

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ВЕСЕЛОВА ДАРЬЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩЕЙ ТЕХНОЛОГИИ ЛИПЫ
СЕРДЦЕВИДНОЙ ЦВЕТКОВ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО И
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ЕГО ОСНОВЕ**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук

Научный руководитель:
профессор, доктор фармацевтических наук
Степанова Элеонора Федоровна

Пятигорск – 2020

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Цветки липы сердцевидной, как возможный объект для корригированных лекарственных форм иммуностропного действия.....	12
1.1.1 Фармакогностическая характеристика лекарственного растения Липа сердцевидная – <i>Tilia cordata</i> Mill.	14
1.1.2 Фитохимический состав цветков липы сердцевидной.....	15
1.2 Корригированные лекарственные формы на основе фитокомпозиций как перспективное направление фармацевтической технологии	16
1.2.1 Характеристика современных корригентов, их роль в медицинской практике	23
1.3 Лекарственные средства иммуностропного действия на основе природных субстанций.....	28
1.3.1 Исходные компоненты и общий ассортимент иммуностропных препаратов растительного происхождения.....	32
Заключение по обзору литературы	35
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Объект исследования и вспомогательные вещества	36
2.2 Методы исследований	37
2.2.1 Физико-химические методы исследования	37
2.2.2 Технологические методы исследования.....	38
2.2.3 Микробиологические методы исследования.....	42
2.2.4 Определение острой токсичности экстракта и сиропа липы	44
2.2.5 Иммунологические методы исследования.....	45
2.2.6 Определение антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия.....	49
2.2.7 Методы статистического анализа данных	51
2.3 Дизайн исследования	51

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТА ЦВЕТКОВ ЛИПЫ СЕРДЦЕВИДНОЙ ЖИДКОГО	53
3.1 Определение товароведческих показателей цветков липы сердцевидной.....	53
3.1.1 Установление влажности цветков липы сердцевидной	56
3.2 Определение оптимальных параметров проведения условий экстракции.....	56
3.2.1. Определение технологических показателей сырья.....	58
3.2.2 Выбор оптимального способа проведения экстракционного процесса.....	59
3.3 Разработка технологии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого	68
3.4 Стандартизация разработанного липы сердцевидной цветков экстракта жидкого	75
3.4.1 Качественный анализ цветков липы, экстрактов на их основе.....	79
3.4.2 Разработка методики качественного и количественного определения флавоноидов в цветках липы сердцевидной	81
3.4.3 Разработка методики качественного и количественного определения флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком.....	91
3.5 Валидация методик испытания на подлинность и количественного определения флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком.....	98
3.6 Спецификация показателей качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого	105
Выводы по главе	106
ГЛАВА 4. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПЫ СЕРДЦЕВИДНОЙ ЦВЕТКОВ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО	108
4.1 Определение острой токсичности липы сердцевидной цветков экстракта жидкого	108
4.2 Исследование иммуностропных свойств липы сердцевидной цветков экстракта жидкого	109
4.3 Биотестирование липы сердцевидной цветков экстракта жидкого на мембраностабилизирующее и антиоксидантное действие на культуре <i>Parametium</i> <i>caudatum</i>	121
Выводы по главе	124

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КОРРИГИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ ЛИПЫ СЕРДЦЕВИДНОЙ ЦВЕТКОВ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО	126
5.1 Исследования по разработке сиропа липы.....	126
5.1.1 Исследования по выбору вспомогательных веществ для сиропа липы	126
5.1.2. Исследования по выбору консерванта в составе сиропа липы.....	130
5.1.3 Состав и технологическая схема получения сиропа липы	131
5.1.4 Изучение стабильности сиропа липы в процессе хранения	137
5.1.5 Определение острой токсичности сиропа липы	139
5.2 Разработка леденцов на основе липы сердцевидной цветков экстракта жидкого	140
5.2.1 Выбор состава леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким..	140
5.2.2 Разработка технологии леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким	142
5.2.3 Исследование по определению нормируемых показателей и изучению стабильности леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким	145
Выводы по главе	149
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	152
ПРИЛОЖЕНИЕ А	174
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	179
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	181
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	183
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	185

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ - биологически активные вещества

ВВ – вспомогательные вещества

ДВ- действующие вещества

ГОСТ – государственный стандарт

ГФ – государственная фармакопея

КМ – коэффициент мобилизации

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

НГ – нейтрофильные гранулоциты

НД – нормативная документация

ОБИ – острая бактериальная инфекция

ОВИ – острая вирусная инфекция

ОСТ – отраслевой стандарт

ЛРС - лекарственное растительное сырьё

ЛП – лекарственные препараты

СЦИ – средний цитохимический индекс

СО – стандартный образец

ТУ – технические условия

ФАН – активно фагоцитирующие нейтрофилы

ФИ – фагоцитарный индекс

ФПК – формазан-позитивные клетки

ФС – фармакопейная статья

ФЧ – фагоцитарное число

ЭЦЛ – экстракт цветков липы

ЭВ – экстрактивные вещества

%П – процент переваривания бактериального антигена

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В настоящее время вопросы расширения возможностей использования отечественного лекарственного растительного сырья, отличающегося эффективностью и безопасностью, являются основным стратегическим направлением развития фармацевтической отрасли Российской Федерации согласно «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года» и «Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года». При этом, важное значение при получении фитопрепаратов имеет разработка ресурсосберегающей технологии, которая способствует повышению качества и экономической эффективности готовой продукции.

Среди многочисленных растительных объектов обращает на себя внимание липа сердцевидная, имеющая большой опыт использования в народной медицине, благодаря своему широкому фармакологическому диапазону, и в тоже время на современном фармацевтическом рынке практически отсутствуют официальные лекарственные средства из этого распространенного отечественного сырья. Одними из причин является очень сложный, многопрофильный фитохимический состав, что затрудняет выбор центрального целевого направления использования, а также отсутствие оптимальных технологических, экономически выгодных решений в отношении лекарственных средств из липы сердцевидной и соответственно комфортных лекарственных форм.

Анализ ассортимента лекарственных препаратов, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств, выявил, что доля противовоспалительных, иммуностимулирующих, адаптогенных и антиоксидантных ЛС составляет всего 1,32% от общего числа, из них лишь 1/5 приходится на долю лекарственных препаратов растительного происхождения. Применение ЛС на основе фитокомпонентов обусловлено возможностью их длительного приёма за счет сведённого к минимуму побочного действия. В тоже время лекарственные средства растительного происхождения обладают богатым

комплексом биологически активных веществ, в частности флавоноидов и антиоксидантов и могут быть использованы при лечении и профилактике инфекционно-воспалительных заболеваний и иммунодефицитных состояний. В фармакотерапевтической группе иммуностимулирующих и иммуномодулирующих средств среди фитопрепаратов зарегистрированных в ГРЛС известны, лишь препараты содержащие экстракт или сок эхинацеи пурпурной, поэтому такая фармакологическая направленность как иммунотропное действие не может считаться в достаточной мере обеспеченной.

Вышеизложенное свидетельствует об актуальности разработки ресурсосберегающей технологии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и скорректированных лекарственных форм на его основе – сиропа и леденцов, которые позволят расширить ассортимент современных иммунотропных и антиоксидантных лекарственных средств на основе фитокомпонентов.

Степень разработанности темы: особенности химического состава цветков липы сердцевидной и фармакологическая активность их экстракта изучена в работах Дорогойченкова В.Н. (1988), Яковлева А.И. (1987), Медведевой Т.М. (2013), Лобановой А.А., Бурковой Е.А. (2015), Ожимковой Е.В. (2009) и других. Сырьевая база значительна, что подтверждено ресурсными исследованиями (Турова А.Д., 1984, Лесиовская Е.Е., 2003). Однако при использовании в качестве лекарственного средства цветки липы сердцевидной применяются только для изготовления настоев.

Что касается скорректированных лекарственных форм, то конечно, основополагающие исследования принадлежат Тенцовой А.И. (1968). Конкретно скорректированными лекарственными формами подробно занимались Шевченко А.М., Темирбулатова А.М. (2007), Якусевич Р.В. (2013), Царахова Л.Н. (2007), Сысуев Б.Б. (2001), Саблина О.С. (2013) и др.

Однако, дальнейшие исследования в этом направлении применительно к конкретному объекту – цветкам липы сердцевидной целесообразны и практически значимы. Такие данные свидетельствуют о целесообразности дальнейших научных исследований в этом направлении.

Цель исследования: разработка ресурсосберегающей технологии получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого, его стандартизация, подтверждение фармакологической активности и создание на его основе скорректированных лекарственных форм.

Задачи исследования:

1. разработать технологию получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого с использованием ресурсосберегающего метода;
2. провести определение основных показателей качества экстракта, установить нормы качества, валидировать используемые для него методики;
3. разработать состав, технологию и нормы качества сиропа и леденцов содержащих экстракт цветков липы сердцевидной;
4. разработать и утвердить нормативную документацию: акт технологической апробации на экстракт и сироп липы;
5. провести доклинические исследования для подтверждения иммуностимулирующего и антиоксидантного действия разработанного липы сердцевидной цветков экстракта жидкого.

Научная новизна исследования: впервые предложен способ получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого методом реперколяции с применением ресурсосберегающей технологии (патент РФ № 2684782). Получение скорректированных лекарственных форм на основе экстракта цветков липы сердцевидной – сиропа и леденцов и обоснование их состава также проведено впервые. Разработана технологическая схема производства экстракта, способы качественного и количественного анализа действующих веществ (ДВ) в экстракте и скорректированных лекарственных формах. При проведении доклинических исследований впервые получены данные об иммуностимулирующей активности экстракта цветков липы сердцевидной в отношении функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов. Выполнена стандартизация липы сердцевидной цветков экстракта жидкого.

Теоретическая и практическая значимость работы: показана возможность составления технологической схемы ресурсосберегающего типа для

цветков липы сердцевидной, содержащих флавоноидную группу и обладающих иммуностропным действием. Такая схема может в дальнейшем быть использована для подобных сырьевых объектов. Поэтому возможен выпуск корригированных лекарственных форм на основе экстракта цветков липы сердцевидной, полученного методом реперколяции, обладающих иммуностропным и антиоксидантным действием в отношении клеток врожденной иммунной системы - нейтрофильных гранулоцитов.

На разработанный экстракт цветов липы сердцевидной жидкий 1:1,8 составлен лабораторный регламент, утвержденный в ПМФИ – филиале ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России от 10.04.2018г. Технологическая апробация экстракта подтверждена актом ООО «Флора Кавказа» от 05.06.2018г., технологическая апробация сиропа липы подтверждена актом ООО «Флора Кавказа» от 27.09.2018г. (Карачаево-Черкесская Республика). Критерии и способы оценки качества разработанного экстракта, а также методики исследования иммунологической активности внедрены в работу центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (акт внедрения от 18.12.2019). Показатели ресурсосберегающей технологии экстракта липы, используются в учебном процессе на кафедре фармации ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (акт внедрения от 18.12.2019) с целью обобщения ресурсосберегающих направлений этой группы БАВ.

Методология и методы исследований: при проведении диссертационной работы использованы различные методы исследований: технологические, спектрофотометрические, физико-химические, фармакологические (в т.ч. иммунологические) и статистические. Методология работы основывается на концепции фармацевтической разработки требований ГФ Российской Федерации и научных трудах в области фармацевтической технологии.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты процесса экстрагирования цветков липы сердцевидной: выбор оптимального экстрагента, метода и условий экстракции;
- результаты выбора оптимальных критериев и методов оценки качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого;

- результаты разработки оптимального состава, технологии и норм качества сиропа с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким;
- результаты исследования по разработке оптимального состава, технологии и норм качества леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким;
- данные по исследованию иммунологической и антиоксидантной активности липы сердцевидной цветков экстракта жидкого.

Степень достоверности и апробация результатов: достоверность полученных результатов достигнута благодаря использованию ресурсосберегающих технологических методов и научных подходов, позволяющих получить воспроизводимые и однозначные результаты. Результаты исследования обработаны с использованием современных методов статистической обработки с учетом характера распределения выборки.

Основные результаты работы доложены на научно-практической конференции с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки» (Пермь, 2018), на VII Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2018), на XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017), на VI Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2017), V Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, Казахстан, 2017), на V Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2016), IV Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, Казахстан, 2016), на Всероссийской научно-практической конференции «Теоретические и прикладные исследования в области естественных, гуманитарных и технических наук» (Прокопьевск, 2016), на 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов

ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2016).

По теме диссертационной работы опубликовано 15 работ, из них 2 в рецензируемых научных изданиях Перечня ВАК и 3 работы, индексируемые в базах цитирования Web of Science, Scopus, получен 1 патент.

Личный вклад автора заключается в разработке дизайна диссертационного исследования, подборе оптимальных методик и общей концепции научной работы. Автор провел анализ и обобщение источников отечественной и зарубежной литературы, а также патентный поиск проведены автором диссертационной работы. Технологические и биологические исследования проводились автором на кафедре фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Физико-химические исследования осуществлялись на базе кафедры фармацевтической и токсикологической химии биотехнологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, также непосредственно автором диссертации. Выполнение иммунологических исследований, определение острой токсичности проводились автором совместно с научными сотрудниками отдела клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Таким образом, объем личного вклада автора составляет не менее 90%.

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ: диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, номер государственной регистрации темы 115081110023.

Объём и структура диссертации: диссертационная работа представлена на 187 страницах, содержит иллюстративный материал: 62 таблицы, 22 рисунка, состоит из оглавления, списка сокращений, введения, 5 глав, заключения и списка литературы, включающего 181 источник из них 19 - иностранных авторов, а также 5 приложений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

На сегодняшний день на российском фармацевтическом рынке наблюдается увеличение предложений доли препаратов растительного происхождения, что обусловлено доступной ценовой политикой при широком спектре фармакологической активности данной группы препаратов [13, 20].

Несмотря на увеличение ассортимента синтетических лекарственных препаратов, ряд современных средств был получен из лекарственных растений, используемых в народной и традиционной медицине. Так, в народной медицине широко используются сок, настой и отвар соцветий липы сердцевидной для полоскания ротовой полости, как потогонные средства при простудных заболеваниях, также в комплексной терапии заболеваний респираторного тракта различной этиологии (бронхиальная астма, кашель, ангина, пневмония); мочеполовой системы (нефриты, циститы, уретриты, мочекаменная болезнь, бесплодие), а также при неврологических нарушениях (эпилепсия, судороги, неврозы, головные боли) [102]. Терапевтический эффект основан на содержании в данном лекарственном растении богатого комплекса биологически активных веществ. Одними из основных ДВ цветков липы сердцевидной выступают полисахариды, сапонины, гликозиды и флавоноиды [142, 143, 144].

Проведение анализа химического состава растений, применяемых в народной медицине, позволяет выделить лекарственное растительное сырье, которое можно рассматривать, как потенциальный источник для разработки современных лекарственных средств.

1.1 Цветки липы сердцевидной, как возможный объект для корректированных лекарственных форм имунотропного действия

Испокон веков люди использовали ЛРС для лечения различных заболеваний. Еще в древней Руси отдавали предпочтение лекарствам, приготовленным из растений, одним из широко используемых был и липовый

цвет [124]. Настои и отвары цветков липы сердцевидной оказывают успокаивающее, противосудорожное и болеутоляющее действие, что особенно ценно при гипертермии. Цветы липы сердцевидной обладают противовоспалительными и антисептическими свойствами, благодаря таким веществам, как гликозиды, цветы липы обладают потогонным, а также жаропонижающим действием [178, 168].

По мнению Лесиовской Е.Е., липа сердцевидная относится к растениям антигипоксантами, так как предупреждает повреждение нейронов головного мозга при токсических воздействиях при интоксикациях различного генеза, нормализуют энергетический обмен в клетках нервной, иммунной и эндокринной системы [70]. Имеются данные об иммуностимулирующем эффекте компонентов соцветий липы [165, 173]. Показано, что гетерополисахариды цветков липы обладают антикоагулирующим действием, а также являются антигипоксантами и иммуностимуляторами [160, 159].

При гепатитах холециститах, желчекаменной болезни и поражениях желудка применяют настои и отвары цветков липы сердцевидной (М.А. Носаль, И.М. Носаль, 1990), также они обладают противоязвенной активностью, что экспериментально подтверждено для скорректированной лекарственной формы – сиропа с экстрактом соцветий липы сердцевидной [94, 112].

Гипогликемические свойства цветков липы обусловлены содержанием в них флавоноидов, представленных в основном кверцетином и кемферолом, что было изучено Л.А. Ашаевой [9].

Для придания кожи эластичности рекомендуется умывать лицо настоем липового цвета в соотношении 1:20 [48]. В гомеопатической области соцветиями липы сердцевидной излечивают расстройства ЖКТ, метеоризм [102].

В настоящее время на фармацевтическом рынке цветки липы представлены в виде измельченного сырья и фильтр-пакетов, брикетов, а также потогонного сбора, состоящего из смеси равных частей липы и плодов малины, при этом важно отметить отсутствие ЛФ на основе экстракта цветков липы сердцевидной [21, 152].

1.1.1 Фармакогностическая характеристика лекарственного растения Липа сердцевидная – *Tilia cordata* Mill.

Растение Липа сердцевидная - *Tilia cordata* Mill. встречается в Европе и на западе Азии. К естественным местам обитания относят территории от Южной Британии и Центральной Скандинавии до европейской части России и стран Средиземноморского региона. Северная граница ареала проходит по территории Норвегии. На территории России липа сердцевидная распространена в лесостепных и лесных зонах Западной Сибири, Крыма, а также на Южном Урале и на Кавказе [141, 42, 149].

Видоспецифичным является морфология соцветий липы сердцевидной: щитковидные, состоящие из 5–15 цветков на удлинённых цветоножках с общим цветоносом, сросшимся в нижней части с главной жилкой прицветного листа светло-желтого и зеленовато-желтого цвета. Цветки липы сердцевидной характеризуются как правильные, их диаметр составляет 1–1,5 см, лепестки беловато-желтые, чашелистики желтовато- или зеленовато-серые. Запах слабый, ароматный, характерный. Вкус сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости. Плод – шаровидный односемянный орешек до 2 мм в диаметре. Цветет в июле, плоды созревают в октябре [40, 52, 119].



Рисунок 1.1.1.1 - Цветки липы сердцевидной – *Tilia cordata* Mill.

С лечебной целью используют цветки липы сердцевидной (*Flores Tiliae*), согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания [40] лекарственное сырье состоит из соцветий с прицветным листом удлинено-ланцетовидной формы с притупленной верхушкой, длиной около 6 см, с цельным краем светло-зеленого цвета, запах сырья слабый (Рисунок 1.1.1.1). Сбор цельных соцветий вместе с прицветным листом производят в сухую погоду во время цветения. Липовый цвет сушат в тени в проветриваемых помещениях или на чердаках. Срок годности высушенного сырья 2 года [40, 39, 85, 99, 29].

1.1.2 Фитохимический состав цветков липы сердцевидной

Цветки липы сердцевидной содержат богатый комплекс БАВ [180, 177, 81, 43], в том числе флавоноидов [78, 175, 76, 77, 174] (Таблица 1.1.2.1).

Таблица 1.1.2.1 – Фитохимический состав биологически активных веществ цветков липы сердцевидной

Группа БАВ	Вещества
Углеводы (поли-, ди-, моносахара)	гомо- и гетерополисахариды (7-10%), сахароза, галактоза, глюкоза, рамноза, арабиноза, ксилоза и галактуроновая кислота
Органические спирты и эфиры	эфирные масла (0,05%), сесквитерпеновый спирт фарнезол
Неомыляемые липиды	тритерпеновые сапонины, воска
Флавоноиды, антиоксиданты, фенольные соединения	тилирозид, тилиацин, тилианин, госсипитрин, астрагалин, гуаяверин кверцитрозид, изокверцитрин, винсетоксикозид В, прунин, афзелин, кверцетин, эриодиктиол; дубильные вещества
Гликозиды	гесперидин (флавоновый гликозид)
Витамины и витаминоподобные вещества	каротин, аскорбиновая кислота, вещества сходные с витамином Р и ретинолом

Запах свежего сырья зависит от присутствия фарнезола главного компонента эфирного масла. Содержание суммы флавоноидов в цветках липы колеблется от 1,2 до 2,5% [72, 114].

Полисахариды цветков липы сердцевидной оказывают обволакивающее, противовоспалительное, смягчительное и отхаркивающее действие при острых и хронических заболеваниях дыхательных путей. Помимо этого, полисахариды, содержащиеся в отварах, переходят в эфирные масла и другие группы биологически активных веществ, а также являются пролонгаторами других биологически активных веществ и лекарств [15, 160, 78, 105].

Гликозиды оказывают потогонное, жаропонижающее действие, а также способствуют выведению токсинов [73, 150].

Флавоноиды оказывают эффективный антиоксидантный эффект, способны уменьшать оксидативный стресс путем подавления микросомального перекисного окисления липидов [14, 181, 170, 166, 164, 146, 163].

Таким образом, липа сердцевидная является лекарственным растением, содержащим эфирные масла, полисахариды, сапонины, флавоноиды и гликозиды в качестве основных групп действующих веществ и обладающим широким спектром терапевтического действия.

1.2 Корректированные лекарственные формы на основе фитокомпозиций как перспективное направление фармацевтической технологии

Согласно ГФ РФ XIV издания сиропы это жидкая лекарственная форма в виде водного раствора вязкой концентрации со сладким вкусом, содержащая сахарозу в концентрации не менее 45% или её заменители [40].

Сиропа используют для корректирования горького или неприятного вкуса некоторых ЛС, в таком случае их классифицируют как вкусовые (простой сахарный сироп) или пищевые (содержащие фруктовые соки или пищевые концентраты, имитирующие фруктовый вкус и аромат - малиновый, клубничный и др.) [120, 84, 71].

Широко известны и изучены консервирующие характеристики сиропов, что важно при длительном хранении ЛП. Концентрированные растворы (64% водный раствор сахарозы) блокируют рост и развитие микроорганизмов за счет

гипертонического эффекта. Бензойная кислота, натрия бензоат, калия сорбат, нипагин и нипазол также часто используют в качестве консервантов, входящих в состав сиропов [56, 153, 131, 133, 80].

Многие секретолитики являются сиропами на основе ЛРС, они могут быть монокомпонентными и комплексными, например, сироп Пертуссин и Стоптуссин, соответственно. Также встречаются желчегонные («Холосас»); адаптогенные, (сироп алоэ с железом, сироп солодки); слабительные (сироп крушины) и седативные (Пассифит) сиропы [122, 55]. Большинство сиропов применяются при простудных заболеваниях как смягчающее кашель и отхаркивающее средство (Пертуссин, сироп алтея, сироп солодки), при железодефицитной анемии (сироп алоэ с железом), при нехватке витамина С (сироп шиповника) и т.д. [153,130, 145] (Таблица 1.2.1).

Таблица 1.2.1 – Характеристика ассортимента сиропов на основе лекарственного растительного сырья

Название препарата/ Производитель	Фармакологическое действие	Фармакологическая группа	Активные компоненты
Алоэ сироп с железом/ Россия	Общетонизирующее, адаптогенное	Стимуляторы гемопоэза	Свежеприготовленный 20% раствор хлорида закисного железа, сироп алоэ древовидного
Алтея сироп / Россия	Противовоспалительное местное, отхаркивающее	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Алтейного корня экстракт
Биоарон С / Польша	Иммуностимулирующее	Иммуностимулирующее средство растительного происхождения	Алоэ древовидного листьев свежих водный экстракт
Бронхikum С / Германия	Отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Тимьяна обыкновенного травы экстракт
Бронхинол / Россия	Противовоспалительное, отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Подорожника ланцетолистного листьев экстракт, мать-и-мачехи листьев экстракт, мятное масло, эвкалиптовое масло

Бронхипрет / Германия	Бронхолитическое, секретолитическое, противовоспалительное, отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Плюща листьев экстракт, тимьяна обыкновенного травы экстракт
Бронхоплант / Россия	Отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Тимьяна обыкновенного травы экстракт
Геделикс / Германия	Спазмолитическое, муколитическое, отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Плюща листьев экстракт
Гербион сироп первоцвета / Словения	Противомикробное, противовоспалительное, отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Первоцвета корней экстракт, тимьяна обыкновенного травы экстракт
Гербион сироп плюща / Словения	Муколитическое, отхаркивающее, бронхоспазмолитическое	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Плюща листьев экстракт
Гербион сироп подорожника / Словения	Противомикробное, противовоспалительное, отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Аскорбиновая кислота, Мальвы цветков, подорожника ланцетовидного листьев экстракт
Доктор Мом / Индия	Отхаркивающее, противовоспалительное, муколитическое, отвлекающее, бронхолитическое, местнораздражающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Адатоны васики экстракт, алоэ барбадосского экстракт, базилика священного экстракт, девясил корневой экстракт, имбиря лекарственного корневищ экстракт, куркумы длинной корневищ экстракт, солодки голой корней экстракт, терминалии белерики экстракт
Доктор Тайсс сироп с подорожником / Германия	Муколитическое, противовоспалительное, отхаркивающее	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Подорожника ланцетовидного экстракт
Калины сироп / Россия	Общеукрепляющее, потогонное	Потогонное средство растительного происхождения	Калины плоды
Крушины сироп / Россия	Слабительное	Слабительное средство растительного происхождения	Крушины ольховидной кора
Кука / Индия	Отхаркивающие	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Азилика священного листьев экстракт, адатоны сосудистой листьев экстракт, альпинии галанги листьев экстракт

			сухой, солодки голой корней и корневищ экстракт сухой, перца длинного плодов экстракт сухой, мяты полевой листьев экстракт сухой
Лазолван ФИТО / Германия	Отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Тимьяна обыкновенного травы экстракт
Линкас / Пакистан	Отхаркивающее	Другие респираторные средства в комбинациях	Адхатоды сосудистой листьев экстракт, перца длинного плодов и корней экстракт, иссопа лекарственного листьев экстракт, альпинии галанга корней и корневищ экстракт, кордии широколистной плодов экстракт, алтея лекарственного цветков экстракт, зизифуса настоящего плодов экстракт, оносмы прицветковой листьев и цветков экстракт
ОРВИС Бронхо Тимьян / Россия	Отхаркивающее	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Тимьяна обыкновенного травы экстракт
Пассифит / Россия	Седативное	Седативные средства в комбинациях	Экстракт валерианы, экстракт шишек хмеля, экстракт чабреца, настойка боярышника, настойка мяты
Пектолван плющ / Украина	Отхаркивающее	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Плюща листьев экстракт
Пертуссин / Россия	Отхаркивающее	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей в комбинациях	Тимьяна ползучего травы экстракт, калия бромид
Проспан / Германия	Отхаркивающие	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Плюща листьев экстракт
Сироп от кашля с подорожником и мать-и- мачехой / Нидерланды	Противовоспалительное, отхаркивающее	Другие респираторные средства в комбинациях	Подорожника ланцетолистного листьев экстракт, мать-и-мачехи листьев экстракт, мятное масло, эвкалиптовое масло

Солодки корня сироп / Россия	Отхаркивающее	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Солодки корни
Стоптуссин- Фито / Израиль	Отхаркивающее, муколитическое, противокашлевое	Другие респираторные средства в комбинациях	Подорожника ланцетовидного листьев экстракт, тимьяна обыкновенного травы экстракт, тимьяна ползучего травы экстракт
Суприма- Бронхо / Индия	Бронхолитическое	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Адатыды сосудистой экстракт, солодки голой экстракт, куркумы длинной экстракт, базилика священного экстракт, имбиря лекарственного экстракт, паслена желтоплодного экстракт, перца длинного экстракт, кардамона настоящего экстракт
Трависил / Индия	Противовоспалительное, отхаркивающее, муколитическое	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Экстракт: абруса прекаторного семян, адатыды сосудистой листьев, акации катеху коры, альпинии лекарственной корневищ, базилика священного, имбиря лекарственного корневищ, куркумы длинной корневищ, перца длинного плодов, перца черного плодов, солодки голой корней, терминалии белерики плодов, терминалии чебулы плодов, фенхеля обыкновенного плодов, эмблики лекарственной плодов, рацементол
Туссамаг / Германия	Бронхолитическое, отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Тимьяна обыкновенного травы экстракт
УроКам / Россия	Уроантисептическое, спазмолитическое, противовоспалительное действие на мочеполовую систему	Антисептики и дезинфицирующие средства в комбинациях	Листьев березы экстракт, брусники и толокнянки обыкновенной экстракт, плодов клюквы экстракт
Холемакс / Россия	Желчегонное	Желчегонное средство растительного происхождения	Шиповника плодов экстракт
Холос / Россия	Желчегонное	Желчегонное растительное средство	Шиповника плодов экстракт

Холосас / Россия	Желчегонное	Желчегонные средства и препараты желчи	Шиповника плодов экстракт
Шиповника плодов сироп / Россия	Повышение неспецифической резистентности организма	Поливитаминальное средство растительного происхождения	Шиповника плоды
Эвкабал / Германия	Противовоспалительное, отхаркивающее	Отхаркивающее средство растительного происхождения	Подорожника экстракт, тимьяна экстракт
Энтофит Диаро / Пакистан	Противодиарейное	Противодиарейные средства в комбинациях	Экстракт: коры голаррены пушистой, плодов мирта обыкновенного, плодов и корней барбариса острого, плодов айвы бенгальской, коры дуба красильного, листьев бузины великолепной

Таким образом, при разработке растительных лекарственных препаратов, часто нуждающихся в корригировании, сиропы являются перспективной ЛФ за счет улучшения вкуса данной группы препаратов и создания комфортных условий приёма, что особо важно для пациентов детского и пожилого возраста [100].

В ГФ РФ XIV впервые введена ОФС «Леденцы», согласно которой леденцы - это твердая дозированная ЛФ, получаемая способом выливания, содержащая одно или несколько ДВ, равномерно распределенных в соответствующей основе, и предназначенная для рассасывания с целью оказания местного действия в полости рта и глотке [40, 16, 117].

Леденцы получают при смешении и последующем расплавлении, как правило, сахара с патокой или сахарным сиропом. Обычно масса леденца составляет 1,5-4,5 г, а влажность карамельной массы 0,5-1,5 %. Биологически активные вещества могут всасываться через слизистую оболочку ротовой полости, таким образом, предохраняя ДВ от метаболизма в пищеварительном тракте [108, 142, 128, 106].

Карамель (Caramel) – синоним леденцы, применяются как антисептические, противогрибковые средства для лечения воспалительных заболеваний горла с анестезирующим или антибактериальным спектрами действия.

Благоприятно относятся к леденцам, как практикующие врачи, так и пациенты. Постепенное всасывание биологически активных ЛВ через слизистые полости рта и горла является преимуществом при назначении лечения пациентам, которые не могут глотать твердые ЛФ [66, 68, 84]. В большинстве случаев леденцы используют при воспалительных заболеваниях полости рта и горла в качестве ЛС анестезирующего или антибактериального спектра действия [104].

Твердые корригированные ЛФ содержат лекарственное вещество и основу, медленно растворимую в воде, отличаются разнообразием геометрической формы и консистенции [70] (Таблица 1.2.2).

Таблица 1.2.2 – Характеристика ассортимента твердых корригированных лекарственных форм на основе лекарственного растительного сырья

Название препарата / Производитель	Фармакологическое действие	Фармакологическая группа	Активные компоненты
Таблетки для рассасывания			
Трависил / Индия	Противовоспалительное, отхаркивающее, муколитическое	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Экстракт: абруса прекаторного семян, адатоды сосудистой листьев, акации катеху коры, альпинии лекарственной корневищ, базилика священного, имбиря лекарственного корневищ, куркумы длинной корневищ, перца длинного плодов, перца черного плодов, солодки голой корней, терминалии белерики плодов, терминалии чебулы плодов, фенхеля обыкновенного плодов, эмблики лекарственной плодов, рацементол
Эхинацея / Россия	Иммуностимулирующее	Иммуностимулирующее средство	Эхинацеи экстракт
Пастилки			
Бронхikum С / Германия	Противовоспалительное, противокашлевое, муколитическое, отхаркивающее	Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей	Тимьяна обыкновенного травы экстракт

Доктор Мом растительные пастилки от кашля / Россия	Отхаркивающее, противовоспалительное, отвлекающее, местнораздражающее	Отхаркивающее средство	Солодки голой корни, имбиря лекарственного корневища, эмблики лекарственной плоды, левоментол
Линкас Лор / Пакистан	Отхаркивающее	Другие респираторные средства в комбинациях	Адхатоды сосудистой листьев экстракт, солодки голой корней экстракт, перца длинного плодов и корней экстракт, фиалки душистой цветков экстракт сухой, иссопа лекарственного листьев экстракт сухой, альпинии галанга, корневищ экстракт

Из анализа Таблицы 1.2.2. видно, что современный ассортимент входящих в группу твёрдых корригированных ЛФ на основе лекарственного растительного сырья невелик (таблетки для рассасывания, пастилки). В настоящее время в фармацевтической технологии разработка данных ЛФ является перспективным направлением, особенно на основе фитокомпонентов [103, 79].

1.2.1 Характеристика современных корригентов, их роль в медицинской практике

ЛП с неприятным вкусом и запахом создают определенные трудности при пероральном приеме. Пациенты, особенно дети, зачастую отказываются от приема таких лекарственных препаратов. Решением данной проблемы служит применение корригирующих веществ. Корригированные ЛФ широко применяются в современной медицинской практике [4, 135, 21, 23].

Органолептические свойства оказывают на человека комплексное воздействие в виде комбинации вкусовых ощущений запаха и консистенции. Важно отметить, что восприятие вкуса и запаха по-разному оценивается пациентами различного возраста [6]. Поэтому препараты, используемые в педиатрии должны обладать сладким вкусом и фруктовым ароматом, а

лекарственные средства для взрослых предпочтительно должны быть менее сладкими, в геронтологии рекомендуются мятные ароматизаторы [162].

Выбор корригентов представляет сложную задачу, т.к. особых правил для получения полного препарата нет. Ведущую роль при исправлении органолептических свойств ЛС играют чисто эмпирические подходы, основанные на субъективном восприятии вкуса и запаха [140].

Натуральными корригентами являются эфирные масла или экстракты, которые содержат корригирующие вещества, полученные из пряностей, частей вегетативных и генеративных органов растений или продуктов их ферментации, основная функция которых состоит в корригировании вкуса и/или запаха [134].

Биохимические и физические аспекты молекулярных взаимодействий при формировании ощущений вкуса изучены не полностью. В последнее время, преобладающей теорией является теория сорбции веществ вкусовыми рецепторами слизистой ротовой полости за счет образования большого количества водородных связей, предложенная еще в 1920 году академиком П.П. Лазаревым [4, 64].

Так, согласно исследованиям А.В. Кузнецова с целью расширения диапазона потребителей препараты могут выпускаться в форме микстур, таблеток, порошков, сиропов, леденцов или аэрозолей с различными вкусами: мед и лимон, лимон, черная смородина, ментол и эвкалипт, апельсин, клубника, например, лекарственные средства «Coldrex», «Strepsils», «Доктор МОМ» [64].

Корригенты вкуса. Наиболее распространёнными корригентами вкуса выступают подсластители. В качестве подсластителей используются производные аминокислот (аспартам), сахароза, декстроза, спирты (сорбитол, маннитол, ксилит); дитерпены (стевииозиды), а также экстракты стевии и периллы; сахарин [64].

Сладкий вкус поддается коррекции карамелью, ванилью, ароматом банана или яичного крема. В случаях тяжело поддающихся корригированию используют улучшение вкуса путем добавления малых количеств хлорида натрия («Salt effect») [136].

Следует отметить, что кроме подбора корректирующих веществ улучшающих вкусовые характеристики, необходимо учитывать возможность замены сахарозы на другие подсластители, это обусловлено увеличением количества заболеваний, связанных с нарушением углеводного обмена (сахарный диабет, ожирение и др.).

Подслащивающие вещества, применяемые в фармацевтической и пищевой промышленности, условно делятся на две группы в зависимости от природы происхождения: натуральные и синтетические. Основным подслащивающим веществом натурального происхождения является сахароза, тем не менее, обладающая рядом недостатков – высокой калорийностью и не применяется для пациентов с нарушением углеводного обмена, в связи с этим становится целесообразным употребление заменителей сахарозы - фруктозу, ксилита, сахарина и др. [69, 161]. Метаболический путь ксилита, маннита и сорбита значительно отличается от глюкозы, они не участвуют в регуляции выработки инсулина и не оказывают влияния на изменение содержания её уровня в крови.

В настоящее время в качестве заменителя сахара широко используется вещество сахарин, являющийся натриевой солью 1,2-бензизотиазолина-3-ОН-1,1-диоксида. Одним из отрицательных качеств данного вещества является его горько-металлический привкус, кроме того имеются сведения о токсичных эффектах и относительно низкой скорости биodeградации сахарина [171].

Альтернативой сахарину служат заменители сахара – изомальты, которые были получены из сахарозы (свекловичный сахар) компанией «Palpting GmbH» и выпускаются в форме гранул. Изомальты обладают низким гликемическим эффектом и калорийностью, не имеют остаточного привкуса и охлаждающего эффекта, появляющегося в результате эндотермической реакции растворения, характерной для других многоатомных спиртов [64].

Многие фруктовые ароматы корректируют *кислый вкус* путем добавления подсластителей, часто используются цитрусовые ароматы (лимон, апельсин, грейпфрут), а также черничный, абрикосовый, вишневый, малиновый и ананасовый. Например, для аскорбиновой кислоты характерен выраженный кислый вкус, который можно компенсировать добавлением веществ имеющих

апельсиновый вкус. В некоторых случаях добавление веществ с солоноватым вкусом нивелирует кислоту, и усиливают эффект коррекции для горьких ЛП.

Некоторые кислоты являются многофункциональными веществами и действуют как корригенты для придания ощущения кислого вкуса, консерванты, синергисты антиоксидантов. При их использовании надо учитывать способность кислот к изменению рН ЛФ, способных нарушать их стабильность и фармакологическую активность. Также в качестве корригентов кислого вкуса используются соленые вещества (хлорид натрия, калия и др.) [60,161].

Для препаратов имеющих *горький вкус* необходима коррекция сладкими ароматами ванили, какао, шоколада, карамели или фруктовыми ароматами апельсина, банана, черной смородины, ежевики.

Широко распространенными веществами, маскирующими горечь, являются эссенции мяты перечной, абрикоса, вишни и корицы. В случае недостаточной коррекции горького вкуса используют хлорид натрия или лимонную кислоту [75].

Солёный вкус корригируют концентрированными растворами сахарозы или её заменителями с добавлением фруктового вкуса (абрикосового, вишневого, лимонного, апельсинового, ежевичного, грейпфрутового, ананасового) и легким подкислением [62].

Корригенты запаха. В некоторых случаях, кроме корригирования вкуса, требуется маскировка нежелательных запахов, для этих целей необходимо использовать ароматические вещества. Обязательным условием при применении корригентов запаха является их способность растворяться в липидах и частично в воде, а также летучесть. Подбор корригирующего агента осложняется, во-первых, из-за того, что вкус и запах воспринимается человеком сочетано, во-вторых, ощущения имеют индивидуальный характер, их восприятие зависит от возраста, национальности, пола и наличия некоторых заболеваний, в-третьих, из-за взаимного влияния веществ и взаимодействия их метаболитов с рецепторами, например эффект корригента ментола (анестезирующее действие, специфический запах) [63].

Корригенты запаха подразделяются на натуральные, например, мед, эфирные масла и корригенты идентичные натуральным - ванилин или синтетический ментол.

В последние годы предлагаются новые, преимущественно синтетические корригенты запаха, благодаря их широкому применению и более низкой стоимости, что приводит к вытеснению натуральных корригентов. Зачастую в состав ЛП входит вторичное ароматическое вещество, которое определяет окончательный запах (малина-ментол, вишня-ментол, абрикос-корица). В данном случае функцию маскировки нежелательных запахов выполняют ментол и корица, а конечный аромат ЛП придает малина, вишня или абрикос. Ароматические вещества устойчивы в форме эссенций, спиртовых экстрактов, и редко водных растворов [162].

Применение *корригентов цвета (красителей)* необходимо для ЛП, имеющих неприятный вид, либо прозрачную окраску, что актуально использовать в педиатрической практике. Красная, голубая или фиолетовая краска считается привлекательной для детей, меньшей популярностью обладает оранжевый, зелёный и розовый цвета, чёрные и неокрашенные лекарственные формы, как правило, не вызывают интереса у ребенка [126].

Красители природного происхождения выделяют из растений, окраска которых обусловлена присутствием в них антоцианов (сине-фиолетовая), каротиноидов (желто-оранжевая), хлорофиллов (желто-зеленая). Важно отметить, что натуральные красители имеют следующие недостатки: разлагаются под действием света, легко окисляются, меняют окраску в условиях изменения pH среды, обладают малой красящей способностью.

В России и в странах СНГ разрешены для окрашивания ЛП синтетические красящие вещества: кислотный красный 2С, индигокармин (фиолетовый), тропеолин (желтый), руберозум (красный), церулезум (синий) и др. [60].

Консерванты. В фармацевтической промышленности для консервирования применяют: метиловый и бутиловый эфиры п-оксибензойной кислоты, сорбиновую и бензойную кислоты, бензоат натрия, а также этиловый спирт. Для

консервирования сахарного сиропа, который наиболее подвержен микробной контаминации, установлен оптимальный состав консервантов: 0,28 % натрия бензоата и 0,07 % сорбиновой кислоты. Хорошими консервирующими свойствами обладает смесь сахарозы, пектина, сорбиновой и лимонной кислот, которая не вызывает дисбактериоза в ЖКТ и эффективно подавляет патогенную микрофлору [11]. Также прекрасным аналогом синтетических пищевых консервантов служат эфирные масла: лимонного эвкалипта, лаванды, бергамота, чайного дерева, мяты перечной и корицы, которые используются в фармацевтической и пищевой промышленности [58].

Позитивные органолептические свойства сиропов (вкус, цвет и запах), обеспечивающие комфортность их приема, определяют приоритетное использование их в качестве скорректированных ЛФ, тем не менее, процесс их корректирования, как жидких пероральных ЛФ, методически довольно сложен. Необходимо учитывать коррекцию вкуса, цвета и запаха в комплексе с одновременным влиянием используемых веществ - корригентов на фармакологическую активность и стабильность ЛФ [49, 101].

