

ИСАЙКИНА НАДЕЖДА ВАЛЕНТИНОВНА

**Разработка иммунокорректирующего растительного сбора
и его стандартизация**

15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Томск – 2003

Работа выполнена на кафедре фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Сибирского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: – доктор фармацевтических наук,
профессор Калинкина Галина Ильинична

Официальные оппоненты: - доктор фармацевтических наук,
профессор Краснов Ефим Авраамович
- доктор медицинских наук,
профессор Пашинский Виталий Глебович

Ведущая организация: Самарский государственный медицинский
университет

Защита диссертации состоится « 20 » июня 2003 г.
в 14⁰⁰ час. на заседании Диссертационного совета Д 208.096.04
при Сибирском государственном медицинском университете по адресу:
634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2/7

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Сибирского государственного медицинского университета по адресу:
пр. Ленина, 107

Автореферат разослан « 19 » мая 2003 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 208.096.04
доктор химических наук, профессор

М.С. Юсубов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Неблагоприятные факторы внешней среды в виде ее загрязнения ксенобиотиками, попавшими в пищу, рост потребления различных лекарственных препаратов, респираторные и другие инфекции снижают иммунологическое здоровье населения. В норме иммунная система защищает организм от всех антигенно - чужеродных веществ как экзогенной, так и эндогенной природы, поддерживая тем самым структурную и функциональную целостность организма на протяжении всей его жизни. В результате сложившейся неблагоприятной обстановки для здоровья людей существует необходимость в иммунокоррекции, которая осуществляется благодаря применению лекарственных средств.

Препараты для иммунокоррекции представляют собой класс синтетических, биотехнологических и природных веществ, способных влиять на различные звенья иммунной системы и вследствие этого изменять силу, характер и направленность иммунных реакций. Перечисленные классы препаратов кроме основного действия имеют существенные побочные эффекты, одним из которых является непредсказуемая аллергическая реакция. Использование средств, полученных из тканей животных, ограничено из-за возможного присутствия в них прионов. Кроме того, некоторые иммуностропные препараты способны вызывать аутоиммунные расстройства. Растительные иммунокорректоры, имея в своем составе комплекс биологически активных веществ (БАВ), уступают по силе действия препаратам синтетического и биогенного происхождения, но обладают рядом преимуществ. Это не только мягкое действие, но и низкая токсичность и аллергогенность, комплексное воздействие на организм.

В этом отношении наибольший интерес представляют препараты на основе БАВ эхинацеи пурпурной, применяемые как у нас в стране, так и за рубежом. Их ассортимент на фармацевтическом рынке России весьма ограничен, в основном это дорогостоящие импортные лекарственные средства: иммунал (Словения); настойка доктора Тайса (Германия); эхинацея композитум С (Германия); эхинабене (Германия); эхинацея гексал (Германия); эхинацин ликвидум (Германия) и ряд других. Поэтому существует потребность в разработке более дешевых отечественных препаратов как на основе эхинацеи пурпурной, так и других лекарственных растений.

Разработка целой серии новых лекарственных средств на основе растительного сырья эхинацеи пурпурной и родиолы розовой осуществляется в Самарском государственном медицинском университете и Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). Однако, очень ограниченный ассортимент иммунокорректирующих средств, в том числе и на основе эхинацеи, не может удовлетворить все возрастающую потребность населения в иммунокорректирующих средствах. Кроме того, учитывая сложность и многогранность процесса нарушений иммунитета, возникает необходимость в создании комплексных лекарственных средств, действие которых будет направлено на все звенья иммунокоррекции.

Поэтому расширение ассортимента препаратов с более высокой степенью иммунокорректирующей активности является весьма актуальной задачей.

Цель диссертационной работы состоит в разработке научно-обоснованной прописи лекарственного растительного сбора, обладающего комплексным иммунокорректирующим действием.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- дать краткую характеристику проблемы иммунодефицита и современных лекарственных средств, используемых при данной патологии;
- составить пропись и обосновать компонентный состав иммунокорректирующего сбора на основе официальных видов лекарственного растительного сырья (ЛРС);
- разработать методики идентификации и стандартизации лекарственного растительного сбора;
- получить рациональный экстракционный препарат из растительного сбора и провести его стандартизацию;
- провести исследование иммунокорректирующих свойств и безвредности экстракционного препарата;
- разработать проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на лекарственный растительный сбор.

