается с идентификацией и количественным определением активного начала. Скорее, он воплощает общую информацию и элементы управления, которые необходимы для обеспечения последовательности в композиции, используя соответствующие современные аналитические инструменты.

Несколько фармакопей, такие как Китайской фармакопее растений, Великобритании Травяные Фармакопее, Британской травяной Сборник, Японский стандарты для фитотерапии и Аюрведическая Фармакопея Индии. Эти фармакопее предлагают монографии трав и растительных препаратов для поддержания их качества в своих странах. Правительство Индии рекомендует

параметры качества для различных аюрведических препаратов растительного происхождения.

Стандартизация растительных лекарственных форм

В традиционных системах медицины, лекарства - это, прежде всего водный отвар или этанола экстракт. Свежие части растений, сок или порошок, как правило, являются редкостью. Таким образом, лекарственные растительные части должны быть аутентичными и не содержат вредных веществ, такие как пестициды, тяжелые металлы, микробные, радиоактивные загрязнения и т.д. Как описано в древних текстах, лекарственное растение подвергается экстракции одним растворителем один или несколько раз, или водному извлечению. Экстракт должен быть затем проверен на указанную биологическую активность на экспериментальной модели животных. Биологически активный экстракт должен быть стандартизирован на основе активного основного соединения (ями) наряду с фингерпринтом [133]. Следующим важным шагом является стабилизация биоактивного экстракта с минимальным сроком годности более года. Стабилизированные биоактивные экстракты должны пройти нормативные или ограниченные исследования безопасности. Определение вероятного способа действия будут объяснять терапевтический профиль [134].

Безопасный и стабильный травяной экстракт может продаваться, если его терапевтическое использование хорошо задокументировано в традиционных системах медицины, а также рассматривается ВОЗ. Ограниченное клиническое исследование для установления его терапевтического эффекта будет способствовать клиническому применению. Травяные лекарства, разработанные в таком режиме должны отпускаться по рецепту или даже как продукты ОТС в зависимости от заболевания [135, 136].

Подлинность, качество и чистота препаратов растительного происхождения устанавливаются по ссылке приведен в фармакопее [137].

Критический анализ и идентификация лекарственного сырья требуется в производстве растительных препаратов ввиду большого разнообразия и изменчивости их химического состава. Чтобы преодолеть эту проблему в фармакопее заложены определенные стандарты [138].

Руководства ВОЗ по качеству стандартизированных растительных препаратов:

- Контроль качества лекарственного растительного сырья, лекарственных средств и готовых препаратов.
- Изучение стабильности и срока годности.
- Оценка безопасности; документации по вопросам безопасности на основе опытов или токсикологических исследований.
- Оценка эффективности по этно-медицинской информации и исследования биологической активности.

Биоактивный экстракт должен быть стандартизирован на основе активного основного соединения вместе с хроматографическим фингерпринтом (ТСХ, ВЭТСХ, ВЭЖХ и ГХ) [139]. Стандартизация лекарственного растительного сырья включает следующие этапы:

1. Посторонние примеси (в собранной траве не допускается наличие почвы, частей насекомых или экскрементов животных и т.д.). В лекарственное растительное сырье не должно быть видимых признаков загрязнения плесенью или насекомыми, и других загрязнений животными, в том числе экскрементов животных.

Не должны быть обнаружены необычный запах, обесцвечивание, слизь или признаки ухудшения. Очень редко можно встретить продаваемое лекарственное сырье, в котором полностью отсутствуют посторонние примеси. Однако, неядовитые, безопасные или безвредные примеси могут быть допущены. Во время хранения, препараты должны храниться в чистом и гигиенической месте, во избежание различных контаминаций. Особое внимание должно уделяться, тому чтобы избежать образования плесени, так как они могут вызывать афлатоксины.

Для определения наличия посторонних примесей в срезе или целом растении удобно использовать макроскопические исследования. Тем не менее, микроскопия является необходимым условием для порошкообразных материалов. Любая почва, камни, песок, пыль и другие посторонние неорганические вещества необходимо удалять перед тем как срезать или измельчать лекарственное растительное сырье для анализа.

2. Макроскопические и микроскопические исследования: Лекарственное растительное сырье классифицируют по сенсорным, макро- и микроскопическим характеристикам. Проверка с целью установления их характеристик является первым шагом на пути установления идентичности и степени чистоты сырья, и должны быть проведены перед проведением любых дальнейших испытаний. Где это возможно, аутентичные образцы сырья и образцов фармакопейного качества должны быть доступны для использования в качестве ссылки. Визуальный осмотр обеспечивает простой и быстрый способ установления идентичности, чистоту и, возможно, качество. Если образец значительно отличается в оттенках цвета, консистенции, запаха или вкуса от спецификации, он будет рассматриваться как не отвечающий требованиям. Тем не менее, решение должно быть принято в том случае, когда оценка запаха и вкус осуществлялась несколькими персонами или одним человеком в разное время [140].

Макроскопическая идентичность лекарственного растительного сырья основана на форме, размере, цвете, характеристиках поверхности, текстуры, характеристики разрушения и внешнем виде поверхности среза. Однако, поскольку эти характеристики судят субъективно и заменители или наполнители могут напоминать подлинный материал. Часто бывает необходимо обосновать выводы микроскопическими и / или физико-химическими анализами.

Микроскопическое исследование лекарственного растительного сырья является необходимым для идентификации измельченных или порошкообразных материалов; возможно придется подвергнуть образец воздействию химическими реагентами. Только микроскопия не всегда может обеспечить полную идентификацию, хотя, когда используется в сочетании с другими аналитическими методами, она часто может обеспечить бесценные

подтверждающие доказательства. Любая дополнительная полезная информация для подготовки или анализа также должна быть включена в процедуру испытания, предусмотренного для отдельных растений, например, определение вен среза и соотношение палисад [141].

3. Тонкослойная хроматография: Тонкослойная хроматография является особенно ценным методом качественного определения малых количеств примесей. Так как он эффективен и легко выполнить, необходимое оборудование недорогое, техника часто используется для оценки лекарственного растительного сырья и их приготовления. Следующие параметры должны быть определены на основании опубликованных фармакопейных монографий или экспериментально установленных для анализа каждого отдельного растительного сырья с помощью ТСХ:

тип адсорбента и способ активации;
способ приготовления и концентрации испытуемых и контрольных растворов;

- объем растворов для нанесения на пластины;
- подвижная фаза и расстояние миграции;
- условия сушки (включая температуру) и метод обнаружения;
- расчет РФ значения полученных пятен.

4. Определение содержания золы: Зола, оставшаяся после сжигания лекарственного растительного сырья, определяется тремя различными способами: определение общей золы, золы, нерастворимый в кислоте и водорастворимой золы. Метод общей золы предназначен для измерения общего количества сырья, оставшегося после сжигания. Он включает в себя как «физиологическую золу», которая является производной самой растительной ткани, так и «нефизиологическую» золу, которая представляет собой остаток постороннего вещества, который прилип к поверхности растений. Нерастворимая в кислоте зола является остатком, полученным после кипячения общей золы разбавленной соляной кислотой, и поджигают остальную нерастворимую часть. Он определяет количество присутствующего силикагеля, особенно в качестве песка и кремнезема.

Водорастворимая зола - это разница в весе между общей золой и остатком после обработки общей золы с водой.

5. Определение экстрагируемых веществ: Этот метод определяет количество активных компонентов, экстрагированных растворителем из данного количества лекарственного растительного сырья [142].

6. Определение содержания воды и летучих веществ: избыток воды в лекарственном растительном сырье будет стимулировать рост микробов, наличие грибов или насекомых, и ухудшение последующим гидролизом. Поэтому пределы для содержания воды должны быть установлены на каждое растительное сырье. Это особенно важно для тех видов сырья, которые легко поглощают влагу и быстро портятся в присутствии воды.

Азеотропной метод позволяет на прямую исследовать наличие воды в исследуемом сырье. Когда образец перегоняют вместе с несмешивающимся

растворителем, таким как толуол или ксилол, вода, присутствующая в образце поглощается растворителем. Вода и экстрагент перегоняются вместе и разделяются в приемники при охлаждении. Если экстрагент безводный, вода может оставаться поглощенной в нем, что приводит к ложным результатам. Поэтому целесообразно насыщать экстрагент водой перед использованием. Аппарат Дина-Старка в лаборатории обычно состоит из вертикальной цилиндрической частицы стекла (ловушка), часто с объемной градуацией по всей его длине и высокоточный кран на дне очень похож бюретку. Вершина цилиндра совпадает с нижней частью дефлегматора. Выступающий сверху цилиндр имеет боковое горло с уклоном в сторону реакционной колбы. В конце боковой рычаг делает резкий поворот так, чтобы конец бокового рычага был вертикальным. Этот конец соединяется с реактором. Во время реакции пары, содержащие реакционную смесь и компонент, которые должны быть удалены выводятся из реакционной колбы вверх в конденсатор, а затем капают в дистилляционную ловушку. Здесь несмешивающиеся жидкости разделяются на слои. Когда верхний (менее плотный) слой достигает уровня бокового ответвления он вытекает обратно в реактор, в то время как нижний слой остается в ловушке. Ловушка при полной емкости, когда нижний уровень достигнет уровня бокового ответвления за этой точкой, нижний слой начнет течь обратно в реактор соответственно. Поэтому важно перекачать или слить нижний слой из аппарата Дина-Старка столько, сколько нужно. Этот тип имеет трубку в нижней части бокового ответвления, что позволяет органическому растворителю на дне вытечь обратно в реакционный сосуд. Вода, генерирующаяся во время реакции, всплывает на поверхность органической фазы. Азеотропная смесь толуола и воды дистиллируется из реакции, но только толуол возвращается, так как он плавает на поверхности воды, которая собирается в ловушку.

Анализ потери при высушивании определяет, как воду, так и летучие вещества. Сушка может быть проведена либо при нагревании до 100-105° или в эксикаторе над фосфорным ангидридом при атмосферном или пониженном давлении при комнатной температуре в течение определенного периода времени. Использование эксикатора особенно полезно для сырья, которые плавятся до клейкой массы при повышенных температурах.

7. Определение летучих масел: Летучие масла характеризуются их запахом, внешним видом как масло и способностью улетучиваться при комнатной температуре. Химически они обычно состоят из смесей, например, монотерпенов, сесквитерпенов и их кислородными производными. В некоторых летучих маслах преобладают ароматические соединения. Потому что они считаются "сущностью" растительного сырья и часто биологически активными веществами, они также известны как "эфирные масла". Термин "эфирные масла" является предпочтительным, поскольку он характеризует основу и описывает физические свойства. Для определения объема летучих веществ растительное сырье перегоняют с водой и дистиллят собирают в градуированную пробирку. Водная часть автоматически отделяется и возвращается в дистилляционную колбу. Если массовая плотность эфирных масел выше или близко к плотности

воды, или их трудно отделить от водной фазы вследствие образования эмульсии, можно добавить в мерную пробирку экстрагент с низкой массовой плотностью и подходящей температурой кипения. Растворенные летучие вещества будут плавать на поверхности водной фазы.

8. Определение содержания горечи: Лекарственные растительное сырье, которое имеет сильный горький вкус используются терапевтически, главным образом в качестве агентов, вызывающих аппетит. Их горечь стимулирует секреции желудочно-кишечный тракта, особенно желудочного сока. Горькие вещества могут быть определены органолептическим методом. Однако, поскольку они в основном состоят из двух или более компонентов с различными степенями горечи, в первую очередь необходимо определить общую горечь органолептическим методом. Горькие свойства растительного сырья определяются путем сравнения концентраций порогов горечи экстракта сырья с разбавленным раствором хинина гидрохлорида. Значение горечи выражается в единицах, эквивалентных горечи раствора, содержащий 1 г хинина гидрохлорида в 2000 мл. После каждой дегустации необходимо использовать безопасную питьевую воду в качестве средства для удаления растительного сырья и для полоскания рта. Вкусовые рецепторы притупляются быстро, если используется дистиллированная вода. Жесткость воды редко имеет какое-нибудь значительное влияние на горечь.

9. Определение гемолитической активности: Многие лекарственные растения, особенно те, которые принадлежат семействам *Caryophyllaceae*, *Araliaceae*, *Sapindaceae*, *Primulaceae* и *Dioscoreaceae* содержат сапонины. Гемолитическая активность растительного сырья или препаратов, содержащих сапонины, определяется в сравнении с тем из контрольным образом сапонины, который имеет гемолитическую активность 1000 единиц в граммах. Суспензию эритроцитов смешивают с равными объемами последовательного гемолиза и определяют после настаивания смесей в течение определенного периода времени. Аналогичное испытание проводят одновременно с сапонином.

10. Определение танинов: Танины - вещества, способные превращать шкуру животных скрывает в кожу путем связывания белков с образованием нерастворимого в воде вещества, устойчивые к протеолитическим ферментам. Этот процесс, при использовании на живую ткань, известен как "вяжущее" действие и является причиной терапевтического применения танинов. Химически, дубильные вещества представляют собой сложные вещества они обычно встречаются в виде смеси полифенолов, которые трудно отделяются и кристаллизуются. Они легко окисляются и полимеризуются в растворе; если это произойдет, они потеряют значительную часть своей вяжущей активности и поэтому их терапевтическое значение будет меньше.

11. Определение индекса набухания: Индекс набухания - это объем в мл набухания 1 г растительного сырья при определенных условиях. Его определение основано на добавлении воды или набухающего агента, как указано в методике процедуры для каждого отдельного растительного сырья. Используя стеклянный мерный цилиндр с пробкой, сырье встряхивают в течение 1 часа, а

затем выдерживают в течение требуемого периода времени. Объем смеси затем считывается. Смешивание целого растительного сырья с агентом набухания легко достичь, но нарезанное или измельченное сырье требует энергичного встряхивания в указанных интервалах чтобы обеспечить равномерное распределение сырья в набухающем агенте.

12. Определение индекса вспенивания: Многие виды лекарственного растительного сырья, которые содержат сапонины могут образовать пену при взбалтывании водного отвара. Вспенивающаяся способность водного отвара растительного сырья и их экстрактов измеряют в пределах индекса вспенивания.

13. Определение остаточных количеств пестицидов: Пределы остатков пестицидов должны быть установлены в соответствии с рекомендациями Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ПСО) и Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ), которые уже установлены для продуктов питания и корма для животных. Эти рекомендации включают аналитическую методологию для оценки конкретных остатков пестицидов.

14. Определение мышьяка и тяжелых металлов: Контаминация лекарственного растительного сырья мышьяком и тяжелыми металлами может объясняется многими причинами, включая загрязнение окружающей среды и следов пестицидов. Определение мышьяка проводят на аппарате Gutzeit.

15. Определение микроорганизмов: Методы обеззараживания ограничены. Например, использование окиси этилена было запрещено в странах Европейского Союза. Лечение ионизирующим облучением также запрещено или требует специальной процедуры регистрации в некоторых странах. Кроме того, наличие афлатоксинов в растительном сырье может быть опасным для здоровья, даже если поглощаются в очень небольших количествах. Поэтому они должны быть определены после использования подходящей очищающей процедуры, например, жидкостной хроматографии (ЖХ). Афлатоксины экстрагируются из измельченного образца раствором метанола - вода (80 + 20, об / об), и после одной стадии очистки на мини колонке, заполненной в основном оксидом алюминия, они рассчитываются с использованием ЖХ, оснащенной колонкой C18, фотохимического реактора и детектора флуоресценций.

16. Радиоактивное загрязнение: рост микробов в растениях обычно предотвращают путем облучения. Этот процесс может простерилизовать растительное сырье, но опасность радиоактивности должно быть принято во внимание. Радиоактивность образцов растений должна быть проверена соответственно с директивами Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ) в Вене и ВОЗ [143].

Для того чтобы получить качественные растительные продукты необходимо проследить правильность всех процессов: идентификации растений; период и место сбора, экстракция, выделение компонентов и процесс верификации.

Химические и инструментальные методы обычно используются для анализа синтетических препаратов для подтверждения его подлинности. В случае

растительных препаратов, картина несколько отличается, специально для фармацевтических композиций, где никакие химические или аналитические методы не подходят.

Поэтому методы биологического скрининга могут использоваться для рутинной проверки растительных препаратов. В случае препаратов растительного происхождения, качество сырья и готовой продукции может изучаться методами фармакогностической идентификации и фотохимическими анализами. Стандартизация растительных препаратов должна обеспечить разработку препарата с использованием сырья, собранного из различных местностей и сравнительную химическую эффективность различных партий препарата. Выбирается препарат с лучшей клинической эффективностью. Все физические, химические параметры должны проверяться на всех партиях.

Параметры стабильности для растительных лекарственных форм включают физические, химические и микробиологические параметры. Физические параметры включают цвет, внешний вид, запах, прозрачность, вязкость, содержание влаги, pH, время дезинтеграции, хрупкость, твердость, текучесть, флокуляция, седиментация, скорость осаждения и значения золы. Химические параметры включают предельные тесты, экстрактивные вещества, химические методы и т.д. Хроматографические методы исследования ЛРС проводятся с помощью ТСХ, ВЭЖХ, ВЭТСХ и ГХ, УФ, флуориметрии, ГХ-МС и т.д. [144]. Микробиологические параметры включают сумму жизнеспособной бактерий, расчет суммы энтеробактерий и т.д. Пределы приведены в официальных источниках, которые могут использоваться в качестве количественного или полуколичественного метода контроля количества примесей, поступающих от реагентов, используемых для удаления различных трав, примеси, попадающие непосредственно от производственных сосудов, примеси от растворителей и т.д.

Химическое разложение веществ, присутствующих в лекарственной форме также производит токсичные или нечистые соединения при хранении в нежелательных условиях. Загрязняющие вещества также могут поступать непосредственно из атмосферы. Они включают в себя, главным образом, пыль, диоксид серы, H_2S , CO_2 , мышьяк, влагу и т.д.

Таким образом проведение мероприятий по стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов, является важной и актуальной задачей на современном этапе развития фармацевтической науки и требует от специалистов, работающих в этой области систематизации и детального анализа полученных в ходе эксперимента данных для их последующего включения в соответствующие разделы разрабатываемого нормативного документа.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В экспериментальных исследованиях использовались материалы, вспомогательные вещества, методы и методики соответствующие требованиям Государственной Фармакопеи Республики Казахстан, European Pharmacopoeia, The United States Pharmacopoeia, АНД, ГОСТ, ТУ и других нормативных документов.

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Активные вещества

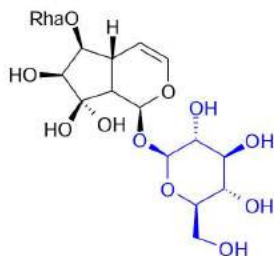
1. В качестве объекта исследования была использована высушенная надземная часть растения коровяк джунгарский (*Verbascum songaricum Schrenk*), которая состоит из цветков, листьев и стеблей, собранного в 2014-2016 годах в разные периоды вегетации в предгорьях Джунгарского Алатау и Тянь-Шаня, на территории Республики Казахстан.

2. Лекарственные субстанции

Цветки коровяка джунгарского. Высушенные полностью распустившиеся цветки дикорастущего травянистого растения коровяка джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*). Венчик бледно-желтого, желтого или коричневого цвета, воронкообразный, около 20 мм в диаметре, с 5 слегка неравными и распространяющимися лепестками. Лепестки венчика густоволосистые на внешней поверхности, голые на внутренней поверхности, с тонкой сетью светло-коричневых жилок. Имеется 5 тычинок, чередующихся от лепестка к лепестку; 2 из них длинные, с гладкими волосками, а другие 3 короткие, с густо опушенными волосками. Запах слабый, своеобразный. Вкус горьковато-слизистый.

Экстракт коровяка джунгарского. Густая твердая масса коричневого цвета с зеленоватым оттенком, с характерным запахом и горьким вкусом.

3. Стандартный образец активного вещества – актеозид (вербаскозид, $C_{29}H_{36}O_{15}$, молекулярная масса - 624.59) – белый порошок с характерным запахом и вкусом.



2.1.2 Вспомогательные вещества

Вода очищенная – *Aqua purificata* H₂O (M_r 18.02) Вода, предназначенная для приготовления лекарственных средств, кроме стерильных и асептических, при отсутствии других указаний (ГФ РК, т.2).

Этанол 96% – *Ethanolum* 96 per centum C₂H₆O (M_r 46.07) Бесцветная, прозрачная, летучая, легко воспламеняющаяся жидкость. Гигроскопична. Смешивается с водой и метиленхлоридом. Горит голубым бездымным пламенем. Температура кипения около 78°C (ГФ РК, т.2).

Метанол CH₄O (M_r 32.04) Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Смешивается с водой и 96 % спиртом. Температура кипения: от 64°C до 65°C.

Гексан C₆H₁₄ (M_r 86.2) Безцветная воспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом (ГФ РК, т.1).

Хлороформ CHCl₃ (M_r 119.4) Трихлорметан. Прозрачная, бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96 % спиртом. Температура кипения: около 60°C (ГФ РК, т.1).

Этилацетат C₄H₈O₂ (M_r 88.1) Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96 % спиртом. Температура кипения: от 76 С до 78 °С (ГФ РК, т.1).

2.2 Методы исследований

Идентификация. А. *Цельное сырье.* Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Определение морфологических групп лекарственных растений». Макроскопический анализ сырья. Небольшое количество лекарственного растительного сырья раскладывают на аналитической доске и рассматривают в разных положениях и, переворачивая, невооруженным глазом и под лупой с разными увеличениями. Размеры сырья определяют с помощью миллиметровой линейки и миллиметровой бумаги. Изучение морфологического строения проводят на 10 свежих и 10 высушенных растениях. При описании растений проводят 10-15 биометрических измерений, таких как высота, длина, ширина и площадь листа, длина соцветия, чашечки, диаметр венчика и др.

В. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья». Микроскопический анализ. Сырье измельчают в порошок (сито 355) (ГФ РК I, т. 1, 2.9.12.). Порошок желтого или желто-коричневого цвета. При рассмотрении порошка сырья под микроскопом с использованием *раствора хлоралгидрата Р* наблюдаются его диагностические признаки. Исследования образцов осуществляли с помощью тринокулярного микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC 3 Mpix, Leica application suite 2.4.0 R1, а также линзы Leica EZ 4D Digital (Германия).

С. Испытание проводят методом тонкослойной хроматографии (ГФ РК I, т. 1, 2.2.27).

Испытуемый раствор. К 1.0 г измельченного в порошок сырья (355) (2.9.12) прибавляют 10 мл метанола Р, нагревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 мин, перемешивая. Затем охлаждают и фильтруют.

Раствор сравнения. 1,0 мг кислоты кофейной Р, 2,5 мг гиперозида Р и 2,5 мг рутина Р растворяют в метаноле Р и разбавляют до 10 мл тем же растворителем.

На линию старта ТСХ пластинки со слоем силикагеля Р наносят 10 мкл раствора сравнения и 30 мкл испытуемого раствора в виде полосок. Пластинку помещают в камеру с системой растворителей кислота муравьиная безводная Р – вода Р – метилметилэтилкетон Р – этилацетат Р (10:10:30:50). Когда фронт растворителей пройдет 15 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат при температуре 100-105 °С и опрыскивают раствором 10 г/л дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира Р в метаноле Р, а затем – раствором 50 г/л макрогола 400 Р в метаноле Р. Пластинку сушат на воздухе в течение 30 мин и просматривают в УФ лампе при длине волны 365 нм.

Ниже показана последовательность зон на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения. На хроматограмме испытуемого раствора могут обнаруживаться дополнительные зоны.

Верхняя часть пластинки	
Кофейная кислота: зеленовато-синяя зона	Желтая или желтовато-зеленая зона
	Синеватая зона
	Зеленоватая зона
	Желтовато-зеленая зона
Гиперозид: желтовато-коричневая зона	Синеватая зона
Рутин: желтовато-коричневая зона	Зеленоватая зона
Раствор сравнения	Испытуемый раствор

Д. 1 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 10 мл воды Р, нагревают 10 мин на водяной бане и фильтруют через бумажный фильтр.

К 5 мл фильтрата прибавляют 5 мл 0,1 моль/л кислоты хлороводородной, обильно встряхивают; образуется стойкая пена (тритерпеновые сапонины).

Посторонние примеси (ГФ РК I, т. 1, 2.8.2.).

Потеря в массе при высушивании. Не более 12 % (ГФ РК I, т. 1, 2.2.32). 1.000 г измельченного в порошок (сито 355) (ГФ РК I, т. 1, 2.9.12.) сырья сушат при температуре 105 °С в течение 2 ч.

Зола общая. (ГФ РК I, т. 1, 2.4.16).

Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной. (ГФ РК I, т. 1, 2.8.1).

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13. Сырье должно соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А. В 1 г сырья допускается общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не более 10^7 бактерий, не более 10^5 грибов и не более 10^2 *Escherichia coli*.

Индекс набухания. Не менее 9. В соответствии с European Pharmacopoeia 8.0, 2.8.4.

Радионуклиды. Сырье должно соответствовать требованиям Сан ПиН № 4 .01.071.03.

Количественное определение. Определение содержания актеозида проводят в соответствии с ВЭЖХ, ГФ РК I, т. 1, 2.8.12.

Испытуемый раствор. К 10.00 г измельченного в порошок сырья (355) (2.9.12) прибавляют 130 мл метанола и экстрагируют на ультразвуковой ванне в течение 30 минут. Полученный раствор центрифугируют в течение 10 минут при скорости вращения 12000 об/мин и декантируют насадочную жидкость в мерную колбу вместимостью 250 мл. Экстракцию повторяют дважды в тех же условиях с 50 мл метанола спирта при втором контакте фаз и 70 мл при третьем. Объем объединенного извлечения доводят спиртом метиловым до метки.

Раствор сравнения. 0.0025 г (точная навеска) стандартного образца актеозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки спиртом метиловым и перемешивают.