1.3 Лекарственные средства иммуотропного действия на основе природных субстанций

Неблагоприятные эколого-гигиенические условия проживания, однообразная напряженная работа, частые и длительные стрессы способствуют ухудшению общего состояния, напряжению и переутомлению человека. В результате возникают вторичные иммунодефицитные состояния и синдром хронической усталости, которые приводят к снижению трудоспособности, головным болям, хроническим инфекционно-воспалительным процессам, аллергиям и др. Помимо этого токсичные вещества, поступающие в организм человека, нарушают стабильность биологических мембран, являющихся мишенью для действия ядов, токсинов, радиоактивного и ультрафиолетового облучения. Это приводит к развитию иммунопатологических процессов,

накоплению реактогенных метаболитов, а также активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и нарушению функционирования антиоксидантной системы (АОС). В связи с вышеперечисленными процессами, представляется вполне оправданным применение комплексных иммуностимулирующих, противовоспалительных и антиоксидантных препаратов для профилактики и лечения указанных патологических состояний [96,93].

К основным группам заболеваний, при которых целесообразно применение препаратов с иммуномодулирующей активностью, относят острые и хронические инфекционно-воспалительные процессы, вторичные иммунодефицитные состояния, аллергии [96,93].

Нарушения в иммунной системе приводят к хронизации воспалительных процессов инфекционной этиологии. При диагностике некоторых заболеваний не выявляют лабораторных изменений в показателях работы иммунной системы, а клиническая картина соответствует хроническому инфекционно-воспалительному процессу, в таких случаях назначают иммуномодулирующие препараты. Их применяют при острых инфекционно-воспалительных процессах, особенно респираторного и мочеполового тракта, при лечении часто и длительно болеющих детей, а также лиц с иммунодефицитами различного генеза. Коррекции иммуномодуляторами, в частности, поддаются длительные вторичные спонтанные иммунодефицитные состояния неустановленной этиологии [50, 51]. Часто на фоне иммунной недостаточности проявляются клинические симптомы аллергических заболеваний (атопический дерматит с пиодермией, бронхиальная астма с явлениями хронического обструктивного бронхита, рецидивирующий герпетический стоматит и т. д.) при которых рекомендуют использовать иммуотропную терапию [169, 47].

Под иммуотропностью ЛП понимают три возможных принципа их действия: активирующее (иммуностимуляторы), супрессирующее (иммунодепрессанты) и модулирующее (иммуномодуляторы).

Иммуностимуляторы – это лекарственные препараты, усиливающие иммунный ответ, приводя пониженные показатели к нормальным значениям.

Иммунодепрессанты подавляют иммунный ответ при некоторых патологических состояниях (аутоиммунных заболеваниях, пересадке органов, привычной невынашиваемости у беременных и др.). Иммуномодуляторы в терапевтических дозах оказывают восстанавливающее действие на функции иммунной системы (эффективную иммунную защиту). Следует отметить, что эффект иммуномодуляторов зависит от иммунопатофизиологических процессов и этиологических факторов, лежащих в основе заболевания конкретного пациента. Эти ЛС способствуют нормализации показателей иммунитета вне зависимости от их исходного уровня. Таким образом, разработка иммуномодулирующих препаратов, позволяющих сбалансировать эффекторные механизмы иммунного ответа, является наиболее приоритетным направлением [47].

Иммуотропные препараты природного происхождения классифицируют по общепринятой классификации с учетом основных принципов функционирования иммунной системы (эндогенные и экзогенные), а также по отношению к методам их получения (естественные, в том числе рекомбинантные, и синтетические). В Таблице 1.3.1 представлены данные, учитывающие классификацию иммуномодуляторов Р.М. Хаитова и Б.В. Пинегина [47] и характеристики иммуностимуляторов, представленных на фармацевтическом рынке.

Таблица 1.3.1 - Классификация препаратов иммуотропного действия по происхождению

Группа		Естественные	Синтетические	Лекарственная форма
Экзогенные	Микробные	Рибомунил (рибосомы бактерии)	Ликопид (глюкозамил мурамилдипептид)	Таблетки, капсулы, аэрозоль
		Бронхо-Мунал (лизаты бактерий)		
		Имудон (лизаты бактерий)		
		ИРС-19 (лизаты бактерий)		
	Растительные	Иммунал, Иммуноорм (сок эхинацеи пурпурной)	-	Таблетки, растворы

Эндогенные	Нуклеиновые кислоты	Натрия нуклеинат (ДНК и РНК дрожжей)	Полудан (полиадениловая кислота+уридиловая кислота)	Порошки, растворы, эмульсии
		Деринат (ДНК из молока лососевых рыб)		
	Тимические	Тактивин, Тималин, Тимостимулин (пептиды из тимуса крупного рогатого скота)	Тимоген (дипептил глутамил-триптофан)	Растворы, порошки, аэрозоль, кремы, суппозитории
			Имунофан (гексапептид арг-асп-лиз-вал-тир-арг)	
	Костомозговые	Миелопид (комплекс из пяти пептидов)	-	Порошки
	Цитокины	Лейкинферон, Суперлимф (комплекс естественных цитокинов)	-	Растворы, суппозитории, порошки, эмульсии, гели, свечи, мази
		Ронколейкин (рекомбинантный ИЛ-2)	-	
		Беталейкин (рекомбинантный ИЛ-1 β)	-	
		Виферон (рекомбинантный ИФН α -2b)	-	
	Факторы роста	Лейкомакс, Нейпоген (КСФ)	-	

Примечание к Таблице 1.3.1: ИЛ-интерлейкин, ИФН – интерферон, КСФ – колониестимулирующий фактор.

Также важно отметить, что существует группа химически чистых низкомолекулярных и высокомолекулярных иммуномодуляторов, не имеющих аналогов природного происхождения. К низкомолекулярным относят вещества преимущественно пептидной природы (Диуцифон, Галавит, Гепон, Глутоксим, Аллоферон, Неовир, Циклоферон), к высокомолекулярным относят производные различных полимеров (Полиоксидоний).

Несмотря на обширный ассортимент ЛП иммуотропной направленности действия, отмечается скудный перечень препаратов, полученных из

растительного лекарственного сырья, в частности препараты на основе эхинацеи пурпурной [38, 47].

1.3.1 Исходные компоненты и общий ассортимент иммуностропных препаратов растительного происхождения

Препараты на основе лекарственного растительного сырья женьшеня настоящего, элеутерококка колючего, лимонника китайского, родиолы розовой, астрагала и др. в той или иной степени обладают иммуностимулирующим эффектом, но в настоящее время их относят к группе общеукрепляющих и тонизирующих препаратов, а не к лекарственным средствам, селективно влияющим на иммунную систему человека [176, 98, 132, 3].

На фармацевтическом рынке представлены растительные препараты иммуностропной направленности действия, которые согласно фармакотерапевтическим группам делятся на:

1. Иммуностимулирующие средства - Эхинацея (эхинацеи узколистной экстракт), Иммунал, Иммуноорм (эхинацеи пурпурной травы сок);
2. Противовоспалительные средства – Глицирам (солодки голой экстракт);
3. Противовирусные средства – Алпизарин (трава копеечника альпийского), Хелепин (десмодиума канадского травы экстракт);
4. Общетонизирующие средства - Элеутерококк П, Элеутерококк Биокор (элеутерококка колючего жидкий или сухой экстракты), Гербион Женьшень, Доппельгерц Женьшень, Женьшеня настойка (женьшеня настоящего сухой экстракт), Лимонника семян настойка;
5. Антисептические средства - Тогзилгон (фито комплекс: одуванчика лекарственного трава, ромашки цветки, алтея корни, хвоща трава, грецкого ореха листья, тысячелистника трава, дуба кора) [3, 18, 32, 118] (Таблица 1.3.1.1).

Лекарственное растительное сырье (ЛРС), используемое в основе производства данных препаратов, содержит богатый комплекс БАВ, которые

обуславливают, в том числе и иммуностропное действие [98, 82, 97, 165, 44, 46, 65, 139, 95].

Препараты, полученные из данных растений, оказывают мягкое, пролонгированное, стимулирующее действие на иммунитет, при этом они обладают и при этом практически лишены противопоказаний [179, 118, 127].

Таблица 1.3.1.1 - Фитохимическая характеристика лекарственного растительного сырья, обладающего иммуностимулирующим эффектом

Лекарственное растение	Лекарственное сырье	Фитохимический состав
Эхинацея пурпурная	корневища с корнями, трава	Полисахариды, ферменты, эфирное масло; кумаровая, кофейная, линолевая кислоты; флавоноидные и органические соединения; гликозиды, фитостерины, смолы; слизистые и дубильные вещества; полиамины, эхинацин, витамины групп А, С, Е; микро- и макроэлементы (магний, железо, селен, цинк, молибден, калий, кальций, марганец); инулин, глюкоза, бетаин, жирные масла
Элеутерококк колючий	корневища с корнями	Полисахариды, липиды, элеутерозиды (А, В, В1, С, Е, F, G); эфирные масла (до 0,8%), смолы, камеди, производные кумарина, флавоноиды, дубильные вещества
Женьшень настоящий	корни	Гликозиды - панаксозиды (А, В, С, D, Е, G) до 20% сапонинов, эфирные масла, алкалоиды, витамины (С, В1, В2), соли цинка, марганца, железа, фосфора, фитоэстрогены
Астрагал шерстистоцветковый	цветки, побеги	Дазиянтозиды (тритерпеновые сапонины), производные дазиянтогенина (ряд циклоартана); флавоноиды (кемпферол, кверцетин, изорамнетин, астрагалозид); дубильные вещества; кумарины; аминокислоты; альфа-токоферол; макро- и микроэлементы (кальций, кремний, алюминий,

		железо, магний, кобальт, цинк, медь, марганец, молибден, хром, селен)
Родиола розовая	корневища и корни	Тиразол, салидрозид (около 1 %); флавоноиды – производные гербацетина, трицина и кемпферола; гликозиды коричневого спирта – розавин, розарин, розин; флавонолигнан родиолин; монотерпеноиды – розиридол и розиридин; дубильные вещества (около 20 %); эфирное масло, содержащее коричный альдегид и цитраль; органические кислоты; липиды; различные микроэлементы
Лимонник китайский	плоды, семена	Лигнаны (схизандрин, схизандрол, дезоксисхизандрин и др.); лимонная (11 %), яблочная (10 %), винная, щавелевая, янтарная, аскорбиновая (до 500 мг%) кислоты; сесквитерпеноиды, флавоноиды, катехины и антоцианы, пектиновые вещества и сахара; эфирное масло (1,9-2,9%), сесквитерпеновые кетоны, витамин Е, жирное масло - глицериды линоленовой, олеиновой кислот и др. (до 33 %)

Из анализа Таблицы 1.3.1.1 видно, что в большей степени в фармацевтическом производстве используются корни и корневища растений, обладающих иммуностимулирующим эффектом, заготовка и воспроизводство которых является длительным и трудоёмким процессом. Необходимо также отметить, что иммуотропные вещества различной природы, избирательно действующие на соответствующий компонент иммунитета (фагоцитарную или микробицидную функцию, клеточные (в том числе цитотоксические) или гуморальные механизмы защиты), помимо данного эффекта, будут в той или иной степени оказывать комплексное воздействие на иммунную систему [47].

Таким образом, целесообразным является выявление ЛРС, содержащего в цветках, плодах или листьях необходимое количество БАВ иммуотропной направленности действия.

Заключение по обзору литературы

В отношении цветков липы сердцевидной установлено, что они содержат различные БАВ, настои и отвары цветков липы применяются при острых и хронических системных и локальных воспалительных процессах, обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе иммуностимулирующей. Установлено, что растительные ЛП с иммуностимулирующей активностью являются востребованными при профилактике и лечении инфекционно-воспалительных заболеваний и на сегодняшний день представлены только препаратами эхинацеи пурпурной.

Кроме того, в настоящее время скорректированные лекарственные формы широко востребованы в медицинской и фармацевтической практике. Позитивные органолептические свойства сиропов (вкус, цвет и запах), обеспечивающие комфортность их приема, определяют приоритетное использование их в качестве скорректированных ЛФ. Разработка твердых скорректированных ЛФ также является довольно перспективным направлением, особенно с учетом потребностей педиатрической практики. Следует отметить индивидуальную особенность применения леденцов как ЛФ - БАВ могут всасываться через слизистую оболочку ротовой полости, таким образом, предохраняя ДВ от метаболизма в пищеварительном тракте.

Тем не менее, в современной медицине отсутствуют официальные скорректированные лекарственные формы содержащие экстракт цветков липы сердцевидной в качестве действующего вещества, фармацевтический рынок ограничен только настоями и сборами, поэтому, разработка технологии получения экстракта цветков липы сердцевидной жидкого представляется актуальной.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования и вспомогательные вещества

Для проведения диссертационного исследования использовали цветки липы сердцевидной – *Tilia cordata* (ФС.2.5.0024.15), собранные в фазу активного цветения в мае – июне 2016 г. и июне 2017 г. в Краснодарском крае и в Ставропольском крае в районе Кавказских Минеральных Вод.

При проведении технологических экспериментальных исследований для разработки сиропа и леденцов использовались вспомогательные вещества (ВВ), полученные от заводов-производителей и соответствующие требованиям нормативной документации (Таблица 2.1.1).

Таблица 2.1.1 – Вспомогательные вещества, используемые в ходе исследований

Вещество	Нормативная документация
Вода очищенная	ФС.2.2.0020.15
Спирт этиловый 96%	ФС.2.1.0036.15
Натрия бензоат	ГФ РФ XIII, ГФ РФ XIV
Кислота сорбиновая	ГОСТ 32779-2014
Кислота лимонная	ГОСТ 908-2004
Сахароза	ГОСТ 33222-2015
Фруктоза	ГОСТ Р 51240-98
Сорбит	ГОСТ Р 53904-2010
Мед пчелиный натуральный	ГОСТ Р 54644-2011
Патока	ГОСТ 10-228-98
Изомальт	ТР ТС 021/2011
Тальк	ФС.2.2.0017.15

При выполнении работы использовалось следующее оборудование: спектрофотометр СФ-2001, рН-метр 150М, микроскоп «Прогресс», микроскоп «Primo Star», CO₂-инкубатор «New Brunswick Scientific Galaxy 170S», термостат

«СМ Климат», весы лабораторные, камера Горяева, лейкосчетчик электронный, лабораторная и вспомогательная посуда.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Физико-химические методы исследования

Качественные реакции на содержание флавоноидов в сырье и в экстракте липы цветков жидком проводили по методике ГФ XIII с порошком магния и раствором кислоты хлористоводородной концентрированной (цианидиновая проба) [39].

Количественное содержание флавоноидов в сырье определяли с использованием спектрофотометрического метода по реакции комплексообразования с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида [39, 40].

При вычислении содержания суммы флавоноидов (в %) в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье использовали формулу:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)}$$

Обозначения:

A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, равный 248;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Определение суммы флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком проводили с использованием спектрофотометрического метода по реакции комплексообразования с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида [29, 30].

При вычислении содержания суммы флавоноидов (в %) в пересчете на рутин использовали формулу:

$$X = \frac{A \cdot 250}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a}$$

Обозначения:

A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм, равный 248;

a – навеска экстракта, г.

Выбор оптимального экстрагента при получении экстракта цветков липы жидкого проводили согласно ГФ РФ [39].

Методика:

1. Пять навесок сырья цветков липы сердцевидной (по 1,0 г) распределяли в колбы объёмом 150 мл.

2. В каждую колбу приливали по 30 мл этилового спирта: в колбу 1 - 30% спирт этиловый, в колбу 2 – 40% спирт этиловый, в колбу 3 – 50% спирт этиловый, в колбу 4 – 70% спирт этиловый и в колбу 5 – 96% спирт этиловый.

3. После чего, все колбы по отдельности присоединяли к обратному холодильнику, затем нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин.

4. Далее горячие извлечения фильтровали в мерные колбы объёмом 100 мл. Экстракцию исходного сырья проводили в описанных выше условиях в четырех повторностях. Фильтровали полученные извлечения в те же мерные колбы.

5. После охлаждения, объемы извлечений в мерных колбах доводили до метки спиртом этиловым соответствующих концентраций и перемешивали.

6. Затем полученные пять извлечений фильтровали и определяли в них содержание флавоноидов с помощью дифференциальной спектрофотометрии по реакции с алюминия хлоридом.

2.2.2 Технологические методы исследования

Определение влажности исходного сырья проводили в соответствии с методикой ГФ РФ XIII и XIV издания [39, 40]. Определение остальных

технологических показателей производилось согласно способам расчета, применяемому в производстве жидких экстрактов методом реперколяции с законченным циклом, предложенным И.А. Муравьевым и Ю.Г. Пшуковым [137, 113].

Определение насыпной массы, коэффициента наполнения сухого и набухшего сырья и коэффициента вытеснения

Насыпная масса сырья - мера объема, которое занимает единица массы измельченных цветков липы.

$$\gamma = \frac{G}{B_o} \quad (1)$$

Коэффициент наполнения сухого сырья это мера объема жидкости, которая необходима для наполнения промежутков, которые находятся между частицами единицы массы сухого, измельченного, уложенного плотно сырья.

$$F = \frac{B_o + B_2 - B_1}{\gamma \cdot B_o} \quad (2)$$

Коэффициент вытеснения сырья это мера объема жидкости, которая вытесняется при погружении единицы массы измельченных, сухих цветков липы.

$$\Delta = \frac{B_1 - B_2}{\gamma \cdot B_o} \quad (3)$$

Коэффициент наполнения набухшего сырья - мера объема жидкости, размещающейся между массой набухшего растительного сырья, и служит мерой объема внешнего сока.

$$\varphi = \frac{B_3}{\gamma \cdot B_o} \quad (4)$$

Обозначения:

γ - насыпная масса измельченного сырья, г/см³;

f –коэффициент наполнения сухого, измельченного сырья, см³/г;

Δ - коэффициент вытеснения измельченного сырья, см³/г;

G – масса сырья, г;

ϕ - коэффициент наполнения набухшего измельченного сырья, см³/г;

V_0 – насыпной объем измельченного сырья, см³;

V_1 – суммарный объем измельченного сырья и экстрагента, см³;

V_2 – объем залитого в цилиндр экстрагента, см³;

V_3 – объем жидкости между частицами набухшего измельченного сырья, см³.

Методика:

50 г цветков липы (G) загружали в цилиндр, уплотняли на вибраторе до прекращения изменения объема, затем фиксировали объем, который занимают цветки липы (V_0), заливали в цилиндр 70 % спирт этиловый – $V_2 = V_0$. После прекращения выделения пузырьков воздуха фиксировали суммарный объем, занимаемый цветками липы и экстрагентом (V_1). Цилиндр закрывали плотно и оставляли на сутки.

После набухания цветки липы прижимали решеткой, доводили экстрагентом до исходного объема – V_0 , жидкость над решеткой сливали с помощью сифона. Остатки жидкости, размещающиеся между частицами исследуемого сырья, полностью сливали, фиксировали объем (V_3).

Определение коэффициента поглощения сырья, образования внутреннего сока, увеличения объема при растворении экстрактивных веществ

У набухшего измельченного сырья объем внутреннего сока обусловлен поглощенным экстрагентом, а также влагой сырья и экстрактивными веществами (ЭВ), которые в значительной мере растворены в используемом экстрагенте.

Коэффициент поглощения сырья отражает единицу объема экстрагента, поглощенного единицей массы цветков липы сердцевидной при набухании сырья, который рассчитывается по формуле:

$$K_{\Pi} = \frac{V - a}{G} \quad (5)$$

В процессе экстракции происходит поглощение сырьём капиллярной влаги и ЭВ (внутренний сок), учитывая это можно рассчитать коэффициент

образования внутреннего сока, представляющий собой единицу объема внутреннего сока, который образуется в единице массы цветков липы сердцевидной:

$$K = \frac{a[100(f - d) + G(X + B)]}{100dG} \quad (6)$$

Единица увеличения объема экстрагента при растворении в данном экстрагенте единицы массы ЭВ это коэффициент увеличения объема (Z):

$$Z = \frac{V_1 \cdot \rho_1 - c + b}{b \cdot \rho_1} \quad (7)$$

При расчете данного параметра необходимо учитывать значение плотности растворителя (ρ_1), которое рассчитывают по концентрации спирта этилового в растворителе в процентах по массе (P_5):

$$P_5 = \frac{100 fP}{GB + 100 f} \quad (8)$$

Обозначения:

G – масса сырья, г;

X - концентрация ЭВ в сырье, %;

V – объем спирта этилового, взятого для экстракции, см³;

B – влажность сырья, %;

f – масса спирта этилового, взятого для экстракции, г;

ρ_1 – плотность растворителя, г/см³

P_5 - концентрация взятого спирта этилового в растворителе, % по массе;

P – концентрация спирта этилового в экстрагенте, % по массе;

a – объем полученного извлечения, см³;

d – масса полученного извлечения, г;

V_1 – объем извлечения, взятого на анализ, см³;

c – масса извлечения, взятого на анализ, г;

b – масса сухого остатка, г;

K – коэффициент образования внутреннего сока, см³/г;

K_n – коэффициент поглощения сырья, $\text{см}^3/\text{г}$;

Z – коэффициент увеличения объема при растворении ЭВ, $\text{см}^3/\text{г}$.

Методика:

Цветки липы 100г, с рассчитанными показателями влажности (В) и содержанием ЭВ (Х), измельченных до частиц размером от 3 до 7 мм, загружали во взвешенный диффузор, уплотняли вибрацией, укладывали на поверхность решетку, закрывали и взвешивали диффузор (G). Сырье заливали 70 % спиртом этиловым до «зеркала» и взвешивали (f). Измельченное сырье настаивали в течение 3-х суток, затем перемешивали жидкую фазу шестикратно в течении суток. Извлечение сливали, проводя первую продувку воздуха через воздуховод. Вторую продувку - через 20 минут. Время каждой продувки 1 минута, при давлении воздуха около 0,1 атм.

Объем полученного извлечения взвешивали (d), фильтровали, плотность ($\rho_{\text{и}}$) определяли с помощью пикнометра. Объем пикнометра принимали за V_1 , массу извлечения в пикнометре за – с. Извлечение выпаривали, высушивали при температуре 100°C, охлаждали и взвешивали (b).

2.2.3 Микробиологические методы исследования

Испытание микробиологической чистоты сиропа липы с целью выбора консерванта проводилось в асептических условиях на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России по методике регламентированной ОФС.1.2.4.0002.15 ГФ XIII [39, 24].

Проводили отбор пробы в объёме 10 мл из каждого образца сиропа с выбранными нами консервантами в 90,0 мл буферного раствора, перемешивали, затем анализировали количество жизнеспособных микроорганизмов и отдельные виды бактерий, присутствие которых недопустимо или ограничено.

Количественное определение микроорганизмов в сиропе липы проводили с помощью чашечного агарового метода с использованием сред для выращивания

бактерий и грибковых микроорганизмов, число микроорганизмов рассчитывали по формуле:

$$N = \frac{\sum c}{n} \cdot d \cdot 10$$

c – количество колоний на всех чашках Петри;

n – число чашек Петри;

d – коэффициент разведения образца;

10 – коэффициент пересчета при проведении посева на чашку в объеме 0,1 мл.

Качественное определение микроорганизмов в сиропе липы проводили с использованием соответствующих селективных и диагностических сред и биохимических тестов регламентированных ОФС.1.2.4.0002.15 ГФ XIII [39].

Определение микробиологической чистоты готовой лекарственной формы – сироп, проводили в соответствии с действующей на период проведения исследования нормативной документацией - ГФ XIII ОФС.1.2.4.0002.15, совместно с аккредитованным испытательным лабораторным центром «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске», договора №4190, 4198 от 11.09.2018г. Протоколы лабораторных исследований в Приложении А.

В настоящее время действующим нормативным документом по определению микробиологической чистоты является ГФ XIV ОФС.1.1.4.0002.18, введенная взамен ОФС.1.2.4.0002.15. Проанализировав и сравнив рекомендуемые требования к микробиологической чистоте ЛП (категория ЗБ) критерии остались неизменны. В исследованиях использовались штаммы *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* [39,40].

Испытание микробиологической чистоты леденцов липы с целью определения сроков годности проводилось в асептических условиях на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России по методике регламентированной ОФС.1.2.4.0002.18 ГФ XIV [40].

10,0 г образца леденцов измельчали и добавляли 100 мл буферного раствора, перемешивали, затем анализировали количество жизнеспособных микроорганизмов и отдельные виды бактерий, присутствие которых недопустимо или ограничено.

2.2.4 Определение острой токсичности экстракта и сиропа липы

Определение острой токсичности проводили по методике на белых лабораторных крысах массой 180-225 г (самцы и самки в равном соотношении) при пероральном введении [121,115]. Все экспериментальные исследования с участием животных были выполнены с соблюдением международных принципов утвержденных Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным, а также принципов гуманности, представленных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС). Кроме того, содержание животных проводилось в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986г), а также соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 199-н от 01.04.2016г. «Правила надлежащей лабораторной практики».

Источник животных – учебно-производственный отдел ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Крысы находились в оптимальных контролируемых условиях ($t=18-26^{\circ}\text{C}$, относительная влажность воздуха – 30-70%), получали полноценное регулярное питание. Продолжительность эксперимента составила 14 дней. Подопытным животным перорально вводили исследуемые растворы. Контрольным крысам вводили равное количество растворителя.

В ходе исследования фиксировали следующие показатели: особенности поведения животных, двигательную активность, наличие и характер судорог, а также координацию движений, количество погибших животных в ходе эксперимента.

LD_{50} рассчитывали по формуле (LD_{50} – доза испытуемого вещества, которая вызывает летальный исход у 50 % животных в исследуемой группе):

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(zd)}{n}$$

LD_{100} - доза испытуемого вещества, которая вызывает летальный исход у всей группы животных;

z - среднее арифметическое из числа животных, у которых наблюдался учитываемый эффект под влиянием каждой двух смежных доз;

d - интервал между каждыми двумя смежными дозами;

n - количество крыс в группе.

Критериями оценки острой токсичности служили картина интоксикации и выживаемость животных.

2.2.5 Иммунологические методы исследования

Инкубация клеток периферической крови в условиях in vitro

Периферическую венозную кровь (с антикоагулянтом) здоровых добровольцев и пациентов с острой вирусной и острой бактериальной инфекцией инкубировали в течение одного часа в CO_2 -инкубаторе («New Brunswick Scientific Galaxy 170S», Великобритания) в присутствии экстракта цветков липы (ЭЦЛ) при температуре 37°C.

Для исследования взяты экстракты цветков липы жидкие 1:1,0 с содержанием флавоноидов – 0,307% и 1:1,8 - 0,327%. В 1 мл экстракта цветков липы жидкого 1:1,0 содержится 0,049 г сухих ЭВ, а в 1 мл экстракта цветков липы жидкого 1:1,8 содержится 0,06 г сухих ЭВ. Исходя из объёма крови взрослого мужчины – 5000 мл, экспериментальная доза экстракта цветков липы 1:1,8 составит 0,000012г/мл крови, для экстракта цветков липы 1:1,0 составит 0,0000098г/мл крови. Для соблюдения экспериментальной дозы делали навески экстракта цветков липы сердцевидной сухого массой 0,006г и растворяли в 1 мл спирта этилового, затем разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:10 ($C = 0,0006$ г/мл).

К 0,1 мл периферической крови добавляли:

– 10 мкл ЭЦЛ 1:1, разовая доза ($C = 0,0006$ г/мл)

- 10 мкл ЭЦЛ 1:1, суточная доза ($C = 0,0018$ г/мл)
- 10 мкл ЭЦЛ 1:1,8, разовая доза ($C = 0,0006$ г/мл)
- 10 мкл ЭЦЛ 1:1,8, суточная доза ($C = 0,0018$ г/мл)
- 10 мкл 0,9% NaCl.

Оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с учетом степени завершенности (в модификации И.В. Нестеровой, 2017 г.) [88].

Постановка реакции фагоцитоза:

1. На середину обезжиренного предметного стекла помещали- 20 мкл периферической крови (ПК) +10 мкл гепарина + 10 мкл взвеси *Staphylococcus aureus* ($1 \cdot 10^6$ мо/мл).
2. Инкубировали при постоянной влажности в течение 2 часов при $t - 37^\circ\text{C}$.
3. Полученные цитологические препараты сушили под углом 45° и фиксировали этанолом 5 минут.
4. Окраску проводили по Романовскому 5 минут.
5. Микроскопировали (Рисунок 2.2.5.1).
6. Оценивали поглотительную способность, завершенность фагоцитоза и переваривающую функцию НГ по показателям, представленным в Таблице 2.2.5.1.



Рисунок 2.2.5.1 – Активно фагоцитирующий нейтрофильный гранулоцит в поле зрения (ув. x1000)

Таблица 2.2.5.1 – Показатели эффективности фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов

Показатель	Обозначение	Формула
процент фагоцитоза – процент НГ, поглотивших микробы, из общего числа посчитанных НГ	% ФАН	$\% \text{ФАН} = \frac{\text{ФА}}{n};$ ФА - число фагоцитирующих НГ n – число НГ
фагоцитарное число - среднее число фагоцитированных микробов, приходящееся на один фагоцитирующий НГ	ФЧ	$\text{ФЧ} = \frac{M}{\text{ФА}};$ М - число микроорганизмов ФА - число фагоцитирующих НГ
фагоцитарный индекс – среднее число фагоцитированных микробов, деленное на 100 НГ	ФИ	$\text{ФИ} = \frac{M}{\Phi};$ М - число микроорганизмов Φ – общее количество НГ
процент переваривания – отношение числа убитых бактерий к общему числу фагоцитированных бактерий	% П	$\% \text{П} = \frac{M_{\text{уб}} * 100}{M};$ M _{уб} – убитые микроорганизмы М – общее количество микроорганизмов
индекс переваривания - среднее число убитых на 1 посчитанный НГ	ИП	$\text{ИП} = \frac{M_{\text{уб}}}{\Phi},$ M _{уб} – убитые микроорганизмы Φ – общее количество НГ

Оценка кислородзависимых механизмов НГ в NBT–тесте (в модификации И.В. Нестеровой, 2017) [88].

Исследования проводили с использованием NBT – теста (спонтанного и стимулированного). Принцип метода состоит в том, что бесцветный нитросиний тетразолий переходит в черно-синие гранулы диформаза при окислении содержимым везикул в цитоплазме нейтрофила.

Спонтанный NBT – тест:

1. На середину обезжиренного предметного стекла помещали - 20 мкл ПК +10 мкл гепарина + 10 мкл 0,1% раствора NBT +10 мкл физиологического раствора

2. Помещали предметное стекло в CO₂ - инкубатор и проводили инкубацию на 15 минут при t - 37°C в условиях постоянной влажности.

3. Полученные цитологические препараты сушили на воздухе (угол наклона 45°) и проводили фиксацию этанолом 70% в течение 5 минут.

4. Окраску проводили 0,5% раствором нейтрального красного 5 минут.

5. Микроскопировали.

Стимулированный NBT – тест:

1. На середину обезжиренного предметного стекла помещали - 20 мкл ПК + 10 мкл гепарина + 10 мкл 0,1% раствора NBT + 10 мкл взвеси *Staphylococcus aureus* ($1 \cdot 10^6$ мо/мл).

2. Помещали предметное стекло в CO₂ - инкубатор и проводили инкубацию на 15 минут при t - 37°C в условиях постоянной влажности.

3. Полученные цитологические препараты сушили на воздухе (угол наклона 45°) и проводили фиксацию этанолом 70% в течение 5 минут.

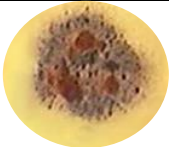
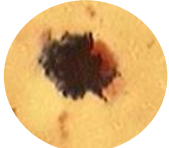
4. Окраску проводили 0,5% раствором нейтрального красного 5 минут.

5. Микроскопировали.

Для каждого варианта теста учитывали НГ с темно-синими гранулами восстановленного формазана (%ФПК – % формазанпозитивных НГ) по принципу Karlow L.S. (Таблица 2.2.5.2) [88].

Таблица 2.2.5.2 – Параметры оценки выраженности цитохимической реакции с нитросиним тетразолием

Интенсивность цитохимической реакции	Изображение	Характеристика
0 степень		окрашено ядро, цитоплазма не окрашена, контуров гранул не видно
1 степень		вся цитоплазма диффузно окрашена или окрашено не более ¼ цитоплазмы
2 степень		в цитоплазме хорошо видны темно-синие гранулы, окрашено более ¼ цитоплазмы

3 степень		всю цитоплазму занимают гранулы, нет наслаивания на ядро, окрашено $\frac{3}{4}$ и более цитоплазмы
4 степень		гранулы занимают 100% площади цитоплазмы, наслаиваются на ядро

Затем определяли по формуле средний цитохимический индекс (СЦИ):

$$\text{СЦИ} = \frac{0a + 1b + 2c + 3d + 4e}{100}$$

где а, b, с, d, е – количество НГ соответственно 0, 1, 2, 3, 4 степени.

Коэффициент мобилизации (КМ) определяли, используя формулу:

$$\text{КМ} = \frac{\% \text{ формазан} - \text{позитивных НГ в стимулированном NBT}}{\% \text{ формазан} - \text{позитивных НГ в спонтанном NBT}}$$

2.2.6 Определение антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия

Биологическая характеристика экстракта цветков липы сердцевидной проводилось на базе вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» и ГОСТом 33044-2014 [34, 115].

В исследованиях использовались отдельные клоны простейших - *Paramecium caudatum*, которые культивировались в условиях вивария в среде Л.К. Лозина-Лозинского, содержащей 0,01% -хлористого натрия и пептона, 0,001% хлористого калия, кальция и магния, 0,002% - натрия углекислого кислого, при pH 6,2 – 7,8 и температурном режиме 25°C [53, 61]. Питание получали регулярно в достаточном объеме в виде взвеси живых несовершенных дрожжей *Rhodotorula gracilis* с пшеничной мукой.

Определение общей токсичности проводили для контрольных проб и в присутствии экстракта цветков липы 1:1,8 по показателям:

1. Скорость размножения (подсчет количества инфузорий в 1 капле в камере Горяева на 1 и 3 сутки);
2. Размер клеток (в мкм, с помощью окуляра-микрометра);
3. Характер движения (замедление, ускорение; прямолинейное, реверсивное, вращение на месте) по шкале активности [61].

Определение антиоксидантной активности in vivo. В качестве токсиканта использовали 1% раствор перекиси водорода, который инициирует процесс перекисного окисления липидов мембран за счет расщепления до перекисных свободных радикалов.

На предметные стекла наносили:

А) контрольное стекло - 20 мкл среды Лозина-Лозинского с парameциями + 20 мкл 1% H_2O_2 – модель повреждающего действия свободных радикалов;

Б) экспериментальное стекло - 20 мкл среды Лозина-Лозинского с парameциями + 20 мкл экстракта цветков липы сердцевидной + 20 мкл 1% H_2O_2 .

Учитывали время полной остановки инфузорий в пробах.

Определение мембраностабилизирующих свойств in vivo.

В качестве токсиканта использовали 14% этиловый спирт повреждающий вызывающий денатурацию ферментов и белков мембран [53, 61].

На предметные стекла наносили:

А) контрольное стекло - 20 мкл среды Лозина-Лозинского с парameциями + 20 мкл 14% этилового спирта – модель денатурации;

Б) экспериментальное стекло - 20 мкл среды Лозина-Лозинского с парameциями + 20 мкл экстракта цветков липы сердцевидной + 20 мкл 14% этилового спирта.

Учитывали время полной остановки инфузорий в пробах.

Все опыты проводили в пяти повторностях. За движением парameций наблюдали 5-7 минут.

2.2.7 Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку данных проводили по методам ОФС.1.1.0013.15, ОФС.1.1.0014.15 ГФ [39, 40], а также с помощью программ Microsoft Excel 2016, StatPlus 2010. Для обработки результатов экспериментов по разработке состава и технологических схем экстракта цветков липы и скорректированных форм полученных на их основе использовали статистические методы с нахождением среднего арифметического (M), средней ошибки среднего арифметического (m), достоверность различий по критерию t Стьюдента. При проведении иммунологических исследований экстракта цветков липы использовали непараметрические критерии: U -критерий Манна–Уитни и критерий Вилкоксона. Результаты представляли как медиана с верхним и нижним квартилем ($Me(Q_1-Q_3)$). Различия определяли значимыми при $p < 0,05$ [59, 157].

2.3 Дизайн исследования

В настоящее время создание ЛФ на базе извлечений из отечественного ЛРС, разработка их состава и оптимальной технологии, является значимым для современной медицины и фармации. На схеме дизайна исследования отражены 3 основных блока (Рисунок 2.3.1). В первом блоке обозначена проблема в медико-социальном плане. Показан этап изучения научной литературы посвященной вопросам скорректированных ЛФ, а также представленных на фармацевтическом рынке нашей страны иммуностропных лекарственных форм на основе ЛРС. Второй блок – это непосредственно экспериментальная часть исследования, а именно разработка ресурсосберегающей технологии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и его стандартизации, установление иммуностропной и антиоксидантной активности липы сердцевидной цветков экстракта жидкого. Разработка и получение на основе липы сердцевидной цветков экстракта жидкого скорректированных ЛФ – сиропа и леденцов. К третьему блоку исследования относится создание лабораторного регламента на производство липы

сердцевидной цветков экстракта жидкого и технологическая апробация липы
сердцевидной цветков экстракта жидкого и сиропа на его основе.



Рисунок 2.3.1 – Дизайн исследования по разработке экстракта цветков липы и корригированных лекарственных форм на его основе

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИПЫ СЕРДЦЕВИДНОЙ ЦВЕТКОВ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО

3.1 Определение товароведческих показателей цветков липы сердцевидной

Используемое лекарственное растительное сырье – собранные в период цветения и высушенные соцветия дикорастущих и культивируемых деревьев липы сердцевидной – *Tilia cordata* Mill, сем. Липовые – *Tiliaceae*. Определение товароведческих показателей проведено в 5 сериях сырья, собранного в Ставропольском и Краснодарском крае.

Качество сырья оценивали по действующей ГФ РФ ФС.2.5.0024.15. Внешние признаки смеси цветков, цветоножек и кусочков прицветников, содержание рутина, влажность, количество ЭВ и золы собранных серий сырья определяли по методикам ГФ XIII [39] (Таблица 3.1.1).

Таблица 3.1.1 - Товароведческие показатели цветков липы сердцевидной согласно ФС. 2.5.0024.15 ($n^*_{оп}=6$)

№ серии	Мест о и год сбора	Числовые показатели									
		Влажность		Зола общая		Зола, нерастворима я в HCl		ЭВ		Флавоноиды	
		%	MX*	%	MX*	%	MX*	%	MX*	%	MX*
1	СК, 2017	5,82	$\bar{Sx} =$ 0,0589 $\varepsilon = 2,60$	6,5 5	$\bar{Sx} =$ 0,0308 $\varepsilon = 1,21$	2,0 7	$\bar{Sx} =$ 0,0108 $\varepsilon = 1,33$	22,4 5	$\bar{Sx} =$ 0,1107 $\varepsilon = 1,27$	0,73 6	$\bar{Sx} =$ 0,0083 $\varepsilon = 2,88$
2	СК, 2017	5,90	$\bar{Sx} =$ 0,02714 $\varepsilon = 0,48$	6,5 3	$\bar{Sx} =$ 0,0592 $\varepsilon = 0,96$	2,1 4	$\bar{Sx} =$ 0,016 $\varepsilon = 1,92$	16,6 2	$\bar{Sx} =$ 0,1423 $\varepsilon = 0,19$	0,59 8	$\bar{Sx} =$ 0,0061 $\varepsilon = 2,61$
3	СК, 2017	5,80	$\bar{Sx} =$ 0,2366 $\varepsilon = 0,43$	5,2 6	$\bar{Sx} =$ 0,0418 $\varepsilon = 2,04$	2,0 5	$\bar{Sx} =$ 0,013 $\varepsilon = 1,62$	19,2 2	$\bar{Sx} =$ 0,1462 $\varepsilon = 1,95$	0,68 1	$\bar{Sx} =$ 0,0033 $\varepsilon = 1,24$
4	КК, 2016	6,25	$\bar{Sx} =$ 0,0534 $\varepsilon = 2,21$	6,0 4	$\bar{Sx} =$ 0,0526 $\varepsilon = 2,23$	2,2 8	$\bar{Sx} =$ 0,0219 $\varepsilon = 2,46$	18,6 7	$\bar{Sx} =$ 0,2151 $\varepsilon = 2,96$	0,70 8	$\bar{Sx} =$ 0,0054 $\varepsilon = 1,97$
5	КК, 2016	6,64	$\bar{Sx} =$ 0,0681 $\varepsilon = 2,63$	6,2 1	$\bar{Sx} =$ 0,0584 $\varepsilon = 2,41$	2,1 4	$\bar{Sx} =$ 0,0224 $\varepsilon = 2,67$	22,1 1	$\bar{Sx} =$ 0,1747 $\varepsilon = 2,03$	0,72 1	$\bar{Sx} =$ 0,0062 $\varepsilon = 2,22$

Примечание к Таблице 3.1.1: MX* - метрологические характеристики, $n^*_{оп}$ - число опытов, СК – Ставропольский край, КК – Краснодарский край.

Серии ЛРС представляли собой смесь цветков, цветоножек и кусочков прицветников различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет измельченного сырья лепестков беловато-желтый, чашелистиков зеленовато - или желтовато-серый, светло-коричневый, прицветных листьев – светло-желтый или зеленовато-желтый, светло-зеленый. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения сладковатый, слегка вяжущий, с ощущением слизистости. По морфологическим признакам все заготовленные серии сырья отвечали требованиям ГФ XIII [39].

Таким образом, все серии исходного сырья соответствовали требованиям ФС.2.5.0024.15 ГФ XIII (Таблица 3.1.1, Таблица 3.1.2).