Научная новизна работы. На основании анализа банка данных литературы и собственных исследований разработана пропись лекарственного растительного сбора «Эхиносол», обладающего комплексным иммунокорректирующим действием.

Установлен качественный и количественный состав основных БАВ сбора «Эхиносол» и полученного из него водно-спиртового экстракта.

Предложены показатели определения доброкачественности сбора «Эхиносол», включенные в проект ФСП.

Для идентификации сбора «Эхиносол» предложены внешние и микроскопические диагностические признаки входящих в него ингредиентов.

Разработаны методики качественного обнаружения и количественного определения основных групп БАВ сбора «Эхиносол»: фенолкарбоновых кислот (ФКК) и полисахаридов, включенные в нормативную документацию.

Обоснован рациональный метод получения экстракта из сбора «Эхиносол» и проведена его стандартизация по общепринятым показателям и содержанию ФКК. Иммунологическими и бактериологическими исследованиями установлено иммунокорректирующее и антимикробное действие жидкого экстракта «Эхиносол». Кроме того, установлена его безвредность. Разработана рациональная лекарственная форма на основе экстракта из сбора «Эхиносол» – водорастворимые гранулы и методика контроля их качества.

Практическая значимость работы. Теоретические и экспериментальные исследования показали целесообразность использования предложенного сбора

«Эхиносол» и экстракционного препарата на его основе в качестве нового иммунокорректирующего средства.

Разработан проект ФСП на лекарственный растительный сбор «Эхиносол». Предложена оптимальная технология получения экстракта из сбора «Эхиносол» и гранул на его основе.

Теоретическая и практическая значимость исследований защищена патентом РФ «Лекарственное средство, обладающее иммунокорректирующим действием».

Жидкий экстракт и водорастворимые гранулы из сбора «Эхиносол» по результатам иммунологических исследований могут быть рекомендованы для углубленного фармакологического исследования в качестве эффективных иммунокорректирующих средств.

На защиту выносятся результаты теоретического и экспериментального обоснования нового лекарственного растительного сбора «Эхиносол» и экстракционного препарата на его основе, обладающего иммунокорректирующим действием.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на научно-практической конференции, посвященной XX – летию фармацевтического факультета КГМА «Фармацевтическая наука и практика» (Кемерово, 1999); Южносибирской Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири» (Абакан, 1999); Международной научной конференции «Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности» (Томск, 2000); 60-ой Юбилейной студенческой научной конференции Н.И. Пирогова (Томск, 2001); Всероссийской конференции «Лекарственные средства и пищевые добавки на основе растительного сырья» (Бийск, 2001).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 статей и тезисов докладов, получен патент на изобретение.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Сибирского государственного медицинского университета и комплексной целевой программой СО АМН Российской Федерации «Здоровье человека в Сибири» (№ Государственной регистрации 01.9.2002479).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав экспериментальной части, выводов, указателя литературы и приложения. Материал изложен на 168 страницах, список литературы включает 149 источников, из них 21 на иностранном языке. Работа иллюстрирована 36 рисунками и 19 таблицами.

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, охарактеризованы научная новизна и практическая значимость работы.

В обзоре литературы (глава 1) приведен краткий анализ проблемы иммунодефицита, характеристика иммунокорректирующих средств

синтетического и биогенного происхождения. Показаны перспективы получения иммунокорректирующих средств на основе лекарственного растительного сырья.

Вторая глава посвящена характеристике объектов и методов исследования.

В третьей главе дается теоретическое обоснование компонентного состава иммунокорректирующего сбора «Эхиносол»; результаты исследования химического состава и методик определения подлинности и доброкачественности сбора.

Четвертая глава посвящена разработке рациональной технологии получения жидкого экстракта сбора и гранулированной лекарственной формы на его основе, методик их стандартизации. Приведены результаты экспериментального исследования иммунокорректирующих свойств сбора «Эхиносол».