Хроматографирование проводят, используя хроматографическую систему Agilent 1100 с детектором на диодной матрице в следующих условиях:

- колонка Supelcosil ABZ+PLUS (15 см *4,6 мм; 3 мкм);
- подвижная фаза: метанол Р - кислота уксусная 0,2% (1:10);
- скорость подвижной фазы – 1 мл/мин;
- температура термостата колонки – 30°C;
- время хроматографирования – 40 мин;

Детектирование пиков проводят при длине волны $\lambda = 330$ нм.

Содержание актеозида (%) в испытуемом растворе вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_w \times V \times 100}{V_o \times 10 \times 1000}$$

Где A_w – концентрация актеозида в введенном растворе, мкг/мл;

V – объем растворителя испытуемого раствора, мл;

V_o – объем вводимой пробы, мкл.

Определение вкуса. Вкус спиртовых экстрактов определяли в растворе воды очищенной из расчета 1 капля экстракта на 1 мл воды и на сахаре при смешивании 1 капли экстракта с 1 г сахара. Вкус горький.

Определение запаха. Согласно ГФ РК I, т.1, 2.3.4. Запах экстракта определяли нанесением тонкого слоя до 1 мм на чистую фильтровальную

бумагу. Запах определяли периодически в течение 15 минут. Запах специфический.

Потеря в массе при высушивании экстракта. Испытание проводили в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 2.8.17. 0,5 г субстанции сушат в сушильном шкафу при температуре от 100°C до 105°C до постоянной массы.

Тяжелые металлы. Испытание проводили в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 2.4.8, метод А.

Микробиологическая чистота экстракта. Испытание проводили в соответствии с требованиями ГФ РК I, т. 1, 2.6.12, 2.6.13.

Препарат должен соответствовать ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 3 В. В 1 г субстанции допускается наличие не более 10000 аэробных бактерий, 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно), энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий не более 100.

Не допускается наличие в 1 г субстанции *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, в 10 г – *Salmonella*.

Исследование антимикробной активности. Эталонные штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus* АТТС 29213 были предоставлены лабораторией кафедры микробиологии и инфекционных болезней (факультет ветеринарной медицины, Университет ветеринарии и фармацевтических наук Брно). Исследуемые экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), серийно разводили, используя среды культивирования, и переносили в четырех экземплярах в 96-луночные плоскодонные микропланшеты.

Свежую культуру *Staphylococcus aureus* ресуспендировали в бульоне Мюллера-Хинтона с получением окончательной целевого инокулята 6×10^5 КОЕ / мл. Исследуемые экстракты были добавлены к 100 мкл суспензии в 96-луночный планшет для получения конечных концентраций 512, 256, 128, 64 мкг / мл и рост микроорганизмов непрерывно контролировали путем измерения оптической плотности при 600 нм в считателе микропланшета (BMG Reader Labtech, Германия) при 37 ° С от 0 до 24 часов. В качестве положительного контроля использовали антибиотик Ципрофлоксацин (1 мкг / мл).

Методика исследования антиоксидантной активности методом ингибирования радикала АВТС.

АВТС⁺ готовили путем смешивания исходного раствора АВТС (14 мМ) в воде с 4,9 мМ персульфатом калия. Эту смесь выдерживают в течение 12-24 ч при комнатной температуре в темноте до достижения стабильного к окислению состояния. Для спектрофотометрического анализа, смешивали 240 мкл раствора АВТС⁺ и 60 мкл испытуемого раствора или стандартного образца с помощью микропланшетного считывателя была определена абсорбция при длине волны 734 нм через 5 мин после смешивания. В каждом измерении оптическая плотность корректировалась значением оптической плотности чистого раствора АВТС.

Методика исследования антиоксидантной активности экстрактов методом ингибирования радикала дифинилпикрилгидразил радикала (ДФПГ). Эффективность экстрактов и стандартного антиоксиданта на ДФПГ

радикал изучали по методу Блуа (1958), где степень обесцвечивания стабильного свободного радикалаДФПГ контролируется на характерной длине волны в присутствии образцов. 30 мкл различных концентраций экстрактов в метаноле добавляли к 270 мкл метанольного раствораДФПГ с концентрацией 44 мкг / мл. Смесь встряхивают и определяют оптическую плотность с помощью микропланшетного считывателя при длине волны 517 нм через 5 мин после смешивания. Уменьшение оптической плотности указывает на процент активностиДФПГ к акцептированию радикалов. Эту активность рассчитывали по уравнению ниже:

$$x = \frac{0 - A1}{A0} * 100\%,$$

Где A0 - поглощение контроля;

A1 - поглощение в присутствии образца.

Концентрация экстракта, которая обеспечивает 50% ингибирование (IC50) была рассчитана по графику зависимости процента ингибирования от концентрации экстракта.

Определение антирадикальной активности экстрактов относительно пероксинитрита. Был использован метод высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) для измерения ингибирования нитрования, опосредованного пероксинитрита тирозина. Способ состоит в смешивании раствора пероксинитрита (8 мкл, 10 мМ) в 0,1 М NaOH с 2.0 мМ раствора тирозина в 0,05 М фосфатном буфере с рН 6,0 (42 мкл), содержащей образец (2,0 мг / мл) и метанола (в соотношении 1 : 1 соотношение с водой) в инжекторе ВЭЖХ. Реакционную смесь вводили непосредственно в систему ВЭЖХ (НР 1100 с автоматическим пробоотборником, четвертичного насоса и диодно-матричным детектором, Agilent Technologies, USA). Разделение проводили на колонке Supelcosil ABZ + PLUS (25 см x 4,6 мм, 5 мкм; Supelco, США); Подвижная фаза состояла из 90% 40 мМ HCOOH и 10% CH3CN (об / об) при скорости потока 1 мл / мин. Хроматограммы были обнаружены при длине волны 356 нм. Ингибирование нитрования тирозинкиназы было рассчитано по отношению к площади пика 3-nitrotyrosine, основанной на контрольном измерении. Процент ингибирования нитрования тирозина сравнивали с Тролокс стандартом (500 мкмоль / л).

3 ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРОВЯКА ДЖУНГАРСКОГО (*VERBASCUM SONGARICUM SCHRENK*)

3.1 Фитохимическое исследование растения Коровяк джунгарский (*Verbascum songaricum Schrenk*)

В научной литературе отсутствуют систематизированные данные о содержании в сырье коровяка джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*) биологически активных веществ, обуславливающих ее использование, и необходимые для обоснования возможности применения данного вида лекарственного растительного сырья в научной и практической медицине.

При выборе методик определения качественного и количественного содержания основных БАВ растения коровяк джунгарский, исходя из сведений об использовании в народной медицине чаще всего водных извлечений, а также, суммируя данные мировой научной литературы о химическом составе видов коровяка, наши исследования были начаты с изучения веществ гидрофильного характера.

3.1.1 Определение фенольных соединений

Фенольные соединения проявляют разноплановую фармакологическую активность, в частности противовоспалительную, антиоксидантную и противораковую. Галловая кислота – это вещество фенольной природы, оказывающее противовоспалительное, антиоксидантное, противогрибковое, антибактериальное действие [145].

Идентификацию фенольных соединений проводили по реакции с железа (III) хлоридом в водно-спиртовых извлечениях.

В результате проведенной реакции с железа (III) хлоридом наблюдали образование темно-зеленого окрашивания, что свидетельствовало о наличии фенольных соединений.

Галловую кислоту определяли методом бумажной и тонкослойной хроматографии в системах растворителей 2 %, 5%, 15 % кислота уксусная в сравнении с достоверным образцом.

Галловая кислота не имела в УФ-свете флюоресценции, а после обратотки хроматограммы 1% раствором железа (III) хлорида проявлялась в виде темно-серого пятна в дневном свете.

Определение количественного содержания фенольных соединений было проведено в пересчете на галловую кислоту.

Определений количественного содержания фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту проводили спектрофотометрическим методом.

1.0 г (точная навеска) измельченного сырья, помещали в колбу со шлифом объемом 100 мл, приливали 30 мл 70% спирта этилового и экстрагировали 30 мин на водяной бане. Экстракцию повторяли еще дважды. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 100 мл, доводили 70% спиртом этиловым до метки (раствор А).

1 мл раствора А помещали в мерную колбу объемом 25 мл и доводили 96% спиртом этиловым до метки. Оптическую плотность измеряли при длине волны 275 нм на спектрофотометре Optizen POP. Параллельно измеряли оптическую плотность фармакопейного стандартного образца (СО) галловой кислоты, для чего 1 мл раствора СО галловой кислоты помещали в колбу объемом 25 мл и доводили 96% спиртом этиловым до метки.

Приготовление раствора СО галловой кислоты. 0.0077 г (точная навеска) галловой кислоты растворяли в мерной колбе объемом 25 мл в 96% спирте этиловом.

Содержание фенольных соединений (X, %) в пересчете на галловую кислоту рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

де А – оптическая плотность исследуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность СО галловой кислоты;

m₀ – масса СО галловой кислоты, г;

m – масса навески сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Результаты количественного содержания фенольных соединений в сырье коровяка джунгарского приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Количественное содержание фенольных соединений в сырье коровяка джунгарского

Сырье	Количественное содержание, %
Листья	3.11 ± 0.07
Цветки	3.95 ± 0.11
Трава в период бутонизации	3.74 ± 0.08
Трава в фазу цветения	3.76 ± 0.05
Трава в фазу плодоношения	3.58 ± 0.10

Как видно из таблицы 1, наибольшее содержание фенольных соединений наблюдалось в цветках коровяка джунгарского, несколько ниже – в траве в фазу цветения и траве в фазу плодоношения. Наименьшее количество фенолкарбоновых кислот было установлено в листьях коровяка джунгарского.

Идентификацию и определение количественного содержания фенольных соединений проводили методом ВЭЖХ. В результате проведенного эксперимента в извлечениях из травы и цветков коровяка джунгарского и коровяка обыкновенного без гидролиза было идентифицировано 4 соединения, а в извлечениях с гидролизом - 3 вещества. Данные вещества – это

фенолкарбоновые кислоты и флавоноиды. В извлечениях цветков коровьяка обыкновенного и коровьяка джунгарского без гидролиза не обнаружена хлорогеновая кислота, а идентифицирована феруловая кислота, которая не присутствует в траве. В извлечениях травы изучаемых видов коровьяка с гидролизом обнаружена хлорогеновая, кофейная кислоты, а также лютеолин. В извлечениях из цветков данных видов коровьяка с гидролизом идентифицированы кофейная кислота, апигенин и лютеолин [146]. Результаты приведены в таблице 2. Время удерживания идентифицированных соединений приведено в таблице 3.

Таблица 2 - Качественный состав фенольных соединений в сырье коровьяка джунгарского

Извлечения без гидролиза		Извлечения с гидролизом	
Трава	цветки	Трава	цветки
Хлорогеновая кислота	Феруловая кислота	Хлорогеновая кислота	Кофейная кислота
Розмариновая кислота	Розмариновая кислота	Кофейная кислота	Лютеолин
Лютеолин	Лютеолин	Лютеолин	Апигенин
Апигенин	Апигенин		
Актеозид	Актеозид	Актеозид	Актеозид

Таблица 3 - Время удерживания идентифицированных фенольных соединений в сырье коровьяка джунгарского

Соединение	Извлечения без гидролиза		Извлечения с гидролизом	
	Трава	Цветки	Трава	Цветки
Хлорогеновая кислота	20.050	-	20.022	-
Феруловая кислота	-	30.693	-	-
Розмариновая кислота	37.895	37.843	-	-
Лютеолин	46.864	46.838	46.825	46.924
Апигенин	52.150	52.133	-	52.127
Кофейная кислота	-	-	21.890	21.902
Актеозид	14.325	14.319	14.320	14.328

Результаты количественного содержания фенольных соединений в сырье коровьяка джунгарского приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Количественное содержание фенольных соединений в сырье коровьяка джунгарского

Соединение	Количественное содержание, %			
	Трава		Цветки	
	Извлечения с гидролизом	Извлечения без гидролиза	Извлечения с гидролизом	Извлечения без гидролиза
Хлорогеновая кислота	0.02	0.06	-0.01	-0.05
Феруловая кислота	-	-	-	0.01
Розмариновая кислота	-	0.03	-	0.02
Лютеолин	0.2	0.2	0.3	0.3
Апигенин		0.03	0.17	0.17
Кофейная кислота	0.11	-	0.04	-0.1
Актеозид	0.36	0.4	0.51	0.52

Как видно из таблицы 4, в извлечениях из травы и цветков коровьяка джунгарского без гидролиза и с гидролизом преобладал актеозид. Сравнивая количественное содержание идентифицированных веществ в извлечениях из травы и цветков без гидролиза и с гидролизом можно сделать вывод о доминантном содержании веществ в цветках коровьяка джунгарского. Количественное содержание некоторых веществ в обоих видах сырья находилось на одинаковом уровне, например, в извлечениях без гидролиза это касается феруловой кислоты, а также розмариновой кислоты; в извлечениях с гидролизом – хлорогеновой кислоты.

3.1.2 Определение качественного и количественного содержания фенолкарбоновых кислот в сырье *Verbascum songaricum*

Качественный состав фенолкарбоновых кислот изучали методом бумажной и тонкослойной хроматографии в системах растворителей 2 %, 5%, 15 % кислота уксусная в сравнении с достоверными образцами фенолкарбоновых кислот [147].

Для хроматографирования использовали водные и водно-спиртовые извлечения исследуемых объектов.

Количественное содержание фенолкарбоновых кислот определяли по следующей методике.

2,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу объемом 200 мл и добавляли 70 мл воды. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане 15 мин. Экстракцию повторяли еще дважды. Извлечение охлаждали, фильтровали через бумажный фильтр на вороне Бюхнера и количественно переносили в мерную колбу объемом 200 мл и доводили объем раствора до метки (раствор А).

В мерную колбу объемом 50 мл вносили 3 мл раствора А и доводили объем раствора 20% этанолом до метки. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 325 нм. Раствором сравнения служил 20% этанол.

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот (X, %) в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 200 \cdot 50 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot 3 \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора;
 m – навеска сырья, г;
 $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты, который равняется 531;
 W – потеря в массе при высушивании, %.

В результате изучения качественного состава было обнаружено в корнях хлорогеновую кислоту, в траве в фазу цветения, траве в фазу созревания плодов, цветках, листьях – хлорогеновую, феруловую и кофейную кислоты.

Результаты количественного содержания фенолкарбоновых кислот в сырье коровьяка джунгарского приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Количественное содержание фенолкарбоновых кислот в сырье коровьяка джунгарского

Сырье	Количественное содержание, %
Листья	1.95 ± 0.07
Цветки	1.63 ± 0.05
Трава в период бутонизации	0.94±0.08
Трава в фазу цветения	1.42± 0.05
Трава в фазу плодоношения	1.04 ± 0.03

Как видно из таблицы 5, наибольшее содержание фенолкарбоновых кислот наблюдалось в листьях коровьяка джунгарского, несколько ниже – в траве в фазу цветения и цветках. Наименьшее количество фенолкарбоновых кислот было определено в корнях изучаемого вида коровьяка.

3.1.3 Определение флавоноидов

Определение количественного содержания флавоноидов в сырье коровьяка джунгарского в пересчете на рутин проводили спектрофотометрическим методом [148].

1,0 г (точная навеска) измельченного сырья коровьяка джунгарского до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями d=2 мм, погружают в колбу, шлифованную объемом 150 мл и прибавляют 30 мл спирта этилового 50%. Затем кипятили на водяной бане в течение 30 мин, присоединив колбу к

обратному холодильнику и, периодически взбалтывали. Горячее извлечение фильтровали через вату в мерную колбу объемом 100 мл. Вату переносили в колбу для экстрагирования и добавляли 30 мл 50% спирта этилового. Экстракцию повторяли еще дважды, собирая фильтрат в ту же колбу. После охлаждения объем извлечения доводили 50% спиртом этиловым до отметки и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу объемом 25 мл переносили 1 мл раствора А, 3 капли кислоты уксусной разведенной и 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и доводили до метки спиртом этиловым 96%. Через 40 мин измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Приготовление испытуемого раствора. В мерную колбу объемом 25 мл наливают 1 мл фильтрата, 3 капли кислоты уксусной разведенной и доведут до отметки.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца рутина, который готовили аналогично испытуемому раствору [149, 150].

Содержание суммы флавоноидов (X, %) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора, нм;

A₀ – оптическая плотность раствора рутина, нм;

m – масса сырья, г;

m₀ – масса рутина, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Приготовление раствора рутина. 0,050 г (точная навеска) стандартного образца рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 часов, растворяли в 85 мл 96% спирта этилового в мерной колбе объемом 100 мл, нагревая на кипящей водяной бане, охлаждали, количественного переносили в мерную колбу объемом 100 мл, доводили объем раствора спиртом этиловым до метки.

Приготовление 2% раствора алюминия хлорида. 2 г алюминия хлорида растворяли в 50 мл 96% этанола в мерной колбе объемом 100 мл, объем раствора доводили тем же растворителем до отметки и перемешивали.

Результаты количественного содержания флавоноидов в сырье коровяка джунгарского и коровяка обыкновенного приведены в таблице 6.

Как видно из таблицы 6, доминирующее количественное содержание флавоноидов наблюдалось в листьях коровяка джунгарского.

Среди сырья коровяка джунгарского стоит отметить листья, так как данное сырье отмечается высоким содержанием суммы флавоноидов.

По сравнению с другими видами сырья цветки коровяка содержат минимальное количество флавоноидов.

Таблица 6 - Количественное содержание флавоноидов в сырье коровьяка джунгарского

Сырье	Количественное содержание, %
Листья	1.25±0.04
Цветки	0.73±0.01
Трава в период бутонизации	0.62±0.01
Трава в фазу цветения	0.91±0.03
Трава в фазу плодоношения	0.5±0.03

3.1.4 Изучение жирнокислотного состава липофильных фракций сырья коровьяка джунгарского

Исследовали липофильную фракцию сырья коровьяка джунгарского, полученную исчерпывающей экстракцией гексаном. Метод определения жирнокислотного состава основан на превращении триглицеридов жирных кислот в метиловые эфиры жирных кислот и газохроматографическом анализе последних [151].

Анализ жирнокислотного состава липофильной фракции осуществляли методом газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот на газовом хроматографе «Селмихром-1» с пламенно-ионизационным детектором. В эксперименте использовали колонку газохроматографическую из нержавеющей стали длиной 2,5 метра и внутренним диаметром 4 мм, наполненную неподвижной фазой – иннертоном, обработанным 10% диэтиленгликольсукцинатом (DEGS).

На хроматографе устанавливают следующие параметры работы: температура термостата колонок – 180°C, температура испарителя – 230°C, температура детектора – 220°C, скорость потока газа носителя (азот) – 30 см³/мин, объем пробы 2 мм³ раствора метиловых эфиров кислот в гексане.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот осуществляли по времени удержания пиков в сравнении со стандартной смесью. Расчет состава метиловых эфиров проводили методом внутренней нормализации.

В качестве стандартов использовали стандарты насыщенных и ненасыщенных метиловых эфиров жирных кислот фирмы "Sigma".

Метиловые эфиры жирных кислот получали по модифицированной методике Пейскера, которая обеспечивает полное метилирование жирных кислот.

Для метилирования использовали смесь хлороформа с метанолом и серной кислотой в соотношении 100:100:1.

В стеклянную ампулу отмеряли 30-50 мкл липофильного экстракта, приливали 2.5 мл метилирующей смеси и ампулы запаивали. Затем их помещали в термостат с температурой 105°C на 3 часа. После окончания метилирования ампулы вскрывали, содержимое переносили в пробирку, добавляли порошкообразный сернокислый цинк на кончике скальпеля, приливали 2 мл дистиллированной воды и 2 мл гексана для экстракции метиловых эфиров.

После тщательного взбалтывания и отстаивания, гексановый экстракт фильтровали и использовали для хроматографического анализа.

При изучении жирнокислотного состава было установлено наличие 18 жирных кислот в сырье коровьяка джунгарского. Результаты жирнокислотного анализа приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Жирнокислотный состав липофильной фракции сырья коровьяка джунгарского

№ п/п	Жирные кислоты	Содержание в липофильной фракции от суммы, % от суммы
1	C _{12:0} лауриновая	0.32
2	Неидентифицированная кислота	0.26
3	C _{14:0} миристиновая	0.50
4	C _{14:1} миристолеиновая	1.15
7	C _{16:0} пальмитиновая	23.47
8	C _{16:1} пальмитинолеиновая	2.38
9	Неидентифицированная кислота	0.84
10	C _{18:0} стеариновая	1.85
11	C _{18:1} олеиновая	30.63
12	Неидентифицированная кислота	0.76
13	C _{18:2} линолевая	9.42
14	Неидентифицированная кислота	0.78
15	C _{18:3} линоленовая	14.64
16	C _{20:1} гондоиновая	6.31
17	C _{22:0} бегеновая	1.39
18	C _{22:1} эруковая	0.05
19	Неидентифицированная кислота	3.42
20	C _{24:0} лигноцериновая	1.83
Содержание идентифицированных жирных кислот		
содержание насыщенных жирных кислот		29.36
содержание ненасыщенных жирных кислот		64.58
Содержание неидентифицированных жирных кислот		6.06

В липофильной фракции исследуемого объекта среди насыщенных кислот преобладала пальмитиновая кислота, ее содержание от суммы составляло 23.47%. Среди ненасыщенных кислот преобладала олеиновая кислота, содержание от суммы которой составляло 30.63%. Среди идентифицированных жирных кислот преобладали ненасыщенные кислоты [152].

3.1.5 Аминокислотный состав сырья коровьяка джунгарского

Для определения связанных и свободных аминокислот в 1 г вещества, его гидролизуют в 5 мл 6 нормальной (Н) соляной кислоты при 105⁰С в течение 24

часов, в ампулах, запаянных под струей аргона. Полученный гидролизат трижды выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40-50⁰С и давлением 1 атмосфера. Образовавшийся осадок растворяют в 5мл сульфосалициловой кислоты. После центрифугирования (1500 об/мин) в течение 5 мин надосадочную жидкость пропускали через колонку с ионно-обменной смолой Даукс 50, Н-8, 200-400 меш, со скоростью 1 капля в сек. После этого смола промывалась 1-2 мл деионизированной воды и 2 мл 0,5 Н уксусной кислоты; затем смола отмывалась до нейтральной рН деионизированной водой [153].

Для элюирования аминокислот с колонки через нее пропускали 3 мл 6 Н раствора NH₄ОН со скоростью 2 капли в сек. Элюат собирался в круглодонную колбу вместе с деионизированной водой, которую использовали для отмывания колонки до нейтральной рН. Затем содержимое колбы досуха выпаривали на роторном испарителе под давлением 1 атм. и температуре 40-50⁰С.

После добавления в эту колбу 1 капли свежеприготовленного 1.5 % раствора SnCl₂, 1 капли 2,2-диметоксипропана и 1-2 мл насыщенного соляной кислотой пропанола, ее нагревают до 110⁰С, выдерживая эту температуру в течение 20 мин, а затем содержимое вновь выпаривают из колбы на роторном испарителе.

На следующем этапе в колбу вводили 1 мл свежеприготовленного ацелирующего реагента (1 объем уксусного ангидрида, 2 объема триэтиламина, 5 объемов ацетона) и нагревали при температуре 60⁰С в течение 1,5-2 мин. Затем образец снова выпаривали на роторном испарителе досуха и добавляли в колбу 2 мл этилацетата и 1 мл насыщенного раствора NaCl. Содержимое колбы тщательно перемешивают и по мере того, как отчетливо образуется 2 слоя жидкостей – берут верхний (этиацетатный) для газохроматографического анализа, который проводили на газо-жидкостном хроматографе «Карло-Эрба-4200» (Италия-США).

Условия хроматографирования:

- температура пламенно-ионизационного детектора – 300⁰С
- температура испарителя – 250⁰С
- начальная температура колонки – 110⁰С
- конечная температура колонки – 250⁰С
- скорость программирования температуры колонки: от 110⁰С до 185⁰С – 6⁰С в мин; от 185⁰С до 250⁰С – 32⁰С в мин. При достижении температуры колонки 250⁰С она должна сохраняться такой до полного выхода всех аминокислот.

Для разделения аминокислот использовалась колонка из нержавеющей стали, размером 400 на 3 мм, заполненная полярной смесью из 0,31 % карбовакса 20 м, 0,28 % силара 5 СР и 0,06 % лексана на хромасорбе WA-W-120-140 меш. Обсчет хроматограммы проводился по внешнему стандарту фирмы Altex.

Как видно из приведенных данных, представленных в таблице 8, при определении качественного состава и количественного содержания аминокислот в сырье коровяка джунгарского выявлено 16 аминокислот, из них 8 незаменимых: лейцин, изолейцин, гистидин, тирозин, глицин, лизин, валин, метионин. В сырье коровяка джунгарского в наибольшем количестве содержится

глутаминовой (2.54%) и аспарагиновой (1.02%) кислот, пролина (0.862%), аланина (0.720%); в корнях - глутаминовой (2.59%) и аспарагиновой (1.148%) кислот, пролина (0.884%), аланина (0.796%). Установлено, что максимальное количество аминокислот содержится в корнях – 10.367% (рисунок 7).