Таблица 3.1.2 - Соответствие фактических товароведческих показателей сырья с требованиями ГФ РФ

Показатели	Фактические значения, всех изученных серий	Требуемое значение по ГФ XIII ФС. 2.5.0024.15
Влажность сырья, %	5,80 - 6,64	не более 13
Количество экстрактивных веществ, %	8,67 - 24,3	-
Количество флавоноидов, %	0,436 - 0,446	-
Зола общая, %	5,26 - 6,55	не более 10
Зола, нерастворимая в HCL, %	2,0 - 2,28	не более 3

При длительном хранении цветков липы, может произойти уменьшение количества экстрактивных и БАВ. Цветки липы сердцевидной хранили в течение 3 лет при температуре не выше 20°C в бумажных пакетах. Определение содержания флавоноидов и ЭВ определяли через каждые полгода.

Результаты изменения концентрации ЭВ и флавоноидов в сырье представлены в Таблице 3.1.3.

Таблица 3.1.3 - Изменение количества экстрактивных веществ и флавоноидов в цветках липы сердцевидной при хранении

№ серии	Срок хранения, мес.	Содержание экстрактивных веществ, %	MX*		Содержание флавоноидов, %	MX*	
			$S\bar{x}$	ε , %		$S\bar{x}$	ε , %
1	-	22,45	0,1107	1,27	0,736	0,0083	2,88
	6	22,40	0,1563	1,79	0,733	0,0029	1,74
	12	22,20	0,1927	2,23	0,733	0,0029	1,75
	18	22,18	0,2000	2,31	0,728	0,0031	1,87
	24	21,90	0,1798	2,11	0,723	0,0022	1,32
	36	21,70	0,2190	2,59	0,719	0,0028	1,69
2	-	16,62	0,0142	2,19	0,598	0,0061	2,61
	6	16,54	0,0888	1,38	0,596	0,0052	2,25
	12	16,30	0,0936	1,47	0,594	0,0057	2,48
	18	16,25	0,1262	1,99	0,592	0,0054	2,34
	24	16,24	0,1275	2,01	0,586	0,0063	2,76
	36	16,17	0,1082	1,71	0,575	0,0080	3,58
3	-	19,22	0,1462	1,95	0,681	0,0033	1,24
	6	19,21	0,2032	2,71	0,676	0,0042	1,61
	12	19,22	0,1917	2,56	0,670	0,0033	1,27
	18	19,19	0,1869	2,50	0,666	0,0035	1,35
	24	18,89	0,1073	1,45	0,663	0,0033	1,28
	36	18,65	0,1632	2,24	0,658	0,0066	2,58
4	-	18,67	0,2151	2,96	0,708	0,0054	1,97
	6	18,60	0,1233	1,70	0,706	0,0047	1,72
	12	18,57	0,1288	1,78	0,703	0,0051	1,81
	18	18,47	0,1369	1,90	0,695	0,0075	2,79
	24	18,30	0,1133	1,59	0,692	0,0067	2,48
	36	18,01	0,1863	2,65	0,689	0,0045	1,69
5	-	22,11	0,1747	2,03	0,721	0,0062	2,22
	6	22,10	0,2468	2,87	0,720	0,0039	2,11
	12	22,01	0,2406	2,79	0,715	0,0041	2,27
	18	21,81	0,1948	2,29	0,711	0,0045	2,48
	24	21,71	0,2055	2,43	0,710	0,0049	2,78
	36	21,26	0,1469	1,76	0,705	0,0031	1,76

Согласно полученным данным при хранении изучаемого ЛРС в течение 3 лет произошло снижение относительного содержания ЭВ в цветках липы на 3,84 %, а флавоноидов на 2,75 %, что не оказывает влияния на качество сырья.

3.1.1 Установление влажности цветков липы сердцевидной

Для разработки методики количественного определения флавоноидов в цветках липы и экстрактах, полученных на их основе необходимо знать величину влажности исходного сырья. Кроме того, в технологических исследованиях возможно использование только качественного ЛС. На основании этого с целью определения качества исходного сырья испытанию по этому показателю были подвергнуты три серии цветков липы, собранные в фазу цветения июне 2017 году в г. Пятигорске и его окрестностях. Для определения значений влажности используемых цветков липы применяли метод высушивания [39, 125] (Таблица 3.1.1.1).

Таблица 3.1.1.1 - Влажность цветков липы, собранных в фазу цветения

№ серии	Влажность, %		Метрологические характеристики	
08.06.2017	5,83	5,80	$\bar{x} = 5,82$	$\Delta X = 0,0154$
	5,82	5,83	$S\bar{x} = 0,0060$	$\varepsilon\% = 0,27\%$
	5,81	5,84		
24.06.2017	5,91	5,87	$\bar{x} = 5,90$	$\Delta X = 0,01108$
	5,83	5,86	$S\bar{x} = 0,02714$	$\varepsilon\% = 0,48\%$
	5,87	5,89		
16.06.2017	5,81	5,83	$\bar{x} = 5,80$	$\Delta X = 0,00956$
	5,79	5,80	$S\bar{x} = 0,02366$	$\varepsilon\% = 0,43\%$
	5,81	5,76		

Таким образом, все серии исходного сырья соответствовали требованиям ГФ XIII и могли быть использованы для дальнейшей работы. Величина влажности учитывалась в дальнейших аналитических расчетах.

3.2 Определение оптимальных параметров проведения условий экстракции

Выбор оптимального экстрагента при получении экстракта цветков липы жидкого. В ходе исследований проведен подбор экстрагента, обеспечивающего

оптимальный выход флавоноидов из цветков липы по методике описанной в Разделе 2.2.1.

Сравнение концентраций и объема спирта этилового, который используется в качестве экстрагента флавоноидов, показал, что наиболее часто используется спирт этиловый 70% [67, 39, 1].

На основании проведенного сравнительного анализа данных ГФ XIII, была выбрана рабочая концентрация спирта этилового – 70%. Кроме того, эта концентрация спирта этилового рекомендуется как оптимальная для экстракции флавоноидов.

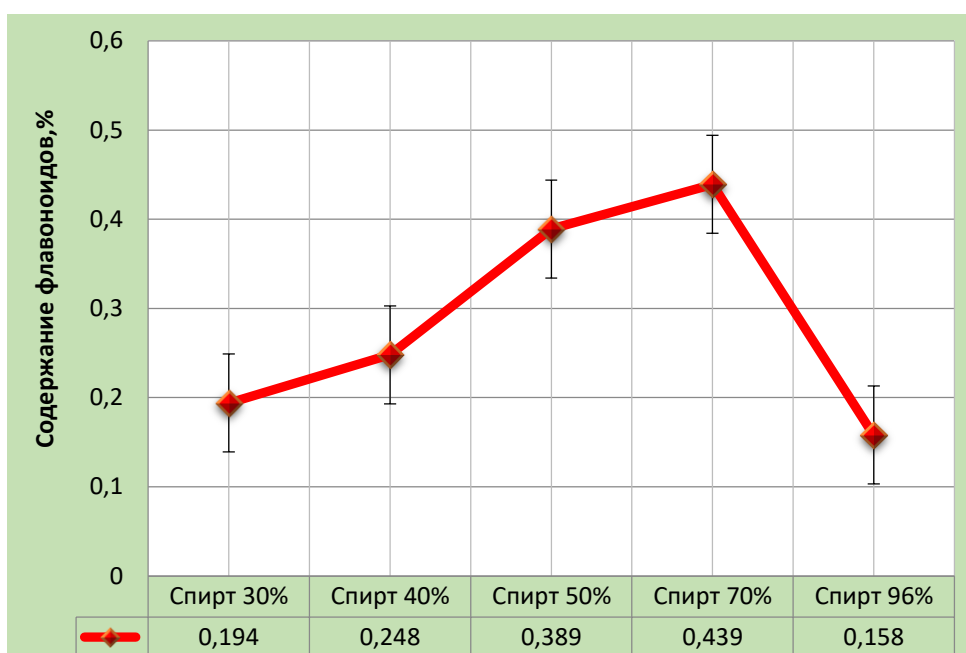


Рисунок 3.2.1 – Количественное содержание флавоноидов в сырье в условиях экстрагирования спиртом различных концентраций

По полученным данным нами установлено, что наиболее оптимальным экстрагентом флавоноидов цветков липы является спирт этиловый с концентрацией 70% (Рисунок 3.2.1).

3.2.1. Определение технологических показателей сырья

Необходимым является определение технологических характеристик сырья, с целью проведения теоретических расчетов эффективности и выбора условий экстрагирования, согласно методикам, описанным в главе 2.

Таблица 3.2.1.1 - Показатели насыпной массы (γ), коэффициент наполнения сухого сырья (f), коэффициента наполнения набухшего сырья (ϕ) в пяти сериях цветков липы

№ серии	γ г/см ³	MX*		f см ³ /г	MX*		ϕ см ³ /г	MX*	
		$S\bar{x}$	ϵ , %		$S\bar{x}$	ϵ , %		$S\bar{x}$	ϵ , %
1	0,251	0,002098	2,16	2,72	0,014614	1,29	1,78	0,02366	3,41
2	0,256	0,002099	2,07	2,74	0,01465	1,14	1,89	0,02366	3,21
3	0,250	0,003033	3,12	2,91	0,01295	1,12	1,82	0,02098	2,96
4	0,260	0,00320	3,12	2,90	0,02720	2,41	1,77	0,01920	2,78
5	0,260	0,00210	2,02	2,85	0,01490	1,35	1,80	0,01740	2,48

Таблица 3.2.1.2 - Показатели коэффициента вытеснения сырья (Δ), коэффициенты поглощения сырья (K_n) в пяти сериях цветков липы

№ серии	Δ , см ³ /г	MX*		Коэффициент K_n , см ³ /г	MX*	
		$S\bar{x}$	ϵ , %		$S\bar{x}$	ϵ , %
1	1,15	0,01265	2,83	2,28	0,02850	2,84
2	1,16	0,00894	1,98	2,30	0,026733	2,20
3	1,10	0,01414	3,30	2,49	0,024143	1,82
4	1,10	0,01410	3,31	2,40	0,02270	2,43
5	1,05	0,01040	2,53	2,45	0,02130	2,23

Таблица 3.2.1.3 - Показатели коэффициента образования внутреннего сока (K), коэффициента увеличения объема при растворении экстрактивных веществ (Z) в пяти сериях цветков липы

№ серии	Коэффициент K , см ³ /г	MX*		Коэффициент Z , см ³ /г	MX*	
		$S\bar{x}$	ϵ , %		$S\bar{x}$	ϵ , %
1	1,910	0,0082	1,1	0,785	0,011954	3,27
2	1,891	0,0175	2,37	0,792	0,0064	2,06
3	1,945	0,0088	1,16	0,787	0,010944	2,71
4	1,90	0,02430	3,30	0,790	0,0049	1,58
5	1,92	0,01020	1,35	0,788	0,014442	4,03

Данные Таблиц 3.2.1.1 – 3.2.1.3 показывают, что в результате исследования пяти различных серий цветков липы определены следующие технологические показатели, в см³/г:

- f (коэффициент наполнения сухого сырья) - 2,72 - 2,91;
- Δ (коэффициент вытеснения сырья) – 1,05 - 1,16;
- ϕ (коэффициент наполнения набухшего сырья) – 1,78 - 1,89;
- γ (насыпная масса) – 0,250 - 0,260;
- K_{Π} (коэффициент поглощения сырья) – 2,28 - 2,49;
- K (коэффициент образования внутреннего сока) – 1,89 - 1,945;
- Z (коэффициент увеличения объема при растворении ЭВ) – 0,785 - 0,792.

Таким образом, нами были установлены технологические характеристики сырья, которое в дальнейшем использовалось для получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого.

3.2.2 Выбор оптимального способа проведения экстракционного процесса

В фармацевтической практике при производстве жидких экстрактов под соотношением фаз 1:1,0 или 1:2,0 принято понимать соотношение твердой фазы и внешнего сока или готового экстракта. Данное соотношение фаз не отражает истинной картины распределения веществ между фазами, т.к. различные виды сырья, имеющие различную пористость, отличаются соответственно и величиной объема внутреннего сока. Разное соотношение объемов внешнего и внутреннего соков при одинаковом числе ступеней экстракции сырья является одной из серьезных причин больших потерь фармакологически активных веществ [113, 148].

Следует отметить, что при классическом производстве жидких экстрактов применяется технология реперколяции (противоточное многоступенчатое экстрагирование) в батарее перколяторов из 3-х диффузоров при соотношении фаз 1:1,0. Степень измельченности сырья обычно составляет не более 7 мм. При

этом анализ фактической эффективности экстрагирования этим способом показал, что она составляет лишь 43-45 % [31, 113, 83, 10, 28, 22].

Увеличение эффективности экстракции за счет снижения концентрации веществ в экстракте недопустимо. Увеличить эффективность процесса экстрагирования можно путем сочетания двух факторов одновременно:

- число ступеней экстракции (число перколяторов в батарее);
- соотношение объемов внешнего и внутреннего соков, при котором соотношение веществ в извлечении, полученном из сырья с различным значением коэффициента образования внутреннего сока в батарее из 4-7 диффузоров равна концентрации веществ в извлечении, полученном из сырья тех же серий в батарее из 3 диффузоров с традиционным соотношением фаз 1:1,0.

При увеличении числа диффузоров в батарее (n) и увеличении соотношения фаз (η) закономерно повышается эффективность процесса экстракции (S), позитивным результатом которого является отсутствие снижения концентрации сухих веществ в экстракте (C), наблюдаемое в условиях только увеличения соотношения фаз (η).

Таким образом, применение различных вариаций, обуславливающих повышение эффективности процесса экстракции, оказывает влияние на качество готовой продукции и экономическую эффективность её производства.

Для определения оптимального сочетания параметров экстракционного процесса (число диффузоров в батарее (n) и соотношение фаз (η)) и установления соответствующих значений степени истощения исходного сырья (S , %) необходимо проводить теоретический расчет эффективности реперколяции, который предусматривает вначале вычисление коэффициента распределения действующих веществ или соотношение объема внешнего к внутреннему соку (η) по формуле 1:

$$\eta = y/K, \quad (1)$$

где

$у$ - отношение объема извлечения, отбираемого в качестве готовой продукции, к массе сырья, см³/г;

K – коэффициент образования внутреннего сока, см³/г.

В зависимости от полученных значений η вычисляют значение степени истощения исходного сырья (S , %):

- при η от 0,3333 до 1,0

$$S = 54,425\eta - 2,496 + \frac{\eta \lg n}{0,00711 - 0,001375\eta + 0,017031\eta^2} \quad (2);$$

- при η от 1, до 2,0

$$S = 51,06 + 94,5988 \lg n + \frac{\lg n}{0,025227 - 0,015469\eta + 0,012653\eta^2} \quad (3),$$

где

η - коэффициент распределения ДВ или соотношение объема внешнего к внутреннему соку;

n - число диффузоров [113,83].

Нахождение оптимальных условий и параметров выбранного нами способа экстрагирования, обеспечивающего максимально возможную эффективность реперколяции в производстве, проводили путем подбора числа перколяторов и соотношения фаз при сохранении концентрации сухих веществ в экстракте не ниже заданных НД.

Выбор оптимального числа диффузоров и соотношения фаз при получении экстракта цветков липы жидкого

Поэтапный расчет эффективности процесса экстрагирования показывает, что S зависит от n и η , в связи с этим необходимо нахождение эмпирической зависимости, связывающей три переменных S , n , η .

На первом этапе исследовали изменение эффективности экстракции в зависимости от числа диффузоров в батарее (n) и коэффициента распределения веществ (η) - постоянное значение 0,93, для соотношения фаз от 1:1 до 1:2. Значения S рассчитывали по формулам 2 и 3.

Данные поэтапного расчета эффективности процесса экстрагирования представлены в Таблице 3.2.2.1.

Таблица 3.2.2.1 – Зависимость эффективности процесса экстрагирования (S) от числа диффузоров (n) с учетом коэффициента распределения веществ (η)

№ серии	η	y	S				
			n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7
1	0,524	1,0	48,64	54,56	59,15	62,90	66,08
	0,576	1,1	51,84	57,85	62,52	66,33	69,56
	0,628	1,2	54,81	60,87	65,55	69,41	72,65
	0,681	1,3	57,67	63,72	68,42	72,25	75,49
	0,733	1,4	60,34	66,35	71,01	74,82	78,04
	0,785	1,5	62,91	68,84	73,45	77,21	80,39
	0,838	1,6	65,44	71,29	75,82	79,52	82,66
	0,890	1,7	67,87	73,61	78,06	81,70	84,78
	0,942	1,8	70,26	75,89	80,25	83,81	86,83
	0,995	1,9	72,67	78,17	82,44	85,93	88,87
	1,047	2,0	75,02	80,40	84,57	87,97	90,85
2	0,529	1,0	48,95	54,89	59,46	63,25	66,43
	0,582	1,1	52,19	58,21	62,89	66,70	69,93
	0,635	1,2	55,20	61,26	65,96	69,80	73,05
	0,687	1,3	57,99	64,03	68,73	72,56	75,80
	0,74	1,4	60,69	66,69	71,35	75,15	78,38
	0,793	1,5	63,29	69,22	73,81	77,57	80,74
	0,846	1,6	65,82	71,65	76,17	79,87	82,99
	0,899	1,7	68,28	74,01	78,45	82,07	85,14
	0,952	1,8	70,72	76,32	80,67	84,22	87,22
	1,055	1,9	73,12	78,60	82,85	86,32	89,26
	1,058	2,0	75,51	80,86	85,01	88,4	91,27
3	0,514	1,0	47,99	53,88	58,46	62,19	65,35
	0,566	1,1	51,23	57,24	61,89	65,70	68,92
	0,617	1,2	54,19	60,25	64,96	68,78	72,02
	0,668	1,3	56,98	63,04	67,74	71,57	74,82
	0,720	1,4	59,68	65,70	70,37	74,19	77,42
	0,771	1,5	62,22	68,18	72,80	76,58	79,77
	0,823	1,6	64,72	70,60	75,15	78,88	82,03
	0,874	1,7	67,12	72,90	77,38	81,04	84,13
	0,925	1,8	69,48	75,40	79,53	83,13	86,16
	0,977	1,9	71,85	77,40	81,70	85,21	88,18
	1,028	2,0	74,16	79,58	83,79	87,23	90,13
4	0,526	1,0	48,76	54,69	59,29	63,04	66,22
	0,579	1,1	52,01	58,03	62,70	66,52	69,75
	0,632	1,2	55,04	61,09	65,79	69,63	72,88
	0,684	1,3	57,83	63,88	68,57	72,41	75,65
	0,737	1,4	60,54	66,55	71,20	75,01	78,22
	0,789	1,5	63,10	69,03	73,63	77,39	80,57
	0,842	1,6	65,63	71,47	76,00	79,70	82,82
	0,895	1,7	68,10	73,83	78,28	81,91	84,98
	0,947	1,8	70,49	76,10	80,46	84,02	87,02
	1,01	1,9	72,90	78,39	82,64	86,12	89,06
	1,053	2,0	75,29	80,65	84,81	88,21	91,08

5	0,521	1,0	48,44	54,36	58,95	62,69	65,86
	0,573	1,1	61,66	57,67	62,33	66,14	69,37
	0,625	1,2	54,65	60,70	65,40	69,24	72,48
	0,677	1,3	57,46	63,52	68,21	72,05	75,29
	0,729	1,4	60,14	66,15	70,82	74,63	77,85
	0,781	1,5	62,71	68,66	73,27	77,03	80,22
	0,833	1,6	65,20	71,06	75,60	79,31	82,45
	0,885	1,7	67,64	73,39	77,85	81,50	84,58
	0,938	1,8	70,08	75,71	80,08	83,65	86,67
	0,989	1,9	72,40	77,91	82,19	85,69	88,64
	1,042	2,0	74,79	80,18	84,36	87,78	90,66

Анализ пяти аналитических серий данных Таблицы 3.2.2.1 и Рисунка 3.2.2.1 позволил выявить максимальное возрастание эффективности экстракции S от 75,40% до 76,32%, которое наблюдается при $n = 4$ и $y = 1:1,8 \text{ см}^3/\text{г}$. Прирост эффективности экстракции при значениях n от 5 до 7 менее значителен и экономически нецелесообразен, в связи с этим мы остановились на батарее из четырех диффузоров. Таким образом, предложенная нами ресурсосберегающая технология повышает эффективность экстракционного процесса в 1,57 раза, в отличие от промышленного способа ($n = 3$ и $y = 1,0$).

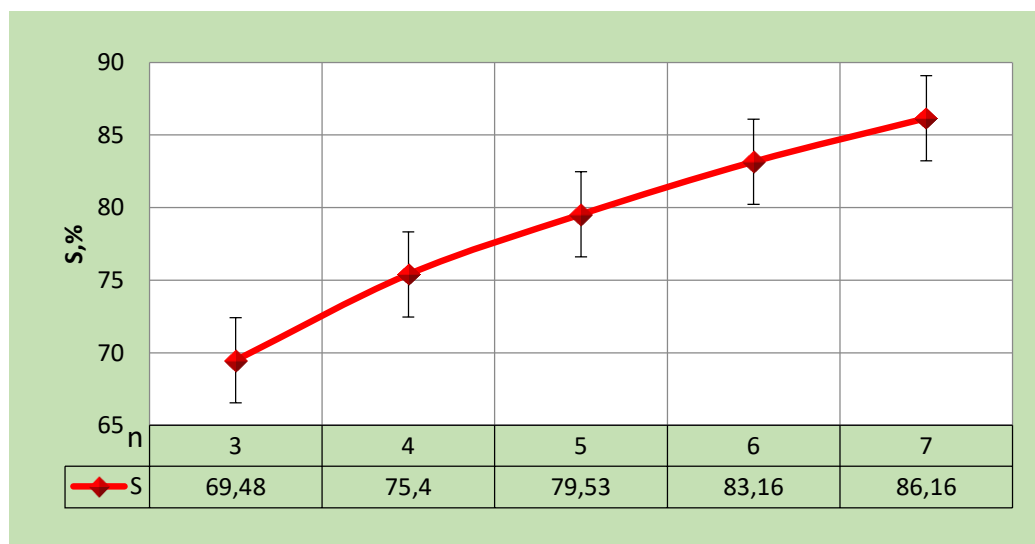


Рисунок 3.2.2.1 – Значения эффективности экстракции при различном количестве диффузоров в батарее, $\eta \text{ const}$

Известно, что увеличение объема внешнего сока позволяет повысить эффективность экстракции, тем не менее, количество дополнительно извлеченных

веществ не пропорционально увеличению рассматриваемого параметра и это приводит к снижению концентрации веществ в экстракте.

Вторым этапом разработки ресурсосберегающей технологии явилось изучение изменения эффективности экстракции (S) в зависимости от объема внешнего сока (y) в интервале от 1,0 до 2,0 при постоянных значениях $n = 4$ и $K = 1,945$. Значения S рассчитывали по формулам (2) и (3). Графическая зависимость $S = f(y)$ отображена на Рисунке 3.2.2.2.

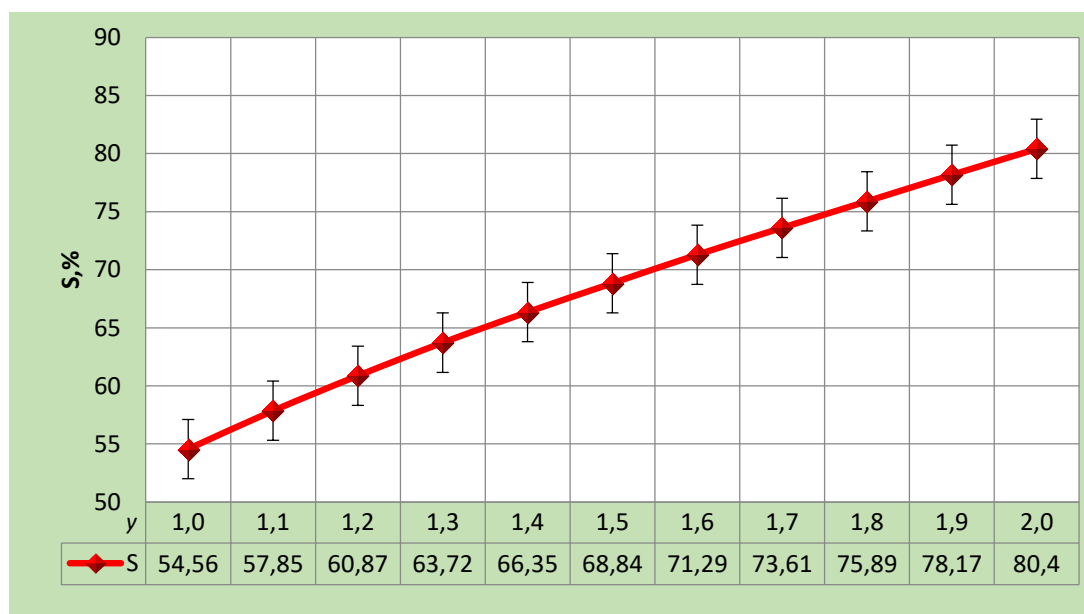


Рисунок 3.2.2.2 - Зависимость степени истощения сырья от увеличения объема внешнего сока ($n = 4$)

Несмотря на то, что максимальное значение эффективности экстракции наблюдается при соотношении фаз 1:2,0, необходимо учитывать возможное снижение концентрации сухих веществ в экстракте липы жидком (C , %), в связи с этим мы вычислили предельно возможную концентрацию веществ в извлечении при изменении y от 1,0 до 2,0 и при постоянном значении $K = 1,945$ по формуле (4).

$$C = \frac{X \cdot S}{100 \cdot y} \quad (4)$$

где S - эффективность процесса экстракции, %;

y - коэффициент съема готовой продукции, г/см³

X - минимальное содержание ЭВ в цветках липы, в % (18,67%).

Результаты расчета значений концентрации сухих веществ (С, %) и эффективности экстракции (S, %) в экстракте цветков липы сердцевидной жидком для $n=3$ (традиционная методика) и для $n=4$, представлены в Таблице 3.2.2.2.

Анализ данных Таблицы 3.2.2.2 показывает, что при $n = 3$, $y = 1,0$ из сырья с содержанием ЭВ 18,67% можно получить экстракт с концентрацией сухих веществ 8,85 %.

Таблица 3.2.2.2 - Концентрация сухих веществ и эффективность экстракции в извлечении цветков липы при различных соотношениях фаз

у, см ³ /г	n = 3		n = 4	
	S, %	C, %	S, %	C, %
1,0	47,99	8,85	53,88	10,05
1,1	51,23	8,69	57,24	9,71
1,2	54,19	8,43	60,25	9,37
1,3	56,98	8,18	63,04	9,05
1,4	59,68	7,96	65,70	8,76
1,5	62,22	7,74	68,18	8,48
1,6	64,72	7,55	70,60	8,23
1,7	67,12	7,37	72,90	8,01
1,8	69,48	7,20	75,40	7,98
1,9	71,85	7,06	77,40	7,60
2,0	74,16	6,92	79,58	7,42

Примечание к Таблице 3.2.2.2: S - эффективность процесса экстракции, n – число диффузоров в батарее, C- концентрация сухих веществ, у - коэффициент съема готовой продукции.

При $n = 4$ и $y = 1,8$, теоретическая эффективность экстракции составляет 75,40%, а концентрация сухих веществ 7,98%, и дальнейшее увеличение соотношения фаз до 1:1,9 и 1:2,0 становится нецелесообразным, так как приводит к снижению концентрации сухих веществ. Таким образом, предложенная нами ресурсосберегающая технология повышает эффективность экстракционного процесса в 1,57 раза, в отличие от классической методики, при этом относительное снижение концентрации сухих веществ в экстракте составляет 9,83%.

По результатам вычислений концентрации сухих веществ в экстракте цветков липы жидком (С, %) для различных значений η построили график зависимости С от η , который представлен на Рисунке 3.2.2.3.

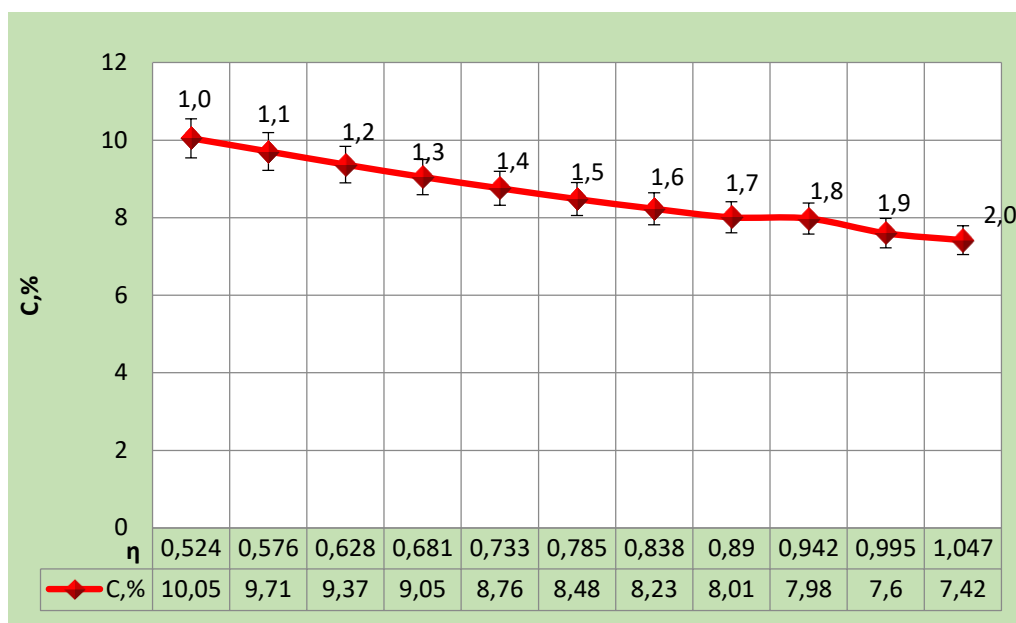


Рисунок 3.2.2.3 – Изменение количества сухих веществ в экстракте цветков липы в зависимости коэффициента распределения веществ ($y = 1,0 - 2,0$; $n = 4$)

На полученной кривой определяют точку с концентрацией соответствующей эталонной и по найденной точке устанавливают значение коэффициента распределения веществ η , при котором эта концентрация обеспечивается.

Также параметром, повышающим скорость экстракции, является дисперсность частиц сырья. В связи с этим нами проведена оценка динамики экстракции сырья с учетом степени измельченности (d). Предел измельченности составил 2 мм, так как для экстрагирования сырья с размером частиц меньше 2 мм необходима специализированная дорогостоящая аппаратура, которой, как правило, нет на средних предприятиях.

Эксперимент проводили в следующих условиях: в диффузоры помещали 50г цветков липы, затем добавляли экстрагент (70% спирт этиловый) в соотношении 1:2,6 с учетом коэффициента поглощения. Каждые 2 часа, в течение 14 часов настаивания, извлечения анализировали на содержание ЭВ. Результаты анализа представлены в Таблице 3.2.2.3.

Таблица 3.2.2.3 – Концентрация экстрактивных веществ в извлечениях из цветков липы в зависимости от степени измельчения и времени настаивания ($n_{оп}=6$)

Степень измельчения	Время, час	Содержание экстрактивных в-в	Содержание флавоноидов
2 мм	2	11,18	0,322
	4	13,26	0,385
	6	16,78	0,482
	8	17,99	0,596
	10	18,78	0,681
	12	19,22	0,682
	14	19,22	0,681
3 мм	2	10,58	0,317
	4	12,66	0,392
	6	15,88	0,477
	8	17,35	0,599
	10	18,59	0,680
	12	19,22	0,682
	14	19,22	0,681
4 мм	2	10,11	0,315
	4	11,85	0,375
	6	14,44	0,445
	8	16,85	0,566
	10	17,11	0,668
	12	19,22	0,678
	14	19,22	0,681
5 мм	2	10,01	0,289
	4	11,66	0,355
	6	14,22	0,445
	8	16,56	0,566
	10	17,01	0,608
	12	19,06	0,645
	14	19,06	0,678
6 мм	2	9,81	0,229
	4	11,35	0,305
	6	14,02	0,425
	8	16,33	0,495
	10	16,88	0,548
	12	18,76	0,585
	14	18,96	0,635
7 мм	2	9,65	0,215
	4	11,11	0,315
	6	13,20	0,412
	8	16,01	0,488
	10	16,22	0,533
	12	18,52	0,576
	14	18,61	0,620

Анализ данных Таблицы 3.2.2.3 показывает, что наибольшее содержание ЭВ, в частности, флавоноидов было извлечено из сырья со степенью измельченности 2 - 4мм. Полученные данные согласуются с информацией о том, что при увеличении размера частиц уменьшается площадь поверхности раздела фаз твердое - жидкость. В то время как при крайне мелком измельчении значительно возрастает число разрушенных клеток и их структур, что приводит к попаданию высокомолекулярных соединений и взвешенных частиц в экстракт. В результате получаются мутные, трудноосветляемые и плохо фильтруемые экстракты. В связи с этим, для получения экстракта цветков липы сердцевидной жидкого мы использовали сырье с размером частиц 2 – 4 мм.

Таким образом, опытным путем определены оптимальные параметры экстракционного процесса цветков липы сердцевидной (Таблица 3.2.2.4).

Таблица 3.2.2.4 - Оптимальные параметры проведения процесса экстракции цветков липы сердцевидной

Параметр	Значение
Концентрация спирта этилового, %	70
Соотношение фаз (y)	1:1,8
Число перколяторов в батарее (n)	4
Степень измельченности сырья, мм	2-4

Адекватность и достоверность полученных данных была подтверждена расчётами значений теоретической эффективности экстракции.

3.3 Разработка технологии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

Получение липы сердцевидной цветков экстракта жидкого проводили в батарее перколяторов из 4-х диффузоров. Спиртовое извлечение из первого диффузора направляли во второй, затем извлечение полученное из него - в третий и в четвертый. Экстракт с наиболее высоким содержанием ЭВ встречался со

свежим ЛРС, создавая при этом противоток. Отбор готового экстракта цветков липы проводился из четвертого диффузора, а остальные диффузоры выводили из работы.

В каждый из четырех перколяторов укладывали по 100 г цветков липы. Чтобы сырьё не всплывало, в верхней части экстрактора закрепляли металлическую решетку. Объём экстрагента, вводимого в батарею перколяторов на каждой ступени экстракции, составлял – 440 мл. Объём каждого извлечения, отбираемого из четвертого - головного перколятора должен быть равен 180 мл.

Учитывая, односменную работу фармацевтических фабрик перерывы для настаивания, как при вводе батареи диффузоров, так и в период съема готовой продукции составили 8 и 16, 8 и 16 пар часов.

Технология производства липы сердцевидной цветков экстракта жидкого:

День первый. В работу вводили перколятор №1, в который заливали 440 мл экстрагента 70% спирта и настаивали 8 часов.

Через 8 часов в работу вводили перколятор №2. Для этого сливали извлечение из перколятора №1 и переносили в перколятор №2. В перколятор №1 заливали 440 мл 70% спирта, сливали из него 180 мл и помещали в перколятор №2. Сливы из перколяторов производили в течение 30-40 минут. Оба перколятора оставляли на 16 часов.

День второй. В работу вводили перколятор №3.

Из перколяторов №1 и №2 сливали извлечения. Из перколятора №2 извлечение помещали в перколятор №3, а из перколятора №1 – в перколятор №2. В перколятор №1 заливали 440 мл 70% спирта, сливали 180 мл, пропускали их через перколятор №2 и помещали в перколятор №3. Оставляли три загруженных перколятора на 8 часов.

Через 8 часов в работу вводили перколятор №4.

Из перколяторов №1, №2 и №3 сливали извлечения. Из перколятора №3 извлечение помещали в перколятор №4, из перколятора №2 – в перколятор №3, а из перколятора №1 – в перколятор №2. В перколятор №1 заливают 440 мл 70%

спирта, сливают 180 мл, пропускали их через перколятор №2 и №3 помещали в перколятор №4. Оба перколятора оставляли на 16 часов.

День третий. Сливали из каждого перколятора извлечения. Из перколятора №4 сливали первую порцию готового продукта – 180 мл. Кран перколятора закрывали, после чего извлечение из перколятора №3 переносили в перколятор №4, из перколятора №2 - в перколятор №3, из перколятора №1 - в перколятор №2. Оставляли три загруженных перколятора на 8 часов. Перколятор №1 оставляют для регенерации спирта с последующей разгрузкой шрота.

Через 8 часов из перколятора №4 получали вторую порцию готового продукта (180мл). Извлечение из перколятора №3 помещали в перколятор №4, а из перколятора №2 помещали в перколятор №3. Оставляли два загруженных перколятора на 16 часов.

Перколятор №2 оставляли для регенерации спирта с последующей разгрузкой шрота.

День четвертый. Из перколятора №4 получали третью порцию готового продукта (180 мл), которую объединяли с двумя предыдущими. Извлечение из перколятора №3 помещали в перколятор №4. Оставляли один загруженный перколятор на 8 часов.

Перколятор №3 оставляли для регенерации спирта с последующей разгрузкой шрота.

Через 8 часов из перколятора №4 получали четвертую порцию готового продукта (180 мл), которую объединяли с тремя предыдущими.

Перколятор №4 оставляли для регенерации спирта с последующей разгрузкой шрота.

Потери на стадии составили 5%.

Полученный липы сердцевидной цветков экстракт жидкий тщательно перемешивали и отстаивали в течение двух суток при температуре 8 – 10°C, затем фильтровали. Упаковывали во флаконы тёмного стекла объёмом 25,0 мл укупоренные полиэтиленовыми пробками и навинчивающимися пластмассовыми крышками.

Технологическая схема получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого представлена на Рисунке 3.3.1.

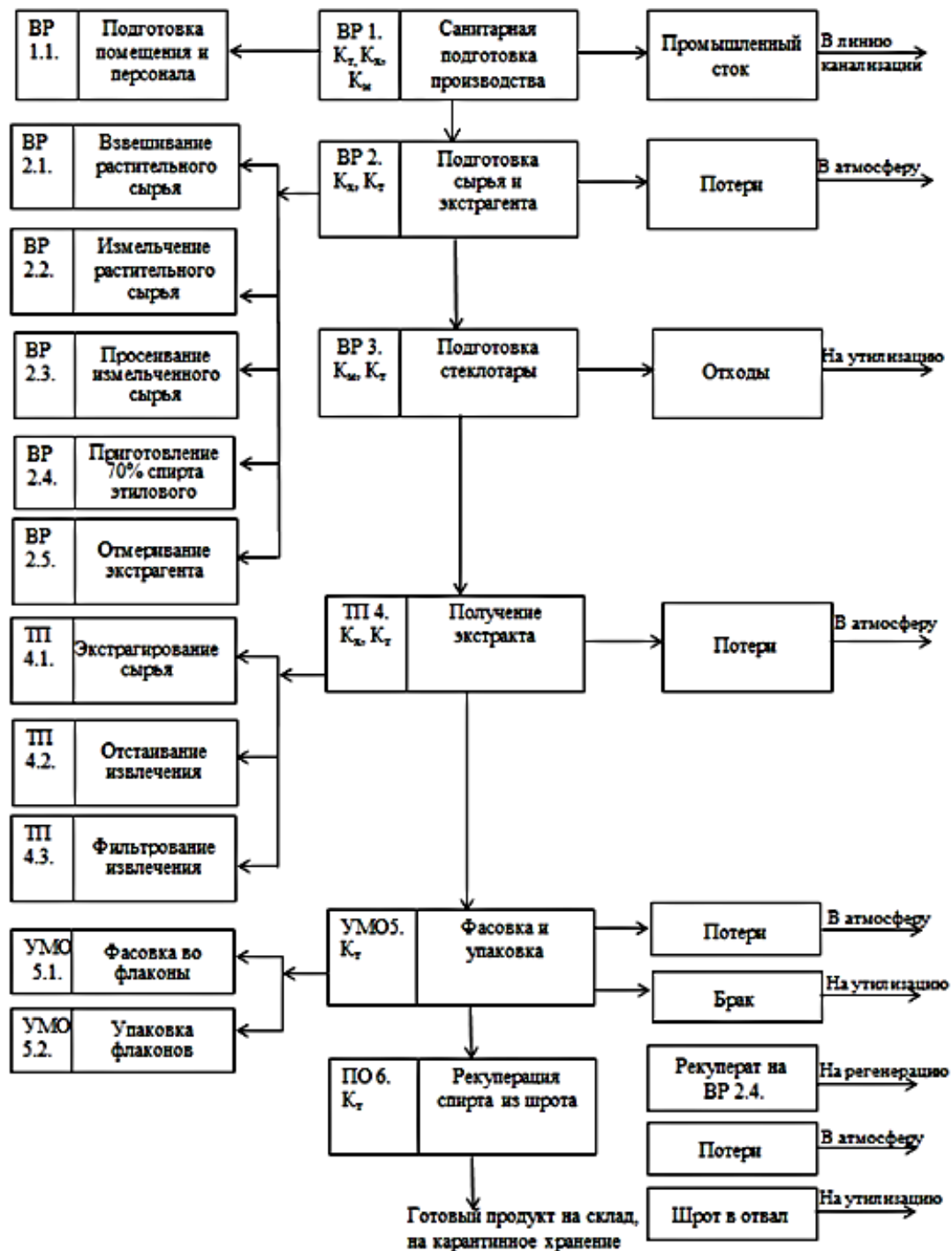


Рисунок 3.3.1 - Технологическая схема получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

Примечание к Рисунку 3.3.1: К_т – контроль технологический, К_х – контроль химический, К_м – контроль микробиологический, ВР – вспомогательные работы, ТП – технологический процесс, ПО – переработка отходов, УМО – упаковка, маркировка и отгрузка готового продукта

Критическая точка процесса производства липы сердцевидной цветков экстракта жидкого находится на стадии ТП 4. получение экстракта - параметр ТП 4.3. фильтрование извлечения. Нарушение на данной стадии приведет к изменению органолептических свойств экстракта – осадок, помутнение.

Расчет фактической эффективности экстрагирования

При равновесных способах экстрагирования наступает равенство концентрации веществ во внутреннем и внешнем соках. Чем быстрее наступает равновесие на каждой ступени экстракции, тем меньше в целом продолжительность экстракции.

Заключение о предельно возможной степени истощения сырья, можно сделать только путем вычисления теоретически возможной эффективности экстракции. В производственных условиях фактическая эффективность экстракции всегда несколько ниже эффективности теоретической. Именно теоретическая эффективность является пределом, к которому необходимо приблизить фактическую эффективность экстракции. Для этой цели применяли различные факторы: экспозиция настаивания на каждой ступени экстракции, дисперсность частиц сырья и др. Теоретическая эффективность в производственных условиях не всегда достижима, поэтому все расчеты, связанные с прогнозированием и нормированием качества извлечений проводятся с учетом фактической эффективности.