В приложении представлен проект ФСП «Сбор Эхиносол».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методики исследования

Подбор компонентов сбора «Эхиносол» осуществляли, учитывая природу биологически активных веществ и поливалентный патогенез заболеваний иммунной системы. Консультативную помощь в обосновании компонентов сбора нам оказывал заведующий кафедрой иммунологии и аллергологии СГМУ профессор В.В. Климов, за что мы ему искренне благодарны. Сбор «Эхиносол» состоит из 6 видов лекарственного растительного сырья: основным компонентом предлагаемого сбора является трава эхинацеи пурпурной, другие ингредиенты также разрешены к применению в медицине, а трава солянки холмовой используется для получения биологически активной добавки «Лохеин».

Качественный состав и количественное содержание БАВ, содержащихся в сборе, оценивали с использованием современных методов фитохимического анализа: хроматографического, УФ-спектрального, спектрофотометрического и др. Для идентификации сырья в сборе использовали макро- и микроскопические методы. При разработке экстракционной лекарственной формы использовали современные технологические методики.

Экспериментальное исследование иммунокорректирующей эффективности сбора «Эхиносол» проводили в ЦНИЛ СГМУ под руководством старшего научного сотрудника Т.В. Перевозчиковой, за что выражаем ей искреннюю признательность и благодарность. Токсико-фармакологические исследования проводили с использованием принятых для этих целей методик и моделей. В эксперименте использовали 162 мыши.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятым методом с определением средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m). Достоверность результатов оценивали параметрически по t-критерию Стьюдента. Кроме того, использовали пакет статистических программ «Statistica for Windows 7.0».

Разработка компонентного состава сбора «Эхиносол» и методик его идентификации и стандартизации

Учитывая требования, предъявляемые к иммунокорректорам, а так же потребность в дешевых отечественных препаратах, обладающих комплексным иммунокорригирующим действием, нами на основании банка данных литературы и опыта использования официальных лекарственных растений в клинической практике был разработан растительный сбор. Для этого нами был выбран ряд лекарственного растительного сырья, такие как трава эхинацеи пурпурной, трава солянки холмовой и другие. При подборе компонентов учитывали способность БАВ растений влиять на основные звенья иммунитета и сопряженные системы организма.

Так, трава эхинацеи пурпурной выбрана нами из-за уникальной способности БАВ (фенилпропаноидов и полисахаридов) эхинацеи пурпурной оказывать целенаправленное действие на иммунную систему человека, тем самым, усиливая защитные функции организма.

Выбор листьев крапивы связан, главным образом, с содержанием в ней витаминов, хлорофилла и солей железа, которые нормализуют в организме человека липидный обмен и оказывают стимулирующее действие на эритропоэз. Кроме того, БАВ листьев крапивы обладают желчегонным и противовоспалительным действием, повышают процессы регенерации слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, а содержащийся в значительном количестве в листьях крапивы хлорофилл оказывает стимулирующее и тонизирующее действие, усиливает основной обмен веществ.

БАВ травы череды стимулируют функцию надпочечников, повышают секрецию кортизола, вызывая противовоспалительный и противоаллергический эффекты.

Лечебное действие ламинарии обусловлено в первую очередь наличием в ней органических соединений йода. Йод улучшает ассимиляцию белка, усвоение фосфора, кальция и железа, активирует ряд ферментов. Под влиянием йода уменьшается вязкость крови, понижается тонус сосудов и АД. Полисахариды ламинарии, в частности альгиновая кислота, обладают гидрофильностью и адсорбционной способностью, поглощают различные эндо- и экзогенные токсины из кишечника, оказывая мягкое слабительное действие.

Выбор солянки холмовой связан, главным образом, с ее гепатопротективными свойствами, обусловленными комплексом биологически активных веществ, важнейшими из которых являются: глицин бетаин, флавоноиды, стерингликозиды, соли органических кислот, алкалоиды (преимущественно изохинолиновой структуры).

Листья березы были выбраны нами из-за ее способности оказывать умеренное желчегонное и мочегонное действие (эфирное масло, флавоноиды). Немаловажны антимикробные и противогрибковые свойства листьев березы. Однако, клиницисты отмечают, что наряду с пылью березы, являющейся потенциальным аллергеном, в некоторых случаях и экстракты из листьев

березы проявляют аллергические свойства. Поэтому в дальнейшем данное сырье было нами исключено из сбора.

Подобным образом нами были выбраны и другие компоненты сбора.

Таким образом, анализ данных литературы по химическому составу и фармакологическим свойствам около 30 растений, позволил нам обосновать рациональность их использования в составе иммунокорректирующего сбора. Предлагаемый нами сбор получил название «Эхиносол».