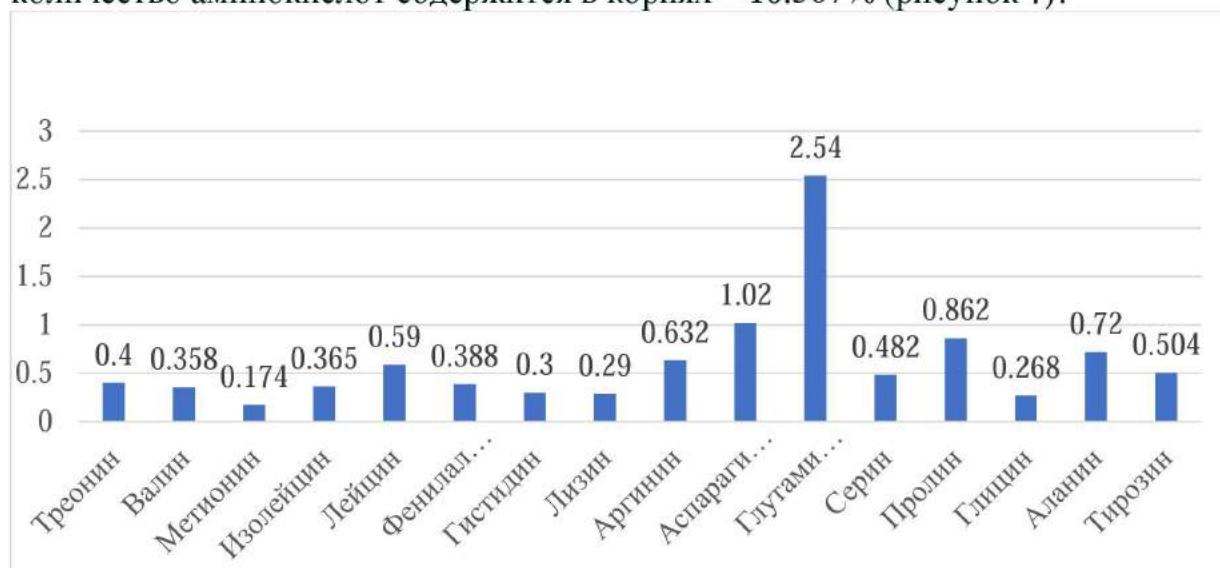


Рисунок 7 – Аминокислотный состав Коровяка Джунгарского

3.1.6 Определение компонентного состава органических кислот

Определение качественного состава и количественного содержания органических кислот в сырье коровяка джунгарского проводили методом газовой хроматографии [154].

50 мг сырья помещали в виалу на 2 мл, добавляли внутренний стандарт (50 мкг тридекана в гексане) и приливали 1 мл метилирующего агента (14% BCl_3 в метаноле, Supelco 3-3033). Смесь выдерживали в герметично закрытой виале 8 часов при 65°C , затем фильтровали и добавляли 1 мл воды очищенной. Для извлечения метиловых эфиров жирных кислот прибавляли 0,2 мл хлористого метилена, встряхивали несколько раз в течение часа, а затем проводили хроматографирование.

Введение пробы (2 мкл) в хроматографическую колонку проводили в режиме *splitless*, то есть без деления потока, что позволяет ввести пробу без потери на деление и существенно (в 10-20 раз) увеличить чувствительность метода хроматографирования. Скорость введения пробы составляла 1,2 мл/мин в течение 0,2 мин.

При проведении анализа придерживались следующих условий хроматографирования: хроматограф Agilent Technologies 6890 с масс-спектрометрическим детектором 5973; хроматографическая колонка – капиллярная INNOWAX, внутренний диаметр 0,5 мм, длина 30 м; скорость газ-носителя (гелий) 1,2 мл/мин; температура нагревателя ввода пробы – 250°C ; программируемая температура термостата – от 50 до 250°C , со скоростью 4 град/мин.

Для идентификации компонентов использовалась библиотека масс-спектров NIST 05 и WILEY 2007 с общим количеством спектров более 470000 в сочетании с программами для идентификации AMDIS и NIST.

Для количественных расчетов использовался метод внутреннего стандарта [155].

Расчет содержания компонентов (С, мг/кг) проводили по формуле:

$$C = K_1 \cdot K_2 \cdot 1000,$$

где

$K_1 = \Pi_1 / \Pi_2$ (Π_1 – площадь пика исследуемого вещества, Π_2 – площадь пика стандарта);

$K_2 = 50 / M$ (50 – вес внутреннего стандарта (мкг), введенного в образец, M – навеска образца (мг)).

В результате проведенных исследований установлено в сырье коровьяка коровьяка джунгарского 14 органических кислот. Результаты эксперимента приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Количественное содержание органических кислот в сырье коровьяка джунгарского

№	Соединение	Содержание органических кислот, мг/кг
1.	Капроновая кислота	30.60
2.	Щавелевая кислота	305.20
3.	Нонановая кислота	24.50
4.	Малоновая кислота	518.00
5.	Фумаровая кислота	31.30
6.	Янтарная кислота	279.60
7.	Бензойная кислота	115.30
8.	Фенилуксусная кислота	25.00
9.	Салициловая кислота	43.70
10.	Яблочная кислота	983.30
11.	Азелаиновая кислота	220.40
12.	Лимонная кислота	3159.10
13.	Ванилиновая кислота	354.60
14.	Феруловая кислота	652.80

Как видно из таблицы 8, в исследуемом объекте наблюдалось достаточно высокое количество лимонной, яблочной и феруловой кислот.

Кроме того, в лекарственном растительном сырье коровьяка джунгарского следует отметить высокое содержание малоновой (518.00 мг/кг), ванилиновой (354.60 мг/кг), щавелевой (305.20 мг/кг) и янтарной (279.60 мг/кг) кислот соответственно.

3.1.7 Определение суммы орто-дигидроксикоричных кислот в сырье коровьяка джунгарского

Содержание суммы орто-дигидроксикоричных кислот в сырье коровьяка джунгарского определяли спектрофотометрическим методом [156].

1,000 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу и добавляли 100 мл 50% спирта этилового, нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. После охлаждения фильтровали в мерную колбу на 100 мл, доводили до метки спиртом (раствор 1).

1 мл раствора 1 помещали в мерную колбу на 10 мл и добавляли 2 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, 2 мл раствора, приготовленного разведением 10 мл нитрита натрия и 10 г натрия молибденовокислого в 100 мл очищенной воды, и 2 мл раствора гидроксида натрия. Полученный раствор доводили очищенной водой до метки. Обязательным условием являлось перемешивание после каждого добавления реагентов.

В качестве компенсационного использовали раствор, содержащий 1 мл раствора 1, 2 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, 2 мл раствора гидроксида натрия, доведенной водой очищенной до метки.

Оптическую плотность определяли сразу после приготовления исследуемого и компенсационного раствора при длине волны 525 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis. Расчет содержания суммы производных орто-дигидроксикоричных кислот в пересчете на актеозид проводили по формуле:

$$\frac{A \times 1000}{185 \times m'}$$

где A – оптическая густота исследуемого раствора при длине волны 525 нм;

m – масса навески сырья, г;

185 – удельный показатель поглощения стандартного образца актеозида при длине волны 525 нм.

При спектрофотометрическом определении суммы производных орто-дигидроксикоричных кислот расчет содержания производился в пересчете на актеозид при длине волны 525 нм согласно методике Европейской фармакопеи издания 8.3 [157].

Полученные данные определения суммы орто-дигидроксикоричных кислот в цветках коровьяка джунгарского представлены в таблице 9. Установлено содержание суммы орто-дигидроксикоричных кислот в цветках коровьяка джунгарского $0,68 \pm 0,08$.

Таблица 9 - Сумма орто-дигидроксикоричных кислот в цветках коровьяка джунгарского ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x} \%$), $\mu = 6$.

№	масса	Оптическая плотность	%	Потеря в массе при высушивании	%	X [%]	SD
1	0.3	0.065	0.59	91.94	0.64	0.68	0.08
2	0.3	0.078	0.70	91.94	0.76		
3	0.3	0.064	0.58	91.94	0.63		

В ходе эксперимента нами было установлено, что суммы орто-дигидроксикоричных кислот в цветках коровьяка джунгарского равна 0,68%.

Тем самым, в ходе проведенных нами исследований по установлению химического состава Коровьяка джунгарского был установлен компонентный состав аминокислот, органических кислот, а также жирных кислот. Были определены смолистые вещества, в том числе следующие высшие жирные кислоты:

- лауриновая (0.32%),
- миристиновая (0.5%),
- миристолеиновая (1.15%),
- пальмитиновая (23.47%),
- пальмитинолеиновая (2.38%),
- стеариновая (1.85%),
- олеиновая (30.63%),
- линолевая (9.42%),
- линоленовая (14.64%),
- гондоиновая (6.31%),
- бегеновая (1.39%),
- лигноцерииновая (1.83%).

А также нами проведено исследование качественного состава и количественного содержания следующих групп БАВ:

- флавоноиды ($0.91 \pm 0.03\%$);
- фенолкарбоновые кислоты (1.63 ± 0.05),
- оксикоричных кислоты ($0.68 \pm 0.08 \%$),
- фенольные соединения (3.95 ± 0.11), в том числе: кофейной кислоты (0.11%), лютеолина (0.2%), апигенина (0.07%), актеозида (0.5%).

Проведенные исследования динамики накопления БАВ определили целесообразность использования цветков коровьяка джунгарского в качестве лекарственного растительного сырья.

3.2 Фармакогностическое изучение сырья коровьяка джунгарского

Для характеристики лекарственного растительного сырья коровьяка джунгарского нами предложены следующие показатели: идентификация сырья, которая включает описание, микроскопические признаки, качественные реакции, числовые показатели, микробиологическую чистоту, а также количественное определение – актеозида и суммы флавоноидов в пересчете на рутин.

3.2.1 Исследование морфолого-анатомических признаков сырья коровьяка джунагрского

Морфологические особенности. Отсутствие систематизированных сведений по установлению подлинности сырья коровьяка джунгарского инициировало нас провести сравнительный морфологический анализ по монографиям видов коровьяка из фармакопей разных стран. Цветки коровьяка

обыкновенного были внесены в Фармакопею ССР 7 издание [158]. Европейская фармакопея включает монографию препарата *Verbasci flos*, который состоит из цветков *Verbascum thapsus L.* и *V. densiflorum Bertol.*

Учитывая во внимание, что в качестве сырья было предложено использовать цветки коровяка джунгарского, мы охарактеризовали органы растения, которые представляют этот вид сырья (венчики, чашелистик и отдельные листья). При этом основной акцент был направлен на признаки размеры и строение венчика, соцветие, опушенность, окраску, запах и вкус.

Анализ совокупности морфологических характеристик коровяка джунгарского и их систематизация дали возможность установить описание сырья: цельное сырье представляет собой цветки, венчики, бутоны цветков, измельченных листьев. Все части растения войлочно-опушенные. Стебель 5-тигранный, прямостоячий, облиственный, более ветвистый в верхней части, войлочно-опушенный. Листья сидячие или короткочерешковые с городчатым краем. Чашечка 5—8 мм дл., разделенная почти до основания на треугольно-ланцетные доли, белоопушенная (рисунок 8).



Рисунок 8 – Цветки коровяка джунгарского

Венчик 25-35 мм в диаметре, желтый, снаружи густоволосистый, внутри голый, пятилопастной; цветки в пучках по 3-6, сближенных между собой; прицветники нижних цветков сердцевидно-округлые, с коротким острием, остальные широкояйцевидные; цветоножки каждого пучка короткие, с двумя яйцевидными прицветниками; пять тычиночных нитей с короткими волосками, пыльники все одинаковые, почковидные; столбик к верхушке утолщенный (рисунок 9). Запах слабый, своеобразный. Вкус горьковато-слизистый.



Рисунок 9 – Фрагменты венчика под линзой

Анатомические признаки сырья

Для установления микро-диагностических признаков сырья были приготовлены препараты с поверхности венчиков, чашелистиков и листьев коровяка джунгарского. При изучении под микроскопом внешней стороны венчика видны следующие диагностические признаки: многочисленные звездчатые волоски с вздутой у вершины многоклеточной ножкой и расходящимися от нее одноклеточными лучами с шиловидно заостренными верхушками (рисунок 10), а также встречаются головчатые волоски. При

рассмотрении внутренней стороны венчика были видны немногочисленные звездчатые волоски и эфирно-масличныеместилища.

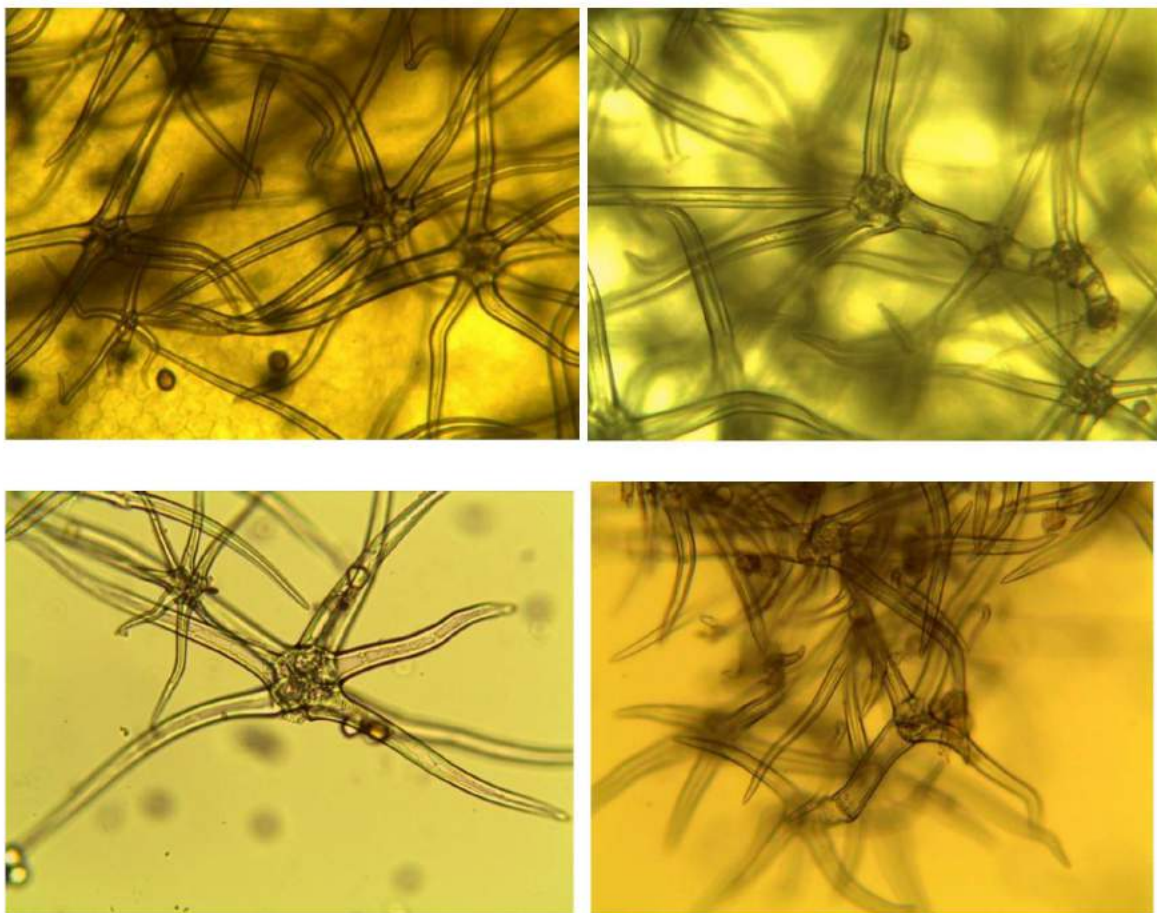


Рисунок 10 - Волоски венчика цветков коровяка джунгарского, вид сверху

Крюющие волоски тычиночных нитей одноклеточные, длинные, тонкостенные и трубчатые, имеют отчетливо гранулированную или поперечнополосатую поверхность с острым (рисунок 11), а иногда с булавовидным наконечником.

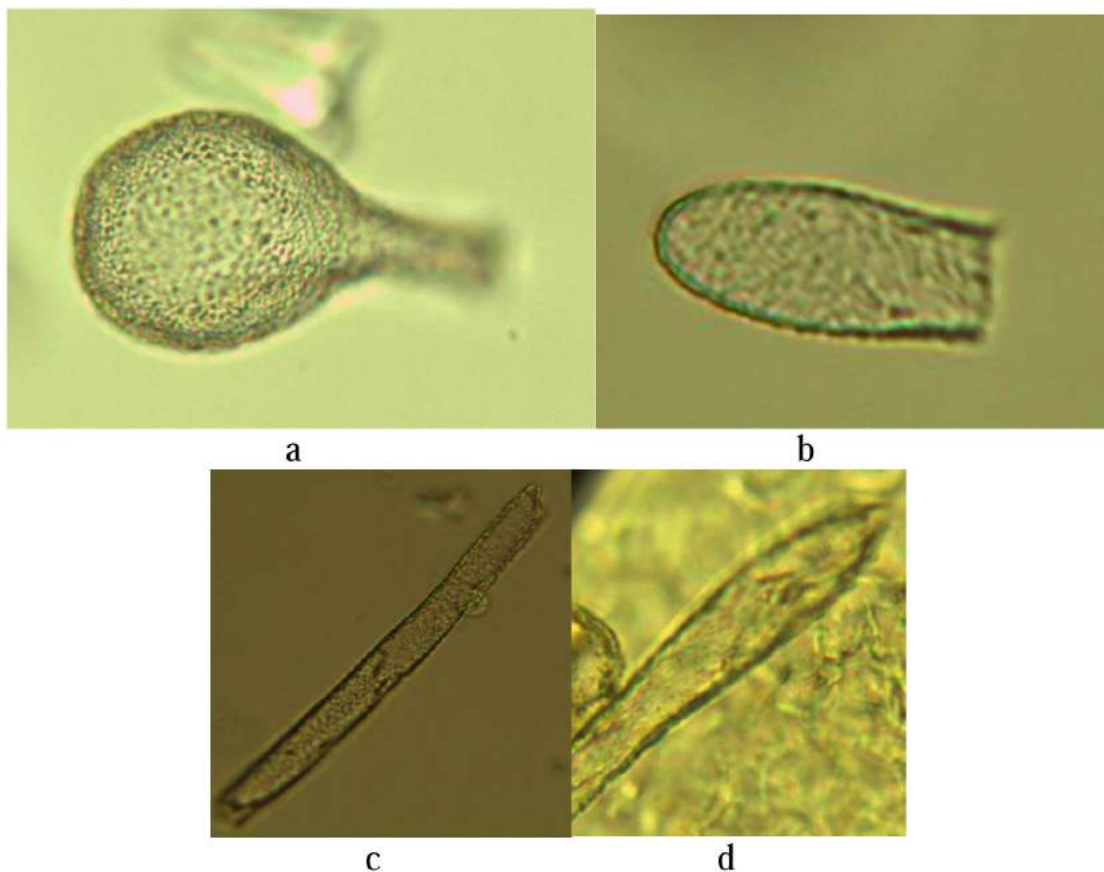


Рисунок 11 – Волоски тычиночных нитей с булавовидным (a,b) и острым (d) наконечниками

При изучении под микроскопом наблюдаются многочисленные пыльцевые зерна, яйцевидные с мелко зернистой экзиной с 3 порами (рисунок 12); фрагменты волокнистого слоя пыльника с утолщенными стенами, дающие характерное форме звезды появление (рисунок 13).



Рисунок 12 - Пыльцевые зерна

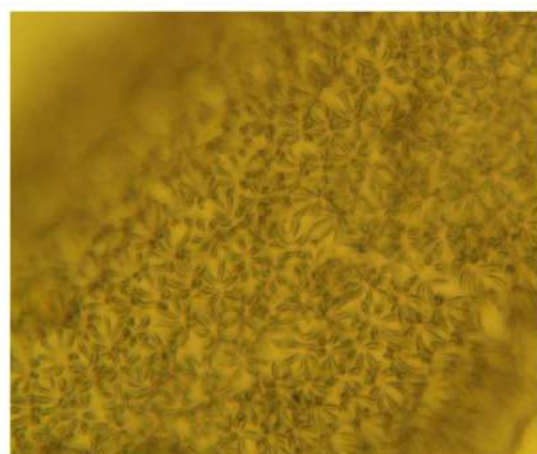


Рисунок 13 - Фрагмент пыльника

При изучении внутренней поверхности препарата чашелистика можно наблюдать, что клетки эпидермиса мелкие, изодиаметрические, слегка вытянутые с почти прямыми стенками. На эпидермисе видны простые и звездчатые, одноклеточные и двухклеточные волоски, а также головчатые волоски. При рассмотрении наружной поверхности чашелистика видно, что эпидермис густо покрыт многоклеточными звездчатыми волосками.

При изучении поверхности листьев можно наблюдать аномоцитный устьичный комплекс, звездчатые многоклеточные и головчатые волоски (рисунок 14, 15).

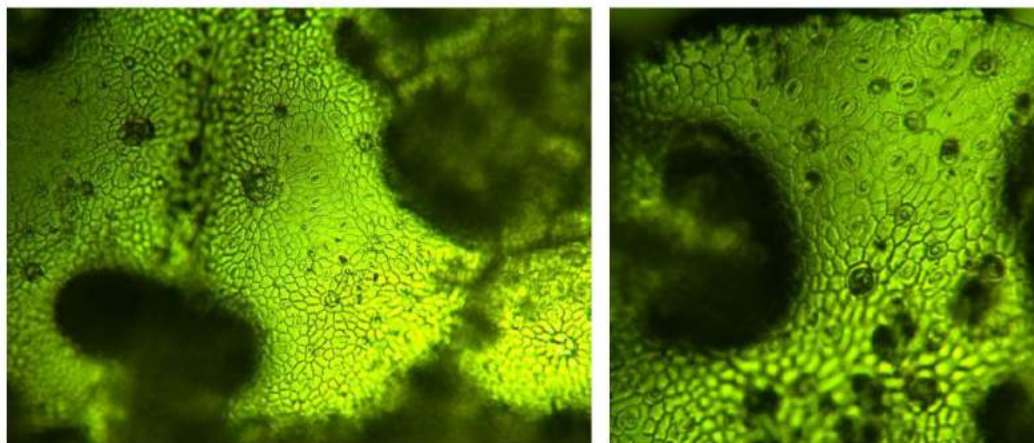


Рисунок 14 – Эпидермис листа коровяка джунгарского



Рисунок 15 – Волоски чашелистика

При изучении края листа видны маловетвистые волоски и многоклеточные звездчатые волоски.

Таким образом, авторами работы при изучении коровяка джунгарского выделены морфологические и анатомические признаки, характерные для представителей рода Коровяк, а также установлены его отличительные особенности [159]. Изучение морфолого-анатомических особенностей коровяка джунгарского позволило систематизировать сведения, необходимые для установления подлинности сырья – травы коровяка и исключить ошибки как при заготовке сырья, так и при его анализе, достоверно отличить от возможных примесей. Результаты данного исследования могут быть использованы при

разработке проекта нормативного документа на новый перспективный вид растительного сырья, содержащий богатый комплекс биологически активных веществ, что позволит расширить сырьевую базу для получения отечественных фитопрепаратов. На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы. В результате проведенных исследований установлена совокупность диагностических признаков необходимых для идентификации сырья:

- клетки эпидермиса полигональные (многоугольные) и изодиаметрические; мезофилл состоит из нерегулярных паренхимных клеток, иногда сопровождаются спиральными сосудами;

- кроющие волоски тычиночных нитей одноклеточные, длинные, тонкостенные и трубчатые, имеют отчетливо гранулированную или поперечнополосатую поверхность с острым, а иногда с булавовидным наконечником;

- многочисленные пыльцевые зерна, яйцевидные с мелко зернистой экзиной с 3 порами; фрагменты волокнистого слоя пыльника с утолщенными стенами, дающие характерное форме звезды появление.

Результаты исследований позволяют идентифицировать цветки коровяка джунгарского, что является основой при разработке раздела «Микроскопия» для проекта нормативной документации.

3.2.2 Определение параметров качества сырья *Verbascum songaricum Schrenk*

Внедрение в фармацевтическую практику лекарственного растительного сырья коровяка джунгарского с целью создания новых лекарственных средств требует наличия нормативного документа, который регламентирует параметры его качества. Нами были определены биологические, химические, технологические, микробиологические параметры сырья коровяка джунгарского. Показатели сырья были определены соответственно ГФ РК, а также Европейской фармакопеи.

Определение влажности сырья. Потерю в массе при высушивании определяли по методике, предложенной в ГФ РК I, т. 1, 2.2.32. Результаты испытаний приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Определение влажности сырья коровяка джунгарского

№	Серия	Потеря в массе при высушивании ЛРС, %
1	VS00201401	9.45
2	VS00201402	9.46
3	VS00201403	9.39
4	VS00201501	9.39
5	VS00201502	9.42
6	VS00201503	9.45

Установлено, что потеря в массе при высушивании для ЛРС коровьяка джунгарского составило не более 10%.

Определение содержания золы общей и золы нерастворимой в кислоте хлороводородной

Определение золы общей и золы нерастворимой в кислоте хлороводородной проводили соответственно требованиям ГФ РК ГФ РК I, т. 1, *2.8.1*. Содержание золы общей для изучаемого ЛРС не превышало 8%, а золы нерастворимой в кислоте хлороводородной – 2%. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Определение зольности сырья коровьяка джунгарского

№	Серия	Зола общая, %	Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной
1	VS00201401	7.60	1.41
2	VS00201402	7.31	1.32
3	VS00201403	7.52	1.40
4	VS00201501	7.60	1.43
5	VS00201502	7.41	1.44
6	VS00201503	7.50	1.42

Определение содержания экстрактивных веществ

Определение содержания суммы в ЛРС коровьяка джунгарского экстрактивных веществ проводили согласно методике ГФ РК. В качестве растворителей использовались вода и спирт этиловый в различных концентрациях (таблица 12).

Таблица 12 – Определение содержания экстрактивных веществ сырья коровьяка джунгарского

№	Серия	Содержание экстрактивных веществ, %				
		Вода очищенная	Спирт этиловый 20%	Спирт этиловый 40%	Спирт этиловый 70%	Спирт этиловый 96%
1	VS00201401	19.560	14.320	17.875	20.886	15.436
2	VS00201402	18.895	14.578	18.230	19.974	14.987
3	VS00201403	19.015	14.872	18.020	20.583	15.632

В результате эксперимента нами было выявлено, что наивысшее содержание экстрактивных веществ извлекается спиртом этиловым 70% и водой, тогда как наименьшее – спиртом этиловым 20%.