Фактическую эффективность (S_{ϕ}) экстрагирования рассчитывают по формулам в процентах и по массе соответственно:

$$S_{\phi} = \frac{100 MC}{G X} \quad (5)$$

$$S_{\phi} = \frac{100 M \lambda}{G \beta} \quad (6)$$

где: S_{ϕ} - фактическая эффективность экстрагирования, %,

C - содержание сухих веществ в экстракте, %,

G - масса сырья, г,

X - содержание ЭВ в сырье, %,

λ - содержание флавоноидов в экстракте, %,

β - содержание флавоноидов в сырье, %,

Фактическая эффективность экстрагирования необходима для всех расчетов, которые связаны с прогнозированием выхода извлечения в единицах массы и единицах объема, прогнозированием качества извлечений по содержанию спирта этилового, сухих и фармакологически активных веществ.

Фактическая эффективность экстрагирования может быть близка или незначительно меньше теоретической.

Для количественной оценки фактической эффективности экстрагирования необходимо сравнить ее с теоретической эффективностью, в связи с чем требуется расчёт относительной эффективности экстрагирования, которая представляет собой отношение фактической эффективности к теоретической:

$$S_o = \frac{S_\phi}{S} \quad (7)$$

где: S_o – относительная эффективность экстрагирования, %,

S_ϕ - фактическая эффективность экстрагирования, %,

S - теоретическая эффективность экстрагирования, %.

Относительная эффективность экстрагирования характеризует степень совершенства промышленной технологии производства жидких экстрактов.

Идеально при промышленном экстрагировании, когда расчеты фактической эффективности составляют $S_\phi = S$. При этом $S_o = S_\phi / S = 1$. В реальных промышленных условиях S_o всегда меньше единицы. Необходимо создание условий экстрагирования, при которых относительная эффективность приближаются к теоретической [113, 83]. Результаты расчетов S_ϕ представлены в Таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 - Результаты сравнительной оценки эффективности ресурсосберегающей и промышленной технологии экстрагирования цветков липы

№ серии	Содержание фармакологически активных веществ в сырье, %		Ресурсосберегающая технология n = 4			Промышленный способ n = 3		
	X	λ	S_{ϕ}	S	S_o	S_{ϕ}	S	S_o
1	22,45	0,736	68,01	70,26	0,968	46,99	48,64	0,966
2	16,62	0,439	73,41	76,32	0,962	46,99	48,95	0,960
3	19,22	0,681	72,23	75,40	0,958	46,02	47,99	0,959
4	18,67	0,708	73,13	76,10	0,961	46,91	48,76	0,962
5	22,11	0,721	72,15	75,71	0,953	46,21	48,44	0,954

Относительная эффективность S_o предлагаемого и промышленного способа экстрагирования лекарственного растительного сырья колеблется в пределах от 0,953 до 0,968, т.е. близка к единице. Фактическая эффективность экстрагирования S_{ϕ} составляет 90-96 % от теоретически возможной предельной эффективности S. Экспозиция настаивания сырья с экстрагентом на каждой ступени экстракции как в предлагаемом, так и в промышленном способе экстрагирования близка к равновесной.

Таблица 3.3.2 - Результаты сравнительной оценки качества липы сердцевидной цветков экстрактов жидких, полученных по ресурсосберегающей технологии и промышленным способом

Качественные показатели	Получение экстракта по ресурсосберегающей технологии n = 4	Получение экстракта классическим (промышленным) способом n = 3
Содержание сухих веществ, %	8,64	8,68
Содержание флавоноидов, %	0,327	0,307
Содержание спирта этилового, %	62	62
Плотность, г/см ³	0,8205	0,8207

Анализ данных Таблиц 3.3.1 и 3.3.2 показывает, что S_{ϕ} при получении липы сердцевидной цветков экстракта жидкого в батарее из четырех диффузоров и $y = 1:1,8$ см³/г составляет 73,41 % и близка к теоретической - 76,32 %.

На производство экстракта по предложенной нами технологии разработан и утвержден лабораторный регламент (Приложение Б), получен патент на способ получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого [109].

3.4 Стандартизация разработанного липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

Нормирование качества полученного липы сердцевидной цветков экстракта жидкого проводили по показателям, предусмотренным ГФ XIII ОФС.1.4.1.0021.15: по содержанию сухих веществ, флавоноидам, спирта этилового и плотности [39].

Для нормирования качества мы использовали методику, разработанную на кафедре фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии профессором Пшуковым Ю. Г. [137,83].

Качество жидких экстрактов нормируется по нижнему пределу содержания сухих и фармакологически активных веществ. По нижнему пределу содержание экстрактивных и фармакологически активных веществ нормируется и качество сырья. Кроме того, качество сырья нормируется по влажности, для которой лимитирован только верхний предел.

Принятый принцип нормирования качества сырья только по нижнему пределу обязывает при нормировании нижнего предела качества соответствующего извлечения ориентироваться на сырье с минимально допустимым содержанием экстрактивных и фармакологически активных веществ.

Качество извлечений зависит и от влажности сырья. С увеличением влажности сырья выход извлечения возрастает, что ведет к снижению концентрации веществ в извлечении. Поэтому нижний предел качества извлечения должен устанавливаться на сырье с минимально допустимым содержанием экстрактивных и фармакологически активных веществ и максимально допустимой влажностью. Расчет для прогнозирования качества извлечений позволяет рассчитать теоретически нижний предел концентрации

веществ в извлечении. Минимально допустимую концентрацию экстрактивных и фармакологически активных веществ в сырье обозначить соответственно через c_n и β_n , а максимально допустимую влажность сырья B_n , то по фактической эффективности способа экстрагирования S_ϕ , можно рассчитать минимально допустимую концентрацию веществ в извлечении в процентах по объему по формулам для определения нижнего предела концентрации сухих веществ $x_n = 16,62 \%$, и фармакологически активных веществ $\beta_n = 0,598 \%$ и предельно допустимой влажностью $B_n = 13 \%$:

Вычисления проводили по формулам:

$$C_n = \frac{100x_n S_\phi \rho_p}{S_\phi (Z\rho_p x_n + B_n) + \rho[10^4 y - S_\phi (Zx_n + B_n)]} \quad (8)$$

$$C_n = \frac{100 \cdot 16,62 \cdot 72,23 \cdot 0,8976}{72,23 \cdot (0,787 \cdot 16,62 \cdot 0,8976 + 13) + 0,8856 \cdot [10000 \cdot 1,8 - 72,23 \cdot (0,787 \cdot 16,62 + 13)]} = 7,13\%$$

$$\lambda_n = \frac{100\beta_n S_\phi \rho_p}{S_\phi (Z\rho_p x_n + B_n) + \rho[10^4 y - S_\phi (Zx_n + B_n)]} \quad (9)$$

$$\lambda_n = \frac{100 \cdot 0,598 \cdot 72,23 \cdot 0,8976}{72,23 \cdot (0,787 \cdot 0,8976 \cdot 16,62 + 13) + 0,8856 \cdot [10000 \cdot 1,8 - 72,23 \cdot (0,787 \cdot 16,62 + 13)]} = 0,26 \%$$

Соотношение между компонентами извлечения может в определенных пределах меняться. При низком содержании ЭВ, влажности сырья и низкой эффективности экстрагирования количество сухих веществ и воды в составе извлечения будет незначительным, а количество экстрагента большим. При этом концентрация спирта в извлечении будет очень близка к концентрации спирта в экстрагенте.

При экстрагировании сырья с высоким содержанием ЭВ и влаги, при той же эффективности экстрагирования, доля сухих веществ и воды в составе извлечения возрастает, а доля экстрагента уменьшится. При этом концентрация спирта в извлечении станет значительно ниже концентрации спирта в экстрагенте. В связи

с этим необходимо устанавливать нижний предел норм качества препарата по содержанию спирта этилового P_n с ориентацией на сырье с максимально возможным содержанием ЭВ $x_M = 22,45 \%$, и предельно допустимой влажностью $B_n = 13 \%$.

$$P_n = \frac{P \cdot \rho \cdot \rho_p [10^4 y - S_\phi (Z \cdot x_M + B_n)]}{\rho_{100} \cdot \{S_\phi (Z \cdot \rho_p \cdot x_M + B_n) + \rho \cdot [10^4 y - S_\phi (Z \cdot x_M + B_n)]\}} \quad (10)$$

$$P_n = \frac{62,36 \cdot 0,8976 \cdot 0,8856 \cdot [104 \cdot 1,8 - 72,23 \cdot (0,787 \cdot 22,45 + 13)]}{0,78927 \cdot \{72,23 \cdot (0,787 \cdot 0,8976 \cdot 22,45 + 13) + 0,8856 \cdot [104 \cdot 1,8 - 72,23 \cdot (0,787 \cdot 22,45 + 13)]\}} \\ = 61,72 \%$$

Плотность извлечения зависит как от содержания сухих веществ, так и от содержания воды, извлеченной из сырья. При низком содержании ЭВ и влажности сырья содержание сухих веществ и воды в извлечении будет незначительным, и плотность извлечения будет близка к плотности экстрагента. При высоком содержании ЭВ и влажности сырья плотность извлечения значительно выше плотности экстрагента.

ГФ и НД нормируют качество жидких экстрактов только по верхнему значению плотности, это означает, что верхний предел плотности препаратов при нормировании качества устанавливается на сырье с возможной концентрацией ЭВ $x_M = 22,45 \%$ и предельно допустимой влажностью $B_n = 13\%$.

$$\rho_p = \frac{\rho_p \cdot \{S_\phi (x_M + B_n) + \rho [10^4 y - S_\phi (Z \cdot x_M + B_n)]\}}{\{S_\phi (Z \cdot \rho_p \cdot x_M + B_n) + \rho [10^4 y - S_\phi (Z \cdot x_M + B_n)]\}} \quad (11)$$

$$\rho_p = \frac{0,8856 \cdot \{72,23 \cdot (0,787 + 13) + 0,8856 \cdot [104 \cdot 1,8 - 72,23 \cdot (0,787 \cdot 22,45 + 13)]\}}{\{72,23 \cdot (0,787 \cdot 0,8976 \cdot 22,45 + 13) + 0,8856 \cdot [104 \cdot 1,8 - 72,23 \cdot (0,787 \cdot 22,45 + 13)]\}} = 0,8256\%$$

Обоснованность разработанных норм качества проверяли экспериментально. Для создания моделей сырья с заданными параметрами необходимо разделить цветки липы сердцевидной на две части. Одну часть сырья обедняли путем экстрагирования 70 % спиртом этиловым и полученным при этом извлечением обогащали другую часть сырья. Обе серии сырья, обеднённое и

обогащенное, высушивали и определяли влажность. В данной методике показатели качества жидкого экстракта должны нормироваться для сырья с предельно допустимой влажностью, которая, согласно ГФ XIII ФС.2.5.0024.15 для цветков липы сердцевидной не должно превышать 13 %, в связи с этим, влажность обеих серий сырья довели до 13%.

Обе серии увлажненного сырья подвергались анализу на содержание ЭВ: в обеднённом сырье – 12,3 %, а в обогащенном – 27,2 %. Из данного сырья были созданы 2 модели.

Модель № 1 для проверки метода нормирования качества извлечения по содержанию экстрактивных и фармакологически активных веществ, должна содержать min допустимое количество ЭВ, которое составляет 19,2 %. Данную модель получили, смешивая 275 г обедненного со 125г обогащенного сырья, таким образом, подготовлена модель № 1 с $X_n = 19,2\%$ и $B_n = 13\%$. Анализ модели сырья № 1 по содержанию флавоноидов - $\beta_n = 0,681\%$.

Модель № 2 для проверки метода нормирования качества извлечений по содержанию спирта этилового и плотности должна содержать max возможное количество ЭВ, которые составляют – 27,2 %. Эту модель готовили, смешивая 50 г сырья обедненного с 350 г обогащенного сырья. Модель № 2 с $C_m = 27,2\%$ и $B_n = 13\%$.

Из данных моделей сырья получали экстракт по ресурсосберегающей технологии в батарее из 4-х диффузоров. Полученные извлечения подвергали анализу: по содержанию сухих веществ, флавоноидов (модель № 1), спирта этилового и плотности (модель № 2).

Таким образом, проведенные теоретические расчеты и результаты экспериментальных данных позволили установить нижние пределы качества экстракта цветков липы жидкого (Таблица 3.4.1).

Таблица 3.4.1 - Нижние пределы качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

Показатель	Обозначение	Теоретическое значение	Экспериментальные данные
Сухие вещества, %	C_n	не менее 7,13	7,03
Фармакологически – активные вещества (флавоноиды), %	β_n	не менее 0,26	0,28
Спирт этиловый, %	P_n	не менее 62 %	63
Плотность экстракта, г/см ³	ρ_p	не более 0,8256	0,8245

Таким образом, отклонения результатов эксперимента от теоретических расчетов, не превышающие 3 % и свидетельствуют о реальности норм качества установленных разработанным методом, а также о возможности его применения для нормирования качества экстрактов жидких. Сам принцип моделирования сырья, с заданными параметрами, применяемый для проверки теоретических расчетов может быть использован для экспериментального нормирования качества препарата.

3.4.1 Качественный анализ цветков липы, экстрактов на их основе

Показателем доброкачественности ЛРС является наличие в нем БАВ, обуславливающих фармакологический и терапевтический эффекты. Различие эффектов БАВ обусловлено их природой, химическим строением, способностью к взаимодействию с другими веществами и пр. В данном исследовании нами были выбраны флавоноиды спиртового экстракта цветков липы, как вещества потенциально обладающие иммуностропным и антиоксидантным действием за счет своей небольшой молекулярной массы и невозможностью вовлечения в реакции гидролитического расщепления, и обладающих восстановительным потенциалом в реакциях окислительного взрыва при митохондриальном окислении субстрата и в реакциях иммунной защиты.

Для подтверждения присутствия флавоноидов в цветках липы проводили качественную реакцию на эти БАВ с порошком магния и раствором кислоты хлористоводородной концентрированной, по методике ГФ XIII. Кроме того, для подтверждения наличия флавоноидов в изучаемых липы сердцевидной цветков экстрактах жидких (1:1,0 и 1:1,8) реакцию проводили и с данными объектами (Рисунок 3.4.1.1).



Рисунок 3.4.1.1 – Качественная реакция на флавоноиды с порошком магния и кислотой хлористоводородной (А – извлечение из липы цветков, Б – липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1, В – липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8)

В результате испытания установлено, что красное окрашивание образовалось во всех трех пробирках, что подтвердило наличие группы флавоноидных соединений и в исходном сырье, и в полученных липы сердцевидной цветков экстрактах жидких.

Далее необходимо было разработать методику одновременного качественного и количественного определения флавоноидов для дальнейшего аналитического контроля технологического процесса. Предварительно следовало установить количественное содержание анализируемых БАВ в исходном сырье, а затем в липы сердцевидной цветков экстракте жидком.

3.4.2 Разработка методики качественного и количественного определения флавоноидов в цветках липы сердцевидной

Создание ЛП природного происхождения, в частности, на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС), содержащего флавоноиды, непосредственно связано с анализом фармакопейного ЛРС.

Введение в действие ГФ XIII издания в определенном смысле унифицировало подход к определению количественного содержания флавоноидов. Следует отметить, что для 20 объектов из всех видов ЛРС, входящего в ГФ XIII, в качестве действующих веществ были выбраны флавоноиды.

Таблица 3.4.2.1 – Лекарственное растительное сырье, для которого в соответствии с ФС проводится количественное определение содержания флавоноидов

Лекарственное растительное сырье, номер ФС	Содержание флавоноидов	Флавоноид, на который ведется пересчет количественного содержания
Березы почки ФС 2.5.0006.15	не менее 2,5%	лютеолин
Бессмертника песчаного цветки ФС 2.5.0007.15	не менее 3%	изосалипурпозид
Бузины черной цветки ФС 2.5.0008.15	не менее 2%	рутин
Гинго двулопастного листья ФС 2.5.0010.15	не менее 0,5%	рутин
Душицы обыкновенной трава ФС 2.5.0012.15	не менее 0,8%	лютеолин
Жостера слабительного плоды ФС 2.5.0014.15	не менее 2,5%	3-о-рутозид рамнитина
Зверобоя трава ФС 2.5.0015.15	не менее 1,5%	рутин
Земляники лесной листья ФС 2.5.0016.15	не менее 1%	рутин
Мяты перечной листья ФС 2.5.0029.15	не менее 0,6%	лютеолин
Ноготков лекарственных цветки ФС 2.5.0030.15	не менее 1%	рутин
Пижмы обыкновенной цветки ФС 2.5.0031.15	не менее 2,5%	лютеолин

Полыни горькой трава ФС 2.5.0033.15	не менее 0,3%	рутин
Пустырника трава ФС 2.5.0034.15	не менее 0,2%	рутин
Ромашки аптечной цветки ФС 2.5.0035.15	не менее 1,2%	рутин
Фиалки трава ФС 2.5.0044.15	не менее 1%	рутин
Хвоща полевого трава ФС 2.5.0045.15	не менее 0,3%	кверцетин
Хмеля обыкновенного плоды ФС 2.5.0046.15	не менее 0,3%	рутин
Чабреца трава ФС 2.5.0047.15	не менее 0,9%	лютеолин-7-гликозид
Череды трехраздельной трава ФС 2.5.0048.15	не менее 0,5%	рутин
Эрвы шерстистой трава ФС 2.5.0054.15	не менее 0,5%	рутин

Из анализа Таблицы 3.4.2.1 следует, что в 12 видах ЛРС расчет количественного содержания флавоноидов проводится в пересчете на рутин, на лютеолин – в 4, по 1 – лютеолин-7-гликозид, изосалипурпозид, 3-о-рутозид рамнитина, кверцетин [39].

С целью выбора оптимальных условий экстракции флавоноидов из цветков липы необходимо провести анализ условий определения количественного содержания этих БАВ соответствии с ФС, с включенными в ГФ XIII (Таблица 3.4.2.2) [39, 122].

Таблица 3.4.2.2 – Характеристики методики определения содержания флавоноидов в пересчете на рутин

Название ЛРС	Навеска сырья, г	Концентрация и объем спирта этилового для экстракции, %, мл	Время экстракции, мин.	Максимум светопоглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом, нм	Величина удельного показателя светопоглощения, нм	Объем раствора А или Б, мл	Концентрация алюминия хлорида, %	Объем раствора алюминия хлорида, мл	Концентрация и объем уксусной кислоты, %, мл	Концентрация спирта этилового для раствора Б, %
Бузины черной цветки	1,0	60 мл 70%	45'	408	248	5,0	10%	1,5 мл	0,5 мл 30%	70%
Гинго двулопастного листья	1,0	30 мл 70%	60'	406	190	1,0	2%	2,0	1 кап. 30%	96%
Зверобоя трава	1,0	30 мл 50%	30'	415	248	1,0	2%	2,0	-	96%
Земляники лесной листья	1,0	100 мл 70%	90'	410	260	2,0	5%	5,0	1 мл 3% через 10 мин.	70%
Ноготков лекарственных цветки	1,0	50 мл 70%	60'	408	248	1,0	2%	5,0	0,1 мл	96%
Полыни горькой трава	1,0	60 мл 70%	30'	410	260	2,0	2%	4,0	1 кап. 30%	96%
Пустырника трава	2,5	50 мл 70%	60'	410	260	2,0	2%	5,0	-	96%
Ромашки аптечной цветки	1,0	100 мл 70%	45'	415	248	3,0	5%	5,0	2 кап. 30% через 10 мин.	70%
Фиалки трава	1,0	100 мл 70%	30'	410	249	2,0	5%	5,0	1 мл 3% через 10 мин.	70%
Хмеля обыкновенного плоды	1,0	100 мл 70%	30'	410	260	1,0	2%	2,0	0,1 мл конц.	96%
Череды трехраздельной трава	1,0	50 мл 70%	60'	415	260	1,0	2%	5,0	-	96%
Эрвы шерстистой трава	1,0	50 мл 60%	60'	410	248	2,0	2%	2,0	0,1 мл 30%	60%

Анализ методик количественного определения суммы флавоноидов показал, что навеска сырья для всего ЛРС составляет, как правило, 1,0 или 2,5 г. По результатам предварительных испытаний определена оптимальная навеска сырья – 5,0 г [125]. Сравнение концентраций и объема спирта этилового, который используется в качестве экстрагента флавоноидов показал, что наиболее часто (в 10 методиках) используется спирт этиловый – 70%.

Объем экстрагента, приведенный в методиках ГФ XIII, колеблется от 30 до 100 мл, в частности в четырех ФС встречается объем равный 100 мл и 50 мл, в двух ФС – 30 мл и 60 мл. В связи с тем, что объем экстрагента более 100 мл регламентирован в 6 из всех проанализированных ФС, для дальнейшей работы использовался этот объем экстрагента.

Другим значимым параметром методики является время проведения экстракции. С учетом данных для экстракции суммы флавоноидов цветков липы было выбрано время экстракции – 60 мин.

Следующим условием проведения испытания, которое было проанализировано, является количество первичного спиртового экстракта, подвергаемое анализу – аликвота. В двух ФС встречается величина аликвоты 3 и 5 мл. В 5 ФС рекомендуется для анализа отбирать по 1 мл раствора А. По 2 мл раствора А – в 5 ФС. В связи с тем, что 2 мл – наиболее распространенная аликвота первичного экстракта, с которой в дальнейшем проводят реакцию комплексообразования, предварительные исследования проводили по методике с величиной аликвоты – 2 мл.

Для получения комплекса алюминия хлорида с флавоноидами в анализируемых ФС используется его 2%, 5% и 10% раствор. Причем последняя концентрация встречается лишь в одной методике, 5% раствор рекомендуется применять в 3 ФС. Подавляющее число методик использует 2% раствор алюминия хлорида. В связи с этим, в качестве базовой концентрации раствора алюминия хлорида была выбрана – 2%.

Основываясь на результатах анализа методик флавоноидов в ЛРС согласно ГФ XIII, нами была составлена схема скринингового анализа методики. Схема включала три изменяющихся параметра методики:

- объем извлечения из цветков липы, взятый на анализ;
- количество 2% раствора алюминия хлорида, необходимое для образования комплекса;
- число капель 30% раствора уксусной кислоты, используемого в методике.

В процессе выбора условий проведения количественного определения флавоноидов в цветках липы проведено 12 испытаний.

На основании полученных результатов были проанализированы положения максимумов поглощения, величины оптических плотностей и рассчитано содержание флавоноидов с использованием величин удельного показателя поглощения 248 и 260.

Результаты скринингового анализа методики количественного определения флавоноидов цветков липы представлены в Таблице 3.4.2.3.

Таблица 3.4.2.3 – Условия и результаты скринингового анализа методики качественного и количественного определения флавоноидов в цветках липы

Номер образца	Аликвота (V_a), взятая на анализ, мл			Раствор алюминия хлорида		Раствор уксусной кислоты 30%		Максимум поглощения, нм	Оптическая плотность	X, % по 248 нм	X, % по 260 нм
	1	2	3	1 мл	2 мл	1 капля	2 капли				
1	+				+	+		414	0,1714	0,367	0,350
2	+			+		+		415	0,1694	0,363	0,346
3	+				+		+	414	0,1384	0,296	0,282
4	+			+			+	415	0,1395	0,299	0,285
<i>р-р сравнения</i>	+						+	—	—	—	—
<i>р-р сравнения</i>	+					+		—	—	—	—
5		+			+	+		413	0,4154	0,444	0,424
6		+		+		+		414	0,3945	0,423	0,403
7		+			+		+	413	0,5318	0,569	0,543
8		+		+			+	414	0,4098	0,439	0,419

<i>p-p</i> сравнен ия		+				+		—	—	—	—
<i>p-p</i> сравнен ия		+					+	—	—	—	—
9			+		+	+		414	0,5912	0,423	0,402
10			+	+		+		414	0,5678	0,405	0,398
11			+		+		+	414	0,6654	0,475	0,453
12			+	+			+	414	0,6652	0,475	0,453
<i>p-p</i> сравнен ия			+			+		—	—	—	—
<i>p-p</i> сравнен ия			+				+	—	—	—	—

Как следует из данных Таблицы 3.4.2.3, и характеров спектров, представленных на Рисунках 3.4.2.1 - 3.4.2.3, положение максимума поглощения для всех 12 экспериментальных условий находился при 415 ± 2 нм. Полученный результат соотносится с данными для другого ЛРС, представленными в ГФ XIII [39].

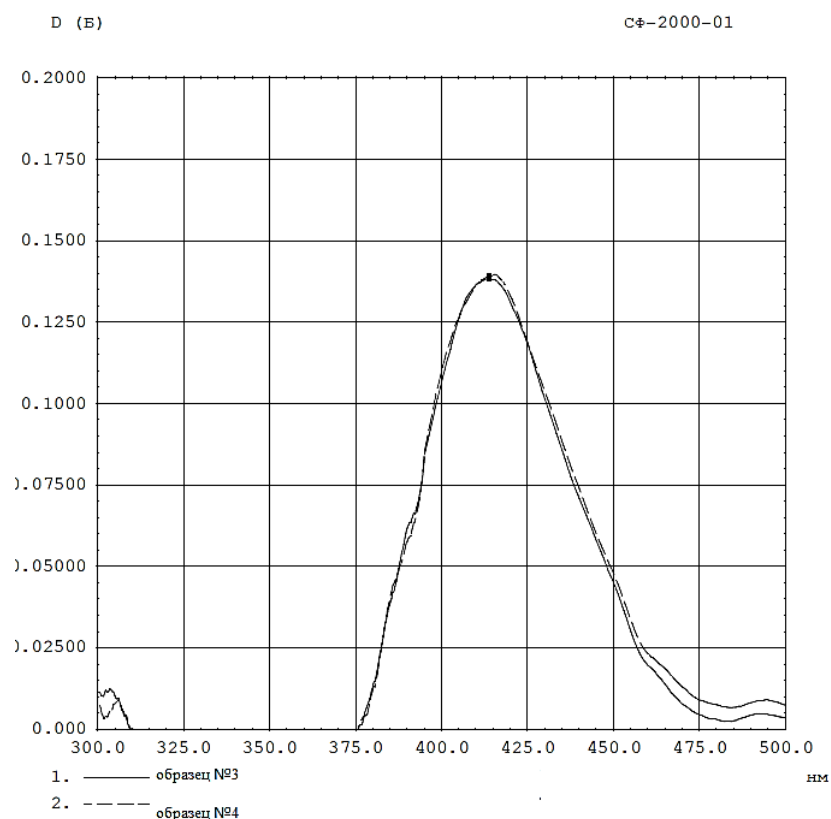


Рисунок 3.4.2.1 – Спектр поглощения комплекса флавоноидов цветков липы с алюминия хлоридом (образцы №3 и №4)

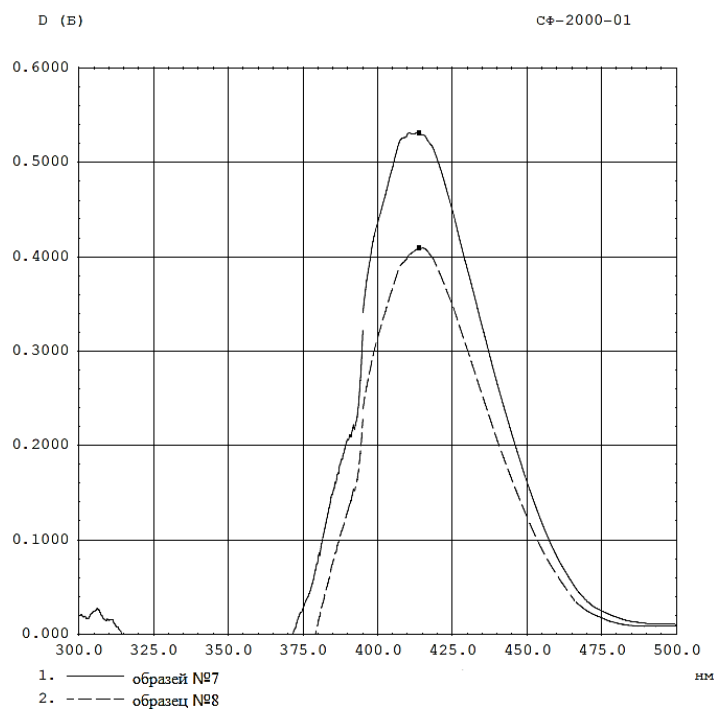


Рисунок 3.4.2.2 – Спектр поглощения комплекса флавоноидов цветков липы с алюминия хлоридом (образцы №7 и №8)

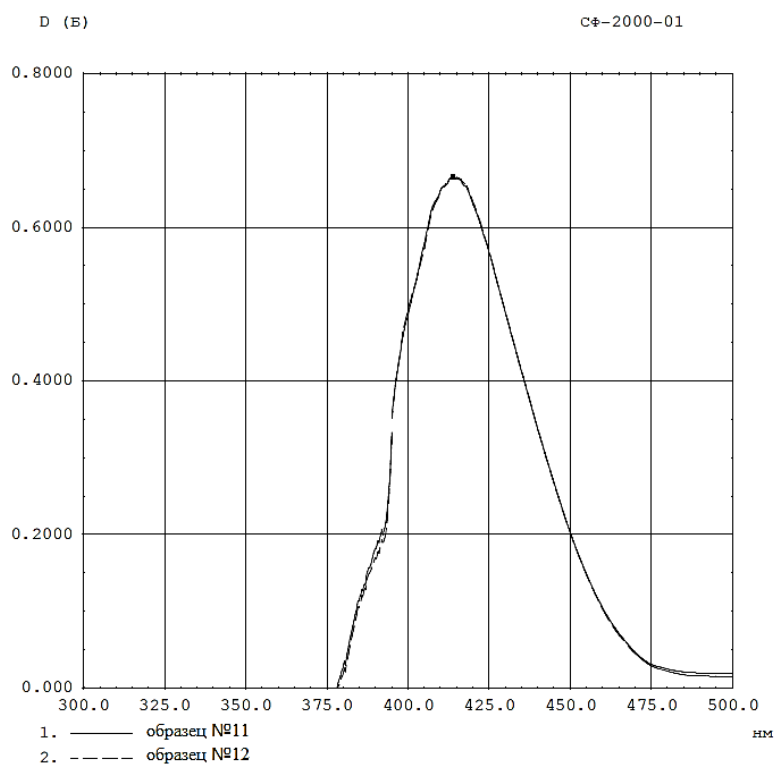


Рисунок 3.4.2.3 – Спектр поглощения комплекса флавоноидов цветков липы с алюминия хлоридом (образцы №11 и №12)

Далее критическому анализу подвергались результаты количественного содержания флавоноидов. Установлено, что использование аликвоты 3 мл, взятой

на анализ, приводило к заниженному содержанию флавоноидов по сравнению с аликвотой в 1 или 2 мл. Возможно, это связано с тем, что 1-2 мл алюминия хлорида недостаточно для образования стабильного комплекса.

Затем определяли содержание флавоноидов в цветках липы по условиям методики с аликвотой – 3 мл в шести повторностях (Таблица 3.4.2.4).

Таблица 3.4.2.4 - Количественное содержание флавоноидов (образец №11)

№	Количественное содержание флавоноидов, %			
	по удельному показателю поглощения 248 нм	метрологические характеристики	по удельному показателю поглощения 260 нм	метрологические характеристики
1	0,475	$\bar{x} = 0,459$ $S\bar{x} = 0,01297$ $\Delta X = 0,03342$ $\epsilon\% = 7,27\%$	0,463	$\bar{x} = 0,433$ $S\bar{x} = 0,01091$ $\Delta X = 0,0280$ $\epsilon\% = 6,48\%$
2	0,396		0,402	
3	0,470		0,441	
4	0,468		0,453	
5	0,458		0,438	
6	0,484		0,398	

Как свидетельствуют результаты испытаний, параметры методики не позволяют получить стабильный результат, что подтверждается относительной погрешностью определения, которая составила около $\pm 7\%$, что неприемлемо для методики количественного анализа. На основании этого в дальнейшем эксперименте не рассматривались условия проведения испытания с навеской извлечения – 3 мл.

В тоже время, такие параметры как количество алюминия хлорида – 2 мл и уксусной кислоты – 2 капли при значении навески 1 мл и 2 мл показали стабильный результат в шести параллельных определениях (Таблицы 3.4.2.5, 3.4.2.6).

Сравнение результатов, полученных для аликвот 1 и 2 мл, количества алюминия хлорида – 2 мл, уксусной кислоты – 2 капли, показали, что меньшей относительной погрешностью обладает методика с объёмом аликвоты 2 мл.

Таблица 3.4.2.5 - Количественное содержание флавоноидов (образец №3)

№	Количественное содержание флавоноидов, %			
	по удельному показателю поглощения 248 нм	метрологические характеристики	по удельному показателю поглощения 260 нм	метрологические характеристики
1	0,296	$\bar{x}=0,299$ $S\bar{x}=0,00413$ $\Delta X=0,01062$ $\epsilon\%=3,56\%$	0,282	$\bar{x}=0,283$ $S\bar{x}=0,00389$ $\Delta X=0,01001$ $\epsilon\%=3,53\%$
2	0,301		0,270	
3	0,312		0,276	
4	0,286		0,285	
5	0,308		0,289	
6	0,290		0,297	

Таблица 3.4.2.6 - Количественное содержание флавоноидов (образец №7)

№	Количественное содержание флавоноидов, %			
	по удельному показателю поглощения 248 нм	метрологические характеристики	по удельному показателю поглощения 260 нм	метрологические характеристики
1	0,569	$\bar{x}=0,568$ $S\bar{x}=0,00229$ $\Delta X=0,00589$ $\epsilon\%=1,04\%$	0,543	$\bar{x}=0,545$ $S\bar{x}=0,00246$ $\Delta X=0,00631$ $\epsilon\%=1,16\%$
2	0,576		0,551	
3	0,568		0,537	
4	0,563		0,550	
5	0,570		0,549	
6	0,560		0,539	

Кроме того, учитывая, что результаты расчетов содержания флавоноидов в пересчете на рутин со значениями удельного показателя светопоглощения 248 нм и 260 нм имеют практически одинаковую погрешность, а в научных исследованиях и ГФ XIII чаще встречается пересчет с использованием величины этого параметра – 248 нм, дальнейшие расчеты вели, используя это значение.

На основании полученных результатов для качественного и количественного анализа цветков липы нами разработана и использована следующая методика:

Методика количественного определения флавоноидов в цветках липы

Ход определения:

1. Точную навеску измельченного сырья (прошедшее сквозь сито с отверстиями 1 мм) массой около 5,0 г (а) помещают в коническую колбу на 250 мл.

2. Прибавляют 100 мл 70% спирта, закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г и оставляют на час.

3. Колбу с сырьем присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 2 часов. Охлаждают.

4. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и содержимое колбы при необходимости восполняют растворителем.

5. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл в сухую колбу вместимостью 200 мл (раствор А испытуемого раствора).

6. Пипеткой 2,0 мл раствора А испытуемого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 2 % спиртового раствора хлорида алюминия и 2 капли 30% уксусной кислоты, доводят объем раствора до метки 96 % этиловым спиртом и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

7. Через 40 мин измеряют оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 415 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствора, 2 капель уксусной кислоты 30%, доведенный спиртом 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. В спектре поглощения извлечения из цветков липы должен наблюдаться максимум поглощения при 415 ± 2 нм.

Содержание суммы флавоноидов в процентах в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле, представленной в Главе 2.

Используя разработанную методику количественного определения флавоноидов в цветках липы, в дальнейшем было проведено определение количественного содержания флавоноидов в исследуемом сырье (Таблица 3.4.2.7).

Таблица 3.4.2.7 – Содержание флавоноидов в исходном сырье липы

№	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов, %	Метрологические характеристики
серия 08.06.2017 (влажность 5,82)			
1	0,415	0,444	$\bar{x}$ =0,436 $S\bar{x}$ =0,0045 ΔX =0,01156 $\varepsilon\%$ = 2,65%
2	0,395	0,423	
3	0,407	0,436	
4	0,410	0,439	
5	0,395	0,423	
6	0,416	0,450	
серия 16.06.2017 (влажность 5,80)			
	0,421	0,451	$\bar{x}$ =0,446 $S\bar{x}$ =0,00476 ΔX =0,01222 $\varepsilon\%$ = 2,74%
1	0,400	0,428	
2	0,425	0,455	
3	0,410	0,439	
4	0,415	0,444	
5	0,430	0,460	
серия 24.06.2017 (влажность 5,90)			
1	0,417	0,447	$\bar{x}$ =0,439 $S\bar{x}$ =0,00582 ΔX =0,01496 $\varepsilon\%$ = 3,41%
2	0,410	0,439	
3	0,397	0,425	
4	0,390	0,418	
5	0,423	0,453	
6	0,420	0,450	

Как следует из данных Таблицы 3.4.2.7, содержание флавоноидов в исходном сырье находилось в интервале от 0,436 до 0,446%, среднее значение этого показателя для трех серий составило – 0,440%.

3.4.3 Разработка методики качественного и количественного определения флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком

Проведение качественных технологических исследований диктует необходимость разработки методик анализа готового продукта.

С этой целью проведены исследования по разработке методики качественного и количественного определения флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком. За основу была взята методика установления содержания флавоноидов в сырье, представленная в Разделе 3.4.2.

В первую очередь необходимо установить соотношение разведений и положение максимума поглощения.

1. Аликвоту экстракта 2 мл помещают в коническую колбу на 50 мл.

2. Прибавляют 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и 2 капли уксусной кислоты 30%, доводят объем раствора спиртом 96% до метки и перемешивали (испытуемый раствор).

3. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли на спектрофотометре в интервале длин волн от 300 до 600 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл испытуемого раствора, 2 капель уксусной кислоты 30%, доведенный спиртом 96% до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

На спектре поглощения извлечения из цветков липы должен наблюдаться максимум поглощения при 415 ± 2 нм.

Результаты анализа для двух экстрактов отражены на рисунках 3.4.3.1 и 3.4.3.2.

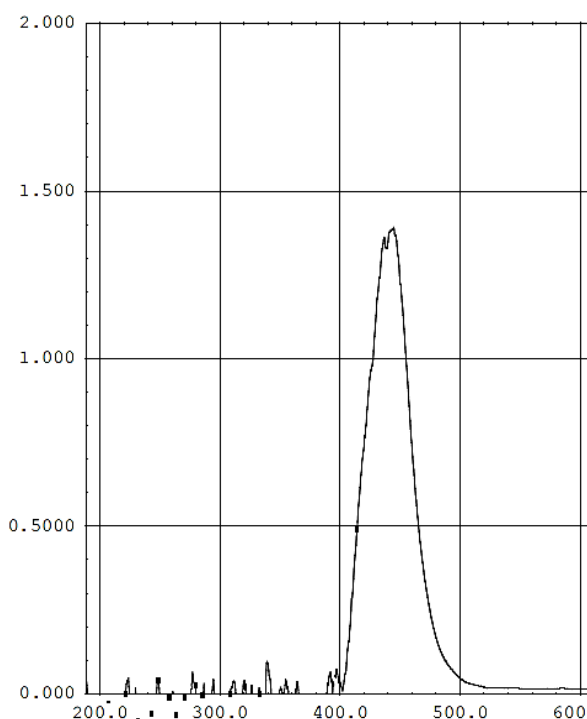


Рисунок 3.4.3.1 – Спектр поглощения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,0

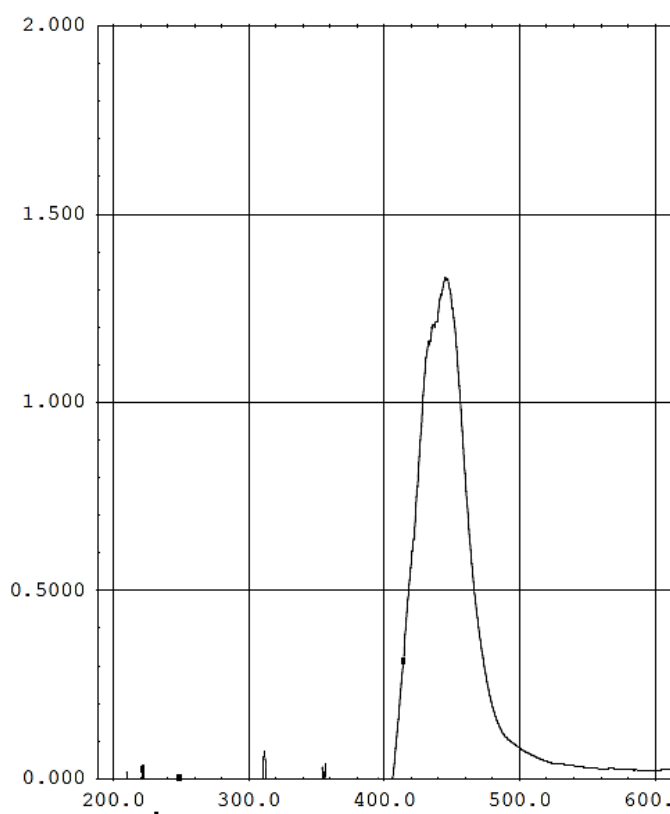


Рисунок 3.4.3.2 – Спектр поглощения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8

Как следует из представленных спектров поглощения, положение максимума для обоих объектов находились при 445 нм. Такой результат объясняется тем, что в процессе пробоподготовки цветков липы исходную навеску сырья кипятили в течение 2 часов. Получение экстрактов не предполагает процесса кипячения, поэтому для получения результатов в одинаковых условия была проведена дополнительная подготовка пробы экстрактов.

1. 50 мл экстракта помещали в коническую колбу объемом 250 мл.
2. Далее присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане, поддерживая слабое кипение в течение 2 ч. Охлаждали.
3. Содержимое колбы тщательно взбалтывали и фильтровали через сухой бумажный фильтр, отбрасывая первые 20 мл в сухую колбу (испытуемый раствор А).
4. Пипеткой 2 мл испытуемого раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2 % спиртового раствора алюминия

хлорида и 2 капли 30% уксусной кислоты, доводили объем раствора до метки 70 % спиртом и перемешивали (раствор Б).

5. Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре (от 200 до 600 нм) толщиной слоя в кювете 10 мм относительно раствора сравнения. Раствор сравнения: 2 мл раствора испытуемого раствора А, 2 капель 30% уксусной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, и доводили до метки спиртом этиловым 70%.

На спектре поглощения извлечения из цветков липы должен наблюдаться максимум поглощения при 415 ± 2 нм. Результат определения представлен в Таблице 3.4.3.1.

Таблица 3.4.3.1 – Максимумы поглощения и величины оптических плотностей липы сердцевидной цветков экстрактов жидких

Объект	Положение максимума, нм	Оптическая плотность
Экстракт 1:1,0	414	1,364
Экстракт 1:1,8	416	1,256

Положения максимумов соответствовали заданным требованиям, однако величина оптической плотности превышала оптимальное значение. Поэтому, для дальнейшей работы изменена схема разведения анализируемого экстракта. После проведения ряда предварительных испытаний методика приобрела следующий вид.

Методика качественного и количественного определения флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком

1. Навеску экстракта объемом 50 мл помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл.

2. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане, в течение 2 часов, поддерживая слабое кипение.

3. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр. Первые 20 мл отбрасываются (испытуемый раствор) в сухую колбу.

4. После этого 2 мл испытуемого раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 2 капли уксусной кислоты 30%, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (раствор А).

5. Оптическую плотность раствора А измеряют на спектрофотометре при 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл испытуемого раствора, 2 капель уксусной кислоты 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Полученные спектры поглощения представлены на рисунках 3.4.4.3 -3.4.4.4.

В результате определения установлено, что для обоих экстрактов положение максимума находилось при 415 ± 2 нм: для экстракта 1:1,0 при 414 нм, для 1:1,8 – 416 нм.

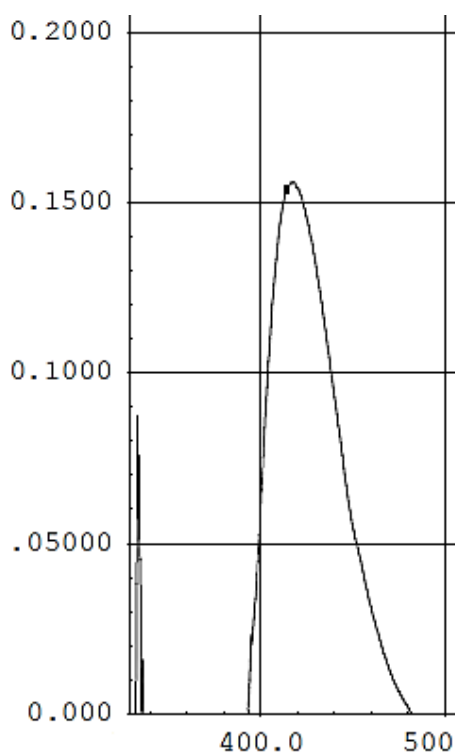


Рисунок 3.4.3.3 – Спектр поглощения комплекса флавоноидов липы сердцевидной цветков экстракта жидкого (1:1,0) с раствором алюминия хлорида

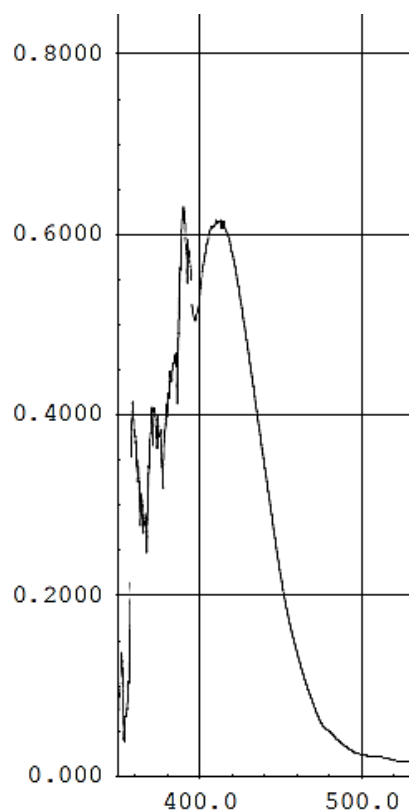


Рисунок 3.4.3.4 – Спектр поглощения комплекса флавоноидов липы сердцевидной цветков экстракта жидкого (1: 1,8) с раствором алюминия хлорида

Таким образом, спектрофотометрически подтверждено, что оба исследуемых экстракта содержат флавоноиды. Кроме того, величины оптических плотностей измеряемых растворов позволили оставить методики определения в конечном виде.

В результате анализа фармакопейных статей и проведенных экспериментальных исследований разработана оптимальная методика определения содержания флавоноидов в сырье и в экстракте цветков липы в пересчете на рутин, характеристики которой представлены в Таблице 3.4.3.2.

Таблица 3.4.3.2 – Особенности разработанной методики определения содержания флавоноидов в пересчете на рутин в цветках липы сердцевидной и липы сердцевидной цветков экстракте жидком

Параметр	Объект	
	Липы сердцевидной цветки	Липы сердцевидной цветков экстракт жидкий
Навеска/ аликвота	5,0 г	50 мл
Концентрация и объем спирта этилового для экстракции, %, мл	100; 70	-
Время экстракции, мин.	60	-
Максимум светопоглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом, нм	415	415
Величина удельного показателя светопоглощения	248	248
Объем раствора А или Б, мл	2	2
Концентрация алюминия хлорида, %	2	2
Объем раствора алюминия хлорида, мл	2	2
Концентрация и объем уксусной кислоты %, мл	30; 0,1	30; 0,1
Концентрация спирта этилового для раствора Б, %	96	70

Далее требовалось установить количественное содержание флавоноидов в полученных экстрактах. Содержание суммы флавоноидов в процентах в пересчете на рутин проводили по формуле, представленной в Разделе 2.2.1.

Результаты проведенного эксперимента представлены в Таблице 3.4.3.3.

Таблица 3.4.3.3 - Содержание флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстрактах жидких

№	Содержание флавоноидов,		Метрологические характеристики
	%	г/мл	
	экстракт 1:1,0		
1	0,301	0,003010	$\bar{x} = 0,307$ $S\bar{x} = 0,0017$ $\Delta X = 0,0043$ $\epsilon\% = 1,39\%$
2	0,312	0,003120	
3	0,308	0,003080	
4	0,311	0,003110	
5	0,306	0,003060	
6	0,305	0,003050	

	экстракт 1:1,8		
1	0,329	0,003290	$\bar{x} = 0,327$ $S\bar{x} = 0,0053$ $\Delta X = 0,0022$ $\varepsilon\% = 1,73\%$
2	0,321	0,003210	
3	0,333	0,003330	
4	0,320	0,003200	
5	0,329	0,003290	
6	0,331	0,003310	

Таким образом, среднее значение содержания флавоноидов в экстракте 1:1,0 составило 0,307%, а в экстракте 1:1,8 – 0,327%. Погрешность определения не превысила 2,0%.

3.5 Валидация методик испытания на подлинность и количественного определения флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком

Установление специфичности методики

Определение специфичности методики подтверждает, что валидируемая методика позволяет однозначно определять ДВ в присутствии сопутствующих компонентов. Определение этой валидационной характеристики, как правило, опирается на данных анализа модельных смесей известного состава. Этот подход не приемлем в нашем случае, т.к. изучаемая ЛФ – суммарное извлечение из ЛРС [7].

При невозможности получения модельных смесей исследуемого объекта, возможно подтверждение специфичности в сравнении с результатами анализа реальных объектов, который должен быть проведен по методике с заведомо доказанной специфичностью.

Применительно к изучению суммарного флавоноидного ЛП – экстракта цветков липы жидкого применена фармакопейная методика с уже доказанной специфичностью, в частности, фотометрическая методика получения окрашенного комплекса рутина с раствором алюминия хлорида (Рисунок 3.5.1) [39].

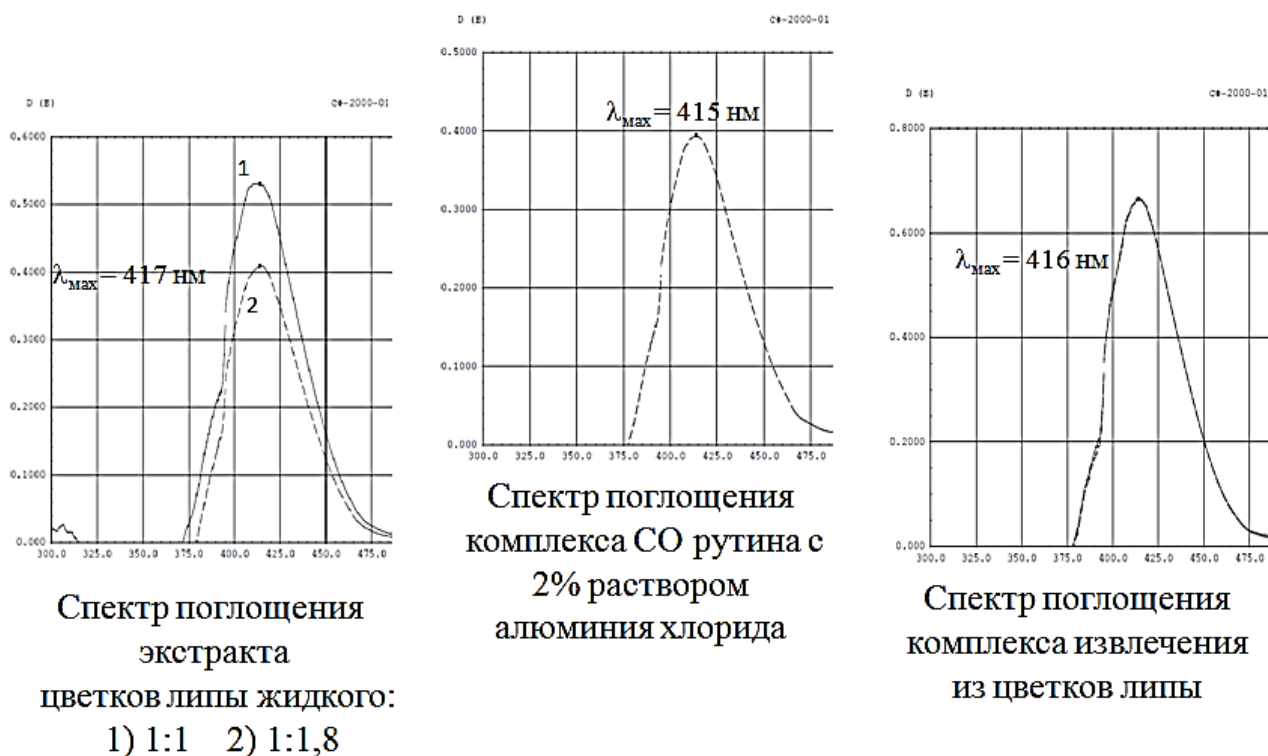


Рисунок 3.5.1 – Результаты определения специфичности методики

Результаты проведения эксперимента свидетельствуют, что положение максимума поглощения комплекса стандартного образца (СО) рутина с алюминия хлоридом соответствуют положениям максимумов поглощения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и извлечению из цветков липы и находят около 415 ± 2 нм [39, 40].

На основании результатов, полученных при определении специфичности методики можно сделать заключение о том, что методика специфична.

Определение линейности

В связи с тем, что по предлагаемой методике содержание флавоноидов проводится в пересчете на рутин, для определения линейности измеряли оптическую плотность шести растворов СО рутина, с концентрациями, охватывающими всю область действия методики, а именно от 80 до 120% от определяемого значения.

Критерием приемлемости этой валидационной характеристики является пропорциональная зависимость оптической плотности раствора рутина от его

концентрации в анализируемом растворе. Коэффициент корреляции должен составлять не менее 0,990 [39, 40].

С применением линейного регрессионного анализа, в частности метода наименьших квадратов, определена зависимость оптической плотности рутина от его концентрации в растворе (г/мл).

На основании полученных экспериментальных данных (Таблица 3.5.1) построен график зависимости оптической плотности от концентрации рутина в спектрофотометрируемом растворе (г/мл) (Рисунок 3.5.2).

Таблица 3.5.1 – Величина аналитического сигнала и концентрация СО рутина в растворе

Концентрация раствора СО рутина, г/мл	0,0025	0,0030	0,0035	0,0040	0,0045
Оптическая плотность, А	0,145	0,227	0,322	0,415	0,522

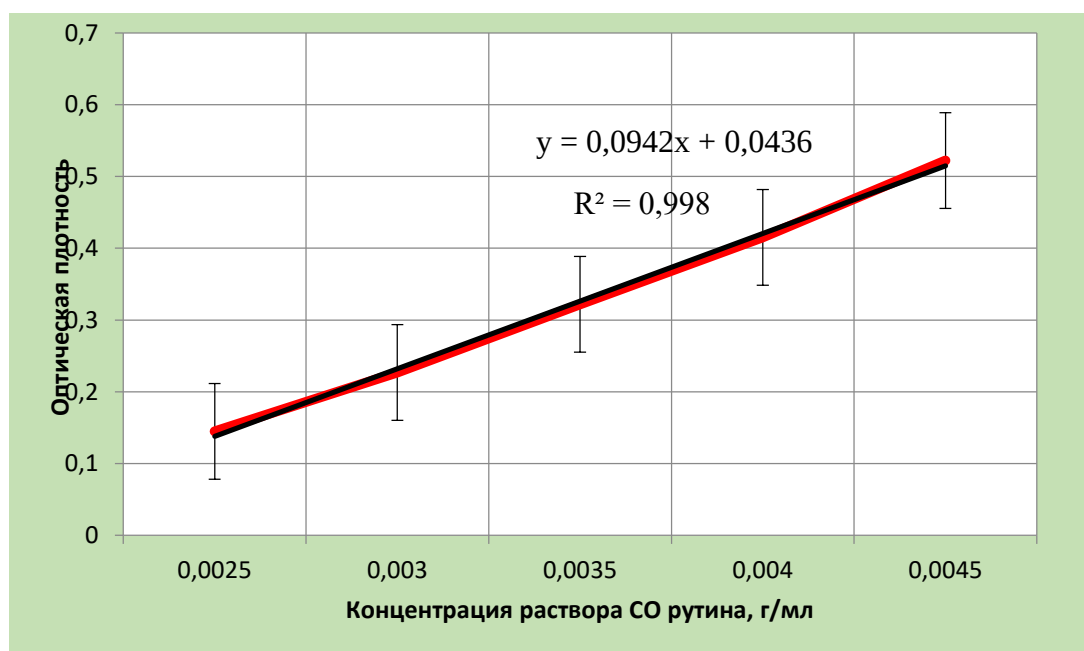


Рисунок 3.5.2 – График зависимости оптической плотности от концентрации СО рутина в растворе

Функциональная зависимость между оптической плотностью и концентрацией вещества описывается следующим линейным уравнением:

$$y = bx + a,$$

y – величина сигнала (оптическая плотность);

x – отклик (концентрация рутина в растворе, в г/мл);

a – свободный член уравнения линейной регрессии;

b – угловой коэффициент уравнения линейной регрессии [39, 40].

Экспериментально установлено, что зависимость оптической плотности рутина от его концентрации аппроксимируется уравнением следующего вида:

$$y = 0,0942x + 0,0436, \text{ г/мл; } r = 0,998$$

Таким образом, проведение испытаний по показателю «Линейность» подтвердили, что существует линейная зависимость между концентрацией рутина в растворе и оптической плотностью.

На основании этого можно сделать заключение о том, данная методика пригодна для количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте цветков липы жидком.

Прецизионность методики

Прецизионность методики определяется уровнем рассеяния результатов, получаемых при ее использовании, относительно величины среднего результата [39, 40]. При установлении прецизионности необходимо учитывать, что этот валидационный параметр может быть определен на трех уровнях:

- повторяемость (сходимость);
- промежуточная прецизионность (внутрилабораторная воспроизводимость);
- межлабораторная воспроизводимость.

Следует отметить, что для целей фармацевтического анализа достаточно только первого уровня. При этом для определения повторяемости существует два способа оценки.

1. Не менее девяти определений, охватывающих диапазон применения методики. Например, на трех уровнях концентрации по три определения для каждого уровня.

2. Не менее шести определений для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к номинальному.

Критерием приемлемости этого показателя является относительное стандартное отклонение (RSD) результатов количественного определения флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком, которое не должно превышать 3,0%.

Сходимость результатов анализа проверяли на трех сериях экстракта цветков липы жидкого (Раздел 3.4.3, 3.4.4). Для этого готовили шесть растворов испытуемых экстрактов цветков липы жидкого в рамках аналитической области методики. Каждый из растворов готовили независимо от других растворов в соответствии с тестируемой методикой, изложенной в Разделе 3.4.3, 3.4.4.

Определяли оптическую плотность, содержание флавоноидов в пересчете на рутин, рассчитывали средний результат, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD) отдельного результата и доверительный интервал ($P = 95\%$) среднего результата. Полученные результаты представлены в Таблице 3.4.3.3.

Результаты испытания «Сходимость» соответствуют критериям приемлемости, т.е. относительное стандартное отклонение результатов количественного определения флавоноидов в изучаемых экстрактах составило менее 1,8 % и не превышает 3,0 %. Таким образом, результаты исследований показали, что данная методика обладает удовлетворительной сходимостью.

Оценка правильности

Целью установления правильности методики является установление степени близости экспериментальных результатов, получаемых с использованием аналитической методики, к истинному значению при сочетании случайных составляющих и общей систематической погрешности.

Критерием приемлемости является открываемость (R) внесенных добавок рутина к испытуемому раствору экстракта, которая должна составлять от 95,0 до 105,0%, т.к. содержание флавоноидов превышает 0,1%, но менее 1% [39, 40].

Определение правильности методики проводили методом добавок. Для этого готовили испытуемые растворы изучаемых экстрактов в соответствии с аттестуемой методикой и добавками рутина. Добавки вносили в количестве от 50 до 100% относительно предполагаемого содержания флавоноидов в пересчете на рутин.

Определение правильности используемой методики количественной оценки содержания флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком в пересчете на рутин

1. Навеску экстракта объемом 50 мл помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл.

2. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане, в течение 2 часов, поддерживая слабое кипение.

3. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр. Первые 20 мл отбрасываются (испытуемый раствор) в сухую колбу.

4. После этого 1 мл испытуемого раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 % и 2 капли уксусной кислоты 30%, доводят объем раствора спиртом 70 % до метки и перемешивают (Раствор I).

Таким образом, в полученном растворе I суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин должно составлять 50% от условий анализа количественного определения.

Затем готовили серию растворов с добавками раствора СО рутина таким образом, чтобы содержание флавоноидов увеличивалось в 1,5; 2,0 и 2,5 раза. С этой целью готовили раствор СО рутина с концентрацией 0,075 г/100 мл – раствор II. Подготовку растворов для проведения эксперимента вели по схеме, представленной в Таблице 3.5.2.

Таблица 3.5.2 – Схема приготовления растворов с добавками рутина на примере анализа липы сердцевидной цветков экстракта жидкого (1:1,0)

Навеска экстракта, мл (раствор I)	Аликвота раствора рутина с концентрацией 0,075 г/100 мл (раствор II)	Объем мерной колбы	Расчетная концентрация флавоноидов в растворе в пересчете на рутин, г/100 мл
1	0	250	0,154
1	1	250	0,229
1	2	250	0,304
1	3	250	0,379

Далее измеряли оптическую плотность для полученных растворов в трех повторностях, полученные результаты усредняли и вычисляли концентрацию рутина в конечном анализируемом растворе (Таблица 3.5.3).

Таблица 3.5.3 – Расчет открываемости вносимых добавок рутина

№	Теоретическое содержание суммы флавоноидов в растворе II после разведения, г/100мл	Внесено добавки, г	Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин, г/100 мл	Найдено флавоноидов, г	R, %
1	0,154	0	0,154	0,152	98,70
2	0,154	0,00075	0,229	0,213	100,9
3	0,154	0,00075	0,229	0,228	99,56
4	0,154	0,00075	0,229	0,231	100,9
5	0,154	0,00150	0,304	0,301	99,01
6	0,154	0,00150	0,304	0,299	98,36
7	0,154	0,00150	0,304	0,294	96,71
8	0,154	0,00225	0,379	0,370	99,73
9	0,154	0,00225	0,379	0,381	100,53
10	0,154	0,00225	0,379	0,375	98,94
R _{ср}					99,33
RSD					1,36

Результаты испытания на правильность методики соответствуют критериям приемлемости, следовательно, данная методика характеризуется удовлетворительной правильностью в пределах установленных требований.

По итогам проведенной экспериментальной аттестации методики контроля подлинности и количественного определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин в липы сердцевидной цветков экстракте жидком можно сделать вывод о том, что разработанные методики пригодны для использования в целях оценки качества изучаемого ЛС.

Предлагаемые методики определения подлинности и количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин удовлетворяют установленным требованиям и пригодны для использования в химико-аналитической лаборатории отдела контроля качества предприятия – производителя.

3.6 Спецификация показателей качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

На основании проведенных аналитических испытаний установлены основные показатели качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого, представленные в Таблице 3.6.1.

Таблица 3.6.1 - Проект спецификации показателей качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

Показатель	Методы	Нормы	Характеристика образца
Описание	Визуальный Органолептический ГФ XIII ОФС.1.4.1.0021.15	Жидкость светло-коричневого цвета с характерным ароматным запахом, сладковатого вкуса	Соответствует
Подлинность	Качественная реакция на флавоноиды ГФ XIII	Наличие красного окрашивания в реакции с порошком магния и раствором кислоты хлористоводородной концентрированной	Соответствует

Содержание спирта этилового, %	ГФ XIII ОФС.1.4.1.0021.15	Не менее 62	63
Содержание флавоноидов, %	Спектрофотометрический (сумма флавоноидов в пересчёте на рутин)	не менее 0,26	0,327
Содержание тяжелых металлов, %	ГФ XIII ОФС.1.4.1.0021.15	Не более 0,01	Не обнаружены
Сухой остаток	ГФ XIII ОФС.1.4.1.0021.15	не менее 7,13	8,64
Упаковка	Флаконы тёмного стекла объёмом 25,0 мл укупоренные полиэтиленовыми пробками и навинчивающимися пластмассовыми крышками		
Маркировка	В соответствии с НД		
Хранение	В прохладном, защищенном от света месте. Срок годности – 2 года.		

Полученные данные свидетельствуют о соответствии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого нормируемым требованиям. Установленные показатели качества были использованы при разработке НД на липы сердцевидной цветков экстракт жидкий.

Выводы по главе

1. Установлено что, товароведческие показатели цветков липы сердцевидной соответствовали требованиям ФС.2.5.0024.15 ГФ XIII: влажность сырья 5,80 - 6,64 %, количество экстрактивных веществ 8,67 - 24,3 %, количество флавоноидов 0,436 - 0,446 %, зола общая 5,26 - 6,55 %, зола, нерастворимая в HCL 2,0 - 2,28 %.

2. Установлена область значений коэффициента съема готовой продукции (соотношение фаз), при которой концентрация веществ в извлечении, полученном из цветков липы в батарее из 4 диффузоров, будет такой же, как и при его производстве промышленным способом в батарее из 3 диффузоров и соотношением фаз 1:1,0.

При получении липы сердцевидной цветков экстракта жидкого установлены оптимальные параметры экстракционного процесса: реперколяционный метод с фактической эффективностью экстракции – 70%, в батарее из 4-х диффузоров,

соотношении фаз 1:1,8; при оптимальной степени измельчения цветков липы от 2 до 4 мм. Составлен и утвержден лабораторный регламент на производство экстракта цветков липы сердцевидной жидкого, проведена апробация технологии в условиях производства, на основании которой составлен соответствующий акт (Приложение В).

3. Разработана оптимальная технология липы сердцевидной цветков экстракта жидкого, при повышении эффективности экстракции соотношение фаз увеличено с 1,0 до 1,8, что увеличивает степень истощения сырья в батарее перколятора в 1,57 раза, в отличие от промышленного способа.

4. Проведена оценка качества экстрактов по содержанию сухих, фармакологически активных веществ, спирта и плотности.

5. Разработанные методики количественного определения содержания флавоноидов в сырье и липы сердцевидной цветков экстракте жидком пригодны к использованию, обладают достаточной точностью, воспроизводимостью и правильностью.

6. Теоретически разработаны, и экспериментально обоснованы нормы качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого:

- сухих веществ – не менее 7,13 %;
- флавоноидов – не менее 0,26 %;
- концентрация спирта этилового в экстракте – не менее 62 %;
- плотность – не более 0,8256 г/см³.

ГЛАВА 4. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПЫ СЕРДЦЕВИДНОЙ ЦВЕТКОВ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО

4.1 Определение острой токсичности липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

Липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8 упаривали до показателя влажности не более 5% до состояния сухого экстракта, растворяли в спирте этиловом и разбавляли физиологическим раствором (конечная концентрация ЭВ 0,0006 г/мл), полученные растворы использовали для определения острой токсичности экстракта (Раздел 2.2.4). Критериями острой токсичности служило патологическое изменение поведения животных, нарушение движений, частоты дыхания, торможение рефлексорной деятельности, а также гибель животных. В качестве контрольного раствора был использован физиологический раствор. Для определения среднелетальной дозы исследуемый раствор вводили крысам однократно перорально в дозах 2,0; 5,0; 10,0; 12,5; 25,0 мл на 1000 г массы животного. Определение острой токсичности проводили согласно методике, описанной в Разделе 2.2.4.

Таблица 4.1.1 – Исследования острой токсичности липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8

№ п/п	Условия опыта	Дозы, мл/кг	Выжило	Погибло	Z	d	Zd
1	экстракт липы	2,0	6	0	0	-	0
2		5,0	6	0	0	3,0	0
3		10,0	6	0	0	5,0	0
4		12,5	6	0	0	2,5	0
5		25,0	6	0	0	12,5	0

1	физиологический раствор	2,0	6	0	0	-	0
2		5,0	6	0	0	3,0	0
3		10,0	6	0	0	5,0	0
4		12,5	6	0	0	2,5	0
5		25,0	6	0	0	12,5	0

Из анализа Таблицы 4.1.1 следует, что в течение всего эксперимента во всех наблюдаемых группах гибели животных не выявлено, что не позволило установить LD₅₀. Введение более высоких доз не представляется возможным, так как 25,0 мл на 1000 г массы тела, является максимально допустимым количеством жидкости в мл для крыс при введении *per os*, а средняя летальная доза в данном случае больше, чем 5,0 мл/кг [115].

В ходе исследований все животные были активны, подвижны с нормальной концентрацией движения, нормальной частотой дыхательных движений с хорошим аппетитом и внешним видом.

Анализ полученных данных, свидетельствует, что при пероральном введении липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8 относится к веществам малоопасным (4 класс опасности), согласно ГОСТ 12.1.007-76 [33].

4.2 Исследование иммуотропных свойств липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

В настоящее время потребность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* растет пропорционально появлению колоссального количества средств и материалов, полученных на основе клеточных и микромолекулярных технологий, требующих апробации и внедрения. Эксперимент, в ходе которого создается модель, предоставляет неограниченные возможности, поскольку есть жесткая связь между действующим причинным фактором и развивающимся процессом. Исследователь получает возможность создать строго контролируемую совокупность воздействующих на организм факторов, в том числе и патогенных [158].

Показано, что показатели функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) можно использовать для оценки эффективности проводимой терапии иммуностропными препаратами различного происхождения (деринат, виферон, ликопид, тимоген, имунофан и др.), в том числе растительного (экстракт софоры, женьшеня, донника и др.) данным многочисленных экспериментов *in vitro* [89, 110, 57, 129, 86, 116, 19].

Нейтрофильные гранулоциты являются самой многочисленной популяцией клеток крови и относятся к врожденному иммунитету, так как выполняют функции неспецифической защиты при развитии иммунного ответа. Широко известно, что НГ участвуют в иммунопатогенезе многих инфекционно-воспалительных, аллергических, аутоиммунных, неопластических заболеваний [2, 5, 8, 12, 88, 167].

Способность НГ молниеносно реагировать на внедрение патогенных микроорганизмов обусловлена их свойствами - адгезией и диапедезом [172, 91]. К спектру эффекторных свойств НГ относят фагоцитарную активность, кислородзависимую и кислороднезависимую микробицидность, образование нейтрофильных экстрацеллюлярных ловушек (NET), экзоцитоз везикул и др. В последние несколько лет установлено, что НГ могут участвовать в регуляции неспецифической и приобретенной иммунной защиты [45, 92, 87, 90, 91, 88].

Таким образом, апробация исследуемого липы сердцевидной цветков экстракта жидкого в эксперименте *in vitro* на самой гипермобильной и уникальной по своим трансформационным возможностям клетке НГ является перспективной. В связи с этим НГ выбраны нами как адекватная высокочувствительная модель, быстро отвечающая на влияние различных иммуностропных веществ.

Исследование влияния липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,0 и 1:1,8 на функциональную активность НГ в норме и при инфекционных заболеваниях проводили на образцах периферической крови (ПК) больных острой вирусной инфекцией - вирусный гепатит В, (средний возраст 25,5 лет), больных с острой бактериальной инфекцией (средний возраст 26,4 года), поступивших на

стационарное лечение в специализированную клиническую инфекционную больницу г. Краснодара в 2018г., а также условно здоровых лиц обоего пола (средний возраст 24,2 года).

Было получено информированное согласие пациентов с вирусным гепатитом В и острым бактериальным тонзиллитом, а также условно здоровых доноров на использование их периферической крови для научных исследований *in vitro*. Протокол и дизайн исследования, а также форма информации для пациента и информированного согласия пациента были одобрены Этическим комитетом (протокол №45 от 25.10.2016г.).

Характеристика экспериментальных групп

Группа1 – образцы ПК пациентов с вирусным гепатитом В (n=15) - ВГВ. Диагноз подтвержден методом иммуноферментного анализа.

Группа 2 – образцы ПК пациентов с острым бактериальным тонзиллитом, (n=15) - ОБТ. По степени тяжести заболевания преобладало среднетяжелое течение. Диагноз изначально выставлялся на основании клинико-эпидемиологических данных и подтверждался обязательным бактериологическим исследованием ротоглотки: преимущественно выделялись стрептококки. Группа 3 (контроль) – образцы ПК условно здоровых лиц (n=15). О функциональной активности НГ после их инкубации *in vitro* в составе цельной крови с экстрактом цветков липы судили по показателям фагоцитарной активности, оценивая процессы захвата и переваривания антигенов и микробицидной кислородзависимой функции с помощью NBT – теста.

Тестирование функций нейтрофильных гранулоцитов при острой бактериальной инфекции – о. бактериальный тонзиллит (ОБИ) и при острой вирусной инфекции - вирус гепатита В (ОВИ) относительно таковых у условно здоровых субъектов позволило установить существенные дефекты НГ, имеющие в основном, одинаковую направленность, не зависящую от этиологии инфекционного процесса, определяющую развитие процесса воспаления для решения проблемы элиминации патогена как вирусной, так и бактериальной природы.

Оценка эффектов экстракта цветков липы сердцевидной жидком 1:1,0 и 1:1,8 в разовой и суточной дозах на нейтрофилы условно-здоровых лиц в нагрузочном NBT-тесте, отражающим активность NADPH-оксидазы, продемонстрировала повышение показателей %ФПК спонтанного и стимулированного стафилококком на фоне значений коэффициента мобилизации (КМ), не отличающихся от контрольных значений. При исследовании фагоцитарной функции НГ в этой же экспериментальной группе выявлено недостоверное повышение показателей %ФАН, ФЧ, ФИ ($p>0,05$), характеризующих функции захвата НГ, и показателей %П, ИП отражающих переваривающую активность ($p>0,05$). Таким образом, исследуемый экстракт не проявил иммуностимулирующей активности в отношении показателей полученных в ходе эксперимента с периферической кровью условно-здоровых лиц, что свидетельствует о его иммуномодулирующей активности и отсутствию рисков развития аутоиммунных реакций (Таблица 4.2.1).

Таблица 4.2.1 - Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого на фагоцитарную и кислород-зависимую микробицидную функцию нейтрофилов условно здоровых лиц, Me[Q₁;Q₃]

Показатель	Интактная кровь	Разовая доза ЭЦЛ 1:1,0	Суточная доза ЭЦЛ 1:1,0	Разовая доза ЭЦЛ 1:1,8	Суточная доза ЭЦЛ 1:1,8
Фагоцитарная активность					
%ФАН	55,5 [54,8; 56,3]	57,5 [55,5; 59,5]	58,5 [57,5; 59,5]	56,5 [55,5;57,5]	59,0 [56,8;63,5]
ФЧ	6,1 [5,4;6,9]	11,3 [9,6; 12,6]	5,6 [5,2;6,2]	10,2 [9,6;10,7]	10,9 [9,3;11,5]
ФИ	2,8 [2,3;3,0]	2,5 [1,1; 3,7]	5,0 [3,3;5,0]	3,8 [2,3;5,5]	3,3 [2,5;3,7]
%П	56,6 [54,4;56,9]	50,8 [49,2; 55,6]	55,6 [55,1;56,5]	54,0 [53,3;54,8]	60,3 [59,0;62,3]
ИП	1,7 [1,5;2,0]	1,2 [1,1; 1,3]	1,6 [1,4; 1,7]	1,8 [1,7;1,9]	2,4 [2,4;2,5]

Кислород-зависимая микробицидная активность					
%ФПК _{сп.}	1,5 [1,0; 2,5]	2,0 [1,8; 2,3]	3,5 [2,5; 5,8]	3,5 [3,0;5,3]	3,5 [2,8;4,0]
%ФПК _{ст.}	5,0 [3,5; 6,3]	5,5 [4,5; 6,5]	6,5 [4,8; 9,8]	6,0 [5,5;6,5]	8,0 [4,8;11,3]
СЦИ _{сп.}	1,0 [1,0; 1,10]	1,0 [1,0; 1,1]	1,1 [1,0; 1,1]	1,1 [1,1; 1,1]	1,1 [1,0; 1,1]
СЦИ _{ст.}	1,1 [1,1; 1,1]	1,1 [1,0; 1,2]	1,1 [1,1; 1,1]	1,2 [1,1;1,3]	1,2 [1,1;1,4]
КМ-%ФПК	2,5 [1,9; 3,3]	2,8 [2,6; 3,0]	2,6 [1,3; 2,9]	1,73 [1,3;1,9]	2,29 [1,7;3,1]

Примечание к Таблице 4.2.1: ЭЦЛ – экстракт цветов липы, %ФАН – активно-фагоцитирующие нейтрофилы, ФЧ – фагоцитарное число, ФИ – фагоцитарный индекс, %П – процент переваривания бактериального антигена, СЦИ – средний цитохимический индекс, %ФПК – процент формазан-позитивных клеток, КМ – коэффициент мобилизации (показатели NBT-теста).

При сравнительной оценке иммуотропных эффектов липы сердцевидной цветков экстракта жидкого в эксперименте *in vitro* на показатели функциональной активности НГ пациентов с острой вирусной и острой бактериальной инфекцией установлено, достоверное влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,0 и 1:1,8 в разовой и суточной дозах.

В частности, при инкубации цельной крови контрольной и опытных групп с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким 1:1,0 в разовой дозе выявлен позитивный эффект в виде нормализации показателей поглотительной способности нейтрофильных гранулоцитов – фагоцитарного числа (ФЧ), фагоцитарного интегрального индекса (ФИ) и переваривающей способности нейтрофильных гранулоцитов - % переваривания (%П), индекса переваривания (ИП) при острой бактериальной инфекции, тогда как при острой вирусной инфекции имело место не только восстановление нарушенных показателей фагоцитарной и кислород-зависимой микробицидной функции, но и стимуляция относительно контроля ФИ, ИП (Таблица 4.2.2).

Таблица 4.2.2 – Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого (1:1,0, разовая доза) на показатели фагоцитарной и микробицидной функции НГ больных острой бактериальной инфекцией (ОБИ) и острой вирусной инфекцией (ОВИ), Ме [Q₁;Q₃]

Показатель	Контроль	ОБИ	ОБИ+ЭЦЛ	ОВИ	ОВИ+ЭЦЛ
Фагоцитарная активность					
%ФАН	55,5 [54,8; 56,3]	43,0 [42,0; 44,0]	44,5 [44,3; 44,8]	46,6 [46,8;47,3]	50,0 [49,5; 50,5]
ФЧ	6,1 [5,4;6,9]	6,2 [6,0; 7,1]*	12,1 [11,8; 12,4]#	6,8 [5,61;8,4]	10,1 [9,6; 10,6]#
ФИ	2,8 [2,3;3,0]	1,4 [1,1; 1,6]*	1,9 [1,6; 2,1]#	1,7* [1,3; 2,2]	6,3 [6,2; 6,4]##*
%П	56,6 [54,4;56,9]	41,4 [41,1;41,7]*	45,7 [44,5; 46,9]#	40,7* [38,0; 42,6]	46,3 [44,6; 49,2]#
ИП	1,7 [1,5;2,0]	0,6 [0,5; 0,7]*	1,7 [1,6; 1,7]#	0,6* [0,5; 0,8]	2,3 [2,2; 2,4]##*
Кислород-зависимая микробицидная активность					
%ФПКсп.	1,5 [1,0; 2,5]	3,0 [2,0; 4,0]*	14,5 [13,8; 15,3]#	6,2* [3,3; 11,3]	7,5 [6,0; 8,5]#
%ФПК ст.	5,0 [3,5; 6,3]	16,0 [9,0; 23,0]*	17,5 [16,8; 18,3]	8,5* [7,8; 9,8]	18,3 [13,5; 21,5]#
СЦИ сп.	1,0 [1,0; 1,10]	1,0 [1,0; 1,0]	1,8 [1,5; 2,1]#	1,17* [1,0; 1,2]	1,1 [1,1; 1,1]#
СЦИ ст.	1,1 [1,1; 1,1]	1,3 [1,2; 1,5]	1,6 [1,5; 1,7]#	1,1* [1,1; 1,2]	1,3 [1,3; 1,4]#
КМ-%ФПК	2,5 [1,9; 3,3]	4,0 [3,0;5,0]*	1,1 [0,9; 1,3]*	2,6 [1,7; 4,2]	3,2 [2,0; 5,1]#

Примечание к Таблице 4.2.2: ЭЦЛ – экстракт цветков липы; %ФАН – активно-фагоцитирующие НГ, ФЧ – фагоцитарное число, ФИ – фагоцитарный индекс, %П – процент переваривания бактериального антигена, СЦИ – средний цитохимический индекс, %ФПК – процент формазан-позитивных клеток, КМ – коэффициент мобилизации (показатели NBT-теста), *достоверность отличий от контроля, #достоверность отличий от интактных клеток (до инкубации).

Наряду с этим, под влиянием липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,0 в разовой дозе *in vitro* существенно усилился цитотоксический потенциал НГ, как при острой бактериальной инфекции, о чем свидетельствует возрастание процент фагоцитоза (%ФПК) спонтанный и %ФПК стимулированный относительно исходного (до инкубации) в 4,8 и 1,5 раза ($p < 0,05$), соответственно, со снижением исходно высокого показателя коэффициента мобилизации (КМ) 1,1 [0,9; 1,3] против 4,0 [3,0;5,0] при острой бактериальной инфекции и против 2,5 [1,9 3,3] в контроле. Сходные изменения показателей NBT-теста обнаружены и при острой вирусной инфекции. Однако, под влиянием экстракта цветков липы сердцевидной 1:1,0 в разовой дозе был более высоким, %ФПК стимулированный, а величина коэффициента мобилизации (КМ) полностью соответствовала показателям контроля (Таблица 4.2.2).

Исследование суточной дозы липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,0 также обнаружило ряд позитивных эффектов (Таблица 4.2.3).

Таблица 4.2.3 – Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого (1:1,0, суточная доза) на показатели фагоцитарной и микробицидной функции НГ больных острой бактериальной инфекцией (ОБИ) и острой вирусной инфекцией (ОВИ), Me [Q₁;Q₃]

Показатель/ группа	Контроль	ОБИ	ОБИ+ЭЦЛ	ОВИ	ОВИ+ЭЦЛ
Фагоцитарная активность					
%ФАН	55,5 [54,8;56,3]	43,0 [42,0;44,0]*	47,0 [46,0;48,0]*	46,6 [46,3;47,3]*	48,0 [46,5;49,5]*
ФЧ	6,1 [5,4;6,9]	6,2 [6,0; 7,1]*	12,9 [12,3;13,6]*#	6,8 [5,6; 8,4]	8,2 [6,6;10,1]*#
ФИ	2,8 [2,3;3,0]	1,4 [1,1; 1,6]*	4,6 [4,1; 5,2]#	1,7 [1,3; 2,2]*	2,0 [1,8; 2,4]*
%П	56,6 [54,4;56,9]	41,4 [41,1;41,7]*	50,6 [49,9;51,3]#	40,7 [38,0;42,6]*	40,0 [36,3;44,]*
ИП	1,7 [1,5;2,0]	0,6 [0,5; 0,7]*	1,4 [1,3; 1,5]#	0,6 [0,5; 0,8]*	0,7 [0,6;0,8]*

Кислород-зависимая микробицидная активность					
%ФПК _{сп.}	1,5 [1,0; 2,5]	3,0 [2,0; 4,0]*	1,5 [1,3;1,8]*#	6,2 [3,3;11,3]*	4,0 [2,8;6,0]#
%ФПК _{ст.}	5,0 [3,5; 6,3]	16,0 [9,0; 23,0]*	3,0 [2,0;4,0]#*	8,5 [7,8;9,8]*	7,1 [5,3;9,8]#
СЦИ _{сп.}	1,0 [1,0; 1,10]	1,0 [1,0; 1,0]	1,0 [1,0;1,0]	0,24 [0,14;0,24]*	1,1 [1,1; 1,1]#
СЦИ _{ст.}	1,1 [1,1; 1,1]	1,3 [1,2; 1,5]	1,0 [1,0; 1,1]	1,1 [1,1;1,2]*	1,1 [1,1; 1,1]#
КМ-%ФПК	2,5 [1,9; 3,3]	4,0 [3,0;5,0]*	1,8 [1,4; 2,1]#	2,6 [1,7; 4,2]	2,6 [1,9;3,9]

Примечание к Таблице 4.2.3: ЭЦЛ – экстракт цветов липы; %ФАН – активно-фагоцитирующие НГ, ФЧ – фагоцитарное число, ФИ – фагоцитарный индекс, %П – процент переваривания бактериального антигена, СЦИ – средний цитохимический индекс, %ФПК – процент формазан-позитивных клеток, КМ – коэффициент мобилизации (показатели NBT-теста), *достоверность отличий от контроля, #достоверность отличий от интактных клеток (до инкубации).