Соотношение компонентов в сборе обусловлено их значимостью в формировании иммунокорректирующего эффекта данного лекарственного средства. Так, действующим «ядром» сбора стала эхинацея пурпурная, а другие компоненты сбора были введены нами в равных частях из-за равноценности действия на все звенья иммунитета и сопряженные системы организма. Последующие иммунологические испытания подтвердили эффективность данной прописи сбора.

Химический состав компонентов сбора является достаточно изученным и позволяет обеспечить действительно комплексное иммунокорректирующее действие предлагаемого сбора на все звенья патологии иммунитета (рис. 1). Однако в задачу нашего исследования входит не только разработка сбора, но и методов его стандартизации. Для чего необходимо было провести качественный и количественный анализ основных групп БАВ сбора и выбрать главные действующие вещества, по которым будет проводиться его стандартизация.

Исследование химического состава сбора «Эхиносол»

Как уже отмечалось, в задачу нашего исследования входила не только разработка лекарственного растительного сбора, но и методик его стандартизации. Для чего необходимо было провести качественный и количественный анализ основных БАВ сбора и выбрать главные действующие вещества, по которым будет проводиться его стандартизация.

Для исследования химического состава сбора использовали общепринятые методы, а так же методики качественного и количественного анализа БАВ по нормативным документам компонентов сбора.

Для получения общего представления о присутствии основных БАВ в сборе, содержащихся в отдельных видах сырья, нами проведен анализ спиртового экстракта сбора «Эхиносол» методом ВЭЖХ на хроматографе «Миллихром А-02» (рис. 2а-е). Анализ рисунков показывает, что, действительно, основные БАВ сбора и его компонентов соответствуют.

Фенольные соединения исследовали методом двумерной хроматографии, который показал, что экстракт сбора Эхиносол содержит не менее 11 веществ фенольной природы, представленные агликонами и гликозидами флавоноидов, ФКК, кумаринами.

Качественное обнаружение ФКК проводили хроматографическим и спектрофотометрическим методами. Хроматографическое исследование проводили методом ТСХ в 30%-ом растворе кислоты уксусной восходящим способом с достоверным образцом цикориевой кислоты – основным компонентом травы Эхинацеи. Детектированием при длине волны 360 нм отмечена наибольшая интенсивность для голубого пятна с $R_f=0,50$. УФ-спектр ФКК имеет характерные максимумы поглощения 290 и 325 нм.

Присутствие остальных групп БАВ (флавоноидов, кумаринов, дубильных веществ, сапонинов, витаминов, бетаинов) было доказано с помощью общепринятых реакций.

Кроме того, исследовали элементный состав сбора Эхиносол, т. к. минеральные компоненты, обладая высокой биологической активностью, играют существенную роль в фармакологических свойствах сбора.

Определение химических элементов проводили нейтронно-активационным анализом. По результатам определения макро- и микроэлементов можно сказать, что минеральный состав сбора представлен не менее 30 химическими элементами, из которых в наибольшем количестве накапливаются такие жизненно важные элементы, как цинк, железо, кальций и селен, участвующие в процессе иммунокоррекции.

Количественное определение БАВ показало (рис. 3), что наибольшую значимость с точки зрения содержания в сборе, а также роли в иммунокорректирующих свойствах, представляют фенолкарбоновые кислоты и полисахариды. Данные группы БАВ предложены нами для оценки качества сбора при его стандартизации. В связи с этим, нами были предложены методики

качественного обнаружения и количественного определения ФКК и ПС, включенные в проект фармакопейной статьи.

Разработка методик стандартизации сбора «Эхиносол»

Для определения подлинности сбора использовали методики обнаружения фенолкарбоновых кислот по УФ-спектру спиртового экстракта и хроматографическому поведению в тонком слое сорбента на пластинках «Силуфол» в сравнении с достоверным образцом цикориевой кислоты.