Разработка критериев подлинности для ЛРС коровьяка джунгарского

Критериями подлинности сырья коровьяка являются коэффициент набухания – реакция на слизи, коэффициент пенообразования – реакция на сапонины, реакция на флавоноиды – комплексные соединения с 1-2% спиртовым раствором хлористого алюминия имеют желтое или желто-зеленое окрашивание. Коэффициент набухания сырья коровьяка джунгарского определяли с использованием методики, предложенной европейской фармакопеей (таблица 13).

Таблица 13 – Определение критериев подлинности сырья коровьяка джунгарского

№	Серия	Коэффициент набухания	Коэффициент пенообразования	Качественная реакция на флавоноиды
1	VS00201401	11	Соотв.	Соотв.
2	VS00201402	10.5	Соотв.	Соотв.
3	VS00201403	11	Соотв.	Соотв.
4	VS00201501	11	Соотв.	Соотв.
5	VS00201502	10	Соотв.	Соотв.
6	VS00201503	10.5	Соотв.	Соотв.

3.2.3 Разработка методики количественного определения актеозида в сырье коровьяка джунгарского

Методику определения актеозида в сырье коровьяка джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*) проводили методом ВЭЖХ.

Использовали стандартный образец актеозида, производимый фирмой Phyto Plan (Германия), метиловый спирт и 0,2% уксусную кислоту, производимые фирмой Sigma-Aldrich (Швейцария).

Приготовление экстракта

10,00 г (точная навеска) измельченного сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 355 мкм помещают в плоскодонную колбу, приливают 130 мл метанола и экстрагируют на ультразвуковой ванне в течение 30 минут. Полученный раствор центрифугируют в течение 10 минут при скорости вращения 12000 об/мин и декантируют насадочную жидкость в мерную колбу вместимостью 250 мл. Экстракцию повторяют дважды в тех же условиях с 50 мл метанола спирта при втором контакте фаз и 70 мл при третьем. Объем объединенного извлечения доводят спиртом метиловым до метки.

Приготовление стандартного образца актеозида

0,0025 г (точная навеска) стандартного образца актеозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки спиртом метиловым и перемешивают.

Хроматографический анализ. Анализ проводят методом ВЭЖХ, используя хроматографическую систему Agilent 1100 с детектором на диодной матрице.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Supelcosil ABZ+PLUS (15 см *4,6 мм; 3 мкм). Разделение проводили методом обращено-фазной ВЭЖХ, в качестве подвижной фазы использовали систему, состоящую из 2 элюентов: А – метиловый спирт и В – 0,2% уксусная кислота. Детектирование пиков проводят при длине волны $\lambda = 330$ нм. Температура термостата колонки – 30°C, скорость потока – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 0,5 мкл, время хроматографирования – 40 мин.

Количественное определение проводили с применением внешнего стандарта, используя калибровочный график, который получают из данных анализов 5 разведений (0,2; 0,5; 1; 2; 5 мкл) стандартного образца актеозида. Был установлен коэффициент регрессии калибровочной кривой (R^2) идентифицированных пиков, который равен 0.99993 (рисунок 16).

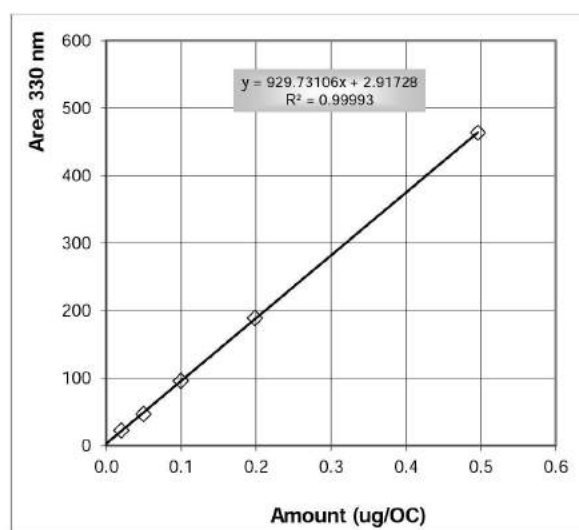


Рисунок 16 – График калибровочной кривой

При разработке методики необходимо было подобрать оптимальные хроматографические условия. При выборе состава подвижной фазы были исследованы смеси различных растворителей в различных соотношениях и при разном режиме элюирования, учитывая растворимость актеозида. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве подвижной фазы метилового спирта (А) и 0,2% уксусной кислоты (В). От 0 по 35 минуту использовали 10% элюента А и 90% элюента В, с 36 минуты – 100% элюента А.

Для анализа 1 мкл испытуемого раствора и 1 мкл раствора стандартного образца актеозида попеременно вводили в колонку хроматографа. На рисунке 16 представлена хроматограмма исследуемого раствора.

Из представленной на Рисунке 17 хроматограммы видно, что время удерживания актеозида при анализе исследуемого экстракта коровяка джунгарского составило 14.318 минут, для стандартного образца актеозида время удерживания составило 14.327 минут. Время удерживания исследуемого вещества, находящегося в испытуемом растворе, не значительно отличается от

времени удерживания стандартного образца актеозиды. На рисунке 18 представлена хроматограмма стандартного образца актеозиды [160].

Содержание актеозиды (%) в испытуемом растворе вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_w \times V \times 100}{V_o \times 10 \times 1000}$$

Где A_w – концентрация актеозиды в введенном растворе, мкг/мл;

V – объем растворителя испытуемого раствора, мл;

V_o – объем вводимой пробы, мкл.

Содержание актеозиды в сырье коровяка джунгарского должно составлять не менее 0.5%.

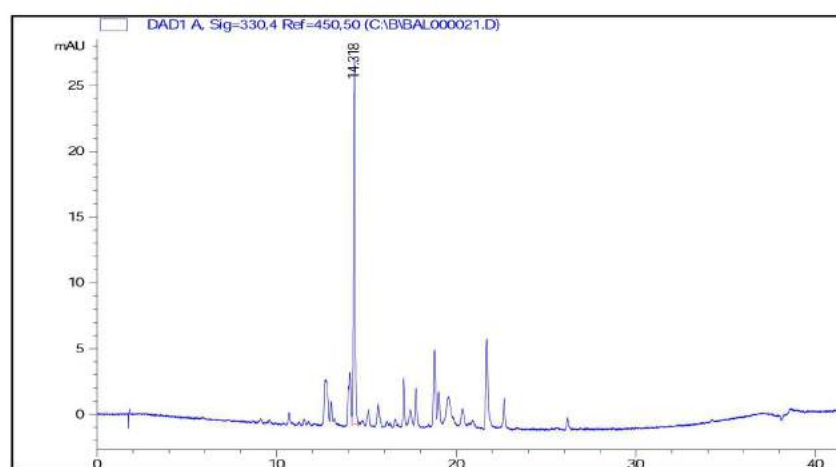


Рисунок 17 - Хроматограмма исследуемого раствора

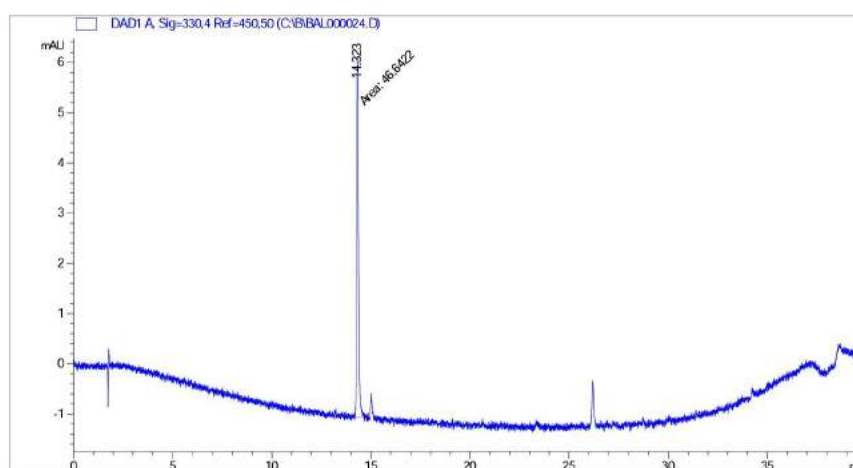


Рисунок 18 - Хроматограмма стандартного образца актеозиды

3.2.4 Валидация методики количественного определения

Валидацию разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, внутренняя (повторяемость) и промежуточная прецизионность, пригодность хроматографической системы и робастность.

Специфичность метода основана на возможности избирательного разделения хроматографической зоны основного действующего вещества от других возможных зон на хроматограмме и устойчивости положения хроматографической зоны основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора в сравнении с хроматограммой стандартного образца актеозиды. Для проверки специфичности методики были получены хроматограммы подвижной фазы и растворов стандартного образца актеозиды. Как видно из рисунка 19, на хроматограмме подвижной фазы отсутствуют пики, мешающие определению актеозиды.

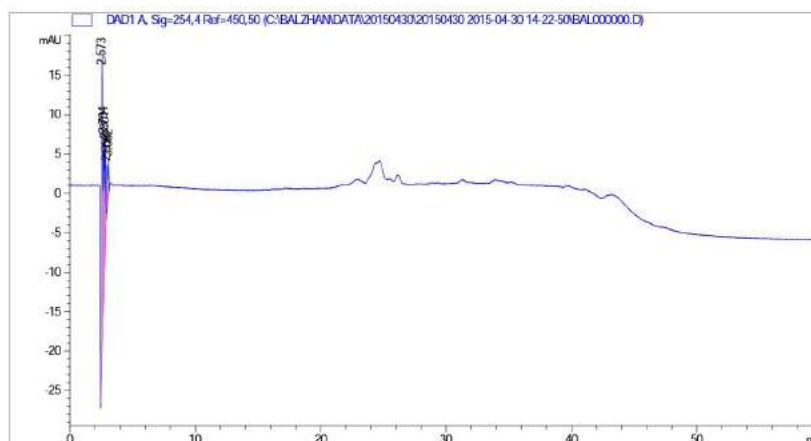


Рисунок 19 – Хроматограмма подвижной фазы

Пригодность системы характеризует надежность анализа в заданных условиях его проведения. Хроматографические параметры (Табл. 14) находятся в пределах, рекомендуемых FDA «Validation of Chromatographic Methods». Это указывает на то, что полученные результаты высоконнадёжны. С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 0.5 и 1 мкл раствора. В Таблице приведен расчет показателей хроматографической системы.

Линейность методики характеризует наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Из формулы, приведенной выше, видно, что содержание актеозиды (X) прямо пропорционально величине сигнала. Поэтому под линейностью можно понимать возможность методики давать расчетные значения концентрации, прямо пропорциональные истинной концентрации анализируемого вещества. Такое определение линейности, которое используется в настоящей работе, полностью соответствует официальным рекомендациям [161, 162].

Коэффициент корреляции равен 0.9998, что соответствует требованиям [163]. Уравнение зависимости истинного от найденного значения концентрации актеозиды имеет вид $y=0.993x+0.0199$. Линейность методики количественного определения содержания актеозиды в сырье коровяка джунгарского представлена на Рисунке 20.

Таблица 14 – Пригодность хроматографической системы

Параметр хроматографической системы	Полученное среднее значение параметра	Нормативный показатель для включения в нормативную документацию
Эффективность хроматографической колонки (N)	304586±3336.13	Не менее 300000
Коэффициент асимметрии (Т)	0.792±0.03	Не более 1
Относительное стандартное отклонение найденного значения содержания актеозиды в испытуемом растворе (RSD).	1.66	Не более 2 %

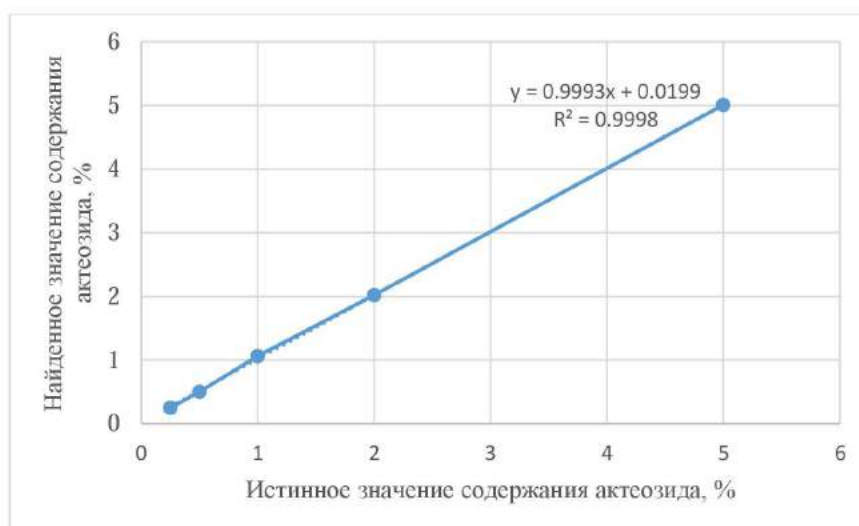


Рисунок 20 – График зависимости найденного значения содержания актеозиды от истинного значения

Повторяемость (внутренняя прецизионность) указывает на сходимость полученных значений концентраций анализируемого вещества. Как видно из таблицы 15, результаты статистически эквивалентны.

Промежуточная прецизионность отражает внутрिलाбораторную изменчивость. Полученные результаты показывают, что методика воспроизводима, так как относительная стандартное отклонение определения актеозиды в первый и второй дни анализа находится в диапазоне от 1.8 до 1.9 % (таблица 15).

Таблица 15 – Оценка повторяемости методики

	1 день определения		2 день определения	
	Масса навески сырья коровьяка джунгарского, г	Содержание актеозида в сырье коровьяка джунгарского, %	Масса навески сырья коровьяка джунгарского, г	Содержание актеозида в сырье коровьяка джунгарского, %
1	10.0	0.5105	10.0	0.5226
2	10.0	0.4926	10.0	0.5106
3	10.0	0.4967	10.0	0.4867
4	10.0	0.5126	10.0	0.4927
	Метрологическая характеристика		Метрологическая характеристика	
	$\bar{x}=0.503$		$\bar{x}=0.503$	
	$\Delta x=0.0099$		$\Delta x=0.016$	
	RSD=1.8		RSD=1.9	

Правильность характеризует близость получаемых с помощью данной методики результатов к истинному значению на всем диапазоне аналитической области методики. Критерием приемлемой правильности является процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100 %, и его средняя величина должна находиться в пределах от 95 до 100 %. Как видно из таблицы 16, данный параметр находится в области от 100.08 до 100.77 %.

Таблица 16 – Оценка правильности методики

Ожидаемое содержание Актеозида в 1 г сырья коровьяка джунгарского, мг	Полученное содержание Актеозида в 1 г сырья коровьяка джунгарского, мг	Процент восстановления, %	Средний процент восстановления, % (n=4)	Относительное стандартное отклонение, % (RSD)
1	2	3	4	5
2.50	2.503	100.12	100.12	0.19
	2.504	100.16		
	2.497	99.88		
	2.509	100.36		
5.00	5.105	102.1	100.62	1.98
	4.926	98.52		
	5.126	102.52		
	4.967	99.34		

Продолжение таблицы 16				
1	2	3	4	5
10.00	10.310 9.752 10.252 9.927	103.1 97.52 102.52 99.27	100.6	2.64
20.00	20.42 19.920 19.950 20.322	102.1 99.6 99.75 101.61	100.77	1.27
50.00	50.108 50.203 49.932 49.917	100.21 100.41 99.86 99.834	100.08	0.28

Таким образом, предложенная методика позволяет определить содержание актеозида в сырье коровьяка джунгарского с малой погрешностью. Достоинствами методики также являются простота и возможность определения актеозида без предварительного его отделения.

3.2.5 Разработка спецификации качества на сырье коровьяка джунгарского

На основе проведенных исследований по установлению морфолого-анатомических, химических, физико-химических, микробиологических и технологических признаков разработана спецификация качества на сырье коровьяка джунгарского (таблица 17).

Таблица 17 – Показатели качества сырья коровьяка джунгарского

Показатели Качества	Регламентируемые нормы	Методы испытаний
1	2	3
Определение	Высушенные полностью распутившиеся цветки дикорастущего травянистого растения коровьяка джунгарского (<i>Verbascum songaricum</i> Schrenk).	В соответствии с АНД
Идентификация	А. Соответствует по внешним признакам.	ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Определение морфологических групп лекарственных растений» «цветки»

Продолжение таблицы 17

1	2	3
	<p>В. При рассмотрении порошка травы под микроскопом наблюдаются соответствующие диагностические элементы</p> <p>С. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются последовательно зоны рутина, гиперозида и кислоты кофейной снизу-вверх. На хроматограмме испытуемого раствора могут обнаруживаться дополнительные зоны.</p> <p>Д. Образуется стойкая пена (сапонины)</p>	<p>ГФ РК I, т. 1, «Методы испытаний лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» ТСХ, ГФ РК I, т. 1, 2.2.27</p> <p>Качественная реакция</p>
<p>Посторонние примеси: - коричневых лепестков - кусочков чашечки и других посторонних веществ</p>	<p>Не более 5 %</p> <p>Не более 2 %</p>	<p>ГФ РК I, т. 1, 2.8.2</p>
<p>Коэффициент набухания</p>	<p>Не менее 9</p>	<p>European Pharmacopoeia 8.0 (2.8.4.)</p>
<p>Потеря в массе при высушивании</p>	<p>Не более 12 %</p>	<p>ГФ РК I, т. 1, 2.2.32</p>
<p>Зола общая</p>	<p>Не более 6 %</p>	<p>ГФ РК I, т. 1, 2.4.16</p>
<p>Золы нерастворимой в кислоте хлороводородной</p>	<p>Не более 2 %</p>	<p>ГФ РК I, т. 1, 2.8.1.</p>

Продолжение таблицы 17		
1	2	3
Микробиологическая чистота	Сырье должно соответствовать требованиям ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 4 А. В 1 г сырья допускается общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не более 10^7 бактерий, не более 10^5 грибов и не более 10^2 <i>Escherichia coli</i> .	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12 и ГФ РК I, т. 2, 2.6.13
Радионуклиды	не должно превышать по цезию 137 – 400 Бк/кг, стронцию 90 – 200 Бк/кг	Санитарные правила от 27.02.2015г. №155.
Количественное определение - актеозида	не менее 0,5 %	ВЭЖХ, ГФ РК I, т. 1, 2.8.12
Упаковка	Сырье упаковывают по 10 кг в мешки по ГОСТ 30090-93	В соответствии с АНД
Маркировка	На этикетке на государственном и русском языках указывают страну-заготовитель, предприятие-заготовитель, его товарный знак и адрес, название сырья, массу нетто, условия хранения, дату заготовки сырья, номер партии, срок хранения.	В соответствии с АНД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90.	ГОСТ 17768-90
Хранение	При температуре не выше 25 °С, в сухом, защищенном от света месте.	В соответствии с АНД
Срок хранения	2 года	В соответствии с АНД
Фармакологическое действие	Противовоспалительное средство	

3.2.6 Исследование стабильности сырья коровяка джунгарского

Исследование стабильности сырья коровяка джунгарского проводили с использованием метода долгосрочных испытаний. Образцы сырья, находящиеся на изучении стабильности, подлежали проверке по показателям качества АНД на сырье в следующие сроки: в 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяца (таблица 18).

Таблица 18 – Результаты испытания стабильности сырья коровьяка джунгарского

Условия хранения: $t=25\pm 2$ °С, RH=60±5 % Начало исследования: 15.06.14. конец исследования: 15.06.16.		Месяцы						
Параметры качества	Регламентируемые нормы	0	3	6	9	12	18	24
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Определение	Высушенные полностью распустившиеся цветки дикорастущего травянистого растения коровьяка джунгарского (<i>Verbascum songaricum</i> Schrenk)	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .
Идентификация	А. Соответствует по внешним признакам. В. При рассмотрении порошка травы под микроскопом наблюдаются соответствующие диагностические элементы. С. На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются последовательно зоны кверцетина, гиперозида и кислоты кофейной снизу-вверх. D. Образуется стойкая пена (сапонины)	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .
Коэффициент набухания	Не менее 9	11	11	11	11	11	11	11

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Посторонние примеси коричневых лепестков - кусочков чашечки и других посторонних веществ	Не более 5 %	4%	4%	4%	4%	4%	4%	4%
	Не более 2 %	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Потеря в массе при высушивании	Не более 12%	9.2 %	10.5%	10.6%	10.2%	10.5%	10.3%	10.5%
Зола общая	Не более 6%	4.8%	4.9%	5.2%	5.5%	5.3 %	5.5%	5.6%
Зола нерастворимая в кислоте хлороводородной	Не более 2%	0.8%	0.8%	0.8%	0.7%	0.8%	0.7%	0.7%
Микробиологическая чистота	В 1 грамме сырья допускается наличия не более 10^5 аэробных бактерий, не более 10^4 грибов (суммарно), не более 10^3 энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий. В 1 грамме сырья не допускается наличие <i>Escherichia coli</i> ; в 10 г сырья не допускается наличия <i>Salmonella</i> .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .	Соотв .
Количественное определение	Не менее 0,5%	0.53%	0.53%	0.53%	0.53%	0.52%	0.52%	0.52%

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТА КОРОВЯКА ДЖУНГАРСКОГО

4.1. Получение различных экстрактов коровяка джунгарского. Подбор оптимальных условий экстрагирования

Экстракция (экстрагирование, диффузия) - это процесс извлечения суммы или индивидуальных биологически активных веществ из сложного по составу сырья с применением растворителя. Экстрагирование лекарственного растительного сырья является одной из наиболее продолжительных этапов его переработки.

Существует классификация всех способов экстрагирования на статические и динамические методы. Статические способы осуществляются за счет периодического заливания сырья экстрагентом и настаивания в течение определенного времени. Динамические способы заключаются в постоянной смене растворителя, или растворителя и сырья. Среди статических и динамических методов экстрагирования можно выделить периодические – когда экстрагирование одного или нескольких фрагментов сырья осуществляется в течение определенного времени, то есть подача материала (растворителя и/или растительного сырья) в экстракционные установки осуществляется периодически. К числу статических периодических методов можно отнести одноступенчатые – это мацерация, а многоступенчатым – ремацерацию, а также циркуляция с переменным сливом (многоступенчатые прямоточные), а также реперколяция с периодическим сливанием - многоступенчатые противоточные.

К числу динамических периодических методов относят одноступенчатые и многоступенчатые, которые представляют собой перколяцию и реперколяцию с законченным и незаконченным циклами соответственно.

В числе динамических способов можно выделить непрерывные (с непрерывной подачей растительного сырья) – прямоточные (экстрагент и растительный материал в одном направлении потока) и противоточные (интенсивное движение экстрагента и растительного материала противоположно друг другу) [164].

Наиболее простыми и удобными в применении способами экстрагирования растительного сырья являются статические, среди которых самый простейший метод – это мацерация, метод настаивания (лат. *macerare* – вымачивать, намачивать), который применяется для изготовления различных экстрактов и настоек. Немного сложнее ремацерационные способы неоднократного настаивания, например, метод бисмацерации, который широко применяется в настоящее время при производстве густых и сухих экстрактов.

На данный момент метод мацерации не всегда отвечает современным требованиям интенсификации технологии производства и применяется в редких случаях.

Преимуществами этого метода является простота способа и оборудования. Недостатками же служат:

- а) неполнота экстракции биологически веществ веществ (менее 90%);

б) долгая продолжительность;
в) повышенное содержание веществ балластной природы в извлечениях (слизи, ВМС, пектины, белки и др.);

г) высокая трудоемкость процесса (двойное прессование, промывка шрота).

В связи с чем в настоящее время внедряются новые модифицированные виды мацерации, которые позволяют максимальной динамизировать диффузионные процессы. Примерами модификаций мацерации являются:

- Дробная мацерация;
- Ультразвуковая экстракция (акустическая);
- Электроимпульсная обработка сырья;
- Центробежная экстракция;
- Вихревая экстракция и т.д.

Известно, существенное воздействие ультразвуковых колебаний на систему твердое тело – жидкость (экстрагент), которое приводит к следующим результатам: тепловое воздействие вследствие поглощения ультразвуковой энергии; повышение скорости массообменного процесса в порах растительного материала (твёрдой фазы) ввиду аномально глубокого проникновения растворителя в капилляры и поры твердой матрицы; ускорение диффузионных процессов. Прежде всего интенсификация процесса экстракции под воздействием ультразвука объясняется возникновением кавитационного эффекта [165].

Механизм ультразвуковой кавитации заключается в образовании в жидкости под действием ультразвуковых колебаний огромного числа пульсирующих пузырьков, заполненных паром или газом. Распространение ультразвуковой волны в экстрагенте способствует возникновению переменного звукового давления, амплитуда которого может достигать порядка нескольких атмосфер. В результате этого давления экстрагент периодически испытывает сжатие и растяжение. Возможно сжать жидкость без существенной модификации ее свойств. По-другому будет обстоять дело при создании в жидкости разрежения, когда простое снижение давления над водой способствует закипанию и парообразованию внутри воды. Кое-что аналогичное происходит вследствие распространения ультразвуковой волны в жидкости, то есть растягивающие усилия в периметре разрежения волны способствуют образованию в жидкости пузырьков, которые получили название кавитационных. Кавитационные пузырьки образуются в жидкости в определенной области каждый раз, когда этой области достигает фаза разрежения ультразвуковой волны. Обычно кавитационные пузырьки существуют не долго, так как уже следующая после разрежения фаза сжатия приводит к захлопыванию большинства из них. По этой причине кавитационные пузырьки исчезают практически сразу после прекращения облучения растворителя ультразвуком. В процессе захлопывания пузырьков газа образуются большие локальные давления свыше тысяч атмосфер, возникают сферические ударные волны. Далее рядом с пульсирующими пузырьками образуются акустические микропотоки. Так как количество кавитационных

пузырьков много и их захлопывание происходит более тысячи раз в секунду, такого рода давления способствуют механическим разрушениям поверхности твердого тела [166].