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют, что происходит нормализация величины фагоцитарного интегрального индекса (ФИ), % переваривания (%П), индекса переваривания (ИП) при инкубации с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким, крови больных острой бактериальной инфекцией, а также % формазан-позитивных клеток (%ФПК) и величины среднего цитохимического индекса (СЦИ) в спонтанном и стимулированном NBT-тесте – при исследовании крови больных острой вирусной инфекцией.

Инкубация крови больных острой вирусной инфекцией с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким 1:1,0 в суточной дозе привела к достоверному росту фагоцитарного числа (ФЧ) (8,2 [6,6; 10,1] против 6,8 [5,6; 8,4] и против 6,1 [5,4;6,9] в контроле), с сохранением переваривающей способности клеток (Таблица 4.2.3).

В результате инкубации образцов цельной крови здоровых субъектов и больных с острой бактериальной и вирусной инфекцией с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким при соотношении фаз 1:1,8 в разовой дозе

обнаружена достоверная нормализация относительного содержания активно-фагоцитирующих НГ в периферической крови больных острой бактериальной инфекцией и тенденция к таковой при острой вирусной инфекции; достоверное возрастание относительно исходного уровня и нормализация большинства показателей поглотительной и переваривающей функции фагоцитов в обеих клинических группах. Позитивный стимулирующий характер экстракта цветков липы сердцевидной жидкого 1:1,8 в разовой дозе в системе *in vitro* обнаружен и при оценке показателей спонтанного и стимулированного NBT-теста, что подтверждается не только достоверной коррекцией его основных показателей % формазан-позитивных клеток (%ФПК), среднего цитохимического индекса (СЦИ), но и нормализацией величины коэффициента мобилизации, за счет его достоверного снижения относительно исходно высоких показателей при острой бактериальной инфекции (в 2 раза) ($p < 0,05$) и при острой вирусной инфекции (в 1,4 раза) ($p < 0,05$) (Таблица 4.2.4).

Таблица 4.2.4 – Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8 в разовой дозе на показатели фагоцитарной и микробицидной функции НГ больных острой бактериальной инфекцией (ОБИ) и острой вирусной инфекцией (ОВИ), Me[Q₁;Q₃]

Показатель	Контроль	ОБИ	ОБИ+ЭЦЛ	ОВИ	ОВИ+ЭЦЛ
Фагоцитарная активность					
%ФАН	55,5 [54,8;56,3]	43,0 [42,0;44,0]*	51,0 [49,5;52,5]#	46,6* [46,8;47,3]	48,0 [46,5;50,5]*
ФЧ	6,1 [5,4;6,9]	6,2 [6,0; 7,1]*	8,7 [8,4;8,9]*#	6,8* [5,6;8,4]	9,5 [9,2;9,8]#
ФИ	2,8 [2,3;3,0]	1,4 [1,1; 1,6]*	2,3 [2,0;2,5]#*	1, 7* [1,3; 2,2]	2,9 [2,4;3,8]#*
%П	56,6 [54,4;56,9]	41,4 [41,1;41,7]*	50,7 [49,9;51,6]#	40,7* [38,0; 42,6]	53,5 [52,0;55,5]#
ИП	1,7 [1,5;2,0]	0,6 [0,5; 0,7]*	1,3 [1,3;1,3]#*	0,6* [0,5; 0,8]	1,7 [1,5;1,8]#

Кислород-зависимая микробицидная активность					
%ФПК _{сп.}	1,5 [1,0; 2,5]	3,0 [2,0; 4,0]*	7,0 [6,5;7,5]*#	6,2* [3,3; 11,3]	9,8 [7,8;12,8]*#
%ФПК _{ст.}	5,0 [3,5; 6,3]	16,0 [9,0; 23,0]*	10,0 [8,0;12,0]#	8,5* [7,8; 9,8]	19,0 [16,3;20,8]*#
СЦИ _{сп.}	1,0 [1,0; 1,10]	1,0 [1,0; 1,0]	1,2 [1,1;1,4]	1,12* [1,1; 1,2]	1,2 [1,2; 1,2]#
СЦИ _{ст.}	1,1 [1,1; 1,1]	1,3 [1,2; 1,5]	1,3 [1,2; 1,5]	1,1* [1,1; 1,2]	1,4 [1,3; 1,4]#
КМ-%ФПК	2,5 [1,9; 3,3]	4,0 [3,0;5,0]*	2,1 [1,1;3,0]#	2,6 [1,67; 4,12]	1,8 [1,0;3,4]*#

Примечание к Таблице 4.2.4: ЭЦЛ – экстракт цветов липы; %ФАН – активно-фагоцитирующие НГ, ФЧ – фагоцитарное число, ФИ – фагоцитарный индекс, %П – процент переваривания бактериального антигена, СЦИ – средний цитохимический индекс, %ФПК – процент формазан-позитивных клеток, КМ – коэффициент мобилизации (показатели NBT-теста), *достоверность отличий от контроля, #достоверность отличий от интактных клеток (до инкубации).

Суточная доза липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8 позволила в эксперименте *in vitro* полностью нормализовать относительное содержание активных фагоцитов и их переваривающую функцию (%П) при острой бактериальной инфекции, тогда как при острой вирусной инфекцией наряду с нормализацией данных показателей имело место восстановление до уровня контрольных значений процентного содержания клеток, содержащих восстановленный формазан (%ФПК) и среднего цитохимического индекса (СЦИ) как в спонтанном NBT-тесте, так и при дополнительной антигенной нагрузке *in vitro* (Таблица 4.2.5). Следует отметить, что если при острой вирусной инфекции величина коэффициента мобилизации снизилась до уровня таковой у условно здоровых лиц, то у больных острой бактериальной инфекцией, несмотря на некоторое снижение исходно высокого значения коэффициента мобилизации (КМ), он продолжал оставаться выше (3,1[2,8;3,4] против 4,0[3,0;5,0] и против 2,5 [1,9;3,3] в контрольной группе).

Таблица 4.2.5 – Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8 в суточной дозе *in vitro* на показатели фагоцитарной и микробицидной функции НГ больных острой бактериальной инфекцией (ОБИ) и острой вирусной инфекцией (ОВИ), Ме [Q₁;Q₃]

Показатель/ группа	Контроль	ОБИ	ОБИ+ЭЦЛ	ОВИ	ОВИ+ЭЦЛ
Фагоцитарная активность					
%ФАН	55,5 [54,8; 56,3]	43,0 [42,0;44,0]*	56,0 [55,5;56,5]#	46,6 [46,3; 47,3]*	58,8 [58,0;59,5]#
ФЧ	6,1 [5,4;6,9]	6,2 [6,0; 7,1]*	5,2 [3,1;7,3]*	6,8 [5,6; 8,4]*	8,6 [8,0;9,7]*#
ФИ	2,8 [2,3;3,0]	1,4 [1,1; 1,6]*	1,3 [1,2;1,3]*	1,7 [1,3; 2,2]*	1,4 [1,3;1,5]*
%П	56,6 [54,4;56,9]	41,4 [41,1;41,7]*	53,9 [51,8;55,9]#	40,7 [38,0;42,6]*	57,6 [56,9;57,9]#
ИП	1,7 [1,5;2,0]	0,6 [0,5; 0,7]*	1,3 [1,2;1,5]*#	0,6 [0,5; 0,8]*	1,3 [1,3;1,3]*#
Кислород-зависимая микробицидная активность					
%ФПКсп.	1,5 [1,0; 2,5]	3,0 [2,0; 4,0]*	3,0 [2,5;4,0]*	6,2 [3,3;11,3]*	4,0 [3,8;4,3]#
%ФПК ст.	5,0 [3,5; 6,3]	16,0 [9,0; 23,0]*	11,0 [8,0;11,0]*#	8,5 [7,8;9,8]*	5,8 [5,3;6,3]#
СЦИ сп.	1,0 [1,0; 1,10]	1,0 [1,0; 1,0]	1,0 [1,0;1,1]	1,2 [0,14;0,24]*	1,1 [1,0;1,1]#
СЦИ ст.	1,1 [1,1; 1,1]	1,3 [1,2; 1,5]	1,2 [1,1;1,3]	1,1 [1,1;1,2]*	1,3 [1,3;1,4]#
КМ-%ФПК	2,5 [1,9; 3,3]	4,0 [3,0;5,0]*	3,1 [2,8;3,4]*	2,6 [1,7; 4,2]*	1,4 [1,4;1,4]#

Примечание к Таблице 4.2.5: ЭЦЛ – экстракт цветов липы; %ФАН – активно-фагоцитирующие НГ, ФЧ – фагоцитарное число, ФИ – фагоцитарный индекс, %П – процент переваривания бактериального антигена, СЦИ – средний цитохимический индекс, %ФПК – процент формазан-позитивных клеток, КМ – коэффициент мобилизации (показатели NBT-теста), *достоверность отличий от контроля, #достоверность отличий от интактных клеток (до инкубации).

Сравнительный анализ полученных данных свидетельствует о том, что липы сердцевидной цветков экстракт жидкий в эксперименте *in vitro* способен изменять параметры функциональной активности НГ при их дефектах, возникающих при острых инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной этиологии. Между тем, экстракт цветков липы сердцевидной жидкий 1:1,8 как в разовой, так и в суточной дозе позволяет получить более оптимальные результаты, коррекции нарушенных функций нейтрофильных гранулоцитов как при острой бактериальной инфекции, так и при острой вирусной инфекции практически до значений изучаемых показателей условно-здоровых лиц (Рисунок 4.1.1, 4.1.2).

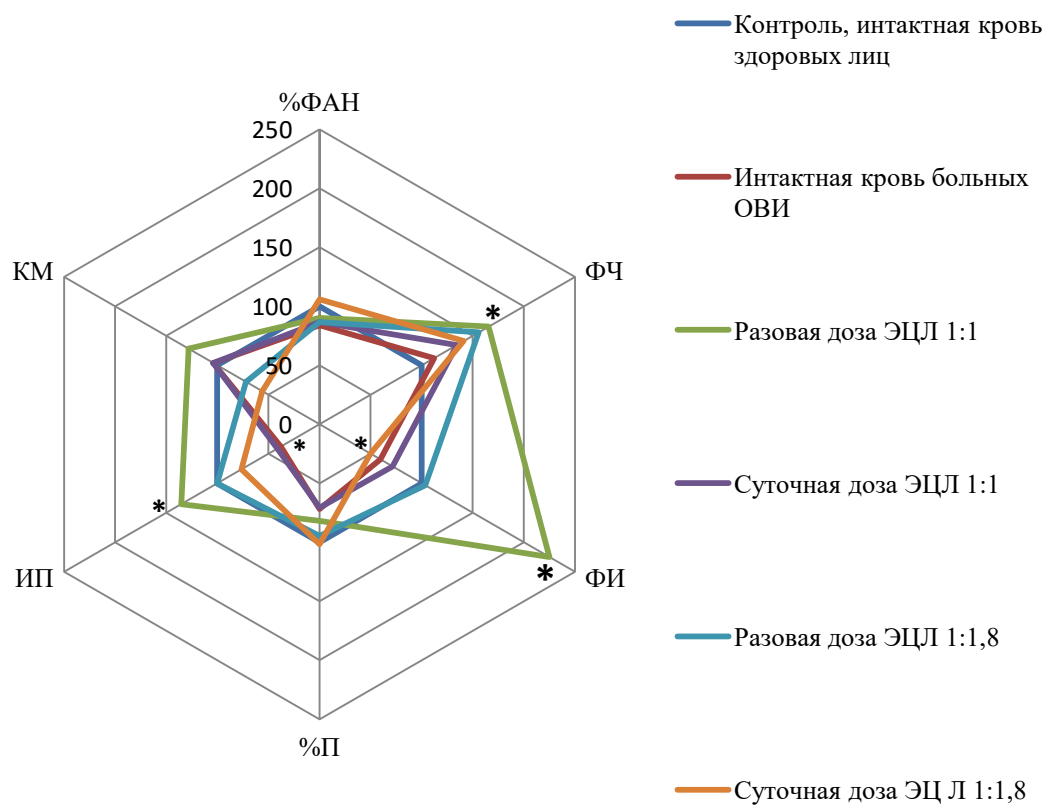


Рисунок 4.2.1 – Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого (ЭЦЛ) на функциональную активность НГ пациентов с острой вирусной инфекцией (ОВИ), в % от контроля

Примечание к Рисунку 4.2.1: ЭЦЛ – экстракт цветков липы; %ФАН – активно-фагоцитирующие НГ, ФЧ – фагоцитарное число, ФИ – фагоцитарный индекс, %П – процент переваривания бактериального антигена, КМ – коэффициент мобилизации, * достоверность отличий от контроля.

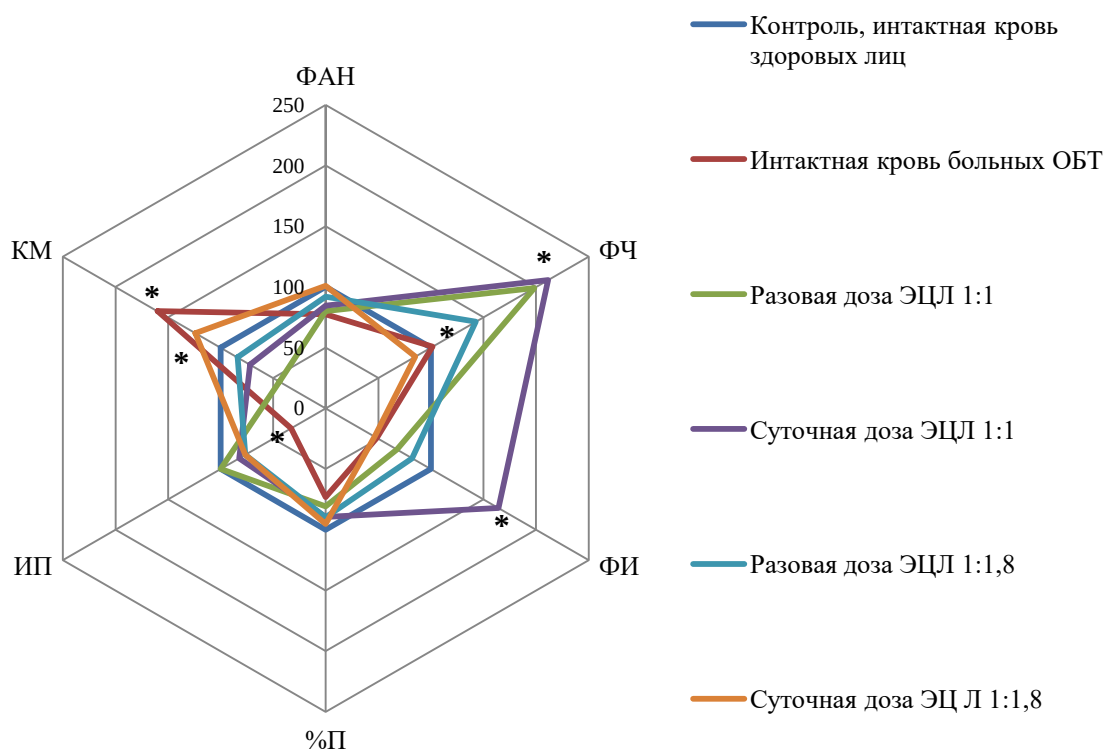


Рисунок 4.2.2 – Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого (ЭЦЛ) на функциональную активность НГ пациентов с острой бактериальной инфекцией (ОБИ), в % от контроля

Примечание к Рисунку 4.2.2: ЭЦЛ – экстракт цветов липы; %ФАН – активно-фагоцитирующие НГ, ФЧ – фагоцитарное число, ФИ – фагоцитарный индекс, %П – процент переваривания бактериального антигена, КМ – коэффициент мобилизации, * достоверность отличий от контроля.

4.3 Биотестирование липы сердцевидной цветков экстракта жидкого на мембраностабилизирующее и антиоксидантное действие на культуре *Parametium caudatum*

В фармакологии инфузории *Parametium caudatum* могут выступать моделью скрининга ЛС, направленного на выявление их антиоксидантных и мембраностабилизирующих свойств [30, 41]. В обычных условиях тело инфузории имеет сложную эллипсовидную форму размером до 280 мкм.

Организмы оптически прозрачны. Поверхность покрыта ресничками, которые служат для перемещения в водной среде и одновременно для выполнения функции рецепторов, реагирующих на различные химические вещества. Они движутся прямолинейно, реверсивно, вращаются на месте. Малейшие изменения в окружающей среде приводят к изменению размера, формы, характера движения парameций.

В сравнении с исследованиями *in vivo*, использование в эксперименте культуры *Paramecium caudatum* имеет ряд преимуществ, таких как:

- максимальная информативность эксперимента, при минимальном времени и возможность корреляционной оценки в пересчете на макроорганизм, основываясь на «поведении» микроскопического организма;

- высокая стандартность объектов исследования, так как культуры представляют собой генетически однородную популяцию клеток, растущих в постоянных условиях;

- высокая чувствительность парameций к изменениям условий существования под воздействием химических и других факторов (в том числе клеточных ядов);

- возможность оценки жизнедеятельности клеток в течении всего эксперимента (что отчетливо прослеживается под микроскопом в виде замедления, ускорения движения, увеличения размера, изменения формы, лизиса или стабильности мембраны и т.д.).

Парameции представляются «выгодной» моделью, так как имеют органоиды, структурные части, присущие клеткам эукариот и одновременно являются саморегулируемым организмом. Являясь высокочувствительными биообъектами, в зависимости от специфики и концентрации влияющих веществ, у парameций наблюдаются не только функциональные, но и структурные изменения клетки [53, 61].

В результате исследования установлено, что концентрация живых парameций в присутствии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

увеличилась относительно контрольной пробы, что свидетельствует об экологически благоприятной среде для развития парameций (Таблица 4.3.1).

Таблица 4.3.1 – Влияние липы сердцевидной цветков экстракта жидкого на аппарат размножения и темп роста парameций (хронический опыт)

Объект исследования	Исходное количество парameций в 0,05 мл	Количество парameций спустя 3 суток	Размер парameций (мкм)	Характер движения
Контроль	5-10	40-50	100-110	Активны
Экстракт цветков липы 1:1,8	5-10	250	60-90	Очень активны

Из анализа Таблицы 4.3.1 видно, что размер парameций под воздействием экстракта меньше, чем в контрольной группе, это расценивается как адекватное значение с учетом одинакового количества питательных веществ и увеличения скорости размножения в экспериментальных пробах в 5-6 раз.

В ходе эксперимента отмечены изменения характера движений клеток инфузорий: преобладали круговые хаотичные движения, ускорение и замедление движений. Эта группа относится к очень активным по шкале активности и к 3 суткам количество парameций увеличилось в 5-6 раз по сравнению с контролем [61].

Проанализировав данные, приведенные в Таблице 4.3.1, можно констатировать, что экстракт в экологическом отношении благоприятен для парameций.

Завершающим этапом наших исследований было определение протективной активности экстракта по отношению к клеточным ядам – 1% раствору пероксида водорода и 14% раствору спирта этилового.

Разработанный экстракт цветков липы 1:1,8 существенно увеличивал время остановки парameций под воздействием клеточных ядов – 1% раствора пероксида водорода и 14% раствора спирта этилового. Мембраностабилизирующую

активность разработанного экстракта характеризует увеличение времени движения парameций до полной остановки, под воздействием спирта этилового, компоненты которого препятствуют повреждению белковой части биомембраны. Повышение времени движения парameций при добавлении 1% раствора пероксида водорода свидетельствует о наличии антиоксидантной активности. Это связано со способностью компонентов экстракта тормозить перекисное окисление липидов мембраны (Таблица 4.3.2).

Таблица 4.3.2 – Изучение степени защиты парameций от действия токсикантов по времени остановки

Наименование объекта	Время остановки парameций в 14% этаноле, мин.	Время остановки парameций в 1% растворе пероксида водорода, мин.
Интakтные	Продолжительность жизни парameций превышает сроки проведения эксперимента, остановки движения не зафиксировано	
Контроль	0,78±0,01	0,25±0,01
Липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8	0,81±0,01	0,38±0,01

Выводы по главе

1. Экспериментально доказано отсутствие острой токсичности липы сердцевидной цветков экстракта жидкого. Анализ полученных данных, свидетельствует, что при пероральном введении экстракт липы сердцевидной жидкий 1:1,8 относится к веществам малоопасным (4 класс опасности).

2. Проведены исследование влияния липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,0 и 1:1,8 на функциональную активность НГ у здоровых лиц, при острой бактериальной инфекции и при острой вирусной инфекции. Установлена достоверная нормализация относительного содержания фагоцитирующих НГ в периферической крови больных острой бактериальной инфекцией и тенденция к таковой при острой вирусной инфекции и достоверное возрастание относительно исходного уровня и нормализация большинства показателей поглотительной и

переваривающей функции фагоцитов в обеих клинических группах под действием разовой и суточной дозы липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8 и 1:1,0, что позволяет сделать вывод об иммуномодулирующей способности исследуемых экстрактов.

3. Проведено биотестирование липы сердцевидной цветков экстракта жидкого на культуре *Parametium caudatum* и показано, что изучаемый экстракт обладает антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КОРРИГИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ ЛИПЫ СЕРДЦЕВИДНОЙ ЦВЕТКОВ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО

5.1 Исследования по разработке сиропа липы

Одним из направлений современных научных исследований по созданию эффективных фитопрепаратов является разработка лекарственной формы - сиропа.

Среди корригированных лекарственных фитопрепаратов сиропам принадлежит наибольший удельный вес. Анализ современной номенклатуры сиропов зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств, показал, что большая их часть – препараты импортного производства [38]. Применение синтетических консервантов позволяет снизить концентрацию сахарозы, а в импортных сиропах осуществить полную её замену на подсластители: фруктозу, сорбит, цикломаты, сахарин и т.д. Использование искусственных подсластителей особенно благоприятно в случае создания лекарственных форм для диабетиков и больных, страдающих ожирением [25].

5.1.1 Исследования по выбору вспомогательных веществ для сиропа липы

Исследования по разработке сиропа липы предусматривают:

- выбор дозы экстракта;
- выбор ВВ, которые обеспечивают необходимые технологические и органолептические свойства сиропа;
- разработка технологической схемы сиропа липы;
- оценка качества и изучение срока годности данного сиропа [25, 26].

Обоснование состава сиропа липы

При изготовлении сиропов фармакологически активной основой служил липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8 в концентрации 5%. В

качестве подсластителей изучали сахарозу, фруктозу, сорбит, глюкозу, а также заранее приготовленные их концентрированные растворы. Кроме того, одним из компонентов предложенного состава выбран мед пчелиный натуральный, так как он обладает приятным специфическим ароматом, усиливающим аромат липы сердцевидной цветков экстракта жидкого. При проведении органолептических исследований использованы 10 композиций сиропа липы с экстрактом жидким, представленные в Таблице 5.1.1.1.

Изготовление сиропов проводили по классической технологии: при нагревании паром до 100° С растворяли подсластители, снимали пену (белковые и слизистые соединения) шумовкой, доводили до кипения дважды или до исчезновения пены, проводили фильтрацию. Экстракт цветков липы жидкий вводили в остывший сироп при перемешивании.

Таблица 5.1.1.1 - Составы изученных композиций сиропа липы

Компоненты сиропа, г	Номер образца									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Липы сердцевидной цветков экстракт жидкий	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Сироп сахарозы	85,0									
Мед пчелиный натуральный	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0			
70 % раствор сорбита		85,0								
70 % раствор фруктозы			85,0							
70 % раствор сахарозы и сорбит (2:5)				85,0						
70 % раствор фруктозы и сорбит (2:5)					85,0					
70 % раствор сахарозы и сорбит (1:1)						85,0				
Сахароза							55,0	35,0	20,0	
Поливиниловый спирт										1,0
Агар									0,5	
Желатоза								1,0		
Фруктоза								20,0	40,0	40,0
Глюкоза										15,0
Вода очищенная							до 100			

При выборе критериев для оценки органолептических сиропа было рассмотрено две методики. В связи с тем, что метод двойной оценки действия корригентов (по А.И. Тенцовой) имеет определенные недостатки, такие как временные затраты, привлечение больших групп людей, участвующих в эксперименте, оценка лишь вкусовых показателей [134, 135, 136], нами было отдано предпочтение органолептической оценке сиропа (внешний вид, цвет, вкус и запах) по методике И.Н. Андреевой [4, 153]. Кроме того оценивался показатель - наличие послевкусия и время его появления (Таблица 5.1.1.2).

Таблица 5.1.1.2 – Критерии оценки органолептических свойств сиропов

Показатель качества	Характеристика	Оценка в баллах
1. Внешний вид	Прозрачный раствор	7 (отлично)
	Слабая опалесценция	5 (хорошо)
	Сильная опалесценция или устойчивая суспензия	4 (удовлетворительно)
	Непрозрачные мутные растворы с осадками	1 (неудовлетворительно)
2. Цвет	Ярко выраженный цвет, соответствующий запаху и вкусу	7 (отлично)
	Ярко выраженный цвет, но не сочетающийся либо со вкусом, либо с запахом	5 (хорошо)
	Невыраженный цвет, соответствующий вкусу и запаху	4 (удовлетворительно)
	Грязный цвет, не соответствующий запаху и вкусу	1 (неудовлетворительно)
3. Вкус и аромат	Характерный полный вкус, соответствующий аромату с длительным приятным послевкусием	12 (отлично)
	Хороший вкус, соответствующий аромату с появлением другого послевкусия через 2 минуты	10 (хорошо)
	Выраженный вкус, слабый аромат, с появлением другого послевкусия менее чем через 2 минуты	8 (удовлетворительно)
	Плохо выраженный вкус с посторонним тоном в ощущении, неприятным послевкусием	6 (неудовлетворительно)

Определение внешнего вида. В прозрачную пробирку приливали исследуемый сироп в объёме 10 мл, затем оценивали просматриваемость на белом фоне. В ходе испытания установлено, что сироп прозрачный.

Определение цвета сиропа. При проходящем свете визуально был определен - светло-коричневый цвет.

Определение аромата и вкуса сиропа. 10 мл сиропа липы помещали в стеклянный стаканчик. При вращении стаканчика жидкость перемешивали и устанавливали аромат, а затем вкус данного образца сиропа.

Оценку органолептических признаков сиропа липы проводили, руководствуясь критериями, представленными в Таблицах 5.1.1.2. В соответствии с системой оценки по данной шкале верхний оценочный предел - 26 баллов, нижний – меньше 15. Общая оценка определяется по сумме баллов, полученных по 3-м критериям (Таблица 5.1.1.3).

Таблица 5.1.1.3 – Оценка органолептических свойств образцов сиропа липы

Номер сиропов	образца	Оценка в баллах общая		
		Внешний вид	Цвет	Вкус, запах
1		7	7	12
2		7	7	8
3		7	7	8
4		7	7	8
5		7	7	8
6		7	7	7
7		7	7	12
8		5	7	5
9		5	6	7
10		4	5	6

Анализ данных Таблицы 5.1.1.3 показал, что высокой оценкой органолептических свойств обладал образец №1 на сиропе сахарозы с медом и образец №7 с медом на сахарозе, который был принят за оптимальный для разрабатываемого препарата, так как массовое содержание сахарозы в нем на 15% ниже, чем в образце №1.

5.1.2. Исследования по выбору консерванта в составе сиропа липы

Разработанный сироп должен соответствовать требованиям ГФ XIII ОФС.1.2.1.0014.15. С этой целью проведены исследования на микробиологическую чистоту. Исследованы 5 образцов сиропов на сахарозе по фармакопейной методике (Раздел 2.2.3) [39].

Результаты исследований образцов сиропов на микробиологическую чистоту, свежеприготовленных и после инкубации в термостате при 30°C в течение 5 суток, представлены в Таблице 5.1.2.1.

Таблица 5.1.2.1 – Микробиологическая чистота сиропов липы сердцевидной (без консервантов)

Номер образца сиропов	Число микроорганизмов в 1 г сиропа				Патогенные бактерии	
	Бактерии		Грибы		Через 1 час	Через 5 суток
	Через 1 час	Через 5 суток, при 30°C	Через 1 час	Через 5 суток		
1	55	360	< 10	< 10	отсутствуют	отсутствуют
2	70	350	< 10	< 10	отсутствуют	отсутствуют
3	70	330	< 10	< 10	отсутствуют	отсутствуют
4	50	380	< 10	< 10	отсутствуют	отсутствуют
5	65	320	< 10	< 10	отсутствуют	отсутствуют

При проведении исследований установлено, что образцы сиропов обсеменены бактериальной флорой (Таблица 5.1.2.1). Через час после изготовления все образцы сиропов соответствовали нормам микробиологической чистоты, установленным в действующей ГФ РФ, однако, по истечению 5 суток при хранении в условиях повышенной температуры, отмечался рост бактерий, что обуславливает необходимость подбора и использования консервантов.

Для достижения микробиологической стабильности сиропа липы в процессе хранения, были изучены консерванты, разрешенные к применению в сиропах: натрия бензоат, сорбиновая и лимонная кислоты. Результаты исследования

микробиологической чистоты сиропов с целью подбора оптимального консерванта приведены в Таблице 5.1.2.2.

При введении сорбиновой кислоты в сироп образовались кристаллы на стенках флакона с сиропом, поэтому мы исключили этот консервант из дальнейшего исследования, несмотря на хорошую растворимость, нейтральный вкус и запах. При добавлении лимонной кислоты наблюдалось помутнение сиропа, что делает невозможным её использование в качестве консерванта.

Таблица 5.1.2.2 - Результаты определения микробиологической чистоты предлагаемого сиропа липы с целью выбора консерванта

Вещество-консервант	Число микроорганизмов в 1 г сиропа				Патогенные бактерии
	Бактерии		Грибы		
	через 1 мес.	через 6 мес.	через 1 мес.	через 6 мес.	
Натрия бензоат (0,2%)	30	70	< 10	<10	отсутствуют
Натрия бензоат (0,5%)	20	60	< 10	<10	отсутствуют
Сорбиновая кислота (0,5%)	30	90	<10	<10	отсутствуют
Лимонная кислота (0,5%)	40	100	<10	<10	отсутствуют

Консервантом выбора при получении сиропа липы стал натрия бензоат в концентрации 0,5%, так как его консервирующие свойства более выражены.

5.1.3 Состав и технологическая схема получения сиропа липы

В результате комплексных технологических, органолептических, физико-химических исследований нами разработан состав и технология сиропа липы.

Экспериментально обоснован состав сиропа липы (в г):

Липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8 5,0

Сахароза 55,0

Мед 10,0

Натрия бензоат 0,5

Вода очищенная до 100,0

Технологическая схема производства сиропа липы приведена на Рисунке 5.1.3.1.

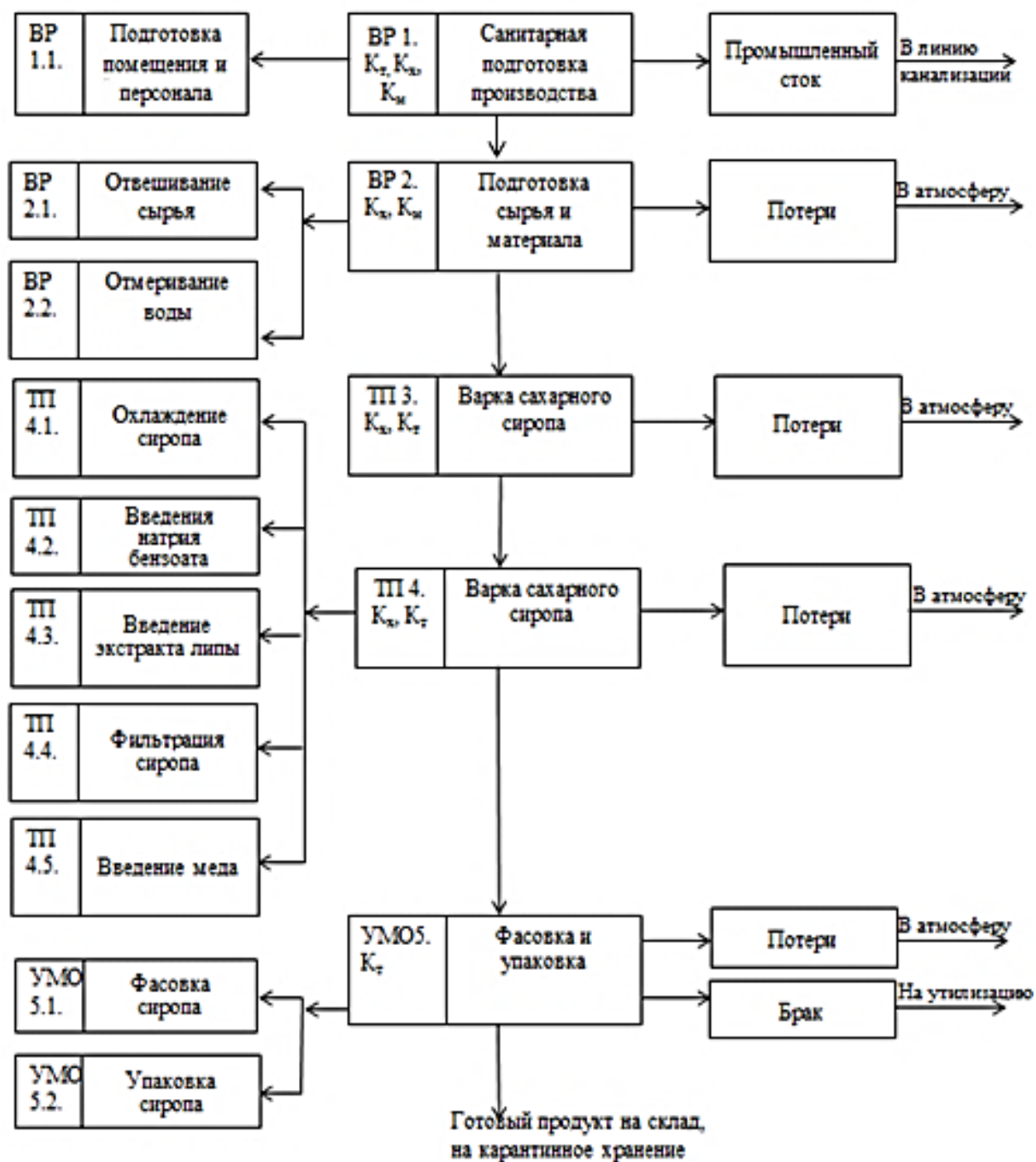


Рисунок 5.1.3.1 - Технологическая схема получения сиропа липы

Примечание к Рисунку 5.1.3.1: K_T – контроль технологический, K_x – контроль химический, K_m – контроль микробиологический, ВР – вспомогательные работы, ТП – технологический процесс, ПО – переработка отходов, УМО – упаковка, маркировка и отгрузка готового продукта

Краткое описание технологии сиропа липы

Производственные помещения, предназначенные для изготовления сиропа липы должно соответствовать 7-8 классу чистоты по ИСО [37]. Необходимо обеспечивать и контролировать условия, чистоту воздуха производственных помещений и оборудования, что особенно важно во время его эксплуатации.

Алгоритм изготовления сиропа липы:

1. Воду очищенную нагреть до 50-60°C в сироповарочном котле.
2. При нагревании и постоянном перемешивании добавить и растворить необходимое количество сахарозы.
3. Раствор сахарозы довести до кипения.
4. После окончания подачи пара снять пену.
5. Пункт 3 и 4 повторить 2 раза.
6. Определить концентрацию сахарозы рефрактометрическим способом.
7. При достижении температуры сиропа 55 ± 5 °C добавить натрия бензоат (количество консерванта должно соответствовать предварительным расчетам).
Необходима якорная мешалка - 60 об/мин, время перемешивания 20 минут.
8. В сахарный сироп добавить рассчитанную навеску экстракта цветков липы сердцевидной жидкого, перемешать.
9. Отфильтровать сироп через нижний спуск реактора.
10. Добавить рассчитанное количество меда.

В Таблице 5.1.3.1 приведены критические точки процесса производства сиропа липы.

Таблица 5.1.3.1 - Перечень критических точек процесса производства сиропа липы

Наименование критического параметра	Наименование технологической стадии	Примечание
Микробиологическая чистота	ВР 1. Санитарная подготовка производства ВР 2. Подготовка сырья и материала ТП 3. Варка сиропа ТП 4. Изготовление сиропа УМО 5. Фасовка и упаковка	Микробиологическая порча Изменение органолептических свойств: запах, цвет, вкус, осадок, помутнение

Температурный режим	ТП 3. Изготовление сиропа сахарного ТП 4.3. Введение экстракта ТП 4.5. Введение меда	Перегрев приводит к карамелизации сиропа
Содержание твердой фазы сахара	ТП 4. Изготовление сиропа липы	Возможность замедления растворения ВВ при высокой концентрации сахара
Число оборотов мешалки	ТП 4. Изготовление сиропа липы	Оказывает влияние на растворение натрия бензоата и однородность сиропа

Таким образом, определены критические точки процесса производства сиропа липы: микробиологическая чистота, температурный режим, содержание твердой фазы сахара, число оборотов мешалки.

Изготовленный сироп фасовали во флаконы по 100 мл светозащитного стекла с винтовой горловиной типа ФВ 100-20-ОС, укупоривали пробками полиэтиленовыми с контрольным вскрытием.

Оценка качества сиропа липы

Полученный сироп липы оценивали по показателям, указанным в ОФС. 1.4.1.0012.15: описание, плотность, рН, микробиологическая чистота, извлекаемый объем по методикам, приведенным в Разделе 2.2.3 [39, 40].

Показатели качества 5 серий сиропа липы приведены в Таблице 5.1.3.2.

Таблица 5.1.3.2 - Показатели качества сиропа липы

Показатель	№серии				
	1	2	3	4	5
Органолептические свойства	Прозрачный светло-коричневый цвет, специфический запах, сладкий вкус				
рН среды	6,0±0,2	5,9±0,2	5,7±0,2	5,8±0,2	5,6±0,2
Плотность, г/см ³	1,296± 0,002	1,298± 0,002	1,296±0, 0,002	1,298± 0,002	1,297± 0,002
Число микроорганизмов в 1 г	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Число клеток грибов	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Число клеток бактерий	-	-	-	-	-
Извлекаемый объем, мл	98±5,0	97±5,0	102±5,0	102±5,0	103±5,0

Определение микробиологической чистоты разработанного сиропа

Определение микробиологической чистоты сиропов на основе экстракта цветков липы сердцевидной жидкого 1:1,0 и 1:1,8, проведено на базе аккредитованного испытательного лабораторного центра «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске» (протоколы лабораторных исследований в приложении) по методике, представленной в Разделе 2.2.3.

Анализ Таблиц 5.1.3.3, 5.1.3.4 позволяет сделать заключение о соответствии сиропов на основе липы сердцевидной цветков экстрактов жидких 1:1,0 и 1:1,8 показателям микробиологической чистоты определяемых ГФ ОФС.1.2.4.0002.18. Отсутствие антимикробного действия сиропа липы подтверждает верность интерпретации полученных результатов микробиологической чистоты.

Таблица 5.1.3.3 - Показатели микробиологической чистоты и антимикробного действия сиропа на основе липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,0

Определяемые показатели	Результаты бактериологических исследований	Гигиенический норматив (бактериологических исследований)	Результаты антимикробного действия сиропа	Гигиенический норматив (антимикробное действие)
Общее число аэробных микроорганизмов	Менее $1 \cdot 10^1$ КОЕ в 1мл	Не более $1 \cdot 10^4$ КОЕ в 1мл	-	-
Общее число дрожжевых и плесневых грибов	Не обнаружено	Не более 10^2 КОЕ в 1мл	-	-
Энтеробактерии, устойчивые к желчи	Не обнаружено	Не более 10^2 КОЕ в 1мл	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Не обнаружено	Отсутствие в 1мл	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Отсутствие в 10мл	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
<i>Salmonella</i> spp.	Не обнаружено	Отсутствие в 1мл	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма

Candida albicans	-	-	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
Pseudomonas aeruginosa	-	-	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма

Таблица 5.1.3.4 - Показатели микробиологической чистоты и антимикробного действия сиропа на основе липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8

Определяемые показатели	Результаты бактериологических исследований	Гигиенический норматив (бактериологических исследований)	Результаты антимикробного действия сиропа	Гигиенический норматив (антимикробное действие)
Общее число аэробных микроорганизмов	Менее $1 \cdot 10^1$ КОЕ в 1мл	Не более $1 \cdot 10^4$ КОЕ в 1мл	-	-
Общее число дрожжевых и плесневых грибов	Не обнаружено	Не более 10^2 КОЕ в 1мл	-	-
Энтеробактерии, устойчивые к желчи	Не обнаружено	Не более 10^2 КОЕ в 1мл	-	-
Escherichia coli	Не обнаружено	Отсутствие в 1мл	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
Staphylococcus aureus	Не обнаружено	Отсутствие в 10мл	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
Salmonella spp	Не обнаружено	Отсутствие в 1мл	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
Bacillus subtilis	-	-	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
Candida albicans	-	-	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма
Pseudomonas aeruginosa	-	-	Не изменена	Интенсивность роста тест-штамма

На основании проведённых аналитических испытаний установлены основные показатели качества сиропа липы, представленные в Таблице 5.1.3.4.

Таблица 5.1.3.4 - Проект спецификации показателей качества сиропа липы

Показатель	Методы	Нормы	Характеристика сиропа
Описание	Визуальный Органолептический ГФ XIII ОФС.1.2.1.0014.15	Прозрачный раствор светло-коричневого цвета с характерным ароматным запахом, сладкого вкуса	Соответствует
Подлинность	Качественная реакция на флавоноиды ГФ XIII	Наличие красного окрашивания в реакции с порошком магния и раствором кислоты хлористоводородной концентрированной	Соответствует
Плотность	ГФ XIII ОФС.1.2.1.0014.15	1,280 – 1,320	1,297
pH	Ионометрический ОФС.1.2.1.0004.15	5,7-6,0	5,8
Микробиологическая чистота	ГФ XIII ОФС.1.2.4.0002.15	Категория 3Б	Соответствует
Извлекаемый объём, %	ГФ XIII ОФС.1.4.2.0002.15	Среднее значение объёма содержимого 10 упаковок - не менее 100 %	100,4
Содержание флавоноидов, мг	Спектрофотометрический	Содержание флавоноидов в 100 мл сиропа должно быть не менее 11 мг	11,34
Упаковка	Флаконы тёмного стекла объёмом 100 мл с винтовой горловиной, с полиэтиленовыми пробками с контрольным вскрытием		
Маркировка	В соответствии с НД		
Хранение	При температуре не более 25°C, в защищенном от света месте. Срок годности – 18 месяцев.		

Полученные данные свидетельствуют о соответствии сиропа липы нормируемым требованиям.

5.1.4 Изучение стабильности сиропа липы в процессе хранения

Изучение стабильности полученных образцов сиропов липы проводили при хранении в естественных условиях на 5 лабораторных сериях в естественных условиях (температура 15-25 °С). Сироп расфасован во флаконы из темного стекла по 100 мл. Критерий изучения - соответствие анализируемого образца

разработанным требованиям. Срок наблюдения – 2 года. Средние результаты по хранению 5 серий сиропов липы приведены в Таблице 5.1.4.1.

Таблица 5.1.4.1 - Результаты изучения стабильности сиропа липы при хранении в естественных условиях

Показатели качества	Описание	Запах	Вкус	Плотность	pH среды	Микробиологическая чистота	Извлекаемый объем
Требования	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета	Специфический - липы	Сладкий	1,280 – 1,320	5,5- 6,1	по ГФ РФ ОФС.1.2.4.000 2.18	95-105 мл
1 серия							
Через 6 мес	+	+	+	1,313±0,003	5,8±0,2	+	98
Через 12 мес	+	+	+	1,312±0,003	5,7±0,2	+	98
Через 18 мес	+	+	+	1,318±0,003	5,8±0,2	+	98
Через 24 мес	+	+	+	1,336±0,003	5,5±0,2	-	97
2 серия							
Через 6 мес	+	+	+	1,315±0,003	5,9±0,2	+	97
Через 12 мес	+	+	+	1,315±0,003	5,7±0,2	+	97
Через 18 мес	+	+	+	1,316±0,003	5,8±0,2	+	96
Через 24 мес	+	+	+	1,338±0,003	5,6±0,2	-	94
3 серия							
Через 6 мес	+	+	+	1,314±0,003	5,9±0,2	+	102
Через 12 мес	+	+	+	1,315±0,003	5,8±0,2	+	102
Через 18 мес	+	+	+	1,315±0,003	5,7±0,2	+	101
Через 24 мес	+	+	+	1,339±0,003	5,7±0,2	-	101
4 серия							
Через 6 мес	+	+	+	1,305±0,003	5,8±0,2	+	102
Через 12 мес	+	+	+	1,307±0,003	5,7±0,2	+	102
Через 18 мес	+	+	+	1,310±0,003	5,7±0,2	+	100
Через 24 мес	+	+	+	1,333±0,003	5,7±0,2	-	100
5 серия							
Через 6 мес	+	+	+	1,305±0,003	5,8±0,2	+	103
Через 12 мес	+	+	+	1,305±0,003	5,8±0,2	+	103
Через 18 мес	+	+	+	1,309±0,003	5,9±0,2	+	102
Через 24 мес	+	+	+	1,333±0,003	6,1±0,2	-	102

Примечание к Таблице 5.1.4.1: «+»- соответствие показателям, «-»- не соответствие показателям.

При хранении в течение 24 месяцев произошло изменение таких показателей как: плотность и микробиологическая чистота на основании чего установлен срок годности сиропа 18 месяцев.

5.1.5 Определение острой токсичности сиропа липы

Объектом исследования является сироп на основе липы сердцевидной цветков экстракта жидкого. В качестве контрольного раствора был использован сахарный сироп. Для определения среднесмертельной дозы раствор исследуемого лекарственного средства, вводили крысам однократно перорально в дозах 2,0; 5,0; 10,0; 12,5; 25,0 мл на 1000 г массы животного. Определение острой токсичности проводили по методике, описанной в Разделе 2.2.4.

Таблица 5.1.5.1 - Исследования острой токсичности сиропа липы

№ п/п	Условия опыта	Дозы, мл/кг	Выжило	Погибло	Z	d	Zd
1	сироп липы	2,0	6	0	0	-	0
2		5,0	6	0	0	3,0	0
3		10,0	6	0	0	5,0	0
4		12,5	6	0	0	2,5	0
5		25,0	6	0	0	12,5	0
1	сахарный сироп	2,0	6	0	0	-	0
2		5,0	6	0	0	3,0	0
3		10,0	6	0	0	5,0	0
4		12,5	6	0	0	2,5	0
5		25,0	6	0	0	12,5	0

Из анализа Таблицы 5.1.5.1 следует, что в течение эксперимента во всех наблюдаемых группах гибели животных не выявлено, что не позволило установить LD₅₀. Введение более высоких доз не представляется возможным, так как 25,0 мл на 1000 г массы тела, является максимально допустимым количеством жидкости в мл для крыс при введении per os, а средняя летальная доза в данном случае больше, чем 5,0 мл/кг [115].

В ходе исследований все животные оставались активны, подвижны с нормальной концентрацией движения и частотой дыхательных движений, а также с хорошим аппетитом и внешним видом.

Анализ полученных данных, свидетельствует, что при пероральном введении сироп липы относится к веществам малоопасным (4 класс опасности), согласно ГОСТ 12.1.007-76 [33].

5.2 Разработка леденцов на основе липы сердцевидной цветков экстракта жидкого

5.2.1 Выбор состава леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Выбор ЛФ леденцы обусловлен тем, что они обладают рядом преимуществ:

- постепенным высвобождением действующих веществ в ротовой полости минуя желудочно-кишечный тракт;
- поддержание концентрации фармакологически активных веществ на уровне терапевтической дозы;
- удобством применения, особенно в педиатрии;
- стабильностью ЛВ в карамели;
- приятным вкусом, цветом и запахом.

Для изготовления леденцов сырьем является: сахар, патока, красители, пищевые кислоты, эссенции [16, 111], таким образом, леденцы являются источником низкомолекулярных, легкоусвояемых углеводов, которые при избыточном поступлении в организм превращаются в жиры. Поэтому, при разработке лекарственных средств с подсластителями целесообразно избегать использования корригентов с повышенной калорийностью. Для достижения этой цели обычно используют сахарозаменители - сорбит или ксилит, недостатком которых является выраженный охлаждающий эффект и послевкусие. Кроме того сорбит и ксилит обладают относительно невысокой стабильностью при воздействии высоких и низких температур, кислых сред, влажности. Калорийность ЛП, в состав которых входят вышеуказанные подсластители не

отличается существенно по энергетической ценности от препаратов с сахарозой [147, 155, 154].

Анализ ассортимента подсластителей используемых в производстве кондитерских изделий позволил выявить современные подсластители, такие как: изомальт, мальтит, эрит и др. [17]. Дополнительным преимуществом которых является соответствие требованиям технического регламента Таможенного союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств». Где указано, что подсластители используемые для получения кондитерских продуктов должны обладать сниженной энергетической ценностью, а также быть диетическим продуктом, который предназначен для людей с ограниченным потреблением сахара [138, 151].

Источник изомальта 100% растительное сырье. Изомальт - объемный подсластитель, который получают исключительно из сахарозы, выделяемой из крахмала, сахарной свеклы, тростника, меда [54].

Сахар изомальт является неинтенсивным подсластителем (степень сладости (0,45 – 0,60) сладости сахарозы - 1.

Преимущество изомальта в сравнении с глюкозой и сахарозой состоит в том, что при его употреблении не происходит значительных изменений уровня глюкозы и соответственно инсулина в крови вследствие более медленного расщепления. Также постепенное всасывание изомальта и ферментирование в толстом кишечнике до низкомолекулярных жирных кислот, углекислого газа и водорода обеспечивает его пробиотические свойства. Положительным качеством леденцов на основе изомальта является отсутствие воздействия на зубную эмаль и развитие кариеса. Гликемический индекс соответствует 9 г-экв, глюкозы, что ниже, чем у сахарозы (68 г-экв) [66].

В состав карамельных форм также входит патока - полужидкая масса, по консистенции немного похожа на свежий мед. Основными показателями качества патоки являются: содержание редуцирующих веществ, массовая доля влаги (не более 22 %), плотность 1410 г/м³ [36, 107].

5.2.2 Разработка технологии леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Леденцы являются твердой ЛФ, в связи с чем отсутствует необходимость введения консервантов [74, 27]. В качестве основы леденцов изучали: сахар, патоку, инвертный сироп, изомальт в разных соотношениях. При проведении органолептических исследований были использованы 6 композиций леденцов с экстрактом липы жидким. Составы леденцовой массы представлены в Таблице 5.2.2.1.

Таблица 5.2.2.1- Состав прописей леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Компоненты леденцов, г	Номер образца					
	1	2	3	4	5	6
Липы сердцевидной цветков экстракт жидкий	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Сахар	60	60	60		45	
Патока	30		30		45	65
Инвертный сироп	10	30				
Изомальт				90		30
Вода очищенная	до 100					

Технологическая схема производства леденцов приведена на Рисунке 5.2.2.1.

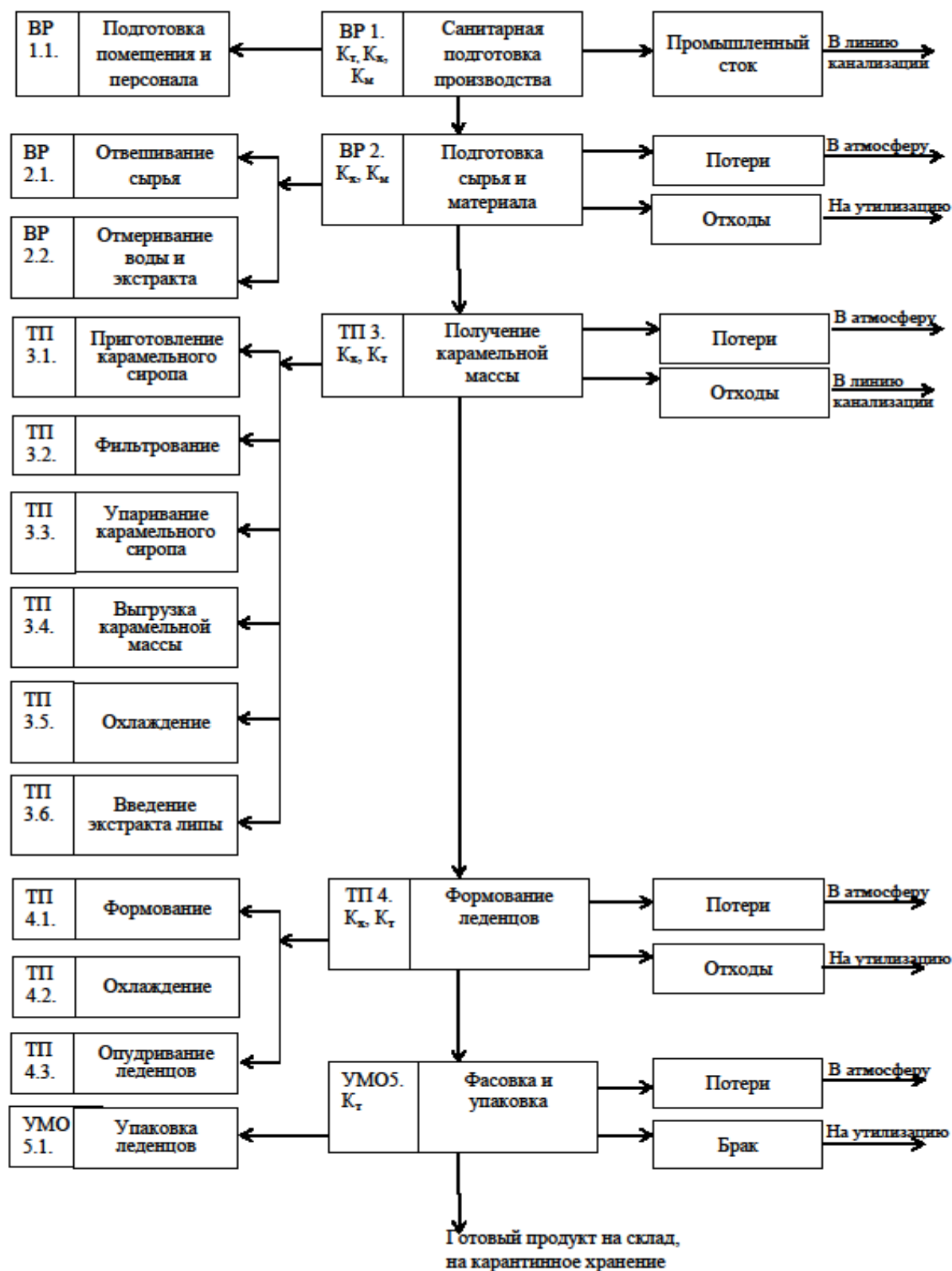


Рисунок 5.2.2.1 – Технологическая схема получения леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Примечание к Рисунку 5.2.2.1: К_т – контроль технологический, К_х – контроль химический, К_м – контроль микробиологический, ВР – вспомогательные работы, ТП – технологический процесс, ПО – переработка отходов, УМО – упаковка, маркировка и отгрузка готового продукта

В выпарной котел загружали воду и изомальт, перемешивали и уваривали до влажности менее 1% при температуре от 100-140°C. Готовая карамельная масса при температуре около 140°C представляет собой вязкую жидкость. Для сохранения текучести карамельной массы ее охлаждали до температуры 83-90°C. Навеску липы сердцевидной цветков экстракта жидкого добавляли к остывающей карамельной массе, перемешивали до однородности. По экспериментальным данным, установлено содержание этилового спирта в экстракте - 63%, который при нагревании и добавлении к горячей карамельной массе испаряется, так как температура кипения этилового спирта при данной концентрации составляет 80,75°C. Установлено, что время охлаждения карамельной массы с 90 до 83°C, составляет $5,8 \pm 0,6$ минут, что приводит к полному испарению этилового спирта. Согласно ОФС 1.1.0008.15 ГФ РФ IX издания этанол относится к растворителям 3 класса.

Критическая точка процесса производства леденцов с липы сердцевидной цветков экстракта жидкого находится на стадии ТП 3. получение карамельной массы - параметр ТП 3.6. введение экстракта липы. На данной стадии важно равномерное перемешивание при введении экстракта и соблюдение температурного режима, с целью полного испарения спирта этилового.

Полученную массу немедленно разливали в подготовленные силиконовые формы, так как они намного технологичнее своих традиционных металлических аналогов. Преимуществом их использования является: отсутствие прилипания карамельной массы, необходимости смазывания поверхности и легкость извлечения готового продукта.

Леденцы остывали в условиях комнатной температуры до полного затвердевания, взвешивали и равномерно обсыпали тальком и упаковывали в жестяные баночки ГОСТ 34405-2018. Фасовка и хранение в жестяных баночках обусловлена отсутствием возможности фасовки в блистерную упаковку в лабораторных условиях.

5.2.3 Исследование по определению нормируемых показателей и изучению стабильности леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Следующим этапом наших исследований – проведение комплексных исследований леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким по предлагаемым показателям.

Влажность – оптимальная влажность леденцов менее 1%.

Пластичность – карамельная масса для приготовления леденцов должна быть пластична при температуре формования.

Внешний вид – готовая карамельная масса должна быть прозрачна.

Цвет – карамельная масса светло – желтого цвета.

Температура плавления – карамельная масса должна быть перейти в жидкое агрегатное состояние в диапазоне температуры 90 – 140°C.

Поверхность – карамельная масса не должна иметь трещин, вкраплений [40].

Результаты исследований органолептических свойств представлены в Таблице 5.2.3.1.

Таблица 5.2.3.1 – Органолептические свойства леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Наименование показателя	Характеристика					
	№ образцов					
	1	2	3	4	5	6
Внешний вид	Леденцы овальной формы с ровными поверхностями и краями					
Цвет	Темного цвета	Светлого цвета	Темного цвета	Светлого цвета	Темного цвета	Темного цвета
Вкус и аромат	Ярко выраженные, характерные для экстракта липы					
Поверхность	Без трещин и вкраплений					
Форма	Леденцы овальной формы					

Анализ данных Таблицы 5.2.3.1 показал, что образцы № 1, №3, №5, №6 не соответствует условиям поиска по показателю – цвет. Высокой оценкой органолептических свойств обладали образцы № 2, №4, №5).

Определение физико-химических показателей леденцов представлено в Таблице 5.2.3.2.

Таблица 5.2.3.2 - Физико – химические показатели леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Показатель	Состав № 1	Состав № 2	Состав № 3	Состав № 4	Состав № 5	Состав № 6
Влажность леденцов	Менее 1 %					
Пластичность при температуре разделки	Нет	Да	Да	Да	Да	Да
Температура плавления	90 – 100°C	130 – 140°C	130–140°C	130 – 140°C	130 – 140°C	130 – 140°C
Средняя масса 1 леденца, г	1,7±0,5	1,7±0,5	1,7±0,5	1,7±0,5	1,7±0,5	1,7±0,5
Отклонения в массе от средней массы, %	±10%	±10%	±10%	±10%	±10%	±10%
Изменение структуры при хранении леденцов	Гигроскопичны	Быстро кристаллизуется и становится гигроскопичной	Гигроскопичны	Стабильна	Стабильна	Стабильна

Из данных приведенных в Таблице 5.2.3.2 следует, что образец № 2 быстро кристаллизуются и становятся гигроскопичным, так как не содержит патоку, которая увеличивает вязкость сиропов, уменьшая скорость кристаллизации. Образцы №1 и №3 не соответствовали параметру – пластичность при разделке и становились гигроскопичными при хранении. Несмотря на то, что образцы леденцов №4, №5, №6 соответствовали условиям поиска по физико-химическим свойствам изученных нами составов, мы выбрали образец №4 так как он соответствует всем изучаемым нами параметрам.

Определение микробиологической чистоты леденцов представлено в Таблице 5.2.3.3.

Таблица 5.2.3.3 - Определение микробиологическая чистота леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Наименование	Номер образца леденцов	Результаты исследований		
		Бактерии	Грибы	Патогенные бактерии
Леденцы с экстрактом липы	1	45	< 10	Не обнаружено
	2	60	< 10	Не обнаружено
	3	60	< 10	Не обнаружено
	4	50	< 10	Не обнаружено
	5	65	< 10	Не обнаружено
	6	70	< 10	Не обнаружено

Из полученных данных следует, что по микробиологической чистоте полученные леденцы соответствуют регламентированным требованиям в ГФ РФ XIV ОФС.1.2.4.0002.18.

По результатам исследований нами выбран состав №4, его основой является изомальт, обладающий гликемическим индексом в 7,5 раз ниже, чем у сахарозы, что так же актуально в условиях повышения тенденции к заболеваниям сахарным диабетом. Таким образом, по результатам исследований экспериментально обоснован состав леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким (в г):

Липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8 5,0

Изомальт 90,0

Вода очищенная 5,0

Изучение стабильности леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Леденцы хранили в естественных условиях в течение 1 года [35]. Результаты изучения стабильности леденцов представлены в Таблице 5.2.3.4, из которой видно, что они выдерживают испытания качества в течение срока хранения.

Таблица 5.2.3.4 - Результаты изучения стабильности леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким при хранении в естественных условиях

Наименование	Сроки хранения, мес.	Исследуемые показатели			
		Описание	Липкость баллы	Потеря в массе при высушивании	Микробиологическая чистота по ГФ РФ
Леденцы с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким	3	Овальной формы, светлого цвета	1	2,66±0,05	Соответствует
	6	Овальной формы, светлого цвета	1	2,72±0,08	Соответствует
	9	Овальной формы, светлого цвета	1	2,88±0,08	Соответствует
	12	Овальной формы, светлого цвета	1	2,920±0,10	Соответствует

Анализ данных Таблицы 5.2.3.4 показал, что леденцы с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким выдерживают испытания качества в течение срока хранения. На основании проведенных аналитических испытаний установлены основные показатели качества леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким, представленные в Таблице 5.2.3.5.

Таблица 5.2.3.5 - Проект спецификации показателей качества леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким

Показатель	Методы	Нормы	Характеристика
Описание	Визуальный Органолептический ГФ XIV ОФС.1.4.1.0030.18	Леденцы овальной формы светлого цвета с ровными поверхностями и краями с характерным вкусом и запахом липы	Соответствует
Однородность массы дозированных лекарственных форм	ГФ XIV ОФС.1.4.2.0009.15	Допустимое отклонение не более 5% от средней массы	Соответствует
Однородность дозирования (по содержанию флавоноидов)	Метод прямого определения ГФ XIV ОФС.1.4.2.0008.18	Первый показатель приемлемости должен быть меньше максимально допустимого значения	Соответствует

Микробиологическая чистота	ГФ XIV ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 3Б	Соответствует
Содержание флавоноидов, мг	Спектрофотометрия	Содержание флавоноидов в 1 леденце должно быть не менее 3 мг	3,2
Упаковка	Жестяная сборная банка со съемной крышкой объемом 150см ³		
Маркировка	В соответствии с НД		
Хранение	При температуре не более 25°C, в сухом защищенном от света месте. Срок годности – 12 месяцев.		

Выводы по главе

1. Разработан сироп на основе липы сердцевидной цветков экстракта жидкого 1:1,8, обоснован состав сиропа (изучены 10 композиций), предложена оптимальная технология.

2. Показана целесообразность использования в качестве консерванта для сиропа - натрия бензоат 0,5 % для достижения требуемой микробиологической чистоты сиропа липы.

3. Разработана технологическая схема получения сиропа липы, описаны технологические стадии и критические параметры процесса. Предложены нормы качества сиропа липы для последующего включения в НД на препарат, проведена апробация технологии в условиях производства, на основании которой составлен соответствующий акт.

4. Разработан состав и технология леденцов с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким. Проведены комплексные исследования по физико-химическим и микробиологическим показателям норм качества леденцов.

5. Установлен срок годности для сиропа липы в результате хранения при комнатной температуре (15-25°C) 18 месяцев, а для леденцов с экстрактом липы сердцевидной при естественном хранении – 12 месяцев.

6. Экспериментально доказано отсутствие острой токсичности сиропа липы. Анализ полученных данных, свидетельствует, что изучаемый сироп относится к веществам малоопасным (4 класс опасности) при пероральном введении in vivo.

Общее заключение

1. Установлены оптимальные параметры и условия проведения экстракции методом реперколяции, в частности определены показатели насыпной массы сырья, образования внутреннего сока, установлено число ступеней экстракции и соотношение фаз – 1:1,8. Разработана технологическая схема получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и проведена сравнительная оценка эффективности традиционной и вновь предложенной ресурсосберегающей технологии, эффективность разработанного варианта выше в 1,57 раза. Доказано, что оптимальными показателями является: число диффузоров - 4, степень измельченности сырья 2-4 мм, оптимальный экстрагент - спирт этиловый 70%. При этом эффективность экстракции составила 73,41 %.

2. Установлено количественное содержание флавоноидов в липы сердцевидной цветков экстракте жидком на основании собственной методики определения содержания флавоноидов в экстракте – 0,327% (при погрешности определения не более 2%). Теоретически разработаны, и экспериментально обоснованы нормы качества липы сердцевидной цветков экстракта жидкого:

- сухих веществ – не менее 7,13 %;
- флавоноидов – не менее 0,26 %;
- концентрация спирта этилового в экстракте – не менее 62 %;
- плотность – не более 0,8256 %.

Проведена валидация соответствующих методик.

3. Разработан сироп липы на основе полученного экстракта, определены ВВ – мед, сахароза, консервант – натрия бензоат 0,5%, выявлены его основные органолептические показатели, установлен срок годности - 18 месяцев. Сконструирована технологическая схема и определены критические точки процесса. Предложены и обоснованы основные показатели качества сиропа липы. Разработаны леденцы с липы сердцевидной цветков экстрактом жидким, создана технологическая схема их получения, показатели качества, установлен срок годности – 12 месяцев.

4. Разработан лабораторный регламент на липы сердцевидной цветков экстракт жидкий 1:1,8. В условиях производства апробированы технологии получения липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и сиропа липы, получены соответствующие акты апробации.

5. Биотестирование липы сердцевидной цветков экстракта жидкого на культуре *Parametium caudatum* показало, что экстракт обладает мембраностабилизирующим и антиоксидантным действием.

В эксперименте *in vitro* на нейтрофильных гранулоцитах периферической крови установлено иммуностропное действие липы сердцевидной цветков экстракта жидкого. Экстракт способен изменять параметры функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при их дефектах, возникающих на фоне острых инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии и обеспечивает коррекцию нарушенных функций нейтрофильных гранулоцитов как при острой бактериальной, так и при острой вирусной инфекции практически до значений изучаемых показателей условно - здоровых лиц.

Экспериментально доказано отсутствие острой токсичности липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и сиропа липы. Анализ полученных данных, свидетельствует, что экстракт и сироп липы относится к веществам малоопасным (4 класс опасности) при пероральном введении в эксперименте *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарова, О.В. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия / О.В. Азарова, Л.П. Галактионова // Химия растительного сырья. – 2012. – №4. – С. 61–78.
2. Алиева, А.А. Гендерные особенности метаболической активности нейтрофилов крови у больных хроническим вирусным гепатитом С / А.А. Алиева, Х.М. Галимзянов, А.В. Буркин, О.Н. Горева // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – №4. – С. 44–49.
3. Амелина, П.С. Эхинацея пурпурная и солодка голая как природные иммуномодуляторы / П.С. Амелина, В.А. Вайнштейн // Сборник материалов V Всероссийской научно–практич. конф. с международным участием «Инновации в здоровье нации», 8-9 ноября, Санкт-Петербург: Издательство СПХФА Санкт-Петербург, 2017. – С. 82–85.
4. Андреева, И.Н. Основные направления развития технологии скорректированных препаратов в отечественном фармацевтическом производстве / И.Н. Андреева, Э.Ф. Степанова, А.М. Шевченко // Успехи современного естествознания. – 2004. – №1. – С.99–100.
5. Андрюков, Б.Г. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий / Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, Е.И. Дробот, Е.В. Матосова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – № 1. – С. 4–18.
6. Анурова, М.Н. Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина // Разработка и регистрации лекарственных средств. – 2015. – № 4. – С. 64–73.
7. Арзамасцев, А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – №4. – С. 8–12.
8. Афанасьева, Ю.Г. Ингибирующее влияние вытяжек из некоторых видов растительного сырья на сенсибилизацию к овальбумину / Ю.Г. Афанасьева, Н.Ж. Басченко, В.В. Сперанский, З.Р. Хабабутдинова / Российский аллергологический журнал. – 2009. – № 2. – С. 24–27.

9. Ашаева, Л.А. Сахароснижающее свойство настоев цветков липы / Л.А. Ашаева, Н.А. Алханова, Е.Я. Ладыгина, Н.П. Артемова, Л.Н. Куршакова, Л.И. Анчикова // Фармация. – 1985. – № 3. – С. 57– 60.

10. Бадалян, Э.В. Суммарные фитопрепараты подорожника большого – возможности совершенствования технологии / Э.В. Бадалян, Э.Ф. Степанова, А. М. Темирбулатова, И.Н. Зилфикаров / Научные ведомости. – 2011. – № 22. – С. 125–130.

11. Бельтюкова, С.В. Консерванты в пищевой промышленности и методы их определения / С.В. Бельтюкова // Пищевая наука и технология. – 2013. – № 3. – С. 58–64.

12. Беляева, А.С. Нейтрофильные гранулоциты как регуляторы иммунитета / А.С. Беляева, Л.В. Ванько, Н.К. Матвеева, Л.В. Кречетова // Иммунология. – 2016. – № 2. – С. 129–133.

13. Бирюкова, Н.М. Развитие производства фитопрепаратов на основе отечественного растительного сырья / Н.М.Бирюкова, А.М.Островская, В.Г.Соколов // Материалы Международной заочной научно-практической конференции «Актуальные проблемы естественных наук», Тамбов, 15 марта, 2013. - С. 6-15.

14. Больных, Е.А. Оценка выраженности суммарной антиоксидантной активности как один из критериев стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды / Е.А. Больных // Science Time. - 2016. - № 4 (28). - С. 106-112.

15. Буркова, Е.А. Антиоксидантные свойства экстрактов цветков липы сердцелистной (*Tilia cordata*) / Е.А. Буркова, В.Р. Хабибрахманова, А.В. Канарский // Вестник Технологического университета. – 2015. – Т. 18. – № 16. – С. 38–40.

16. Варина, Н.Р. Обоснование состава и разработка технологии изготовления леденцов на основе фитопрепарата «Дентос» / Н.Р. Варина, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Л.Д. Климова, С.В. Первушкин // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 12–4. – С. 492–495.

17. Варина, Н.Р. Стандартизация леденцов «Дентос» для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний ротовой полости / Н.Р. Варина, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Л.Д. Климова А.Е. Щербовских, А.С. Лапина, Е.А. Филиппова // Современные проблемы науки и образования. – 2015.– № 2–2. – С. 487. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22403> (дата обращения: 19.08.2018).

18. Вельмьяйкина, Е. И. Исследование по созданию иммуномодулирующего лекарственного средства сиропа с настойкой эхинацеи пурпурной / Е.И. Вельмьяйкина, В.А. Куркин, Л.Д. Климова, О.В. Бер // Известия Самарского научного центра РАН. – 2009. – № 1–6. – С. 1265–1268.

19. Веселова, Д.В. Иммуностимулирующее действие экстракта цветков липы в эксперименте *in vitro* / Д.В. Веселова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Э.Ф. Степанова, Т.В. Русинова // Биофармацевтический журнал, 2019. – Т.11. - №3. – С. 17-20.

20. Веселова, Д.В. Использование в современной медицине цветков липы сердцевидной / Д.В. Веселова, Э.Ф. Степанова // Фармация и фармакология. – 2016.– № 1(14). – С. 4–9.

21. Веселова, Д.В. Перспектива разработки коригированных лекарственных форм на основе экстракта цветков липы / Мат. науч.–практ. конф / Волгоград, апрель 2016, Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины, 2016. –С. 610–611.

22. Веселова, Д.В. Получение и исследование экстрактов липы сердцевидной / Д.В. Веселова, Э.Ф. Степанова, А.М. Темирбулатова, В.В. Верниковский // Материалы науч.– практ. конф. «Беликовские чтения», Пятигорск, 4-5 декабря, 2018. – С. 443–447.

23. Веселова, Д.В. Применение экстракта цветков липы в современной медицине / Материалы науч.–практ. конф. «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», Шымкент, Республика Казахстан, 9-10 декабря, 2016. – С. 37–38.

24. Веселова, Д.В. Проведение анализа микробиологической чистоты сиропа, приготовленного на основе экстракта цветков липы / Д.В. Веселова, Э.Ф. Степанова // Материалы науч.–практ. конф. «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», Шымкент, Республика Казахстан, 12 декабря, 2017. – С. 139–140.

25. Веселова, Д.В. Разработка состава и технологические исследования сиропа липы / Д.В. Веселова, А.М. Темирбулатова, Э.Ф. Степанова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – №2. – С. 39–43.

26. Веселова, Д.В. Сироп на основе жидкого экстракта цветков липы / Д.В. Веселова, Э.Ф. Степанова // Мат. XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 10–13 апреля, 2017. – С. 92.

27. Веселова, Д.В. Технологическое обоснование и нормирование качества липы экстракта жидкого и леденцов на его основе / Д.В. Веселова, А.М. Темирбулатова // Colloquium–journal. – 2019. – №5 (29). – С.22–26.

28. Веселова, Д.В. Технология получения сухого экстракта липы сердцевидной / Мат. всерос. науч.–практ. конф. «Теоретические и прикладные исследования в области естественных, гуманитарных и технических наук» / Прокопьевск, 17 июня, 2016. – С. 5–9.

29. Веселова, Д.В. Фармакотехнологические исследования цветков липы сердцевидной / Д.В. Веселова, А.М. Темирбулатова, А.Г. Курегян, Э.Ф. Степанова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2018. – №22. – С.133–136.

30. Володина, Т.А. Обоснование оптимального состава композиций из растительных экстрактов с использованием биологического теста на парameциях // Т.А. Володина // Омский научный вестник. – 2012. – № 2. – С. 30 – 31.

31. Гаврилов, А. С. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов / А. С. Гаврилов // Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 449 с.

32. Ганковская, Л. В. Основы клинической иммунологии и аллергологии: учебное пособие / Л. В. Ганковская, Л.С. Намазова-Баранова, Р.Я. Мешкова. – М: Педиатръ, – 2016. – 152 с.
33. ГОСТ 12.1.007–76 Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М.: Изд-во Стандартиформ, 2007 – 7 с.
34. ГОСТ 33044–2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. – Москва: Стандартиформ, 2015. – 16 с.
35. ГОСТ 34405–2018 Банки металлические сборные. Общие технические условия. – М.: Изд-во Стандартиформ, 2018. – 11 с.
36. ГОСТ 6477–88 Карамель. Общие технические условия. – М.: ИПК издательство стандартов, 2004. – 11 с.
37. ГОСТ Р ИСО 14644–1–2017 Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 1. Классификация чистоты воздуха по концентрации частиц. М.: Стандартиформ, 2019 – 20 с.
38. Государственный реестр лекарственных средств. [Электронный ресурс]. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения – 28.07.2019).
39. ГФ XIII издание, [Электронный ресурс]. URL.: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content> (дата обращения 16.11.2017).
40. ГФ XIV издание, [Электронный ресурс]. URL.: [http:// www.femb.ru](http://www.femb.ru) (дата обращения 16.02.2019).
41. Демина, Н.Б. Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств / Н.Б. Демина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – №1 (2). – С. 8–13.
42. Дорогова, Ю.А. Популяционное и экологическое разнообразие наиболее распространенных видов древесных растений в подзоне хвойно-широколиственных лесов: автореферат. дис. ... канд. фарм: наук: 15.00.01 / Дорогова Юлия Александровна. – Йошкар-Ола, 2009.– 22 с.
43. Дорогойченков, В. Н. Количественное определение восстанавливающих моносахаридов в водорастворимом полисахаридном комплексе из цветков липы

сердцелистной / В. Н. Дорогойченков, В. Н. Чушенко // Фармация. – 1988. – №4. – С. 39–40.

44. Доценко, Э.А. Иммунодефициты и некоторые иммуномодулирующие средства / Э.А. Доценко, Д.А. Рождественский, Г.И. Юпатов // Вестник ВГМУ. – 2014. – №3. – С. 103–120.

45. Егорова, Е.А. Ферментативные изменения в нейтрофилах крови у больных лакунарной ангиной, осложненной паратонзиллярным абсцессом на фоне комплексной терапии / Е.А. Егорова, Х.М. Галимзянов, Р.С. Аракельян // Universum: медицина и фармакология. – электрон. научн. журн. – 2014. – № 2. [Электронный ресурс]. URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/984> (дата обращения 16.07.2018).

46. Зарубаев, В.В. Противовирусная активность глицеретовой и глицирризиновой кислот / В.В. Зарубаев, В.Б. Аникин, В.С. Смирнов // Инфекция и иммунитет. – 2016. – №3. – С. 199–206.

47. Иммунотерапия: руководство для врачей / под ред. Р. М. Хаитова, Р. И. Атауллаханова, А. Е. Шульженко. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 768 с. ISBN 978-5-9704-4378-1

48. Кабанов, С.В. Фитохимический анализ скорректированной лекарственной формы на основе фитокомпозиции липы сердцевидной и первоцвета весеннего / С.В. Кабанов, Л.Н. Царахова // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «О некоторых вопросах и проблемах современной медицины», 03 июля, Челябинск, 2015. - С.148-150.

49. Кайшева, Н.Ш. Роль аптечных организаций в качественном обеспечении населения лекарственными средствами растительного происхождения / Н.Ш. Кайшева, Н.В. Габриелян, М.М. Хачатрян // Мат. науч. программы 12 спец. выставки Аптека 2005, 25–28 октября, Москва, 2005. – С. 99–100.

50. Караулов, А.В. Дифференцированные подходы к комплексному применению иммуномодуляторов и пробиотиков у больных с часто рецидивирующими вирусными инфекциями / А.В. Караулов, Е.Б. Мищенко, В.Ф.

Ликов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2004. – № 1. – С. 19–25.

51. Караулов, А.В. Эффективность иммуномодуляторов при респираторных инфекциях: нерешенные проблемы и перспективы применения / А.В. Караулов // Детская оториноларингология. – 2011. – № 1. – С. 22–25.

52. Кароматов, И.Д. Липа сердцевидная / И.Д. Кароматов, А.Т. Абдувохидов // Биология и интегративная медицина. - 2017. - № 8. - С. 134-141.

53. Ким, В.Э. Экспресс-анализ биологической активности комплексного фитоизвлечения и разработка микрокапсул на его основе / В.Э. Ким, Э.Ф. Степанова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, Биология, Фармация. – 2015. – № 4. – С. 122–125.

54. Ким, Л.В. Перспективы применения изомальта при производстве кондитерских изделий на АО «БАЯН СУЛУ» / Л.В. Ким // Мат. II Всероссийской конф. «Современные проблемы финансового регулирования и учета в агропромышленном комплексе» – 2018. – С. 365–368.

55. Ким, М.Е. Сиропы с фитопрепаратами: номенклатура, разработка, особенности состава, технологии (обзор) / М.Е. Ким, Т.А. Олейникова, С.Б. Евсеева // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2015.– № 2–2. – С.193–198.

56. Ким, М.Е. Сиропы: состав, технология, современное состояние исследований (обзор литературы) / М.Е. Ким, Э.Ф. Степанова, С.Б. Евсеева // Фармация и фармакология. – 2014. – № 2–3 (4). – С. 7–14. [Электронный ресурс]. [https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-3\(4\)-7-14](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-3(4)-7-14). (дата обращения: 15.06.2016)

57. Ковалева, Л.Г. Иммуностропные эффекты плодов софоры японской в эксперименте *in vitro* / Л.Г. Ковалева, Н.В. Колесникова, А.М. Сампиев // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – №5. – С.107–110.

58. Кокина, М.С. Эфирные масла растений как натуральные пищевые консерванты / М.С. Кокина, М.М. Шамцян // Матер. IV Всерос. научно–практич.

конф. с участием молодых ученых «Инновационные материалы и технологии в дизайне», 22–23 марта, 2018. – С.59–60.

59. Кочетов, А.Г. Методы статистической обработки медицинских данных: Методические рекомендации для ординаторов и аспирантов медицинских учебных заведений, научных работников / А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, В.П. Масенко, И.В. Жиров, С.Н. Наконечников, С.Н. Терещенко. – М.: РКНПК, 2012. – 42 с.

60. Краснокурский, П.С. Общие правила для корригентов // Новая аптека. – 1998. – № 1. – С. 16–17.

61. Кудрин, А.Н. Система экспресс-методов интегральной оценки биологической активности индивидуальных и комплексных препаратов на биологических объектах / А.Н. Кудрин, В.В. Ананин, В.Ю. Баланьян // Российский химический журнал. – 1997. – Т.41. – №5. – С. 114–123.

62. Кузнецов, А.В. Корригенты вкуса в производстве лекарственных препаратов / А.В. Кузнецов, А.А. Кузнецов // Фармация. – 2011. – №2. – С. 53–57.

63. Кузнецов, А.В. Задачи и основы формирования вкуса таблетированных лекарственных препаратов / А.В. Кузнецов, А.М. Шевченко, Л.С. Кузнецова, Н.А. Романцова, А.А. Кузнецов, Т.Ю. Манджиголадзе // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 218. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22305> (дата обращения: 19.02.2017).

64. Кузнецов, А.В. Корригенты вкуса в производстве лекарственных препаратов / А.В. Кузнецов, А.А. Кузнецов // Фармация. – 2011. – № 2. – С.53–56.

65. Кузнецов, К.В. Элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*) – адаптоген, стимулятор функций организма животных и иммуномодулятор / К.В. Кузнецов, Г.И. Горшков // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 11–3. – С. 477–485.

66. Куринной, А.В. Разработка носителя кондитерской лекарственной формы для фармакотерапии и профилактики заболеваний пародонта / А. В. Куринной, А. А. Рыжов, В. В. Гладышев, В. Г. Клементьев, А. Д. Дюдюн // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – № 4 (73). – С. 68–70.

67. Куркин, В.А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений / В.А. Куркин, А.В. Куркина, Е.В. Авдеева, В.Б. // Фундаментальные исследования. – 2013. – №11–9. – С.1897–1901.

68. Лапина, А.С. Разработка состава и стандартизация лекарственных леденцов «Дентос» / А.С. Лапина // Мат. научно–практической конф. с международным участием «Молодые учёные — от технологий XXI века к практическому здравоохранению» Аспирантские чтения — 2016, 10 октября, 2016. – С. 218–219.

69. Левченко, В.И. Корригирование вкуса лекарственных веществ / В.И. Левченко, Т.В. Гармаш / Состояние и перспективы развития новых готовых лекарственных средств и фитохимических препаратов. –1990. – С.142–143.

70. Лесиовская, Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии: учебное пособие / Е.Е. Лесиовская, Л.В. Пастушенков. – 2–е изд.–М.: ГЭОТАР–МЕД. – 2003. – С. 297 – 333.

71. Лойд, В. Аллен. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов: учебн. пособие / Лойд В. Аллен, А.С. Гаврилов. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2014. – 512 с.

72. Lupinskaya, S.M. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе / С.М. Lupinskaya, С.В. Орехова, О.Г. Васильева // Химия растительного сырья. – 2010. – №3. – С.143–145.

73. Lupinskaya, S.M. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе / С.М. Lupinskaya, С.В. Орехова, О.Г. Васильева // Химия растительного сырья. – 2010. – № 3. – С. 143-145.

74. Майорова, Е.И. Разработка оптимального состава и технологии изготовления леденцов на растительной основе / Е.И. Майорова, М.В. Воронкова, В.В. Иванова // Мат. 64–й Всероссийской межвузовской студенческой научной конференции с международным участием «Молодежь, наука, медицина», 19-20 апреля, 2018. – С. 81–84.

75. Маравина, С.В. Корригирование вкуса жидких лекарств // Фармация. – 2001. – № 5. – С. 31–35.