Большинство производственных предприятий осуществляет экстрагирование малоэффективными, трудоемкими и длительными методами перколяции и мацерации. Использование ультразвука — один из наиболее перспективных и эффективных методов интенсификации экстрагирования растительного сырья. Ультразвуковой метод экстрагирования сырья позволяет значительно сократить длительность процесса и увеличить селективность извлекаемых веществ. При воздействии ультразвуковых волн, как следстви, нарушается поверхностный диффузионный слой, тем самым, происходит углубление проникновения экстрагента в материал. В результате чего растительный материал набухает гораздо быстрее, возникают турбулентные и вихревые потоки, которые способствуют скорейшему переносу масс и растворению биологически активных веществ. При этом происходит интенсивное движение всего содержимого клетки, что невозможно осуществить при использовании других способов экстрагирования. Тем самым, это приводит к существенному ускорению процесса перехода биологически активных веществ из сырья в экстрагент. Ультразвуковую экстракцию проводят в ультразвуковой ванне (рисунок 21) [167].



Рисунок 21 – Процесс ультразвуковой экстракции

На эффективность процесса ультразвуковой экстракции влияют следующие параметры: интенсивность ультразвукового облучения, его продолжительность, температура термостата, а также процентное соотношение лекарственного растительного сырья и растворителя. По данным мировой научной литературы оптимальной частотой облучения является 21 – 22 КГц, наиболее рекомендуемая плотность – не более 2 – 2,2 Вт/см², а соотношение твердой фазы к растворителю – не более 10%. В процессе экстрагирования в перерывах между ультразвуковой облучением следует проводить перемешивание. Важно отметить тот факт, что долгая продолжительность экстрагирования не повышает степени извлечения БАВ, но при этом заметно воздействует на их устойчивость.

Тем самым нами наиболее оптимальным способом экстрагирования была выбрана ультразвуковая экстракция.

Метанольный экстракт. Сухое измельченное растительное сырье коровяка джунгарского экстрагируют метанолом (Sigma-Aldrich, Германия) в соотношении 1:10 с использованием метода ультразвуковой экстракции. Экстрагируют последовательно 3 раза в ультразвуковой ванне в течение 1 часа и фильтрат упаривают под вакуумом на роторном испарителе при 30 °С досуха. Температура выпаривания была подобрана увеличением температуры от 0 до 40°С. Учитывалась температура испарения растворителя, но образование стойкой пены при повышении температуры термостата до 40°С, позволило сделать вывод, что оптимальной температурой выпаривания экстракта является 30 °С.

Гексановый экстракт. Жидкость-жидкостная экстракция - метод разделения и концентрирования веществ, основанный на их различном распределении между двумя несмешивающимися жидкими фазами, обычно между водой и несмешивающимся с ней органическим растворителем. В делительную воронку наливаем 700 мл метанольного экстракта, 70 мл воды и 400 мл гексана, интенсивно встряхивают метанольный экстракт с гексаном в делительной воронке. После разделения слоев отделяют гексановую часть. К оставшейся метанольной части в делительную воронку доливают еще 400 мл гексана и повторяют процедуру еще 2 раза. Жидкий экстракт выпаривают до суха на роторном испарителе при 40°С.

Хлороформный экстракт. Оставшуюся метанольную часть выпаривают на роторном испарителе до 150 мл и наливают раствор в делительную воронку, добавляют 700 мл воды и 350 мл хлороформа и встряхивают с хлороформом в делительной воронке и после расслоения жидкостей выливают их последовательно из воронки. Экстрагирование с тем количеством хлороформа повторяют еще 2 раза. Полученный хлороформный экстракт выпаривают до суха на роторном испарителе при 40°С.

Этилацетатный экстракт. В делительную воронку к оставшемуся раствору (700 мл) наливают 350мл этилацетата, встряхивают раствор с этилацетатом и после расслоения жидкостей выливают их последовательно из воронки. Экстрагирование с тем количеством этилацетата повторяют еще 2 раза. Полученный этилацетатный экстракт выпаривают до суха на роторном испарителе при 40°С.

Водный экстракт. Водный экстракт получали с использованием метода жидкость-жидкостной экстракции. Жидкий водный экстракт высушивали с применением лиофильной сушилки. Процесс лиофильной сушки, происходящий в сублиматоре, состоит из трех фаз: самозамораживания, сублимации и удаления остаточной влаги испарением. Интенсивность процесса в большой степени зависит от величины вакуума, которая определяет режим движения (оттока) парогазовой смеси. Самозамораживание происходит при интенсивном испарении части влаги и непрерывно возрастающем вакууме. Из материала за период испарения удаляется обычно 10-15 % содержащейся влаги, причем часть капиллярной и осмотически связанной. В процессе сублимации удаляется 40-

50% и более влаги [168]. Схема получения экстрактов коровяка джунгарского представлена на рисунке 22.

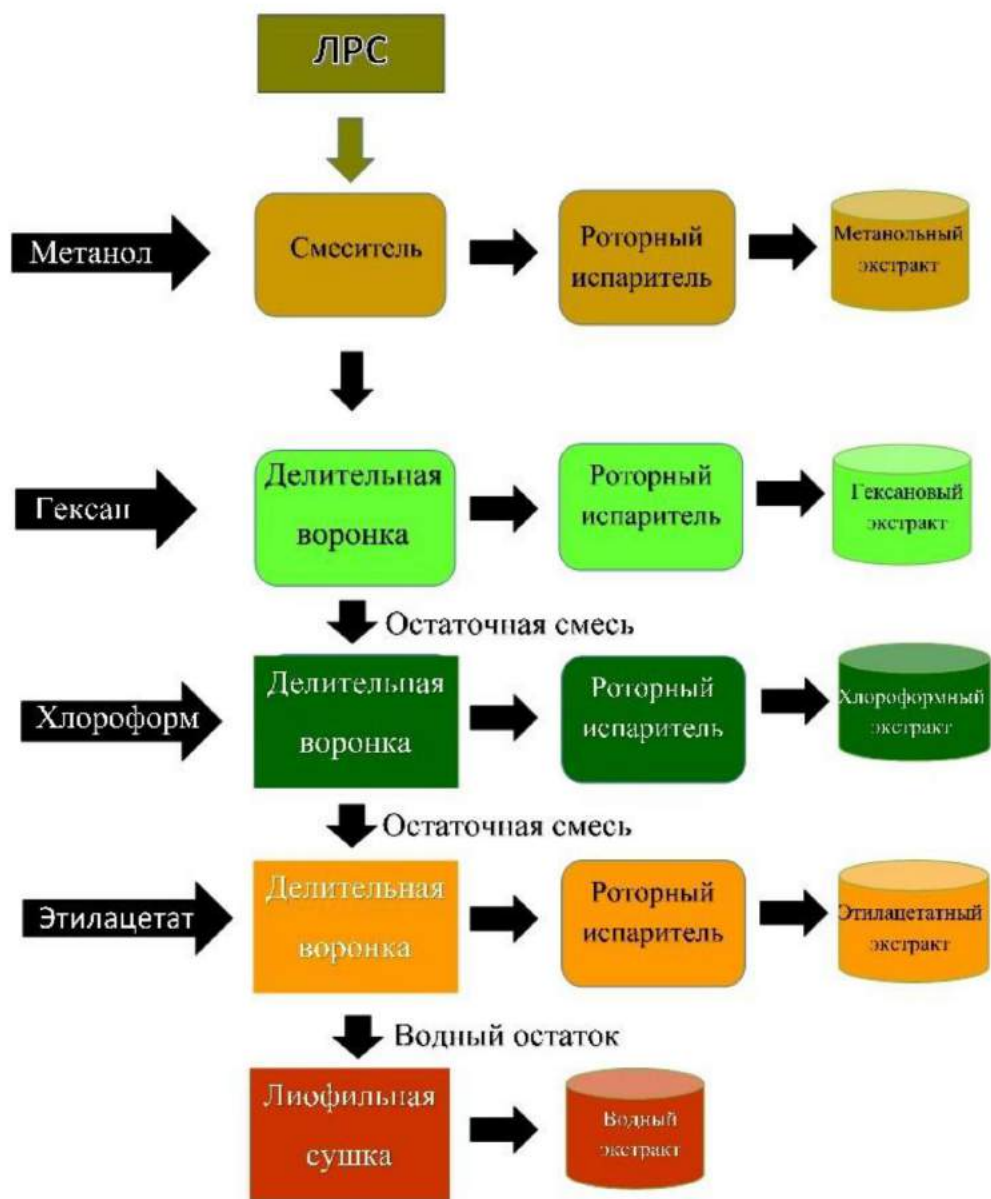


Рисунок 22 – Схема получения экстрактов коровяка джунгарского

4.2 Изучение факторов, влияющих на полноту экстрагирования путем биоскрининга

Исследование антимикробной активности полученных экстрактов

Для исследования антимикробной активности разработанных нами экстрактов был выбран метод микроразведений. Анализ был проведен на штаммах *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

Растения рода *Verbascum* L. содержат такие биологически активные соединения, как флавоноиды, фенилэтанойдные и неолигнанные гликозиды,

сапонины, а также иридоидные и монотерпеновые гликозиды. На данный момент в научной литературе существует большое количество публикаций по исследованию антимикробной активности различных видов *Verbascum*. Метанольные экстракты *V. gypsicola* Vural and Aydogdu, *V. pseudoholotrichum* Hub.-Mor., *V. cymigerum* Hub.-Mor., *V. cholorostegium* Bornm and Murb, *V. linguifolium* Hub.Mor., *V. pellitum* Hub.-Mor., *V. dalamicum* Hub.- Mor., *V. chionophyllum* Hub.-Mor., *V. cilicium* Boiss, *V. trapifolium* (Stapf) Hub-Mor., *V. meinckeanum* Murb и *V. lyratifolium* Kochel были изучены относительно их антимикробного действия по отношению к *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *M. smegmatis*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *C. albicans*, *R. rubra* и *K. fragilis* методом диск-диффузии. Экстракты коровяка показали высокую антимикробную активность против грамположительных бактерий дрожжевых культур, использованных в этих исследованиях. В другом исследовании была исследована антимикробная активность метанольных экстрактов цветков, листьев, семян и корней *V. phlomoides*, *V. blattaria*, *V. nigrum*, *V. bombyciferum*, *V. chaixii*, *V. dumulosum*, *V. olympicum*, *V. phoeniceum* и *V. roripifolium* против *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *C. albicans*. Было установлено, что антимикробная активность метанольного экстракта *V. sinuatum* показали ингибирование против всех испытанных штаммов бактерий (МИС между 15,5 и 250 мкг / мл).

Результаты исследования антимикробной активности по отношению к вышеуказанным штаммам различных экстрактов коровяка джунгарского представлены на рисунках 23 и 24.

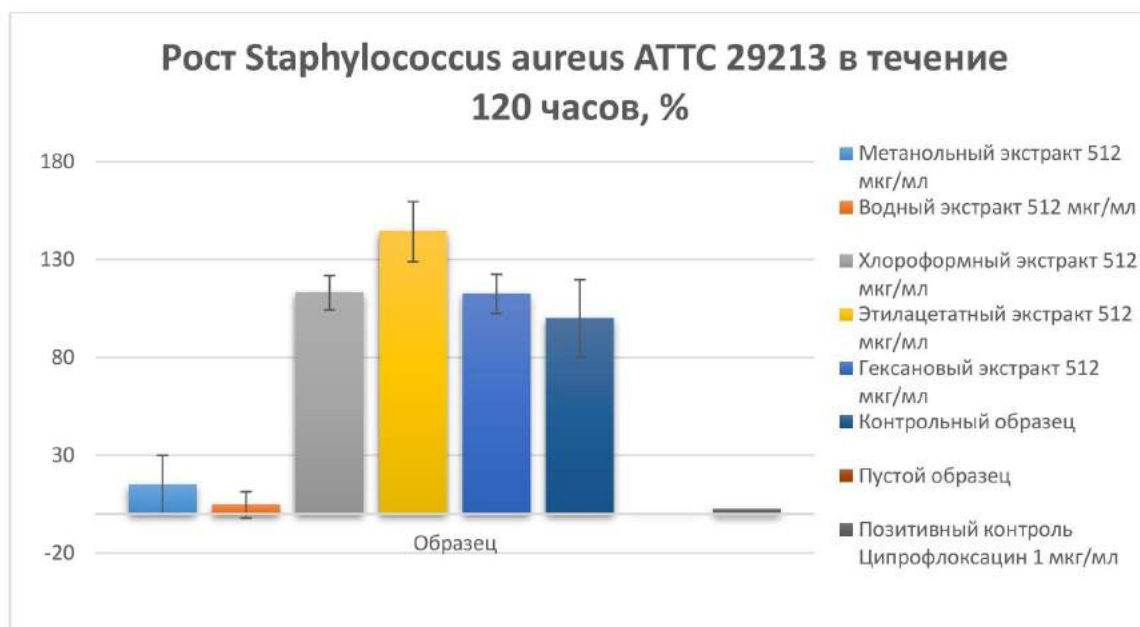


Рисунок 23 – Рост *Staphylococcus aureus* ATTC 29213 в течение 120 часов, %

Как видно из Рисунка 22, хлороформный, этилацетатный и гексановый экстракты не показали антимикробное действие. В то время как, Водный

экстракт показал высокую активность против *Staphylococcus aureus*. (рост = 4,5837%), что сопоставимо с активностью стандартного антибиотика (рост = 2,4397%). А также обнаружена чувствительность *Staphylococcus aureus* к метанольному экстракту *V. songaricum*, процент ингибирования составил 85,1770%.

Результаты изучения влияния экстрактов коровяка на *Candida albicans* показали отсутствие антимикробной активности. Наихудшую активность продемонстрировал водный экстракт коровяка джунгарского.

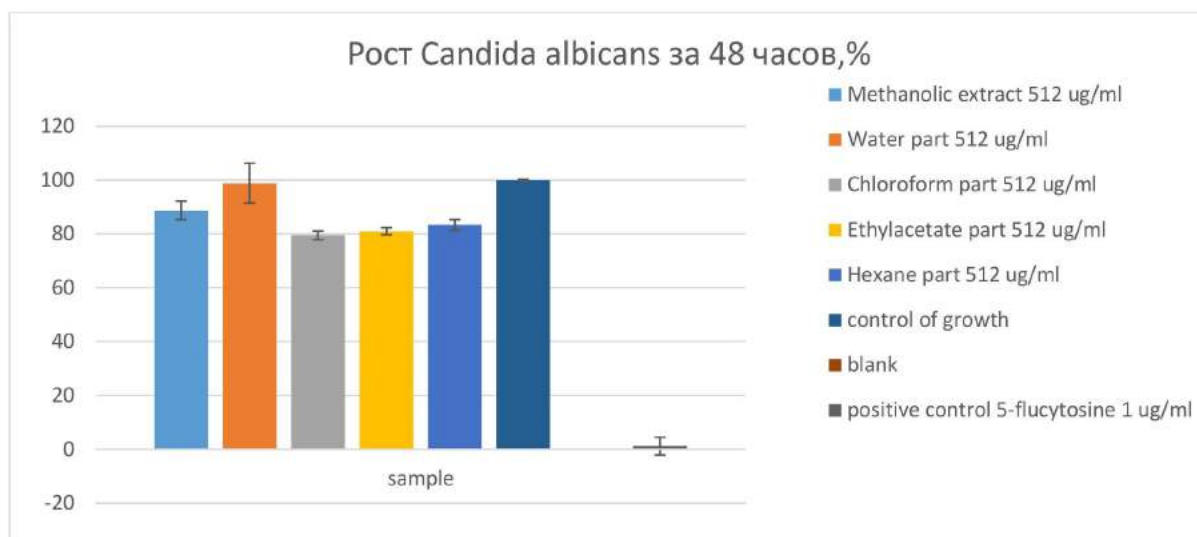


Рисунок 24 – Рост *Candida albicans* в течение 48 часов, %

На основании полученных результатов нами было выявлено, что вода и метанол являются лучшими растворителями для извлечения антимикробных веществ против *Staphylococcus aureus* из цветков коровяка джунгарского.

В заключение, высокое значение антибактериальной активности водного и метанольного экстрактов *Verbascum songaricum Schrenk* в отношении *Staphylococcus aureus* является предпосылкой к открытию новых антибактериальных агентов, что способствует возможности создания новых антибиотиков, которые могли бы служить в качестве селективных агентов против инфекционных заболеваний.

Исследование антиоксидантной активности различных экстрактов коровяка джунгарского

Одной из основных причин патологических изменений в человеческом организме, приводящих к преждевременному старению и развитию многих болезней (известно более 100) является избыточное содержание в биологических жидкостях различного типа соединений радикальной природы. Постоянное повышенное содержание в межклеточных и внутриклеточных биологических жидкостях свободных радикалов (СР) создает условия для развития оксидантного стресса, выражающегося с биохимической точки зрения в том, что СР окисляют стенки сосудов, белки, ДНК, липиды. Свободные радикалы

способны разрывать связи в молекуле ДНК, повреждать генетический аппарат клеток, регулирующий их рост, что приводит к онкологическим заболеваниям. Липопротеиды низкой плотности после окисления могут откладываться на стенках сосудов, что вызывает развитие атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. От воздействия свободных радикалов здоровый организм защищает естественная антиоксидантная система, содержащая ферментные и неферментные вещества. Снижение активности естественной антиоксидантной системы человека и, следовательно, возрастание концентрации свободных радикалов в организме связано со многими неблагоприятными факторами: это радиоактивное и ультрафиолетовое облучение, ухудшение экологической обстановки, широкое распространение социальных заболеваний (алкоголизм, курение, наркомания), постоянные стрессы, потребление загрязненной пищи, неконтролируемый прием некоторых лекарственных препаратов.

Метод ингибирования свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидрази́ла (ДФПГ). Данный быстрый и простой метод широко применяется для скрининга антиоксидантной активности биологически активных веществ различными научно-исследовательскими лабораториями. ДФПГ широко используется для определения способности различного рода соединений действовать в качестве ловушки свободных радикалов или доноров водорода. В радикале ДФПГ запасной электрон делокализован в молекуле и дает глубокий фиолетовый цвет, обнаруживаемый при 517 нм в поглощении. Когда раствор ДПП находится в контакте с антиоксидантом (донорное соединение протона) молекула превращается в его восстановленную форму (гидразин), который имеет бледно-желтый цвет. На рисунке 25 продемонстрирован механизм действия радикала ДФПГ.

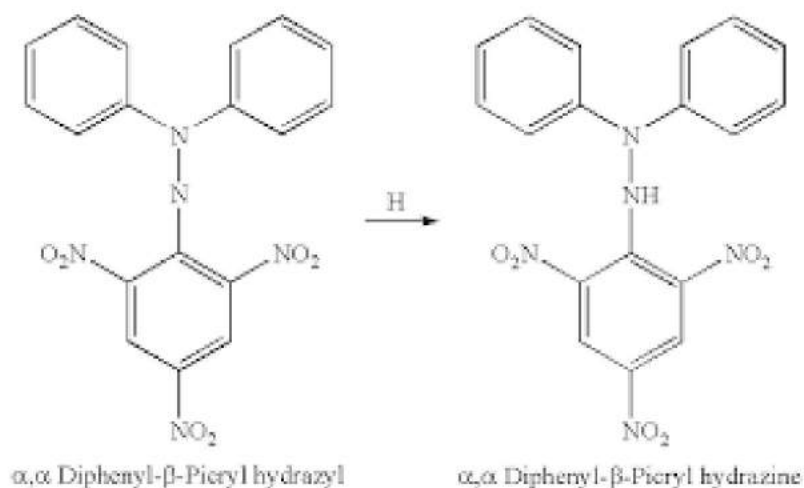


Рисунок 25 – принцип действия радикала ДФПГ

В этой модельной системе используют стандартный антиоксидант сравнения – тролокс. По химической природе он представляет собой водорастворимый аналог витамина Е. Витамин Е – известный и широко применяемый антиоксидант. Его антиоксидантная активность доказана и

хорошо изучена. Токоферолы оказывают антиоксидантное действие, следует отметить, что одна молекула витамина Е способна нейтрализовать два радикальных продукта за счет собственной окислительного превращения, модифицировавшись в нетоксичный токоферолхинон. На рисунке 26 представлены значения активности различных экстрактов коровьяка джунгарского в отношении радикалов ДФПГ.



Рисунок 26 – Антиоксидантная активность экстрактов коровьяка джунгарского по отношению к ДФПГ радикалу

В результате проведенных исследований нами было установлено, что гексановый экстракт на основе цветков коровьяка джунгарского не проявляет активности в отношении свободных радикалов ДФПГ, в связи с чем не применялся в последующих экспериментах. А также было выявлено, что максимальный эффект антиоксидантной активности оказывает метанольный экстракт на основе коровьяка джунгарского. Как видно из Рисунка 25, процент ингибирования ДФПГ радикала экстрактом метанола составил 92.79 ± 0.21 .

Антиоксидантная активность экстрактов по отношению к катион-радикалу АБТС. Метод основан на использовании восстанавливающего агента 2,2'-Азино-бис-3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты (АБТС). Это соединение характеризуется химической стабильностью, низкой токсичностью, хорошей растворимостью в воде. Главным же его достоинством является способность окисляться в ходе пероксидазной или псевдопероксидазной реакции с образованием метастабильного катион-радикала, имеющего высокий коэффициент молярной экстинкции на длинах волн, отличных от спектральных характеристик самого АБТС. катион-радикал АБТС стабилен в течение нескольких минут при комнатной температуре и мгновенно количественно реагирует с несколькими антиоксидантами, такими как Тролокс, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, цистеин, глутатион и билирубин. На рисунке 27 представлен механизм ингибирования катион-радикала АБТС.

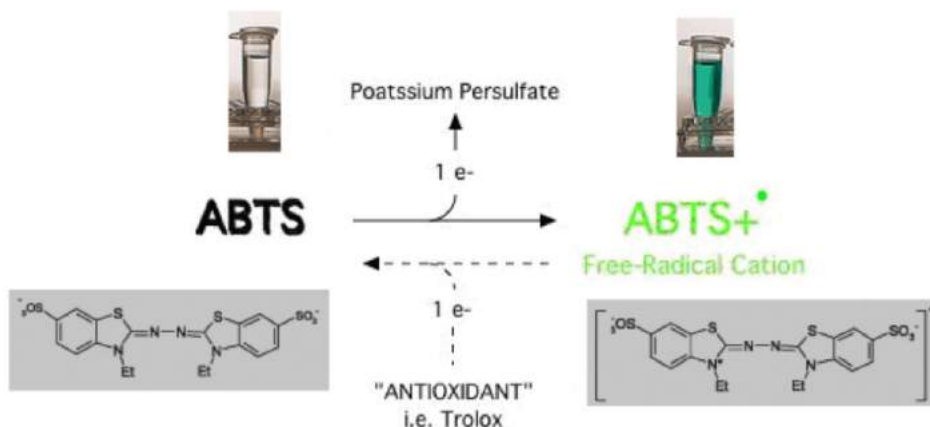


Рисунок 27 – Принцип ингибирования катион-радикала АБТС

В этом анализе АБТС преобразуется в катион-радикал путем добавления персульфата натрия. Этот катион-радикал имеет голубой цвет и поглощает свет при 734 нм. Катион-радикал АБТС является реактивным по отношению к большинству антиоксидантов, включая фенолы, тиолы и витамин С. Во время этой реакции, синий катион-радикал АБТС превращается обратно в бесцветную нейтральную форму. Реакцию можно контролировать спектрофотометрически. Этот анализ часто называют анализом Тролокс эквивалентной антиоксидантной активности (ТЭАА). Реакционную способность различных антиоксидантов испытывают по сравнению с Тролоксом, который представляет собой водорастворимый аналог витамина Е. На рисунке 28 представлены результаты изучения активности экстрактов коровьяка джунгарского по отношению к свободным радикалам АБТС.



Рисунок 28 – Ингибирование АБТС радикала экстрактов коровьяка джунгарского

В результате проведенных исследований по изучению способности экстрактов коровьяка джунгарского ингибировать АБТС радикал было

установлено, что наивысшую активность продемонстрировали этилацетатный и метанольный экстракты, 99,2% и 99,35% соответственно (рисунок 27). Ввиду отсутствия активности гексанового экстракта в предыдущем эксперименте, его способность ингибировать АБТС радикал не была изучена.

Исследование активности разработанных экстрактов ингибировать нитрование тирозина. Пероксинитрит является мощным нитрующим и окислительным агентом, который формируется с помощью быстрой реакции окиси азота с супероксид-анионом. Оксид азота является простым неорганическим радикалом, проявляющим разнообразные физиологические функции, в том числе регуляция нейротрансмиссии и сосудистого тонуса. Пероксинитрит - биологический токсин, производимый в естественных условиях с помощью почти диффузионно-контролируемой реакции окиси азота с супероксидом, способный нитровать и окислять различные биомолекулы, такие как тиолы, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты. В данной работе нами был проведен мониторинг реакции нитрования тирозина в присутствии пероксинитрита и различных экстрактов коровяка джунгарского. Эксперимент проводили с помощью метода ВЭЖХ. В ходе исследования нами было отмечено, что высокий процент ингибирования нитрования тирозина показал экстракт метанольный, значение которого составило $67,8 \pm 2,0$. Немаловажным является тот факт, что хлороформный экстракт продемонстрировал наивысшую активность ($86,6 \pm 1,8$), значение которого оказалось выше в сравнении с тролоксом $82,7 \pm 1,5$. Результаты исследования активности экстрактов коровяка джунгарского ингибировать реакцию образования нитротирозина представлены на рисунке 29.