76. Медведева, Т. М. Изучение нейротропной активности гранул на основе сухого экстракта липы сердцевидной листьев / Т. М. Медведева, В. Ц. Болотова, И. Е. Каухова, Е. В. Дьяконова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26. – №2. – С. 78–81.

77. Медведева, Т. М. Идентификация фенольных соединений в сухом экстракте липы сердцевидной цветков / Т. М. Медведева // Сборник материалов III Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 25–26 апреля 2013 г. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2013. – С. 182.

78. Медведева, Т.М. Препараты на основе экстрактов липы: получение и фармакологическая активность / Т.М. Медведева, В.В. Сорокин, И.Е. Каухова, В.Ц. Болотова // Фармация. – 2011. – № 7. – С. 34–36.

79. Меньшутина, Н.В. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. Т.1. – М.: БИНОМ, 2012. – 328 с.

80. Меньшутина, Н.В. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. Т.2. – М.: БИНОМ, 2013. – 480 с.

81. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учебное пособие / С.А. Минина, И.Е. Каухова – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 559 с. ISBN: 978-5-9704-0878-0

82. Моржина, В.А. Лекарственные растения, обладающие общетонизирующей и адаптогенной активностью: рододендрон Адамса и лимонник китайский / В.А. Моржина // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2016. – Т. 6. – № 5. – С. 903.

83. Муравьев, И.А. Теоретические основы производства жидких экстрактов методом реперколяции с законченным циклом / И.А. Муравьев, Ю.Г. Пшуков – Пятигорск: Кн. изд-во, 1985.–48 с.

84. Муравьев, И.А. Технология лекарств: изд. 3–е, перераб и доп. Т. 1/ Муравьев И.А. – Пятигорск, 1980. – 704с.

85. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.

86. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений / Под редакцией И.В.Нестеровой, Г.А. Чудиловой // М:Кэприкорн Паблишинг, 2018. – С. 338. ISBN: 978–0–9774757–8–0

87. Нестерова, И.В Физиологические особенности фагоцитарной функции НГ, ассоциированной с активностью микробицидной системы, у здоровых новорожденных / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Е.И. Клещенко, Т.В. Смерчинская, О.И. Сапун, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, Е.В. Фомичева, Л.Н. Кокова, А.Е. Стрюковский // Российский аллергологический журнал. – 2012. – №1. – С. 224–226.

88. Нестерова, И.В. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии: методические рекомендации / И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, С.В. Ковалева, Л.В. Ломтатидзе и др. рек. ЦМС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. – Краснодар, 2017. – 52с.

89. Нестерова, И.В. Нейтрофильные гранулоциты: новые роли старых игроков / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова и др. // Физиология и патология иммунной системы (ФИПИС). – 2014. – Т. 18. – №10. – С. 3–25.

90. Нестерова, И.В. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г. А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе и др. // Инфекция и Иммуитет. – 2017. – № 7(3). – С. 219–230. doi:10.15789/2220–7619–2017–3–219–230.

91. Нестерова, И.В. Особенности физиологического и дефектного функционирования нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоинфекционной и противоопухолевой защиты / И.В. Нестерова // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т.12. – №2. – С. 205.

92. Нестерова, И.В. Проблемы лечения вирусно–бактериальных инфекций у часто и длительно болеющих иммунокомпрометированных детей / И.В. Нестерова, Е.И. Клещенко, С.В. Ковалева, О.Н. Алексеева, Л.В. Ломтатидзе, Г.А. Чудилова // Российский аллергологический журнал. – 2011. – №2. – С.86–93.

93. Новикова, И.А. Современные аспекты клинического применения иммуномодуляторов / И.А. Новикова // Медицинские новости. – 2015. – № 5. – С. 23–26.
94. Носаль, М. А. Лекарственные растения и способы их применения в народе / М.А. Носаль, И. М. Носаль. – Харьков: Интербук, 1990. – 208 с.
95. Озими́на, И. И. Целенаправленный поиск биологически активных веществ в растениях / И. И. Озими́на, О. О. Фролова // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1. – С. 382–391.
96. Островская, А.С. Актуальные аспекты лечения острых респираторных заболеваний у детей: препараты топического действия при ринофарингите / А.С. Островская, С.А. Иваничкин // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11. – № 5. – С. 160–166.
97. Ошкина, Е.В. Лимонник китайский – дальневосточный эфирнонос / Е.В. Ошкина, Р.Д. Колесникова, Н.В. Выводцев, Ю.Г. Тагильцев // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. – 2014. – № 5 (341). – С. 35–41.
98. Павлов, Д.В. Лимонник китайский на российском Дальнем Востоке / Д.В. Павлов, Ю.Г. Тагильцев, Р.Д. Колесникова // Естественные и технические науки. – 2018. – № 1 (115). – С. 33–38.
99. Палечкин, А. В. Разработка технологии гранул экстракта липы, таблеток экстракта гибискуса и таблеток экстракта шиповника: дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.01 / Палечкин Анатолий Владимирович. – Санкт–Петербург, 2009. – 194 с.
100. Палка, Э. Корригенты в педиатрических препаратах / Палка Э. // Детские лекарственные формы: материалы симпоз. М., 1972. – С. 56–65.
101. Пантюхин, А.В. Теоретические аспекты разработки биологически активных добавок в виде скорректированных сиропов / А.В. Пантюхин, С.В. Райкова, А.А. Архангельская // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. - 2011. - №4 (99). - С. 177-186.

102. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: использование в народной медицине и быту /Л.В. Пастушенков, А.Л. Пастушенков, В.Л. Пастушенков – Спб.: БХВ-Петербург, 2012. – 660 с. ISBN: 978-5-9775-0836-0

103. Пат. 2103876 Российская Федерация, МПК A23G 3/00, Леденцы лакричные и способ их производства / М.Г. Собко, О.А. Иванов, И.Н. Ежова; заявитель и патентообладатель Товарищество с ограниченной ответственностью «Вулкан». – №. 96105803/13; заявл. 26.03.1996; опубл. 10.02.1998.

104. Пат. 2318530 Российская Федерация, МПК A61K 36/484, A61K 36/28, A61K 36/185, A61P 37/00. Биологически активный стимулятор и способ коррекции вторичных иммунодефицитов с его применением / П.Н. Сисягин, Г.Р. Реджепова, З.Я. Косорлукова, Е.П. Сисягина, А.В. Аринкин, В.В. Сочнев, В.Н. Скира, Г.К. Волков, А.А. Савельев, С.П. Сисягин; заявитель и правообладатель Государственное научное учреждение Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечерноземной зоны РФ Российской академии сельскохозяйственных наук, ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия». – № 2006109916/15; заявл. 28.03.2006; опубл. 10.03.2008, Бюл. №7.

105. Пат. 2373956 Российская Федерация, МПК A61K 41/00, A61K 36/18, B01D 11/02. Способ получения полисахаридного комплекса из цветов липы сердцевидной / Е.В. Ожимкова, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман; заявитель и правообладатель ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет». – № 2008139200/15; заявл. 02.10.2008; опубл. 27.11.2009, Бюл. № 33.

106. Пат. 2402226 Российская Федерация, МПК A23G 3/36, Иммуномоделирующие леденцы / О.И. Закутнов, В.И. Закутнова; заявитель и правообладатель ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет». – №2009124337/13; заявл. 25.06.2009; опубл. 27.10.2010, Бюл.№30.

107. Пат. 2428043 Российская Федерация, МПК7 A23G3/00, A23G 3/48. Способ получения леденцовой карамели функционального назначения / Н. Ф. Иванкина, Н. А. Фролова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО

Дальневосточный государственный аграрный университет. – № 2010106596/13; заявл. 24.02.2010; опубл. 10.09.2011, Бюл. №25.

108. Пат. 2428171 Российская Федерация, МПК А61К 8/98, А61К 8/34, А61К 8/92, А61Q 11/02, А61Р 1/02. Состав лекарственной фитосубстанции с антимикробными и противовоспалительными свойствами «Дентос» / Н.Р. Шагалиева, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, С.Д. Колпакова, Н.А. Петрова, И.М. Байриков, Е.В. Даниленко, О.А. Шмелев; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. – № 2009143215/15, заявл. 25.11.2009; опубл. 10.09.2011, Бюл. № 25.

109. Пат. 2684782 Российская Федерация, МПК А61К 36/185, В01D 11/02, А61К 2121/00. Способ получения экстракта из цветков липы / Д.В. Веселова, Э.Ф. Степанова, А.М. Темирбулатова, В.В. Верниковский; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. – 2010106596/13; заявл. 29.03.18; опубл. 15.04.2019, Бюл.№11.

110. Плехова, Н.Г. Метаболическая активность нейтрофилов и моноцитов как модель для исследования биосовместимости организма с инородными материалами / Н.Г. Плехова, Л.М. Сомова, В.И. Пуздаев и др. // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 1. – С. 85–94.

111. Плотникова, И.В. Карамель профилактического назначения на патоке / И.В. Плотникова, И.В. Мызина, В.В. Трощенко // Символ науки. – 2016. – № 4–3 (16). – С. 118–120.

112. Позднякова, А.Ю. Фармакологическое изучение экстракта из соцветий липы сердцевидной как противоязвенного средства: дис. ... канд. фарм. наук: 14.03.05 / Позднякова Анастасия Юрьевна . – СПб, 2012. – 194 с.

113. Пшуков, Ю.Г. Разработка ресурсосберегающей технологии и норм качества на жидкие экстракты / Ю.Г. Пшуков, Т.А. Шаталова, Н.Н. Гужва, А.М. Домунян и др. // Фармацевтическая наука и практика в новых социально–экономических условиях: Научные труды. – 1997. – Т. 36. – Ч 1. – С. 157–161.

114. Растяпин, А.В. Разработка технологии и аппаратурного оформления процесса получения биологически активных экстрактов цветков липы

сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.) и травы зверобоя обыкновенного (*Hypericum perforatum* L.) Уральского региона: дис. ... канд. тех. наук: 05.21.03 / Растяпин Алексей Владимирович. – Екатеринбург, 2002. – 125 с.

115. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств Ч. 1 / под ред. А.Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. – 944с. ISBN: 978-5-8125-17667-0

116. Русинова, Т.В., Сравнительная оценка иммуотропных эффектов *in vitro* дерината и синтетического агониста TLR9 на рецепторную функцию нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в норме и при инфекционном процессе / Т.В. Русинова, Г.А. Чудилова, Н.В. Колесникова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 5 (160). – С. 94–97.

117. Саблина, О.С. Изучение цветовых характеристик таблеток, полученных на основе изомальта / О.С. Саблина, А.С. Гаврилов // материалы конференции с международным участием «Фармация и общественное здоровье», Екатеринбург, 21 декабря, 2012. - С. 132 – 134.

118. Самохина, Е.О. Возможности фитотерапевтической коррекции иммунодефицитных состояний / Е.О. Самохина // Врач. – 2009. – № 2. – С. 78–80

119. Самылина, И.А. Фармакогнозия: учебник / И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2013. – 976 с.

120. Сергеева, Е.О. Разработка состава, технологии и методов анализа сиропа для детей с кислотой янтарной / Е.О. Сергеева, Т.Ф. Маринина, Е.В. Компанцева, С.Г. Тираспольская, А.А. Потапова, М.А. Додохова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 92.

121. Сидоров, К.К. Методы определения острой токсичности и опасности химических веществ. (Токсикология) / К.К. Сидоров. – М.: Медицина, 1970.– 171с.

122. Синева, Т.Д. Сиропа: классификация, ассортимент, производители // Новая аптека. – 2008. – №2. – С. 64–70.

123. Сорокина, А. А. Использование спектрофотометрии при анализе промышленных образцов лекарственного растительного сырья / А. А. Сорокина,

А. И. Марахова, Н. Н. Федоровский, Т. И. Белоус // Фармация. – 2012. – № 4. – С. 43–44.

124. Сорокина, Т.С. История медицины: в 2 т.– Т.1: учебник для студ. Учреждений высш. Мед. образования // Т.С. Сорокина. – 13–е изд. – М.: Академия, 2018. – 288 с.

125. Степанова, Э.Ф. Разработка и анализ жидкого экстракта цветков липы / Э.Ф. Степанова, Д.В. Веселова, А.Г. Курегян, М.А. Огай, А.М. Темирбулатова, Т.С. Кочконян // Фармация. 2019. Т. 68. № 2. С. 33–38.

126. Струпан, Е.А. Пищевые красители из дикорастущего лекарственного сырья / Е.А. Струпан, Н.Н. Типсина, О.А. Струпан // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2008. – № 1. – С. 260–263.

127. Сухенко, Л.Т. Биологически активные вещества некоторых растений и механизмы их противомикробной активности / Л.Т. Сухенко // Естественные науки. – 2010. - № 3 (32). - С. 166-176.

128. Сысуев, Б.Б. Разработка технологии и исследование твердых скорректированных лекарственных форм с цветочной пылью: автореф. дис. ... канд.фарм.наук: 15.00.01 / Б.Б. Сысуев.–Пятигорск, 2001.–24с.

129. Сычев, И.А. Биологическая активность растительных полисахаридов / И.А. Сычев, О. В. Калинкина, Е.А. Лаксаева // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2009. – №4. – С. 143-148.

130. Тангиева, Т.А. Корректирование жидкой лекарственной формы препарата «Пантогам» для детей / Т.А. Тангиева, Ф.А. Мякиева, Г.А. Ким, Н.С. Назаренко // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2006. – № 2 (49). – С. 307

131. Темирбулатова, А.М. Разработка сиропа и технологические исследования на базе корней и корневищ родиолы розовой / Темирбулатова А.М., Степанова Э.Ф. //Успехи современного естествознания. – 2006. – №3. – С. 58–59.

132. Темирбулатова, А.М. Исследования по расширению спектра использования экстрактов родиолы розовой, липы сердцевидной и астрагала эспарцетного в медицинской практике / А.М. Темирбулатова, Э.Ф. Степанова,

Д.В. Веселова, Л.П. Лежнева // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2019. – Т. 5. – № 1. – С. 84–93. DOI: 10.18413/2313–8955–2019–5–1–0–6

133. Темирбулатова, А.М. Фармакотехнологические исследования композитного сиропа на основе растительного сырья / А.М. Темирбулатова, Э.Ф. Степанова, Л.П. Лежнева, З.Д. Хаджиева, Д.В. Веселова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – №1. – С. 130–133.

134. Тенцова, А.И. Корригирование жидких лекарств сиропами и эфирными маслами. / Аптечное дело. – 1963. – №1. — С.21–26.

135. Тенцова, А.И. Современное состояние вопроса о корригирующих веществах. / Аптечное дело. – 1960. – №4. – С. 68–75.

136. Тенцова, А.И. Улучшение вкуса лекарств путем применения различных корригирующих веществ /А.И. Тенцова, Г.С. Киселева/ Аптечное дело за рубежом. – 1968. – №2. – С.21–26.

137. Теоретические основы производства жидких экстрактов методом реперколяции с законченным циклом / И.А. Муравьев, Ю.Г. Пшуков// Пятигорск: Пятигорская типография им. Анджиевского, 1985. – 48 с.

138. Технический регламент Таможенного союза. Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств. ТР ТС 029/2012. [Электронный ресурс]. <http://www.consultant.ru/> (дата обращения 12.02.2018).

139. Тимофеев, Н.П. Сравнительная активность и эффективность растительных адаптогенов / Н.П. Тимофеев // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2016. – № 12. – С. 502–505.

140. Титова, А.В. Вспомогательные вещества, используемые в производстве лекарственных препаратов. Стандартизация и методы контроля: дис.... д-ра фармац. наук: 15.00.01 / Титова Анна Васильевна. – М., 2006. – 412 с.

141. Турова, А. Д. Лекарственные растения СССР и их применение / А.Д. Турова, Э. Н. Сапожникова. – М.: Медицина, 1984. — 304 с.

142. Тутелян, В.А. Лекарственные средства растительного происхождения и биологически активные добавки к пище. Оценка безопасности и стандартизация / В.А. Тутелян, Б.П. Суханов, К.И. Эллер, О.И. Соловьева, В.Л. Багирова, В.М. Булаев, И.А. Самыгина, Е.В. Ших, Т.А. Сокольская // Вопросы питания. – 2004. – Т.73. – №5. – С. 32-37.

143. Фаттахова, Г.А. Сапонины как биологически активные вещества растительного происхождения / Г.А. Фаттахова, А.В. Канарский // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17. – №3. – С. 196–202.

144. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система) / под ред. А.Г. Чучалина, А.Л. Хохлова. – М.:Видокс, 2017. – 847 с. ISBN: 978-5-9904876-9-7

145. Федорова, Е.П. Получение и анализ сиропа с биологически активными веществами растений / Е.П. Федорова, Н.В. Благоразумная // сб. науч. трудов «Естествознание и гуманизм». – 2006. – Т.3(1). – С. 36–39.

146. Федосеева, Г.М. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды: методическое пособие по фармакогнозии // Г.М. Федосеева, В.М. Мирovich, Е.Г. Горячкина, М.В. Переломова. – Иркутск: ИГМУ, 2009. - 67 с.

147. Физико–химические основы технологии кондитерских изделий: учебник. – 2–е изд., перераб. и доп. / А.В. Зубченко. – Воронежская гос. технол. акад. – Воронеж, 2001. – 389 с. ISBN: 5-89448-054-х

148. Фролова, Н.А. Разработка технологии и товароведная оценка карамели, обогащенной экстрактами из биологически активного растительного и животного сырья / Н.А. Фролова, И.Ю. Резниченко, Н.Ф. Иванкина // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – №4. – С. 1–6.

149. Хлонов, Ю.П. Липа сердцевидная *Tilia cordata* Mill / Ю.П. Хлонов // Ботанические исследования Сибири и Казахстана. – 2006. – С. 39–53.

150. Шайхынбекова, Р.М., Антиоксидантные свойства фитопрепаратов в условиях *in vitro* / Р.М. Шайхынбекова, Е.М. Рослякова, Л.М. Байболатова, Н.С.

Байжанова, А.Г. Бисерова // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 9-3. – С. 479-481.

151. Шалимов, С.Д. Разработка рецептуры диетической карамели / С.Д.Шалимов, М.А. Заикина // материалы международной научно–практической конференции «Проблемы конкурентоспособности потребительских товаров и продуктов питания», Курск, 5 апреля, 2019. - С. 318–324.

152. Шаталова, Т. А. Получение стабилизированных водных извлечений из плодов софоры, травы душицы, цветков липы / Т.А. Шаталова, А.Ю. Айрапетова, Л.А. Мичник, О.В. Мичник, И.И. Клишина // Известия Самарского научного центра РАН. – 2011. – №1–4. – С. 956-959.

153. Шаталова, Т.А. Разработка технологии и изучение биологического действия отхаркивающего сиропа / Т.А.Шаталова, А.Ю. Айрапетова, Л.П.Мыкоц, Е.О. Сергеева, Н.С. Ляхова, Е.Г. Доркина, Х.Н. Гюльбякова, С.Г. Тираспольская // Современные проблемы науки и образования. – 2013. - №4. – С.348. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9785> (дата обращения: 25.08.2017).

154. Швецова, А.В. Разработка леденцовой карамели без сахара и оценка ее качества / А.В. Швецова, Г.Б. Пищиков // Вестник ЮУрГУ. Серия Пищевые и биотехнологии. – 2016. – Т. 4. – № 3. – С. 64–70. DOI: 10.14529/food160308

155. Швецова, А.В. Разработка технологии плавления и изучение стабильности компонентов патокодержащих леденцов / А.В. Швецова, Г.Б. Пищиков // Аграрный вестник Урала. – 2016. – № 7 (149). – С. 87–92.

156. Шишкина, Д.И. Натуральный сахарозаменитель изомальт, его свойства и особенности, роль в функциональном питании / Д.И. Шишкина, Д.С. Бондаренко, Б.А. Баранов // Научные исследования: от теории к практике. - 2015. - Т.1. - № 4(5). - С. 224-226.

157. Шорохова, И. С. Статистические методы анализа: учеб. пособие / И. С. Шорохова, Н.В. Кисляк, О.С. Мариев // Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2015. – 300 с.

158. Экспериментальное моделирование дисфункций нейтрофильных гранулоцитов: Учебное пособие по дисциплине «Клиническая иммунология, аллергология» для аспирантов, соискателей и научных работников. / Н.В. Колесникова, Е.Ф. Филиппов, И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова и др. – Краснодар, 2018. – 82 с.

159. Яковлев, А.И. Биологическая активность гликуроногликана, выделенного из лекарственного сырья *Tilia cordata* / А.И. Яковлев, А.И. Конопля, П.П. Митченко, М.А. Буряк // Материалы V Всероссийского съезда фармацевтов, Ярославль, 15 - 16 сентября, 1987. – №5. – С. 453–454.

160. Яковлев, А.И. Полисахариды соцветий *Tilia cordata* / А.И. Яковлев // Химия природных соединений. – 1985. – №1. – С. 116–117.

161. Якусевич, Р. В. Разработка состава, технологии и норм качества скорректированной лекарственной формы – сиропа на основе пижмы обыкновенной (*TANACETUM VULGARE L.*): дис. ... канд. фармацевт. наук: 14.04.01 / Якусевич Роман Викторович. – Пятигорск, 2013. – 131 с.

162. Ясницкий, Б.Т. Корригенты запаха и вкуса в производстве лекарственных препаратов / Б.Т. Ясницкий, Е.Б. Дольберг, Т.В. Медведева // Химико–фармацевтическая промышленность. – 1987. – №9. – С. 17–24.

163. Andersen, Q. M. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications / Q.M. Andersen, K.R. Markham // Taylor & Francis Group, LLC, 2006. – 1198 p.

164. Aralbaeva, A.N. A composition of medicinal plants with an enhanced ability to suppress microsomal lipid peroxidation and a protective activity against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity / A.N. Aralbaeva, A.T. Mamataeva, R.S. Utegaliyeva, N.I. Zhaparkulova, M.K. Murzakhmetova, M. Khanin, M. Danilenko // Biomedicine & Pharmacotherapy. - 2017. - Vol. 96. - P. 1283–1291.

165. Barreiro Arcos, M. L. *Tilia cordata* Mill, extracts and scopoletin (isolated compound): differential cell growth effects on lymphocytes / M. L. Barreiro Arcos, G.Cremaschi, S. Werner, J. Coussio, G. Ferraro, C. Anesini // Phytotherapy research. – 2006. – Vol. 20(1). – P. 34–40.

166. Caillet, S. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants / S. Caillet, H.Yu, S.Lessard, G. Lamoureux, D. Ajdukovic, M. Lacroix // Food Chemistry. - 2007. – Vol. 100. – P. 542–552.

167. Cortjens, B. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection / B.Cortjens, S.A. Ingelse, J.C.Calis, A.P.Valar, L.Koendetman, R.A.Bem, J.B.van Woensel // Clinical immunology. – 2017. - Vol.176. - P. 100–106.

168. Fitsiou, I. Volatile constituents and antimicrobial activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller oils / I. Fitsiou, O. Tzakou, M. Hancianu A.Poiata // Journal of Essential Oil Research. – 2007. – Vol. 19(2). – P. 183–185.

169. Gan, R.–Y. Antioxidant activity and total phenolic content of medicinal plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases / R.–Y. Gan, X.-R. Xu, F.-L. Song, L. Kuang, H.-B. Li // Journal of Medicinal Plants Research. – 2010. – Vol. 4(22). – P. 2438–2444.

170. Georgiev, Y.N. Acidic polysaccharide complexes from purslane, silver linden and lavender stimulate peyer's patch immune cells through innate and adaptive mechanisms / Y.N. Georgiev, M.H. Ognyanov, P.N. Denev, M.G. Kratchanova, H. Kiyohara, H.Yamada, T.G.Batsalova, B.M. Dzhambazov, M. Ciz, O.Vasicek, A. Lojek, B.S.Paulsen, H.Barsett, D.Antonova // International Journal of Biological Macromolecules. - 2017. –Vol. 105. – P. 730–740.

171. Kobetičová, K. Artificial sweeteners and the environment / K.Kobetičová, K.A.Mocová, L.Mrháľková, Z. Fryčová, V. Kočí // Czech J. Food Sci. – 2016. – Vol. 34. – P.149–153.

172. Mantovani, A. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity / A. Mantovani, M.A. Cassatella, C. Costantini, S. Jaillon // Nat. Rev. Immunol. – 2011. - Vol.11. - № 8. – P. 519–531.

173. Manuele, M. G. Effect of *Tilia x viridis* flower extract on the proliferation of a lymphoma cell line and on normal murine lymphocytes: contribution of monoterpenes, especially limonene / M. G. Manuele, G. Ferraro, C. Anesini //Phytotherapy Research. – 2008. –Vol. 22(11). – P. 1520–1526.

174. Medvedeva, T. M. Composition investigation of the extracts from medicinal plant raw material with the aim to create new anti-inflammatory drugs / T. M. Medvedeva // Abstracts Book of IALS/BMEP students' conference, University of Massachusetts, 26–28 April 2013. – Boston, USA, 2013. –P. 34–35.

175. Medvedeva, T. M. Development of an extraction procedure of *Betula pendula* and *Tilia cordata* dry extract / T. M. Medvedeva // Abstracts Book of the 15th International Congress "PHYTOPHARM 2011", Nuremberg, Germany, 25–27 July 2011. – St. Petersburg, 2011. – P. 74.

176. Murthy, H.N. Biotechnological production of eleutherosides: current state and perspectives / H.N.Murthy, Y.S.Kim, M.I.Georgiev, K.Y. Paek // Appl Microbiol Biotechnol. – 2014. – Vol.98(17). – P.7319 – 7329. doi: 10.1007/s00253-014-5899-9.

177. Praczko, A. Free and glycosidic aroma compounds in inflorescences of *Tilia cordata* Mill. / A. Praczko, J. Gora // Herba Polonica. – 2001. – Vol. 47. – № 3. – P. 191–202.

178. Serafini, M. Flavonoids as anti-inflammatory agents / M. Serafini, I. Peluso, A.Raguzzini // Proceedings of the Nutrition Society. – 2010. – Vol. 69. – P. 273–278.

179. Shakhmurova, G. Phytoecdysteroids as promising immune stimulating agent / G. Shakhmurova, V. Sirov, A. Batirbekov // European Research. - 2016. - № 10 (21). - P. 88–90.

180. Vidal, J. P. Characterization of volatile compounds in linden blossoms *Tilia cordata* Mill. / J. P. Vidal, H. Richard // Flavour and Fragrance Journal. – 1986. – Vol. 1. – № 2. – P. 57–62.

181. Wojdylo, A. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs/ Wojdylo A., Oszmiński J., Czemerys R. // Food Chemistry.– 2007. - Vol. 105. – №3. – P. 940–949.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Протоколы лабораторных исследований микробиологической чистоты сиропа
липы

Ф94-ДП-02.02

**Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае»
Филиал Федерального бюджетного учреждения здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске»
Аккредитованный испытательный лабораторный центр**

Адрес: 357700 г. Кисловодск, ул. Стопани, 4
Телефон/факс: (87937) 6-55-96
ОКПО 76852088, ОГРН 1052600297595
ИНН/КПП 2636045473/262802001

АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ
РОСС RU.0001.511583 зарегистрирован в реестре
«28» сентября 2015 г.



Вр.и.о. главного врача Филиала ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в г. Кисловодске"

Е.В. Черенко

от « 20 » сентября 2018 г.

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ № 2669
от « 20 » сентября 2018 г.

1. Наименование пробы (образца):	1. Сироп с липой 1:18		
2. Заказчик:	Ф/л Кищенко Виктория Михайловна		
3. Дата и время отбора пробы (образца):	11.09.2018	10.00	
4. Дата и время доставки пробы (образца):	11.09.2018	12.00	
5. Цель отбора:	На соответствие: Государственной фармакопеи XIII издание от 01.01.2016 г., ОФС.1.2.4.0002.15		
6. Юридическое лицо, индивидуальный предприниматель или физическое лицо, у которого отбирались пробы (образцы):	Ф/л Кищенко Виктория Михайловна (наименование и юридический адрес) РФ 357500, Ставропольский край, г. Пятигорск		
7. Объект, где производился отбор пробы (образца):	Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ РФ 357500, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11		
8. Код пробы (образца):	1757.02.09.18 3-ЛФ		
9. Изготовитель:	--- (наименование, фактический адрес (страна, регион и т.д.))		
10. Дата изготовления:	---		
11. Номер партии:	не известен	12. Объем партии:	не известен
13. Тара, упаковка:	Стерильная посуда		
14. НД на методику отбора:	Государственная фармакопея XIII издание от 01.01.2016 г., ОФС.1.2.4.0002.15		
15. Акт отбора:	Акт отбора образцов (проб) от 11.09.2018 г.		
16. Условия транспортировки:	Автотранспорт		
17. Условия хранения:	н/у		
18. Дополнительные сведения:	Разовый договор №4190, 4198 от 11.09.2018 г.		
19. Лицо, ответственное за оформление данного протокола:	Т.Ю. Ватутина		
20. Руководитель (заместитель) ИЛЦ:	Л.Г. Еремкина		
	Подпись	Ф.И.О.	

Ксерокопирование, полная или частичная перепечатка протокола без разрешения филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске» запрещена и считается недействительной

Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае»
Филиал Федерального бюджетного учреждения здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске»
АККРЕДИТОВАННЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР

Адрес: 357700, г. Кисловодск, ул. Стопани, 4
Телефон/факс: (87937) 6-55-96
ОКПО 76852088, ОГРН 1052600297595
ИНН/КПП 2636045473/262802001

АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ
РОСС RU.0001.511583 зарегистрирован в реестре
«28» сентября 2015 г.

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

от 18 сентября 2018

Бактериологическая лаборатория

- Регистрационный номер в журнале: 6
- Наименование пробы (образца): сироп с липой 1:18
- Дата и время доставки пробы (образца): 11.09.2018 11.00
- Дата окончания исследований: 18.09.18
- Код пробы (образца): 1757.02.09.18 3-ЛФ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

(распространяются на образец, подвергнутый испытанию)

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ						
№ п/п	Определяемые показатели	Результаты исследований	Гигиенический норматив	Единицы измерения (для граф 3,4)	НД, регламентирующая объем исследований	НД на методы исследований
1	2	3	4	5	6	7
Проба №6 Код пробы: 1757.02.09.18 ПК-ПП Наименование пробы: сироп с липой 1:18						
6	Общее число аэробных микроорганизмов	менее $1 \cdot 10^1$	Не более $1 \cdot 10^4$	КОЕ в 1мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Общее число дрожжевых и плесневых грибов	не обнаружено	Не более 10^2	КОЕ в 1мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Энтеробактерии, устойчивые к желчи	Не обнаружено	Не более 10^2	КОЕ в 1мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Escherichia coli	Не обнаружено	Отсутствие	В 1 мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Salmonella spp.	Не обнаружено	Отсутствие	В 10 мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Staphylococcus aureus	не обнаружено	Отсутствие	В 1 мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15

Антимикробное действие препарата

6	Тест-штамм B subtilis	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Тест-штамм C.albicans	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Тест-штамм E. coli	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Тест-штамм S. aureus	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
6	Тест-штамм Ps.aeruginosa	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15

Исследования проводили:

Должность	Ф.И.О.	Подпись
Фельдшер-лаборант	Каспарьян К.В.	
Ответственный за оформление протокола	Шевченко СВ	
Врач-бактериолог, заведующая лабораторией	Ерёмкина Л.Г.	

Ф94-ДП-02.02

**Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае»
Филиал Федерального бюджетного учреждения здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске»
Аккредитованный испытательный лабораторный центр**

Адрес: 357700 г. Кисловодск, ул. Стопани, 4
Телефон/факс: (87937) 6-55-96
ОКПО 76852088, ОГРН 1052600297595
ИНН/КПП 2636045473/262802001

АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ
РОСС RU.0001.511583 зарегистрирован в реестре
«28» сентября 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ.

Вр.и.о. главного врача Филиала ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в г. Кисловодске"

Е.В. Черенко

от « 20 » сентября 2018 г.

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ № 2668
от « 20 » сентября 2018 г.

1. Наименование пробы (образца):	1. Сироп с липой 1:1		
2. Заказчик:	Ф/л Кищенко Виктория Михайловна		
3. Дата и время отбора пробы (образца):	11.09.2018	10.00	
4. Дата и время доставки пробы (образца):	11.09.2018	12.00	
5. Цель отбора:	На соответствие: Государственной фармакопеи XIII издание от 01.01.2016 г., ОФС.1.2.4.0002.15		
6. Юридическое лицо, индивидуальный предприниматель или физическое лицо, у которого отбирались пробы (образцы):	Ф/л Кищенко Виктория Михайловна (наименование и юридический адрес) РФ 357500, Ставропольский край, г. Пятигорск		
7. Объект, где производился отбор пробы (образца):	Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ МЗ РФ РФ 357500, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11		
8. Код пробы (образца):	1756.02.09.18 3-ЛФ		
9. Изготовитель:	--- (наименование, фактический адрес (страна, регион и т.д.))		
10. Дата изготовления:	---		
11. Номер партии:	не известен	12. Объем партии:	не известен
13. Тара, упаковка:	Стерильная посуда		
14. НД на методику отбора:	Государственная фармакопея XIII издание от 01.01.2016 г., ОФС.1.2.4.0002.15		
15. Акт отбора:	Акт отбора образцов (проб) от 11.09.2018 г.		
16. Условия транспортировки:	Автотранспорт		
17. Условия хранения:	н/у		
18. Дополнительные сведения:	Разовый договор №4190, 4198 от 11.09.2018 г.		
19. Лицо, ответственное за оформление данного протокола:	Т.Ю. Ватутина		
20. Руководитель (заместитель) ИЛЦ:	Л.Г. Еремкина		
	Подпись Ф.И.О.		

Ксерокопирование, полная или частичная перепечатка протокола без разрешения филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске» запрещена и считается недействительной

Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
 «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае»
 Филиал Федерального бюджетного учреждения здравоохранения
 «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае в городе Кисловодске»
 АККРЕДИТОВАННЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР

Адрес: 357700, г. Кисловодск, ул. Стопани, 4
 Телефон/факс: (87937) 6-55-96
 ОКПО 76852088, ОГРН 1052600297595
 ИНН/КПП 2636045473/262802001

АТТЕСТАТ АККРЕДИТАЦИИ
 РОСС RU.0001.511583 зарегистрирован в реестре
 «28» сентября 2015 г.

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

от 18 сентября 2018

Бактериологическая лаборатория

1. Регистрационный номер в журнале: 5
2. Наименование пробы (образца): сироп с липой 1:1
3. Дата и время доставки пробы (образца): 11.09.2018 11.00
4. Дата окончания исследований: 18.09.18
5. Код пробы (образца): 1756.02.09.18 3-ЛФ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

(распространяются на образец, подвергнутый испытанию)

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ						
№ п/п	Определяемые показатели	Результаты исследований	Гигиенический норматив	Единицы измерения (для граф 3,4)	НД, регламентирующая объем исследований	НД на методы исследований
1	2	3	4	5	6	7
Проба №5 Код пробы: 1756.02.09.18 ПК-ПП Наименование пробы: сироп с липой 1:1						
5	Общее число аэробных микроорганизмов	менее $1 \cdot 10^1$	Не более $1 \cdot 10^4$	КОЕ в 1мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Общее число дрожжевых и плесневых грибов	не обнаружено	Не более 10^2	КОЕ в 1мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Энтеробактерии, устойчивые к желчи	Не обнаружено	Не более 10^2	КОЕ в 1мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Escherichia coli	Не обнаружено	Отсутствие	В 1 мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Salmonella spp.	Не обнаружено	Отсутствие	В 10 мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Staphylococcus aureus	не обнаружено	Отсутствие	В 1 мл	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15

Антимикробное действие препарата

5	Тест-штамм B subtilis	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Тест-штамм C.albicans	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Тест-штамм E.coli	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Тест-штамм S.aureus	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15
5	Тест-штамм Ps.aeruginosa	Не изменена		интенсивность роста тест-штамма	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15	ГФ XIII, 2016 г ОФС.1.2.4.0002.15

Исследования проводили:

Должность	Ф.И.О.	Подпись
Фельдшер-лаборант	Каспарьян К.В.	
Ответственный за оформление протокола	Шевченко СВ	
Врач-бактериолог, заведующая лабораторией	Ерёмкина Л.Г.	

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Титульный лист лабораторного регламента на производство экстракта цветков
липы сердцевидной жидкого

2018 г.



Срок действия регламента до «10» Апрель 2023г.

ПЯТИГОРСК – 2018

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт технологической апробации экстракта цветков липы сердцевидной жидкого
1:1,8


ОАО «Флора Кавказа»

369260, КЧР, Урупский р-н, ст. Преградная, ул. Подгорная 62 а
 ОГРН 1060912008970, ИНН/КПП 0912001280/091201001
 АО АКБ «ТЕКСБАНК» в г. Черкеске
 Р/с 40702810000000009457
 К. счет: 30101810500000000845
 БИК 049133845
 ОКВЭД 24.42.1 ОКПО 96203653
 Web-сайт: www.flora-kavkaza.ru, e-mail: info@flora-kavkaza.ru
 Бухгалтерия (87876) 6-14-32, e-mail: Buh@flora-kavkaza.ru
 Отдел сбыта и снабжения (878-76) 6-10-68, e-mail:
Prodaja@flora-kavkaza.ru

АКТ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ АПРОБАЦИИ

Предмет апробации: Нарботка опытной партии экстракта липы сердцевидной жидкого 1:1,8.

Кем предложен: аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Веселовой Д.В. Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России под руководством д.ф.н., профессора кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России – Степановой Э.Ф.

Где и кем был апробирован: 369260, КЧР, Урупский р-н, ст. Преградная, ул. Подгорная, 62а, ООО «Флора Кавказа».

Цель апробации: Расширение ассортимента и структуры выпускаемой продукции ООО «Флора Кавказа».

Результаты апробации: Показана технологическая рациональность лекарственного препарата. Представленные материалы удовлетворяют требованиям для промышленного производства и гарантируют воспроизводимость технологии и достоверность научных результатов.

Эффективность апробации: Предложенное средство включено в перспективный план к промышленному освоению в 2019-2020 гг.

Генеральный директор
 ООО «Флора Кавказа»



Т.С. Кочкаров

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Акт технологической апробации сиропа липы



369260, КЧР, Урупский р-н, ст. Преградная, ул. Подгорная 62 а
ОГРН 1060912008970, ИНН/КПП 0912001280/091201001
АО АКБ «ТЕКСБАНК» г.Черкесск
Р/с 40702810000000009457
К. счет: 30101810500000000845
БИК 049133845
Web-сайт: www.flora-kavkaza.ru, e-mail: info@flora-kavkaza.ru
Бухгалтерия (87876) 6-14-32, e-mail: Buh@flora-kavkaza.ru
Отдел сбыта и снабжения (878-76) 6-10-68, e-mail: Prodaja@flora-kavkaza.ru

Предмет апробации: Нарботка опытной партии сиропа на основе экстракта цветков липы сердцевидной жидкого 1:1,8.

Кем предложен: аспирантом кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Веселовой Д.В. Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России под руководством д.ф.н., профессора кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России – Степановой Э.Ф.

Где и кем был апробирован: 369260, КЧР, Урупский р-н, ст. Преградная, ул. Подгорная, 62а, ОАО «Флора Кавказа».

Цель апробации: Расширение ассортимента и структуры выпускаемой продукции ОАО «Флора Кавказа».

Результаты апробации: Показана технологическая рациональность лекарственного препарата. Проведенные работы показали перспективность использованного способа получения сиропа и воспроизводимость предложенной технологии.

Эффективность апробации: Предложенное средство включено в перспективный план к промышленному освоению в 2019-2020 гг.

Генеральный директор
ООО «Флора Кавказа»



Т.С. Кочкаров

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Акты внедрения результатов диссертационного исследования



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4 тел. (861) 268-36-84 факс (861) 268-32-84 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК 040349001

№ _____ от " ____ " _____ 20 ____ г.

на № _____ от " ____ " _____ 20 ____ г.

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по
научно-исследовательской
работе ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России

А.Н. Редько

« 18 » _____ 2019 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Наименование научно-исследовательской работы: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук «Разработка ресурсосберегающей технологии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и лекарственных форм на его основе», выполненная в Пятигорском медико-фармацевтическом институте (ПМФИ) – филиале ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России на кафедре фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии.
2. Научный руководитель: профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор Э.Ф. Степанова.
3. Исполнитель: аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России Д.В. Веселова.
4. Наименование учреждения, внедрившего разработку и дата внедрения: ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, центральная научно-исследовательская лаборатория.
5. Основные результаты внедрения, их практическая и теоретическая значимость: разработанные в диссертационном исследовании методологические подходы к выбору критериев и способов оценки качества экстрактов, а также методики исследования иммунологической активности биологически активных веществ используются в научных работах, направленных на выявление механизмов активации клеток иммунной системы.

Заведующий центральной
научно-исследовательской
лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России,
к.м.н.

Автор

К.И. Мелконян

Д.В. Веселова



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4 тел. (861) 268-36-84 факс (861) 268-32-84 e-mail: corpus@ksma.ru
ИНН 2309023448 КПП 230901001 БИК 040349001

№ _____ от " ____ " _____ 20 ____ г.

на № _____ от " ____ " _____ 20 ____ г.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор

ФГБОУ ВО КубГМУ

Минздрава России

С. Н. Алексеев

« 18 » _____ 2019 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Наименование научно-исследовательской работы: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук «Разработка ресурсосберегающей технологии липы сердцевидной цветков экстракта жидкого и лекарственных форм на его основе», выполненная в Пятигорском медико-фармацевтическом институте (ПМФИ) – филиале ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России на кафедре фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии.
2. Научный руководитель: профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор Э.Ф. Степанова.
3. Исполнитель: аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России Д.В. Веселова.
4. Наименование учреждения, внедрившего разработку и дата внедрения: ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармации.
5. Основные результаты внедрения, их практическая и теоретическая значимость: результаты диссертационного исследования используются в лекционном курсе и при проведении практических занятий со студентами фармацевтического факультета в рамках преподавания дисциплины «Фармацевтическая технология» по теме «Жидкие экстракты».

Заведующий кафедрой фармации
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
д.ф.н., профессор

Автор

А.М. Сампиев

Д.В. Веселова