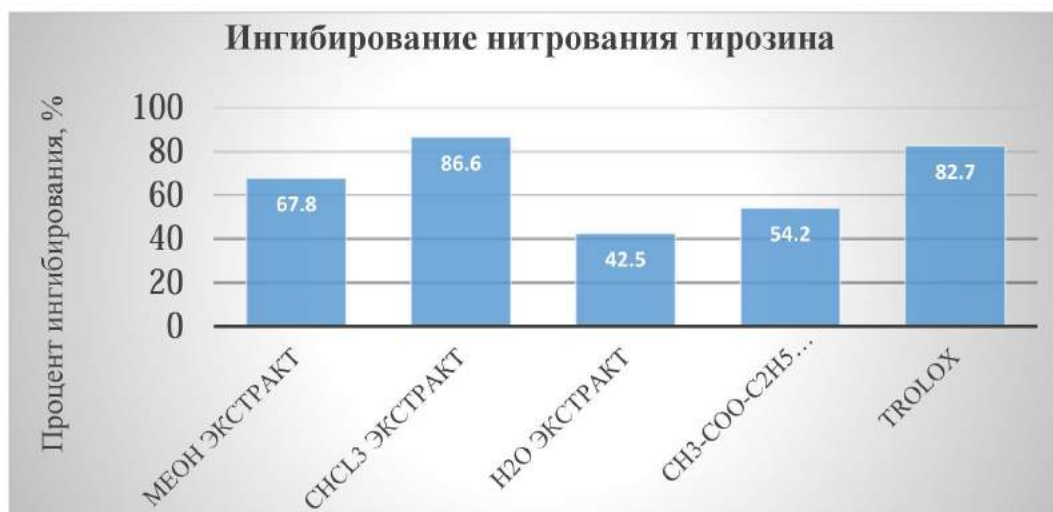


Рисунок 29 – Активность ингибирования пероксинитрита экстрактов коровяка джунгарского

Тем самым, проведенные скрининговые биологические исследования по выбору оптимального способа экстрагирования сырья коровяка джунгарского показали, что наиболее рациональным растворителем для экстракции сырья коровяка джунгарского является метанол.

4.3 Технология производства сухого экстракта коровяка джунгарского

Технология производства экстракта *Verbascum songaricum Schrenk* состоит из следующих стадий: подготовка сырья и вспомогательных веществ, экстрагирование с использованием ультразвука, отстаивание, фильтрование, высушивание экстракта, фасовка, упаковка и маркировка. Каждый этап производства сопровождается контролем качества промежуточной и готовой продукции. Вспомогательные работы включают подготовку помещения и оборудования, а также подготовку персонала.

Вспомогательные работы.

Подготовка производственных помещений. Подготовка аппаратуры и оборудования: Для предупреждения микробной обсемененности продукции технологический процесс осуществляется в условиях максимально ограничивающих возможность загрязнения продукции микрофлорой.

Подготовка персонала к работе: Подготовка персонала к работе осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 52249-2004 и МУ 42–1–11–93 «Подготовка персонала к работе». В гардеробе персонал снимает верхнюю одежду и проходит в помещения санпропускников, где надевает переходную одежду и обувь. В помещении санпропускников персонал снимает переходную одежду, размещает ее в индивидуальных шкафчиках и надевает защитную технологическую одежду и обувь в следующем порядке: головной убор – куртка – брюки – носки – обувь. Далее персонал должен вымыть руки до локтей с мылом, ополоснуть и высушить с помощью воздушной сушилки, при необходимости принять душ и обработать руки установленным дезинфицирующим раствором из дозатора и пройти к месту работы.

Изложение технологического процесса.

Стадия 1. Подготовка сырья. При необходимости сырье просеивают на вибросите или размалывают на мельнице. При просеве (размоле) используют герметичные системы, с вакуумной загрузкой исходного сырья и выгрузкой в приемную тару. В процессе транспорта исходного и просеянного (размолотого) сырья используются силиконовые манжеты, которые обеспечивают беспылевое ведение процессов.

Развес сырья производят в весовых помещениях с использованием медицинских точных весов Российской фирмы «МАССА-К», марки ВЭМ-150 во взрывозащищенном исполнении, все данные протоколируются и заносятся в протокол взвешивания сырья.

Стадия 2. Подготовка экстрагента. На данном этапе осуществляется подготовка необходимого количества растворителя. До начала технологического процесса все ингредиенты и материалы проходят проверку соответствию нормативной документации.

Стадия 3. После загрузки сырья и растворителя в ультразвуковую ванну подается ультразвук. Экстрагирование проводят в течение 1 часа при частоте ультразвука 25кГц. Экстракцию повторяют трижды. В процессе производства проверяются частота ультразвука, температура и время экстракции.

Стадия 4. Отстаивание полученной массы осуществляют в отстойнике после каждого этапа экстрагирования.

Стадия 5. Фильтрация. Фильтрация осуществляется при помощи Фильтр Н75.

Стадия 6. Получение сухого экстракта. Высушивание полученного жидкого экстракта осуществляют на вакуумно-выпарном устройстве при температуре 30°C. Температура сушки установлена в связи с риском вспенивания экстракта при повышении температуры.

Стадия 7. В моечной машина осуществляется мойка и сушка флаконов и крышек. Контроль в процессе производства – температура воды и сушильного аппарата, чистота флаконов и крышек.

Стадия 8. С помощью автомата розлива готовой продукции экстракта коровьяка джунгарского разливается по 50 и 100 г в плотные полимерные банки, круглого сечения в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 3.2.1, и наклеиваемой этикеткой выполненной типографическим способом в соответствии с ГОСТ 7625-86Е. Банки должны иметь воздушное пространство не менее 3 % от всей емкости. Групповая и транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90. На этикетке банки на государственном и на русском языке указывают страна-производитель, товарный знак, торговое название, лекарственная форма, масса содержимого упаковки, условия хранения, «Продукция прошла радиационный контроль», номер серии, дату выпуска и срок годности. Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-986.

Стадия 9. Упаковка флаконов в картонные коробки. Стол для упаковки. Контроль в процессе производства – комплектность, правильность маркировки, проверка печати.

Стадия 10. Упаковка в гофра-тару.

Соответственно приведенному технологическому процессу был составлен технологический регламент, состоящий из следующих разделов: характеристика готовой продукции производства, технологическая схема производства экстракта коровьяка джунгарского, аппаратурная схема производства экстракта и спецификация оборудования, характеристика сырья и вспомогательных веществ, описание технологического процесса, материальный баланс, переработка и утилизация отходов производства, техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария, охрана окружающей среды, технико-экономические нормативы, перечень производственных инструкций.

На рисунках 30 и 31 представлены технологическая и аппаратурная схемы производства сухого экстракта на основе растительного сырья коровьяка джунгарского.

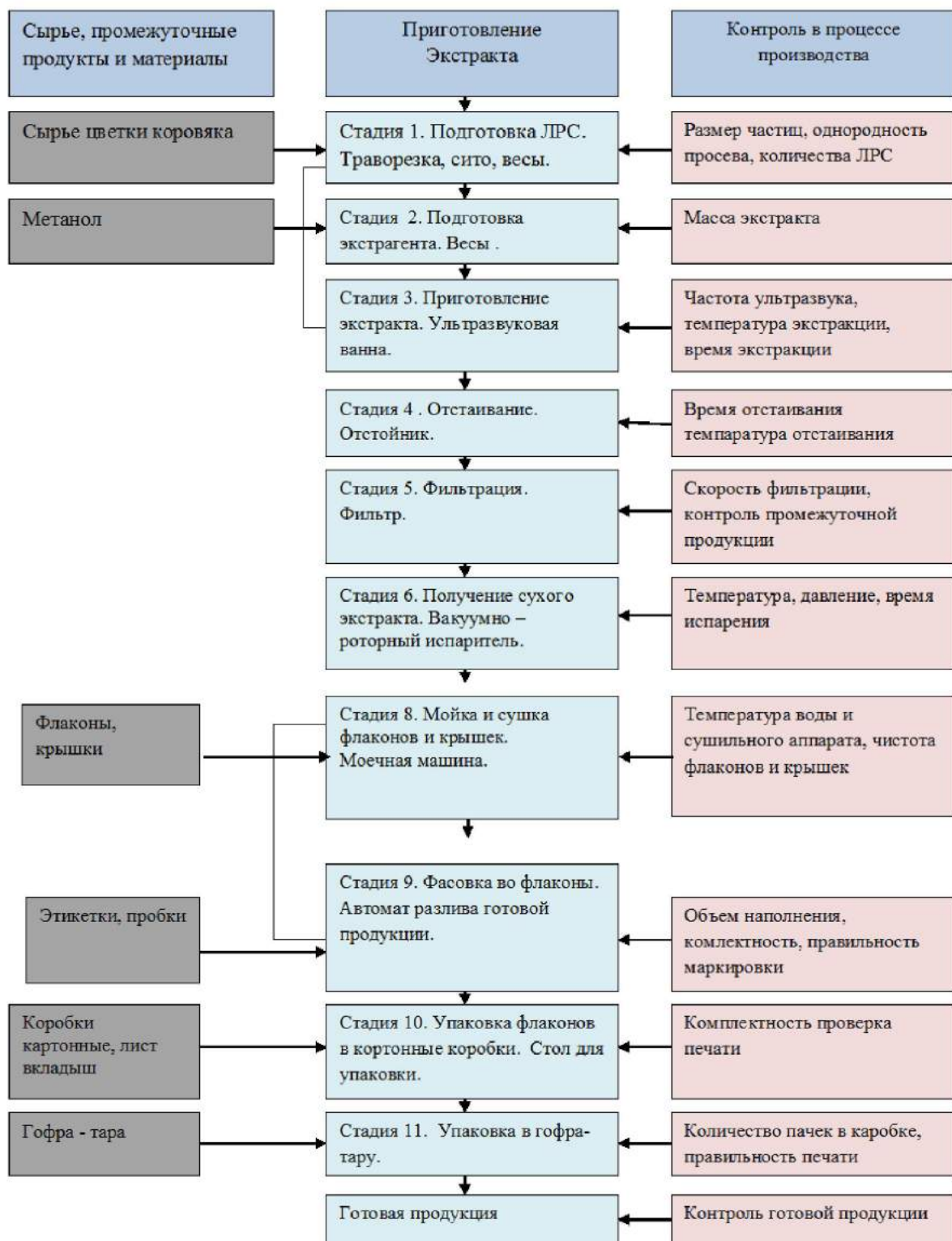


Рисунок 30 - Технологическая схема производства экстракта коровяка джунгарского

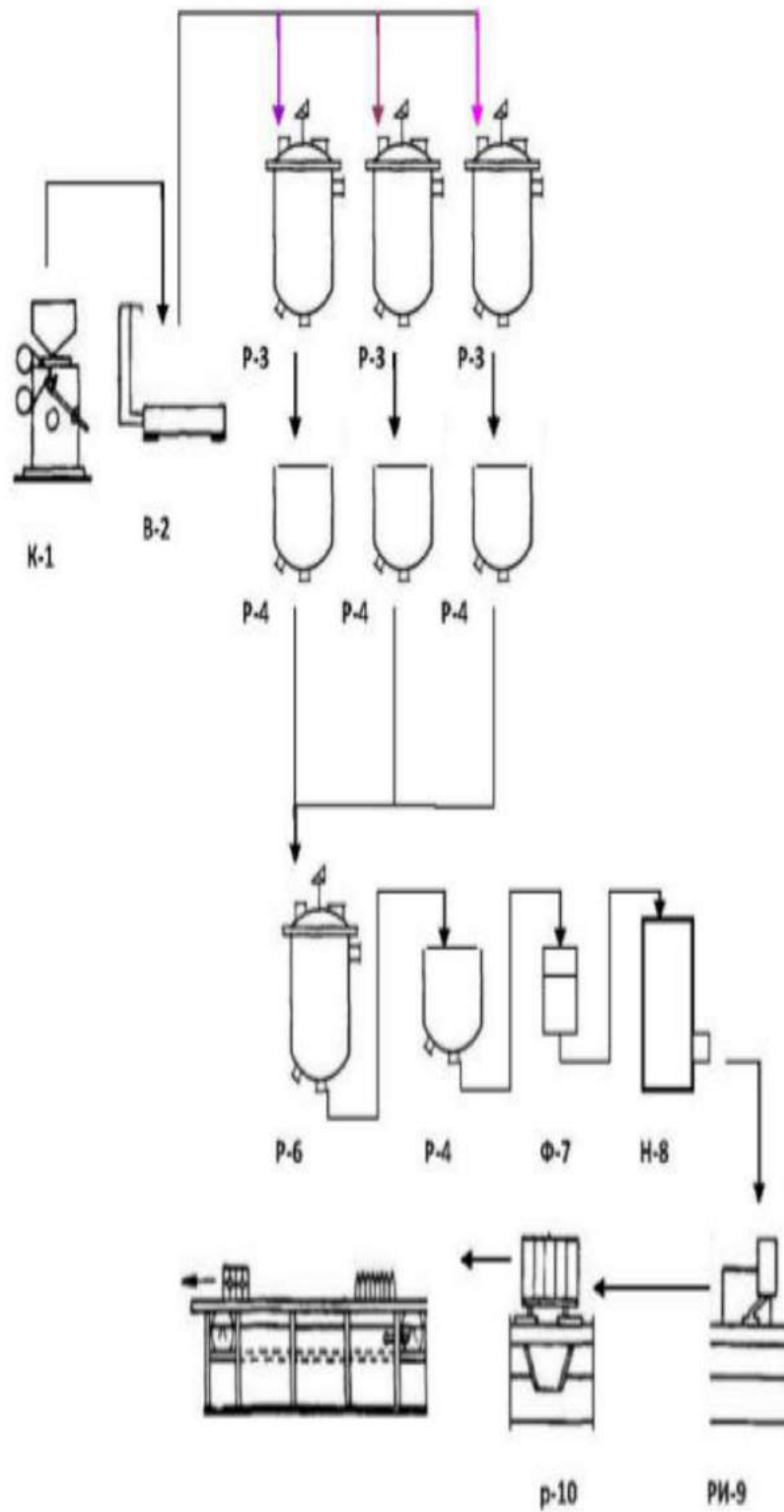


Рисунок 31 - Аппаратурная схема производства сухого экстракта коровьяка джунгарского

4.4 Стандартизация сухого экстракта коровьяка джунгарского

Определены физико-химические, микробиологические параметры экстракта коровьяка джунгарского и предложена спецификация его качества (таблица 19). Определение показателей качества экстракта проводилось соответственно требованиям к качеству сухих экстрактов по общей статье «Экстракты» Государственной Фармакепеи РК.

Таблица 19 – Спецификация качества экстракта коровьяка джунгарского

Показатели Качества	Регламентируемые нормы	Методы испытаний
1	2	3
Описание	Твердая масса коричневого цвета с зеленоватым оттенком, с характерным запахом и горьким вкусом.	В соответствии с АНД
Идентификация:	На хроматограмме испытуемого раствора на 14-й минуте появляется пик с электронным спектром актеозида (Актеозид) Появляется зеленое окрашивание (Флавоноиды)	ВЭЖХ Качественная реакция
Тяжёлые металлы	Не более 0.01 % (100 ppm)	ГФ РК I, т. 1, 2.4.8, метод А
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	ГФ РК I, т. 1, 2.9.11
Растворители Метанол	Не более 0.05 % (об/об)	ГФ РК I, т. 1, 2.8.17
Микробиологическая чистота	Препарат должен соответствовать ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 3 В. В 1 г субстанции допускается наличие не более 10^4 аэробных бактерий, 10^2 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно), энтеробактерий и некоторых других грамотрицательных бактерий не более 10^2 . Не допускается наличие в 1 г субстанции <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , в 10 г – <i>Salmonella</i> .	ГФ РК I, т. 1, 2.6.12, 2.6.13

Продолжение таблицы 19		
1	2	3
Количественное определение: - актеозида - флавоноидов пересчете кверцетин	в на Не менее 0,5% Не менее 4%	ГФ РК I, т. 1, 2.2.25, ВЭЖХ Спектрофотометрия
Упаковка	По 50 и 100 г в плотной полимерной банке, круглого сечения в соответствии с ГФ РК I, т. 1, 3.2.1, и наклеиваемой этикеткой выполненной типографическим способом в соответствии с ГОСТ 7625-86Е. Банки должны иметь воздушное пространство не менее 3 % от всей емкости.	В соответствии с АНД
Маркировка	На этикетке банки на государственном и русском языках указывают название страны-производителя, предприятия-изготовителя, его товарный знак и адрес, название субстанции массу нетто, условия хранения, дату изготовления и срок годности.	В соответствии с АНД
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е.	ГОСТ 17768-90Е
Хранение	В воздухонепроницаемых контейнерах, в защищенном от света месте	В соответствии с АНД
Срок хранения	3 года	В соответствии с АНД
Основное фармакологическое действие	Противовоспалительное средство	

4.5 Определение сроков хранения экстракта коровяка джунгарского
Исследование стабильности является одним из основных этапов разработки новых лекарственных средств.

Лекарственные средства в процессе хранения должны сохранять свои свойства, поэтому стабильность является одним из основных требований, предъявляемых к качеству лекарственного средства.

Целью изучения стабильности лекарственного средства лекарственных средств является сбор информации об изменении качества лекарственного препарата в течение периода хранения, влияния различных факторов окружающей среды (высокая и низкая температура, влажность, свет), а также регламентирование условий хранения, сроков повторного анализа и хранения.

Нами было проведено изучение стабильности и определение срока и условий хранения экстракта коровяка джунгарского при длительном хранении в естественных условиях (long-term/real time testing).

Исследования проводили путем оценки свойств (физических, химических, биофармацевтических и микробиологических) в течение заданного времени.

Условия и регламент периодичности проведения испытаний: 0, 3, 6, 9, 12 месяцев, температура хранения $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, относительная влажность (RH) $(60\pm 5)\%$. Результаты исследования стабильности отражены в таблице 20.

Таблица 20 - Результаты исследования стабильности экстракта коровяка джунгарского

Условия хранения: $t=25\pm 2$ °C, RH=60±5 % Начало и конец исследования: 15.07.15 - 15.07.16.		Месяцы				
Параметры качества	Регламентируемые нормы	0	3	6	9	12
Определение	Твердая масса коричневого цвета с зеленоватым оттенком, с характерным запахом и горьким вкусом	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Идентификация	На хроматограмме испытуемого раствора на 14-й минуте появляется пик с электронным спектром актеозида (Актеозид) Появляется желто-зеленое окрашивание (Флавоноиды)	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	3.7%	3.7%	3.8%	3.8%	3.85%
Тяжелые металлы	Не более 0.01 % (100 ppm)	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.	Не обн.
Микробиологическая чистота	В 1 грамме сырья допускается наличие не более 10^5 аэробных бактерий, не более 10^4 грибов (суммарно), не более 10^3 энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий. В 1 грамме сырья не допускается наличие <i>Escherichia coli</i> ; в 10 г сырья не допускается наличие <i>Salmonella</i> .	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.
Количественное определение	-актеозида не менее 0,5%	0.53%	0.53%	0.53%	0.53%	0.53%
	-сумма флавоноидов в пересчете на кверцетин не менее 4%	4.12%	4.12%	4.12%	4.12%	4.12%

4.6 Технико-экономическое обоснование производства экстракта коровяка джунгарского

Капитальные вложения. Общий объем капитальных вложений на проектно-технологическую документацию, реконструкцию цеха, приобретение основного оборудования, монтажные работы и пусконаладочные работы «Технологической линии по производству экстракта» определен согласно расчету, приведенного в нижеследующих таблицах, и составляет на 1 апреля 2016 года $6\,585\,860 + 1\,975\,758 + 197\,575,8 = 8\,759\,193,8$ тенге. В таблице 21 приводятся данные по стоимости оборудования цеха.

Монтажные работы. 30% от стоимости основного оборудования
 $6\,585\,860: 100\% * 30\% = 1\,975\,758$ тенге

Пусконаладочные работы. 10% от стоимости монтажных работ:
 $1\,975\,758: 100\% * 10\% = 197\,575,8$ тенге.

Таблица 21 – Себестоимость оборудования

п/п №	Наименование оборудования	Кол-во, шт.	Цена, тенге	Сумма, тенге
1	Платформенные лабораторные весы AND /61 кг/	1	65 500	65 500
2	Ультразвуковая ванна /объем 100 л/	2	914940	914940
3	Смеситель для экстрактов /объем 60 л/	2	350 000	700 000
4	Вакуумно-выпарная установка /объем 500 л/	1	3685 500	3685 500
5	Фильтр	1	30000	30000
6	Полуавтоматическая настольная машина для розлива /произв. до 1 000 флаконов/час/ (Швейцария)	1	170 000	170000
7	Стол для упаковки готовой продукции /Болгария/	1	85 000	85 000
ВСЕГО:		9	6585860	6585860

$$Q_{\text{час}} = 18\,000 / 24 \text{ часа} = 750 \text{ уп/час}$$

$$Q_{\text{смену}} = 750 * 8 \text{ часов} = 6\,000 \text{ уп/смену}$$

$$Q_{\text{год}} = 6\,000 * 255 \text{ дней} = 1\,530\,000 \text{ уп/год}$$

$$K_{\text{расчета}} = 1\,530\,000 / 18\,000 = 85$$

Затраты на электропотребление. Общая мощность оборудования:

$$64 \text{ кВт} \cdot 8 \cdot 255 = 130\,560 \text{ кВт/год}$$

$$130\,612 \cdot 8,2 = 1\,071\,018,4 \text{ тенге/год}$$

На освещение помещений и бактерицидные лампы:

$$10 \text{ кВт} \cdot 8 \cdot 255 = 20\,400 \text{ кВт/год}$$

$20\,400 \cdot 8,2 = 167\,280$ тенге/год

Стоимость энергозатрат = Общая мощность оборудования + затраты на освещение и бактерицидные лампы.

$1\,071\,018,4 + 167\,280 = 1\,238\,298,4$ тенге/год.

Общие годовые затраты на энергопотребление составят 1 238 298,4 тенге.

Запасные части и инструменты. Годовые расходы на запасные части и инструменты взяты в размере 5% от стоимости амортизационных отчислений на оборудование и составляют: $702\,789:100\% \cdot 5\% = 35\,139,45$ тенге.

Затраты на сырьё и основные материалы

Годовые затраты сырья и основных материалов подсчитаны на производство по рыночным ценам поставщиков (данные на 1 апреля 2016 года). Годовые затраты на сырьё и основные материалы составляют 41250000 тенге (таблица 22).

Таблица 22 – Затраты на сырьё

п/п №	Наименование	Ед. изм.	Расход на 1530 000 уп., кг	Стоимость, тенге
Основное сырьё:				
1	Сырьё коровьяка джунгарского	кг.	10000	100000
2	Спирт метиловый	кг.	30000	180000
Вспомогательное сырьё				
1	Пластмассовые флаконы	Шт	1530 000	7650000

Амортизационные отчисления. Сумма амортизационных отчислений определена по стоимости оборудования согласно «Единых норм амортизационных отчислений на полное восстановление основных фондов народного хозяйства СССР» утвержденные 22 октября 1990 года №1072

– Амортизационные отчисления на здание 3% от стоимости цеха:

– $585\,860:100\% \cdot 3\% = 197\,575,8$ тенге

– Амортизационные отчисления на оборудование 12% от стоимости оборудования: $6\,585\,860:100\% \cdot 12\% = 790\,303,2$ тенге

Амортизационные отчисления приведены в соответствие и составляют 987 879 тенге.

Запасные части и инструменты. Годовые расходы на запасные части и инструменты взяты в размере 5% от стоимости амортизационных отчислений на оборудование и составляют: $790\,303,2:100\% \cdot 5\% = 39\,515,16$ тенге.

Ремонтный фонд. Ремонтный фонд основного оборудования состоит из текущего и капитального ремонта.

При расчете величины этого фонда за основу бралась средняя заработная плата по Республике Казахстан с учетом вредного производства. Социальный налог 11%. Годовые затраты на заработную плату составили:

$12 * 460000 * 1,11 = 6\,127\,200$ тенге.

Таблица 23 – Заработная плата обслуживающего персонала

Должность	Кол-во штатных единиц	Заработная плата, тенге	Общая сумма, тенге
Начальник цеха	1	150 000	150 000
Главный технолог	1	120 000	120 000
Инженер технической линии	1	75 000	75 000
Начальник отдела контроля качества	1	100 000	100 000
Заведующий складом	1	60 000	60 000
Оператор технологической линии	3	60 000	180 000
Фасовщицы	2	50 000	100 000
Уборщица	1	45 000	45 000
Итого:			830 000
Годовой фонд			9960000

Себестоимость годового выпуска продукции. Запроектированный годовой объем по выпуску экстракта коровяка джунгарского 1 530 000 флаконов. Полная себестоимость выпускаемых предприятием экстрактов составляет (таблица 24) Производительность цеха по выпуску экстракта 1 530 000 упаковок в год. Себестоимость 1 упаковки: $56647129 : 1\,530\,000 = 37$ тенге.

Таблица 24 - Себестоимость годового выпуска продукции

п/п /№	Элементы затрат	Сумма, тенге
1	Годовой фонд заработной платы обслуживающего персонала	9960000
2	Годовой расход сырья и основных материалов	41250000
3	Затраты на энергопотребление	1 238 298.40
4	Амортизационные отчисления	987 879
5	Запасные части и инструменты (5% от амортизационных отчислений на оборудование)	39 515.16
6	Ремонтный фонд	436 921.5
7	Прочие расходы 5% от пунктов 1-6	2 503 990. 7
	Итого:	56647129

Прибыль и срок окупаемости

- Реализация настоящего проекта позволит производству выпускать экстракт 1 530 000 упаковок в год.
- Себестоимость получаемой продукции в год составит 56647129 тенге.
- Себестоимость одной упаковки экстракта коровяка джунгарского равна 37 тенге.

Проведенные нами исследования показали целесообразность производства экстракта коровяка джунгарского, что обусловлено приемлемой стоимостью экстракта, которая составила 37 тенге за 1 упаковку, что делает возможным его конкурентоспособность на фармацевтическом рынке Казахстана.

5 ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И СПЕЦИФИЧЕСКОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ РАЗРАБОТАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ КОРОВЯКА ДЖУНГАРСКОГО (*VERBASCUM SONGARICUM SCHRENK*)

5.1 Исследование острой токсичности

Изучение острой токсичности экстракта коровяка джунгарского проводили согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под редакцией А.Н. Миронова) с определением LD₅₀ [169]. Критериями оценки острой токсичности разработанного экстракта служили степень интоксикации и выживаемость подопытных животных в течение 48 часов. В первые 6 ч после введения раствора животные находились под непрерывным наблюдением, дальнейший мониторинг проводился в течение 2-х недель, причем в. Оценку острой токсичности проводили на аутбредных белых мышах (массой 18-25 г). Животные выращены в виварии КазНМУ имени С.Д.Асфендиярова, содержались при следующих условиях: температура воздуха 20±2 °С, относительная влажность 60%.

Перед введением необходимые количества исследуемого экстракта растворяли в воде. Оценка острой токсичности проводилась на аутбредных белых мышах (масса 20-26 г), которым натошак однократно подкожно вводили растворы в количестве 500 мг/кг. Каждую дозу в острых опытах испытывали на 5 мышах. Первая введенная доза составила 500 мг/кг веса животных в пересчете на растворенное вещество.

Так как все животные остались живы после первого эксперимента, далее вводили раствор по нарастающей концентрации до 5000 мг/кг. В течение 2-х часов после введения экстракта постоянно следили за клиникой интоксикации, затем, проводили наблюдение в конце рабочего дня, ежедневно. Срок последующего наблюдения составлял 14 суток, в течение которых оценивали состояние животных (частоту и глубину дыхания, сонливость, заторможенность реакций, координацию движений, цианоз ушей и хвоста, наличие судорог, потребление воды и корма, изменение массы тела, частоту мочеиспускания, количество и консистенцию фекальных масс, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители и др.). Результаты исследований по изучению острой токсичности экстракта коровяка джунгарского на мелких лабораторных животных (мышах) приведены в таблице 26. При введении различных концентраций экстракта от 500 до 5000 мг/кг, а также спустя 6 часов после введения экстракта коровяка джунгарского нами не было замечено существенных изменений в поведении и внешнем виде животных. В течение последующих двух недель проводили мониторинг за следующими признаками: двигательная активность, наличие судорог, координация движений, реакция на раздражители, тонус скелетной мускулатуры, дыхание, состояние кожного покрова, шерсти и окраска видимых слизистых оболочек, потребление воды и пищи. Достоверных заметных отклонений по сравнению с контрольной группой подопытных животных, которые принимали воду очищенную, не было

отмечено. Принимая во внимание тот факт, что однократное подкожное введение аутбредным белым мышам экстракта в дозе 5000 мг/кг не вызывает гибели мышей и изменения их двигательной активности и поведенческих реакций в течение двух недель мониторинга, нами был сделан вывод, что исследуемый экстракт по Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова, может быть отнесен к практически нетоксичным препаратам $LD_{50} > 5000$ мг/кг. [170]. Согласно существующей классификации (ГОСТ 12.1.007-76), исследуемый экстракт соответствует IV классу опасности «Вещества малоопасные». В таблице 25 представлены данные о безопасности разработанного экстракта.

Таблица 25 – Определение острой токсичности экстракта коровьяка джунгарского на мышях

Результат	Доза, мг/кг				
	500	1000	2000	3000	5000
Количество животных	6	6	6	6	6
Выжило	6	6	6	6	6
Погибло	0	0	0	0	0
Z	-	0	0	0	0
D		400	500	1000	3000
DZ	-	0	0	0	0

$m=6$; $LD_{50} = LD_{100} - \sum(dZ) m$; $LD_{50} > 5000$ мг/кг

Примечание: Z – показатель разницы между количеством погибших животных при использовании двух соседних доз; D – показатель разницы между количеством двух соседних доз.

5.2 Изучение противовоспалительной активности

Изучение противовоспалительной активности травы и экстракта коровьяка джунгарского оценивали в экспериментах на модели «формалинового» отека лапы крыс. Исследование выполняли на нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 210-240 г. Условия содержания подопытных животных в виварии: естественный режим освещения; температура воздуха 20 ± 2 °C, относительная влажность воздуха 60 %. Эксперимент проводили согласно правил надлежащей лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в РК, а также Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных для экспериментальных исследований (1986) [171]. Перед экспериментом подопытные животные прошли двухнедельный карантин и содержались на стандартном рационе вивария.

Острый воспалительный отек лапы крысы индуцировали субплантарным введением (под подошвенный апоневроз) в заднюю правую лапу крысы 0,1 мл 2 % водного раствора формалина. Интенсивность воспалительной реакции оценивали онкометрически, измеряя толщину лапы животного с помощью

инженерного электронного штангенциркуля до и через 2, 4, 6 часов, а также в динамике через 24 и 48 часов после введения раствора формалина. Противовоспалительную активность экстракта *Verbascum songaricum Schrenk* выражали в процентах угнетения отека.

Перед введением исследуемый экстракт разводили в воде очищенной, получали водную вытяжку, настаивая сырье в кипяченной воде и вводили внутривентрикулярно в терапевтических дозах равных 25, 50, 100 мг/кг.

Экспериментальные крысы были разделены на 6 групп (по 6 животных в каждой): 1). крысы, которые внутривентрикулярно получали экстракт *Verbascum songaricum Schrenk* в дозе 25 мг/кг, 2). крысы, получавшие ЭКЖ в дозе 50 мг/кг, 3). крысы, получавшие внутривентрикулярно сухой экстракт коровьяка джунгарского в дозе 100 мг/кг до введения формалина, 4). крысы, получавшие водную вытяжку сырья коровьяка джунгарского до введения формалина 5). крысы, получавшие подкожно Диклофенак 8 мг до введения формалина, 6). крысы контрольной группы, получавшие воду очищенную.

Статистическая обработка результатов эксперимента проводилась с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2010. Также вычисляли средние арифметические и квадратические значения для ряда выборок. На основе гистограмм распределения, величин асимметрии и эксцесса оценивали нормальность распределения переменных. Для оценки достоверности различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли t-критерий Стьюдента. За достоверное значение принимали разницу при уровне вероятности 95 % и более ($p < 0,05$). Результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Исследование противовоспалительной активности

Серия опыта	До	2 часа	4 часа	6 часов	24 часов	48 часов
Вода очищенная	3.77±0.09	4.88±0.09*	4.77±0.09*	4.55±0.09*	4.30±0.09*	3.83±0.09
ЛРС «Коровьяк джунгарский»	3.77±0.09	4.67±0.09*	4.65±0.09*	4.51±0.09*	4.22±0.09*	3.84±0.09
ЭКЖ 25 мг/кг	3.77±0.09	4.60±0.09*	4.53±0.09*	4.4±0.09*	4.18±0.09*	3.85±0.09
ЭКЖ 50 мг/кг	3.77±0.09	4.56±0.09*	4.47±0.09*	4.31±0.09*	4.09±0.09*	3.84±0.09
ЭКЖ 100 мг/кг	3.77±0.09	4.49±0.09*	4.44±0.09*	4.20±0.09*	4.01±0.09*	3.85±0.09
Диклофенак	3.77±0.09	4.27±0.09*	4.17±0.09*	3.96±0.09*	3.89±0.09	3.83±0.09

Примечание: * – разница с контролем (перед опыта) достоверны ($p < 0,05$).

Как показано в таблице 26 и на рисунке 29 в ходе эксперимента нами было выявлено, что субплантарное введение (под подошвенный апоневроз) раствора формалина вызывает воспалительную реакцию у подопытных животных, о чем свидетельствует выраженное увеличение объема лапы. Было выявлено, что максимальный объем отека лапы (пик воспаления) был замечен через 2 часа после введения раствора формалина, при этом объем отека у подопытных крыс контрольной группы увеличивался в среднем на 29 % ($p < 0,05$). Через 48 часов после введения раствора формалина значительных различий в выраженности отека между опытными и контрольными групп не было отмечено.

Внутрижелудочное введение исследуемых экстрактов и препарат сравнения Диклофенак оказывали влияние на развитие формалинового воспаления, регистрируемого по величине формирующегося отека лапы.

Так, было выявлено, что активность исследуемых растворов ингибировать формалиновое воспаление, как и предполагалось, увеличивалась в ряду ЛРС коровьяка джунгарского <экстракт коровьяка джунгарского 25 мг/кг <экстракт коровьяка джунгарского 50 мг/кг <экстракт коровьяка джунгарского 100 мг/кг <препарат сравнения Диклофенак. При этом важно уточнить, что отличие между активностями экстракт коровьяка джунгарского 50 мг/кг и экстракт коровьяка джунгарского 100 мг/кг не велика, поэтому целесообразно в качестве оптимальной концентрации предложить 50 мг/кг. При введении препарата сравнения Диклофенака объем отека лапы подопытных крыс была в среднем меньше, чем в контроле.

Спустя 6 часов объем лапы у подопытных крыс, получавших раствор сравнения при формалиновом воспалении, достоверно не отличался от его значения до эксперимента.

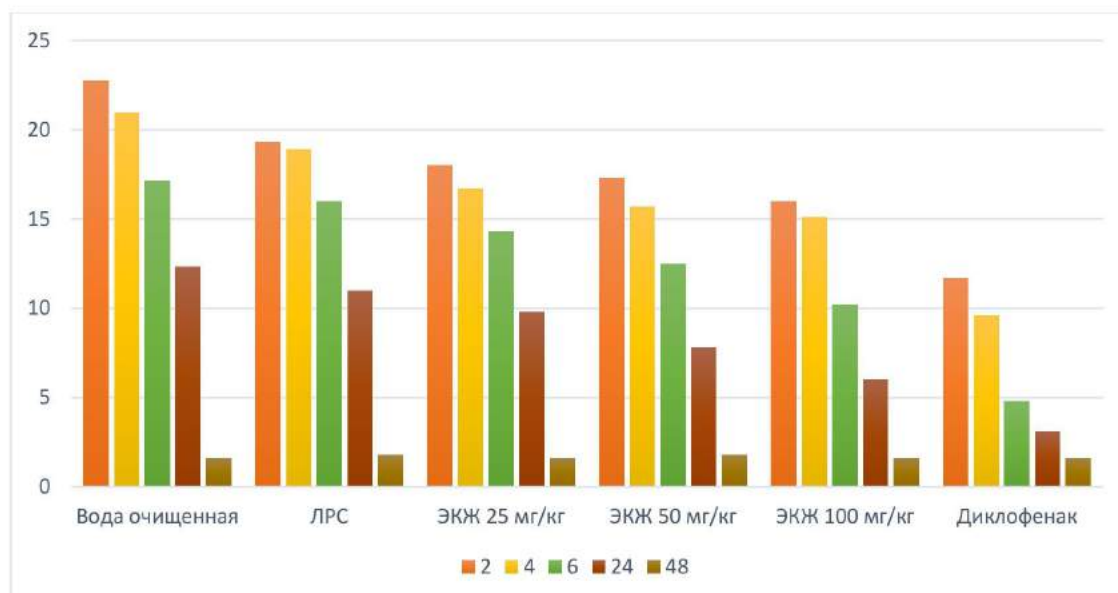


Рисунок 32 - Влияние экстрактов КД и Диклофенака на выраженность формалинового отека лапы крыс в течение 2, 4, 6, 24 и 48 часов

Тем самым, проведенные нами исследования по установлению фармакологической активности травы и сухого экстракта коровяка джунгарского показали наличие противовоспалительной активности в траве и экстракте коровяка джунгарского. Как и предполагалось, активность экстракта превышала действие травы. Но все-таки не превысила активность препарата сравнения. Было установлено, что оптимальная концентрация экстракта - 50 мг/кг.

ВЫВОДЫ

1. На основе комплексных фитохимических исследований по определению динамики накопления основных биологически активных веществ в траве, цветках и листьях растения коровяк джунгарский (*Verbascum songaricum Schrenk*) в периоды бутонизации, цветения и плодоношения, нами было установлено, что оптимальным периодом сбора сырья коровяка джунгарского является фаза цветения, а также наивысшее содержание БАВ (фенольных соединений = $3,95 \pm 0,11$) было обнаружено в цветках растения. Также нами было выявлено наличие и количественное содержание флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, оксикоричных кислот, жирных кислот, органических кислот и аминокислот.

2. На основе ботанических, фармако-технологических, химических, физико-химических и микробиологических исследований сырья коровяка джунгарского (*Verbascum songaricum Schrenk*) нами был разработан аналитический нормативный документ на цветки коровяка джунгарского, который регламентирует нормы качества данного лекарственного растительного сырья и включает следующие параметры: идентификация, включающая анатомические и морфологические признаки сырья, качественную реакцию на сапонины, посторонние примеси, потеря в массе при высушивании не более 12%, зола общая не более 6%, зола, нерастворимая в кислоте хлористоводородной не более 2%, индекс набухания не менее 9, микробиологическая чистота и количественное определение – актеозида не менее 0,5%.

3. На основании изучения факторов, влияющих на полноту экстрагирования лекарственного растительного сырья коровяка джунгарского, нами была разработана технология и проведена стандартизация сухого экстракта коровяка джунгарского, который обладает высокой антиоксидантной активностью, достаточно высокой антимикробной активностью по отношению к *Staphylococcus aureus*, а также значительной противовоспалительной активностью. Более того нами было выявлено, что разработанный экстракт *Verbascum songaricum Schrenk* является безопасным, соответствует IV классу опасности «Вещества малоопасные».

4. На основании фармако-технологических, химических, физико-химических и микробиологических исследований нами был разработан АНД на экстракт коровяка джунгарского, который включает следующие нормы качества экстракта: описание, идентификация, тяжелые металлы не более 0.01 %, потеря в массе при высушивании не более 5%, растворители – метанол не более 0,05 % (об/об), количественное определение – актеозида не менее 0,5%, сумма флавоноидов в пересчете на кверцетин не менее 4%, микробиологическая чистота - препарат должен соответствовать ГФ РК I, т. 1, 5.1.4, категория 3 В.

5. Технико-экономическое обоснование производства экстракта коровяка джунгарского показывает, что себестоимость 1 упаковки (50г) составляет 37 тенге, что позволяет создать условия для конкурентоспособности и импортозамещения лекарственного средства на фармацевтическом рынке.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Концепция перехода Республики Казахстан к устойчивому развитию на 2007-2024 годы», одобренной Указом Президента Республики Казахстан Н.А.Назарбаева от 14 ноября 2006 года № 216.
2. Адекенов, С.М. Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов // Поиск и создание методов получения фитопрепаратов: сб трудов. - Алматы: Ғылым, 1997. - С.3-22.
3. Кукес В.Г. Фитотерапия с основами клинической фармакологии // Под ред. акад. РАН В. Г. Кукеса. М.: Медицина, 1999. – 192 с.
4. Адекенов С.М. Современное состояние и перспективы производства отечественных фитопрепаратов // Российские аптеки, 2003. -№5.
5. Ушбаев К.У., Абдрахманов С.А., Токешова Л.Е. Лекарственные и пищевые растения Казахстана в терапии некоторых заболеваний. – Алматы, 2005. -158с.
6. Прокопенко А.П. Сотворення та впровадження у практику рослинних лікарських засобів //Фарм. журн. – 1979. - № 2 - С. 25-28.
7. Прокопенко А.П. Современное состояние химии и технологии фитохимических препаратов // Тезисы докл. науч.-техн. совещ. Пути повышения эффективности производства и повышения качества фитохимических препаратов. - М.,1978. - С.8-10.
8. Прокопенко А.П., Ветров П.П., Жуков Г.А. Современное состояние и пути повышения технического уровня фитохимических производств. Сообщение 1. Общие сведения о фитохимических препаратах и лекарственном растительном сырье //Фармаком. – 1993. - № 3. - С.3-9.
9. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения. / Под ред. Т.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. -СПБ: Специальная литература. -1999. - 407 с.
10. Koch V. Hufeland S. Phytotherapie - (k) cine besondere Therapie richtung? - 1994. -94 с.
11. Мамчур Ф.И. Справочник по фитотерапии. 2 изд. – Киев, 1989. - 108 с.
12. Пастушенов Л.В., Лесковская Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии. – М.: Медицина, 1995. - 45 с.
13. Марченко А.И., Баранюк А.И., Левицкая Е.В., Соколовская Е.П. Лекарственные растения в стоматологии // изд. «Штиинца», Кишинев, 1981.
14. Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения (Растения-целители). -4-е изд., испр. И доп.-М.: Высш.шк, 1990.
15. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия). -2 изд., стереотипное. - М.: Недра, 1989. - 512с.
16. Кукенов М.К., Грудзинская Л.М., Беклемишев Н.Д. и др. Лекарства из растений // изд. «Мектеп», Алматы, 2002.
17. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология. - М., 2000. - 216 с.
18. Нургожина Э.О., Рахимова А.К., Жаугашева С.К. и др. Характеристика фитопрепаратов, в том числе и фитомазей, предназначенных для лекарственной коррекции местных воспалительных процессов. //В кн.: «Развитие фитохимии и

перспективы создания новых лекарственных препаратов. Лекарственные формы фитопрепаратов и их фармакологическое изучение. Технология промышленного производства отечественных фитопрепаратов». – Алматы: Ғылым, 2004. - Кн. 3. – С.296-306.

19. Рахимов К.Д. Развитие фитотерапии в Казахстане: состояние и перспективы // Фармация Казахстана. - 2004. - С.22-24.

20. Тулеуов Б.И., Дильбарханов Р.Д., Датхаев У.М. и др. Флора Казахстана как перспективный источник новых натуральных антиоксидантов. – СПб, 2006. – 230 с.

21. Grieve M.A. Modern Herbal Dover Publications: New York, 1981. –Т.2. - P.562–566.

22. Heywood V.H. Flowering plants in the world. - New York: Oxford University Press, 1993.

23. Kaynak G., Das kin R., Yilmaz O., Erdogan E. *Verbascum yurtkuranyanum* (Scrophulariaceae), a new species from Northeast Anatolia, Turkey//Ann Bot Fennici. -2006. - Vol.43. -P.456–459.

24. Celebi A., Karaveliogullari F.A., Acik L.C. Taxonomic relationships in Turkish *Verbascum* L. Group A (Scrophulariaceae): evidence from SDS-PAGE of seed proteins and numerical taxonomic study//Turk. J. Biochem. F.-2009. – Vol.34, №4. - P.234–241.

25. Ferguson I.K. *Verbascum* L. In: Heywood VH, Tutin GT, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) *Flora Europaea* // Cambridge University Press, Cambridge. – 1972. – Vol. 3. P.205–216.

26. Kheiri, S., Investigation of regeneration system in some *verbascum* plants from Scrophulariaceae family based on pollen to ovum ratio // Journal of biology, Islamic Azad University. - 2009. – Vol.74, №67.

27. Ivancheva S., Stantcheva B. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria // Journal of Ethnopharmacology, – 2000. Vol. 69, № 2. – P.165–172.

28. Ferguson I.K. *Verbascum* L. In: Heywood VH, Tutin GT, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) *Flora Europaea* // Cambridge University Press, Cambridge. – 1972. – Vol.3. P.205–216.

29. Huber-Morath A. Die Turkishchen Verbasceen // Kommissionsverlag fon Gebruder Fretz AG, Zurich. -1971.

30. Huber-Morath A. *Verbascum* L. In: Davis PH (ed) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* // Edinburgh University Press, Edinburgh. -1978. – Vol.6. - P 461–603.

31. Alipieva K.I., Orhan I.E., Tatli Cankaya I.I., Kostadinova E.P., Georgiev M.I. Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins // Phytochem, Rev, - 2014. – Vol. 13. – P.417–444.

32. Makbul S., Kandemir A., Turkmen Z., Beyazoglu O. Morphological and anatomical features of *Verbascum alyssifolium* Boiss. and *Verbascum calycosum* Hausskn. Ex Murb. (Scrophularicaae) // Herbal Journal System Botanic, - 2008. – Vol. 15. – P.125-140.

33. Alba Ch., Bowers M.D., Blumenthal D., Hufbauer R. Evolution of growth but not structural or chemical defense in *Verbascum thapsus* (common mullein) following introduction to North America // *Biol, Invasions*, - 2011. – Vol. 13. – P.2379-2389.
34. Whitson TD. Weeds of the West. – Wyoming: Pioneer of Jackson Hole, 1991. – 630p.
35. Muzik T.J. Weed Biology and Control. - New York: InTech, 2015. - 134p.
36. Valverde P.L., Fornoni J., Nunez-Farfan J. Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium* // *J Evol Biol*, - 2001. – Vol. 14. – P.424-432.
37. Yilmaz G., Dane F. *Verbascum samniticum* Ten. (Scrophulariaceae): A New Record for the Flora of Turkey // *Turk J Bot*, - 2008. – Vol. 32. – P.411-414.
38. Mirhaidar H., Plant sciences-Nashre Farhange Eslami, 2005. – P.418-423.
39. Hoffman D. Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine. – Rochester: Healing Arts Press, 2003. – 666p.
40. Лавренова Г.В., Онипко В.Д. Тысячи золотых рецептов народной медицины. – СПб.: Издательский дом «Нева», 2004. – 352с.
41. Foster S., Tyler V.E. The Tyler's honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies – 4th ed. – New York: Routledge, 2009. – 441p.
42. Leporatti M.L., Ivancheva S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy // *Journal of Ethnopharmacology*, - 2003. –Vol. 87, № 2–3, P.123–142.
43. Sezik E., Yeşilada E., Honda G., Takaishi Y., Takeda Y., Tanaka T. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia // *J, Ethnopharmacol*, - 2001. – Vol. 75, № 2-3. – P.95-115.
44. Mabey R. The New Age Herbalist. New York: Macmillan Publishing Company, 1988. – 113p.
45. Yarnell E. Medicinal Herbs for Otitis Media. *Alternative & Complementary Therapies* // Mary Ann Liebert, Inc. Publishers. – 1997. - Vol.3, №5. – P.350–54.
46. Bianchini F., Corbetta F. Health Plants of the World. Atlas of Medicinal Plants. - New York: Newsweek Books, 1977. – 60p.
47. Moerman DE. Medicinal Plants of Native America // University of Michigan Museum of Anthropology Technical Reports, 1986. – P.505–507.
48. Vogel V.J. American Indian Medicine. – Norman: University of Oklahoma Press, 1990. – 341p.
49. Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present), 2nd edn. Nobel Tip Kitabevleri Ltd, Istanbul, 1999.
50. Tatli I.I., Akdemir ZS Traditional uses and biological activities of *Verbascum* species. *FABAD J Pharm Sci* (2006) 31:85–96.
51. Grieve M.A. A modern herbal. Barnes and Noble Books, New York, 1995.
52. Turker A.U., Gurel E. Common mullein (*Verbascum thapsus* L.): recent advances in research // *Phytother Res*. – 2005. – Vol.19, №9. – P.733–739.
53. EMEA; www.ema.europa.eu
54. Georgiev M.I., Pastore S., Lulli D., Alipieva K., Kostyuk V., Potapovich A., Panetta M., Korkina L. *Verbascum xanthophoeniceum*-derived phenylethanoid

glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes. *J Ethnopharmacol.* – 2012. – Vol. 144, №3. – P.754–760.

55. Abou Gazar H., Tasdemir D., Ireland C.M., Calis I. Iridoids and triterpene saponins from *Verbascum wiedemannium* (Scrophulariaceae). *Biochem Syst Ecol.* – 2003. – Vol.31, №4. – P.433–436.

56. Grabias B., Swiatek L. Iridoid glucosides in *Verbascum* genus. *Herba Polonica.* – 1987. – Vol.33, №4. – P.225–232.

57. *European Pharmacopoeia 8.0*, 2014, P.1325-1326.

58. Warashina T., Miyase T., Ueno A. Iridoid glycosides from *Verbascum thapsus* L. // *Chem Pharm Bull.* – 1991. – Vol.39, №12. – P.3261–3264.

59. Pardo F., Perich F., Torres R., Delle Monache F. Phytotoxic iridoid glucosides from the roots of *Verbascum Thapsus* // *J Chem Ecol.* – 1998. – Vol.24, №4. – P.645–653.

60. Hussain H., Aziz S., Miana G.A., Ahmad V.U., Anwar S., Ahmed I. Minor chemical constituents of *Verbascum Thapsus* // *Biochem Syst Ecol.* – 2009. – Vol.37, №2. – P.124–126.

61. Zhao Y.L., Wang S.F., Li Y., He Q.X., Liu K.C., Yang Y.P., Li X.L. Isolation of chemical constituents from the aerial parts of *Verbascum thapsus* and their antiangiogenic and antiproliferative activities // *Arch Pharm Res.* – 2011. – Vol.34, №5. – P.703–707.

62. Swiatek L., Luczak S., Grabias B. Occurrence of iridoids in various organs of *Verbascum phlomoides* L. and *Verbascum thapsiforme* Schrad. // *Farm Pol.* – 1984. – Vol.40, №7. – P.415–418.

63. Klimek B. Hydroxycinnamoyl ester glycosides and saponins from flowers of *Verbascum phlomoides* // *Phytochemistry.* – 1996. – Vol.43, №6. – P.1281–1284.

64. Seifert K., Schmidt J., Lien N.T., Johne S. Iridoids from *Verbascum* species // *Planta Med.* – 1985. – Vol.5. – P.409–411.

65. Vesper T., Seifert K. Iridoids from *Verbascum nigrum* // *Liebigs Ann Chem.* – 1994. – Vol.7. – P.751–753.

66. Akdemir Z.S., Tatli I.I., Bedir E., Khan I.A. Acylated iridoid glycosides from *Verbascum lasianthum* // *Turk J Chem.* – 2004. – Vol.28. – P.101–109.

67. Akdemir Z.S., Tatli I.I., Bedir E., Khan I.A. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum* // *Turk J Chem.* – 2004. – Vol.28. – P.227–234.

68. Tatli I.I., Khan I.A., Akdemir Z.S. Acylated iridoid glycosides from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. Ex Benth. // *Z Naturforsch B.* – 2006. – Vol.61. – P.1183–1187.

69. Skaltsounis A.L., Tsitsa-Tzardis E., Demetzos C., Charvala C. Unduloside, a new iridoid glycoside from *Verbascum undulatum* // *J Nat Prod.* – 1996. – Vol.59, №7. – P.673–675.

70. Magiatis P., Melliou E., Tsitsa E., Charvala C., Mitaku S. Two new acylated iridoid glycosides from *Verbascum undulatum* // *Z. Naturforsch. C.* – 2000. – Vol.55, №7–8. – P.667–669.

71. Munoz E., Lamilla C., Marin J.C., Alarcon J., Cespedes C.L. Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda* // *Ind. Crop.Prod.* – 2013. – Vol.42, № 1. – P.137–144.
72. Emam S.S. Glycosides of *Verbascum letourneuxii* Asch and its antioxidants activity // *Aust.J.Basic.Appl.Sci.* – 2010. – Vol.4, №10. – P.5038–5050.
73. Akdemir Z.S., Tatli I.I., Bedir E., Khan I.A. Neolignan and phenylethanoid glycosides from *Verbascum salviifolium* Boiss // *Turk.J.Chem.* – 2004. – Vol.28. – P.621–628.
74. Warashina T., Miyase T., Ueno A. Phenylethanoid and lignan glycosides from *Verbascum Thapsus* // *Phytochemistry.* – 1992. – Vol.31, № 3. – P.961–965.
75. Abou Gazar H., Tasdemir D., Ireland C.M., Calis I. Iridoids and triterpene saponins from *Verbascum wiedemannium* (Scrophulariaceae) // *Biochem.Syst.Ecol.* – 2003. – Vol.31, №4. – P.433–436.
76. Seifert K., Preiss A., Johne S., Schmidt J., Lien N.T., Lavaud C., Massiot G. Triterpene saponins from *Verbascum songaricum* // *Phytochemistry.* – 1991. – Vol. 30, №10. – P.3395–3400.
77. Hartleb I., Seifert K. Songarosaponin D—a triterpenoid saponin from *Verbascum songaricum* // *Phytochemistry.* -1994. – Vol.35, № 4. – P.1009–1011.
78. Hartleb I., Seifert K. Triterpenoid saponins from *Verbascum songaricum* // *Phytochemistry.* – 1995. – Vol.38, № 1. – P.221–224.
79. Miyase T., Horikoshi G., Yabe S., Miyasaka S., Melek F.R. Saikosaponin homologs from *Verbascum* spp. The structures of mulleinsaponins I–VII // *Chem Pram Bull.* – 1997. – Vol.45, № 12. – P.2029–2033.
80. Ninova P., Abdusamatov A., Yunusov S.Yu. Alkaloids of *Verbascum nobile* // *Chem. Nat. Comp.* – 1971. – Vol.7, № 4. – P.526–527.
81. Ziyaev R., Abdusamatov A., Yunusov S.Yu. Alkaloids of *Verbascum songoricum* // *Khim.Prir.Soedin.* -1971. – Vol.7, №6. – P.853–854.
82. Koblicova Z., Turcek F., Ninova P., Trojanek J., Blaha K. Verbaskine, a macrocyclic spermine alkaloid of novel type from *Verbascum pseudonobile* Stoj. et Stef. (Scrophulariaceae) // *Tetrahedron.Lett.* – 1983. – Vol.24, № 40. – P.4381–4384.
83. Drandarov K., Hais I.M. Separation of E-Z isomeric macrocyclic spermine alkaloids of *Verbascum pseudonobile* and *Verbascum phoeniceum* and their derivatives using thin-layer chromatography // *J.Chrom.A.* – 1996. – Vol.724, № 1–2. – P.416–423.
84. Drandarov K., Hesse M. C1-Derivatives of macrocyclic spermine alkaloids. Verbamedines versus incasines // *Tetrahedron.Lett.* – 2002. – Vol.43, №29. – P.5025–5027.
85. Youhnovski N., Drandarov K., Guggisberg A., Hesse M. Macrocyclic spermine alkaloids from *Verbascum*: isolation, structure elucidation and synthesis of the (E/Z)-isomeric pairs (S)-verbaskrine/(s)-isoverbasikrine and (S)-verbamekrine/(S)-isoverbamekrine // *Helv.Chim.Acta.* – 1999. – Vol.82, № 8. – P.1185–1194.
86. Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants // *Nat.Protoc.* – 2010. – Vol. 5. – P.536–549.

87. Verpoorte R, Choi YH, Kim HK NMR-based metabolomics at work in phytochemistry // *Phytochem.Rev.* – 2007. – Vol.6. – P.3–14.
88. Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? // *Trends.Biotechnol.* – 2011. – Vol.29, № 6. – P.267–275.
89. Georgiev M.I., Ali K., Alipieva K., Verpoorte R., Choi Y.H. Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics // *Phytochemistry.* – 2011. – Vol.71, №16. – P.2045–2051.
90. Georgiev M.I., Ivanovska N., Alipieva K., Dimitrova P., Verpoorte R. Harpagoside: from Kalahari desert to pharmacy shelf. // *Phytochemistry.* – 2013. – Vol.92. – P.8–15.
91. Kupeli E., Tatli I.I., Akdemir Z.S., Yesilada E. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. // *J.Ethnopharmacol.* – 2007. – Vol.110, № 3. – P.444–450.
92. Speranza L., Franceschelli S., Pesce M., Menghini L., Patruno A., Vinciguerra I., De Lutiis M.A., Felaco M., Felaco P., Grilli A. Anti-inflammatory properties of the plant *Verbascum mallophorum*. // *J.Biol.Regul.Homeost.Agents.* – 2009. – Vol.23, № 3. – P.189–195.
93. Paszkiewicz-Gadek A., Grochowska K., Galasinski W. Effect of the aqueous extract and saponin fraction from the flowers of *Verbascum thapsiforme* on protein biosynthesis in a rat liver ribosomal system. *Phytother.Res.* -1990. – Vol.4. – P.177–181.
94. Kupeli Akkol E., Tatli I.I., Akdemir Z.S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of saponin and iridoid glycosides from *Verbascum pterocalycinum* var. *mutense* Hub.-Mor. // *Z.Naturforsch.C.* – 2007. – Vol.62, № 11–12. – P.813–820.
95. Tatli I.I., Akdemir Z.S., Yesilada E., Kupeli E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of major phenolics from *Verbascum salviifolium* Boiss. // *Z. Naturforsch. C.* – 2008. – Vol.63, № 3–4. – P.196–202.
96. Akdemir Z., Kahraman C., Tatli I.I., Kupeli Akkol E., Sutar I., Keles H. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam. // *J.Ethnopharmacol.* – 2011. – Vol.136, № 3. – P.436–443.
97. Dimitrova P, Kostadinova E, Milanova V, Alipieva K, Georgiev M, Ivanovska N Anti-inflammatory properties of extracts and compounds isolated from *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. *Phytother Res.* – 2012. – Vol.26, №11. – P.1681–1687.
98. Dimitrova P., Georgiev M.I., Khan M.Th., Ivanovska N. Evaluation of *Verbascum* species and harpagoside in models of acute and chronic inflammation // *Central.Eur.J.Biol.* – 2013. – Vol.8, №2. – P.186–194.
99. Georgiev M.I., Pastore S., Lulli D., Alipieva K., Kostyuk V., Potapovich A., Panetta M., Korkina L. *Verbascum xanthophoeniceum*-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes // *J.Ethnopharmacol.* – 2012. – Vol.144, № 3. – P.754–760.

100. Grigore A., Colceru-Mihul S., Litescu S., Panteli M., Rasit Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullein) // *Pharm.Biol.* – 2013. – Vol.51, № 7. – P.925–929.
101. Schapoval E.E.S., Winter de Vargas M.R., Chaves C.G., Bridi R., Zuanazzi J.A., Henriques A.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* // *J.Ethnopharmacol.* – 1998. – Vol.60. – P.53–59.
102. Suntar I., Tatli I.I., Kupeli Akkol E., Keles H., Kahraman C., Akdemir Z. An ethnopharmacological study on *Verbascum* species: from conventional wound healing use to scientific verification // *J.Ethnopharmacol.* - 2010. – Vol.132, № 2. – P.408–413.
103. Korkina L., Mikhal'cik E.V., Suprun M.V., Pastore S., Dal Toso R. Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides // *Cell.Mol Biol (noisy-le-grand)*. – 2007. – Vol.53, № 5. – P.78–83.
104. Mehdinezhad B., Rezaei A., Mohajeri D., Ashrafi A., Asmarian S., Sohrabi-Haghdost I., Hokmabad R.V., Safarmashaei S. Comparison of in vivo wound healing activity of *Verbascum thapsus* flower extract with zinc oxide on experimental wound model in rabbits // *Adv.Environ.Biol.* – 2011. – Vol.2011. – P.1501–1509.
105. Mehdinezhad B., Rezae A., Mohajeri D., Safarmashaei S. Comparison of in vivo wound healing activity of *Verbascum thapsus* flower extract with zinc oxide on experimental wound model in rabbits // *Am.Euras.J.Toxicol.Sci.* – 2012. – Vol.4, № 1. – P.24–30.
106. Zgorniak-Nowosielska I., Grzybek J., Manolova N., Serkedjieva J., Zawilinska B. Antiviral activity of *Flos verbasci* infusion against influenza and herpes simplex viruses // *Arch.Immunol.Ther.Exp. (Warsz)*. – 1991. – Vol.39, № 1–2. – P.103–108.
107. Serkedjieva J. Combined antiinfluenza virus activity of *Flos verbasci* infusion and amantadine derivatives // *Phytother.Res.* – 2000. – Vol.14, № 7. – P.571–574.
108. Rajbhandari M., Mentel R., Jha P.K., Chaudhary R.P., Bhattarai S., Gewali M.B., Karmacharya N., Hipper M., Lindequist U. Antiviral activity of some plants used in Nepalese traditional medicine // *Evid.Based.Complement.Alternat.Med.* – 2009. – Vol.6, №4. – P.517–522.
109. Zanon S.M., Ceriatti F.S., Rovera M., Sabini L.J., Ramos B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba Argentina // *Rev.Latinoam.Microbiol.* – 1999. – Vol.41, № 2. – P.59–62.
110. Escobar F.M., Sabini M.C., Zanon S.M., Tonn C.E., Sabini L.I. Antiviral effect and mode of action of methanolic extract of *Verbascum thapsus* L. on Pseudorabies virus strain RC // *Nat Prod Res.* – 2012. – Vol.26, № 17. – P.1621–1625.
111. Magiatis P., Spanakis D., Mitaku S., Tsitsa E., Mentis A., Harvala C. Verbalactone, a new macrocyclic dimer lactone from the roots of *Verbascum undulatum* with antibacterial activity // *J Nat Prod.* – 2001. – Vol.64, № 8. – P.1093–1094.
112. Turker A.U., Camper N.D. Biological activity of common mullein, a medicinal plant // *J Ethnopharmacol.* – 2002. – Vol.82, № 2–3. –P.117–125.

113. Senatore F., Rigano D., Formisano C., Grassia A., Basile A., Sorbo S. Phyto-growth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum* // *Fitoterapia*. - 2007. - Vol.78, № 3. - P.244–247.
114. Sener A., Dulger B. Antimicrobial activity of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. on microorganisms isolated from urinary tract infection // *Afr J Microbiol Res*. - 2009. - Vol.3, № 11. - P.778–781.
115. Dulger B., Gonuz A. Antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Salvia*, and *Stachys* species // *Pharm Biol*. - 2004. - Vol.42, № 4–5. - P.301–304.
116. Sengul M., Ogutcu H., Adiguzel A., Sahin F., Kara A.A., Karaman I., Gulluce M. Antimicrobial effects of *Verbascum georgicum* Bentham extract // *Turk J Biol*. - 2005. - Vol.29. - P.105–110.
117. Ozcan B., Yilmaz M., Caliskan M. Antimicrobial and antioxidant activities of various extracts of *Verbascum antiochium* Boiss. (Scrophulariaceae) // *J Med Food*. - 2010. - Vol.13, № 5. - P.1147–1152.
118. Ozcan B., Esen M., Caliskan M., Mothana R.A., Cihan A.C., Yolcu H. Antimicrobial and antioxidant activities of the various extracts of *Verbascum pinetorum* Boiss. O. Kuntze (Scrophulariaceae) // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. - 2011. - Vol.15, № 8. - P.900–905.
119. Kahraman C., Ekizoglu M., Kart D., Akdemir Z.S., Tatli I.I. Antimicrobial activity of some *Verbascum* species growing in Turkey // *FABAD J Pharm Sci*. - 2011. - Vol.36. - P.11–15.
120. Ali N., Shah S.W., Shah I., Ahmed G., Ghias M., Khan I., Ali W. Anthelmintic and relaxant activities of *Verbascum thapsus* Mullein // *BMC Complement Altern Med*. - 2012. - Vol.12. - №29.
121. Kozan E., Cankaya I.T., Kahraman C., Akkol E.K., Akdemir Z. The in vivo anthelmintic efficacy of some *Verbascum* species growing in Turkey // *Exp Parasitol*. - 2011. - Vol.129, № 2. - P.211–214.
122. Yuldashev M.P. Flavonoids of roots of *Verbascum songaricum* // *Khim.Prir. Soedin*. - 1996. - Vol.6. - P.951–952.
123. Makhatova B.G., Datkhayev U.M., Zhakipbekov K.S. *Verbascum songaricum schrenk* – the source of new herbal medicines' development // *Материалы IV международной научно-практической конференции «Современная достижения фармацевтической технологии и биотехнологии»*. - 2014. - С.17-18.
124. Сокольская Т.А., Даргаева Т.Д., Шемерянкина Т.Б. Роль стандартов в фармакопейном анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. - 2009. - № 3. - С. 10–13.
125. Шемерянкина Т.Б., Сокольская Т.А., Даргаева Т.Д. Требования к стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на его основе // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. - 2010. - № 3. - С. 9–12.
126. *Indian Pharmacopoeia* 2010; I: 198-201.

127. Calixto J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guideline for herbal medicines // *Braz J Med Biol Res.* – 2000. – Vol.33, № 2. – P.179-189.
128. Ansari S.H. Standardization of crude drugs // *Essentials of Pharmacognosy*, 1st edition. – 2005. – Vol.6, №14. – P.581.
129. Hussain K. et al. *Southern Med Review.* – 2009. – Vol.2, № 1. – P.19-23.
130. Шаторная В.Ф., Слесаренко Е.Г., Островская С.С., Кононова И.И. Стандартизация лекарственного растительного сырья - основа безопасности и эффективности фитопрепаратов // *Материалы международной научно-практической интернет конференции «Теоретические и практические аспекты исследования лекарственных растений».* -2014. - С.265-266.
131. Kokate C.K., Gokhale S.B. *Pharmacognosy.* - Delhi: Nirali prakashan, 2004.
132. Neeli R.E., Kamta P.N., Pradeep K.S. Standardization Strategies for Herbal Drugs-An Overview // *Research J. Pharm. And Tech.* – 2008. – Vol.1, № 4. –P.310-312.
133. Takeda S., Shigudzumi T., Ohta J. // *J. Japan Pharm. Soc.* - 2002. - Vol.60. - P.887-889.
134. Velkhaidi A., Reshavi S., Mousavi Y. // *Iran J.Med.* 2001. - Vol. 10. - P.64-78.
135. Patel P.M., Patel N.M., Goyal R.K. Quality control of herbal products // *The Indian Pharmacist.* – 2006. – Vol.5, № 45. – P.26-30.
136. Quality control methods for medicinal plant materials (WHO). Geneva, A.T.T.B.S. Publishers and distributor Delhi 2002.
137. Sagar Bhanu P.S., Zafar R., Panwar R. Herbal drug standardization // *The Indian Pharmacist.* - 2005; Vol.4, № 35. – P.19-22.
138. Shrikumar S., Maheswari M.U., Suganthi A., Ravi T.K., *Pharma infonet.* – 2004. – Vol.2.
139. Tomasetti T., Pacci A., Campanella S., Gatta C., Ornelli A., Della Picciola D.// *Compar. Biochem.Biophys.* - 2002. - Vol. 61. - P.1011-1027.
140. Маркарян А.А., Даргаева Т.Д. Получение и контроль качества фитоэкстракта, применяемого при патологиях предстательной железы. // *Сб.науч.трудов «Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты».* Москва, 2003. - вып.9. - С.222-226.
141. Маркарян А.А., Даргаева Т.Д., Николаев С.М., Николаева Г.Г. Разработка и стандартизация биологически активной добавки к пище – сухой экстракт «Фитопрост» // *Мат.науч.конф. «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов».* Москва, 2003. - С.225.
142. Kamboj V. P. *Current science.* – 2000. – Vol. 78, № 1. – P.35-39.
143. Yi-Zeng Liang, Peishan Xie and Kelvin Chan, *Journal of Chromatography*, 2004. – Vol.812, № 1-2. P.53-70.
144. Николаев С.М., Шантанова Л.Н., Мондодоев А.Г., Матханов И.Э., Маркарян А.А. Экспериментальная фитотерапия повреждений почек. Улан-Удэ, 2003, 184с.

145. Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu OI, Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extract // *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*/ - 2003. – Vol.36. – P.263-271.
146. Махатова Б.Г., Датхаев У.М., Бурда Н.Е., Кисличенко В.С. Определение фенольных соединений в сырье *Verbascum songaricum* и *Verbascum Thapsus* // *Вестник Казахской академии наук*. – 2016. – №1. – С.80-84.
147. Махатова Б.Г., Датхаев У.М., Бурда Н.Е., Кисличенко В.С. Определение фенолкарбоновых кислот в сырье *Verbascum songaricum* // *Вестник КазНМУ, посвященный 85-летию Казахского национального медицинского университета имени С.Д. Асфендиярова*. – 2015. - №4. – С.521-523.
148. Махатова Б.Г., Датхаев У.М., Бурда Н.Е., Кисличенко В.С. Определение содержания флавоноидов в сырье *Verbascum songaricum* и *Verbascum Thapsus* // *Фармация Казахстана*. – 2015. -№12(175) – С.45-48.
149. Авдеева Е.Ю. Динамика содержания флавоноидов и фенолоксилов в наземной части *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (Rosaceae) / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, И.В. Шилова // *Растительные ресурсы*. – 2009. – № 1. – С. 107–112.
150. Бурда Н.Є. Визначення кількісного вмісту флавоноїдів у траві якріців сланких / Н.Є. Бурда, Б.М. Кливняк // *Актуальні питання народної і нетрадиційної медицини: здоров'я та довголіття: мат. Наукового симпозиуму з міжнародною участю, Київ, 28 березня 2014 р.* – Київ, 2014. – С. 26.
151. Бурда Н.Є. Кількісне визначення флавоноїдів у траві гадючника в'язолистого / Н.Є. Бурда, І.О. Журавель, В.С. Кисличенко, В.Б. Дем'яохін // *Фітотерапія. Часопис*. – 2010. – № 3. – С.58-60.
152. Balzhan G. Makhatova, Ubaydilla M. Datkhayev., Nadezhda Ye. Burda, Viktoriya S. Kyslychenko. Fatty acids from *Verbascum songaricum* herb // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2015. – Vol.6, №6. – P.277-279.
153. Махатова Б.Г., Датхаев У.М., Мамекова А.А. Аминокислотный состав *Verbascum songaricum* // *Материалы международной научно-практической конференции «Инновационные достижения в современной фармации и медицине»*. Вестник ЮКГФА. – 2016.– №3 (73). – С.70-72.
154. Махатова Б.Г., Бурда Н.Е., Волошина В.С., Кисличенко В.С., Сакипова З.Б., Датхаев У.М. Определение органических кислот в траве *Verbascum Thapsus* и *Verbascum songaricum* // *Материалы международной научно-практической конференции «Стратегия «Казахстан-2050»: К университету международного уровня»*, Вестник КазНМУ. – 2014. – № 5. – С.122-124.
155. Вивчення ліпофільних екстрактів трави та підземних органів *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / Н. Є. Бурда, І. О. Журавель, В. С. Кисличенко, В. Б. Дем'яохін // *Український медичний альманах*. – 2010. – Т. 13, № 6. – С. 37–39.
156. Махатова Б.Г., Датхаев У.М., Орынбасарова К.К. Определение суммы производных орто-дигидроксикоричных кислот в цветках коровьяка джунгарского // *Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы фармации и медицины»*. – 29 мая 2015. - Вестник ЮКГФА. – 2015. – №2 (71). – С.60-62.

157. Определение органических кислот в сырье *Tribulus terrestris* L. / Б.М. Кливняк, Н.Е.Бурда, Я.В. Рожковский и др. // Фармация Казахстана. 2014. – № 6. – С. 31-34.
158. Государственная фармакопея Российской Федерации, 7 издание, 1925.
159. Balzhan G. Makhatova, Baurzhan Makhatov, Ubaidilla Datkhayev, Daniela Tekelova, Toygul Serikbayeva. Determination of *Verbascum songaricum* Schrenk morphological and anatomical characters // International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. – 2016. – Vol.8, №6. – P. 1050-1053.
160. Махатова Б.Г., Датхаев У.М. Разработка методики количественного определения актеозида в сырье коровяка джунгарского методом ВЭЖХ // Материалы III Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации». – 2015. – С.308-312.
161. ICH (1995) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures (Q2A) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073381.pdf> /. – Загл. с экрана.
162. ICH (1996) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Industry. Validation of Analytical Procedures: Methodology (Q2B) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM073384.pdf> /. – Загл. с экрана.
163. FDA (1994) Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, Rockville, MD [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf> – Загл. с экрана.
164. Чуешов В.И., Гладух Е.В., Сайко И.В., Ляпунова О.А., Сичкарь А.А., Крутских Т.В, Рубан Е.А., Черняев С.В. Технология лекарств промышленного производства. – Винница: Нова Книга, 2014. – 696с.
165. Минина С. А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 560с.
166. Хмелев В.Н., Сливин А.Н., Барсуков Р.В., Цыганок С.Н., Шалунов А.В. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности // Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2010. – 203с.
167. Захарова Л.М., Дятлов А.В. Определение оптимальных параметров ультразвуковой экстракции при экстрагировании клубеньков стахиса // Технологии XXI века в легкой промышленности, МГУТУ им. К.Г. Разумовского, Выпуск №7, 2013. – С.31-36.
168. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны, Наука, 1974, 253с.

169. Миронов А.Н., Бутаян Н.Д. Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Часть первая, М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
170. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / В.П. Фисенко [и др.] М.: Медицина. 2000. С. 220-221.
171. Михайлов П. Медицинская косметика: пер. с болг. / П.Михайлов. М.: Медицина. 1985. 208 с.



УТВЕРЖДЕН

Директор по качеству

АО «Химфарм»

Л.М.Бочкунова

_____ 20__ г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА
РГП на ПХВ «Национальный центр
экспертизы лекарственных средств,
изделий медицинского назначения и
медицинской техники» МЗСР РК

«____» _____ 20__ г.

ПРИКАЗ

Комитета контроля медицинской и
фармацевтической деятельности
МЗСР РК

от «__» _____ 20__ г.

№ _____

АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного растительного сырья

Verbasci songaricae flos

Жоңғар аюқұлақ гүлдері

Коровяка джунгарского цветки

Название производящего растения

Verbascum songaricum Schrenk

Жоңғар аюқұлақ

Коровяк джунгарский

Название семейства

Scrophulariaceae

Сабынкөктер

Норичниковые

Наименование и страна организации-производителя

АО «Химфарм», Казахстан

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

АО «Химфарм», Казахстан

Наименование и страна организации-упаковщика

АО «Химфарм», Казахстан

Область применения

Для изготовления лекарственных препаратов

ВАНД РК 42-

Вводится впервые

Срок введения установлен с

«__» _____ 20__ г.

Срок действия до

«__» _____ 20__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ЗАПРЕЩЕНА

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

УТВЕРЖДЕН

Директор по качеству

АО «Химфарм»

Л.М.Бочкунова

«__» _____ 20__ г.

ПРИКАЗ

Комитет контроля медицинской и
фармацевтической деятельности
МЗСР РК

от «__» _____ 201__ г.

№ _____

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА

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

«__» _____ 20__ г.

АНАЛИТИЧЕСКИЙ НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного препарата

Коровяка джунгарского сухой экстракт

Жоңғар аюқұлақтың құрғақ сығындысы

МНН: -

Наименование и страна организации-производителя

АО «Химфарм», Республика Казахстан

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

АО «Химфарм», Республика Казахстан

Наименование и страна организации упаковщика

АО «Химфарм», Республика Казахстан

ВАНД РК 42–

Вводится впервые

Срок введения установлен с

«__» _____ 201__ г.

Срок действия до

«__» _____ 201__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

АО «Химфарм»

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный Директор АО «Химфарм»
И. Урбанец
«__» _____ 201 г.



ПРОЕКТ
ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ
на производство экстракта коровяка джунгарского

Согласовано:

Директор по производству
АО «Химфарм»
Майорская С.Н. *[Signature]*
«__» _____ 201 г.

Рекомендовано к утверждению:

Руководитель НИИЦ
Данце И.Я. *[Signature]*
«__» _____ 201 г.

Разработчик:

PhD Докторант по специальности
«Технология фармацевтического
производства» Махатова Б.Г.

Алматы, 2016

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан

АО «КазАгроИнновация»

ТОО «Юго-Западный научно-исследовательский институт
животноводства и растениеводства»

Справка

Представленное для установления подлинности растительное сырье, состоящее из надземных частей травянистого растения с остатками стеблей, листьев и цветоносных побегов, идентифицировано нами как травянистое растение семейства Норичниковые (Scrophulariaceae) — Коровяк джунгарский – *Verbascum songaricum* Schrenk – Жоңғар аюқулағы, собранное в период массового цветения в урочище Каска-су Тoleбийского района Южно-Казахстанской области.

Зав. отделом настобин
и кормопроизводства
ТОО «ЮЗНИИЖР»
геоботаник, к.б.н.



Ибрагимов Т.С.