Количественное содержание фенолкарбоновых кислот в сборе определяли, как и в надземной части эхинацеи пурпурной, по сумме фенолкарбоновых кислот в пересчете на цикориевую кислоту прямым спектрофотометрированием (рис. 4). При разработке методики анализа отработывали степень измельчения сырья, условия экстракции, в качестве экстрагента использовали этанол различной концентрации. Оптимальными параметрами методики являются: кипящая водяная баня; экстрагент - 40%-ый этанол, так как позволяет наиболее полно извлечь фенолкарбоновые кислоты из сбора; время экстракции - 45 минут; измельченность сбора - 1 мм; соотношение сырья и экстрагента 1: 50, при однократной экстракции. Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в образцах сбора колебалось от 2,14% до 3,12%. В проекте ФСП норма содержания суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на цикориевую кислоту составляет не менее 2,00 %.

Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95,00% находится в пределах $\pm 0,17$. Ошибка методики составляет не более 5%.

Хроматограмма спиртового извлечения сбора «Эхиносол»

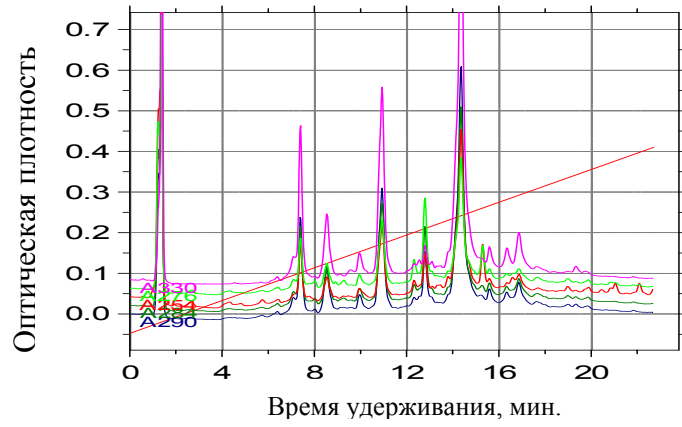


Рис. 2 а.

**Хроматограмма спиртового извлечения
травы эхинацеи пурпурной**

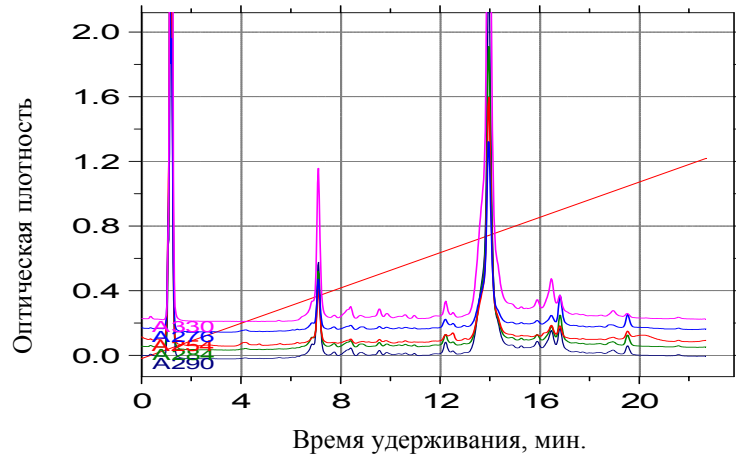


Рис. 2 б.

Хроматограмма спиртового извлечения травы череды

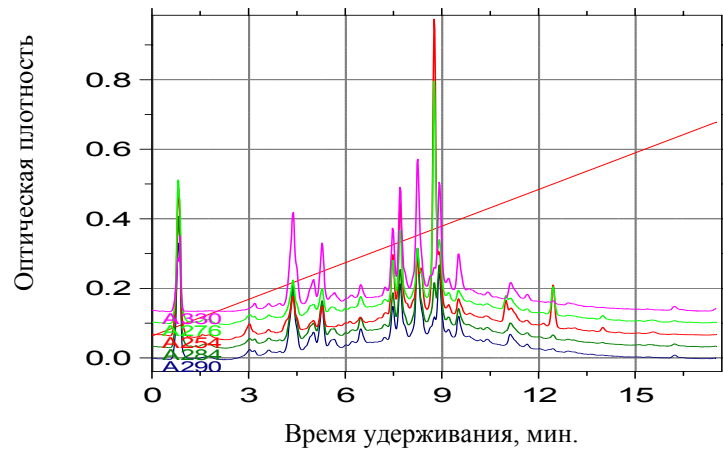


Рис. 2 в.

Хроматограмма спиртового извлечения травы солянки холмовой

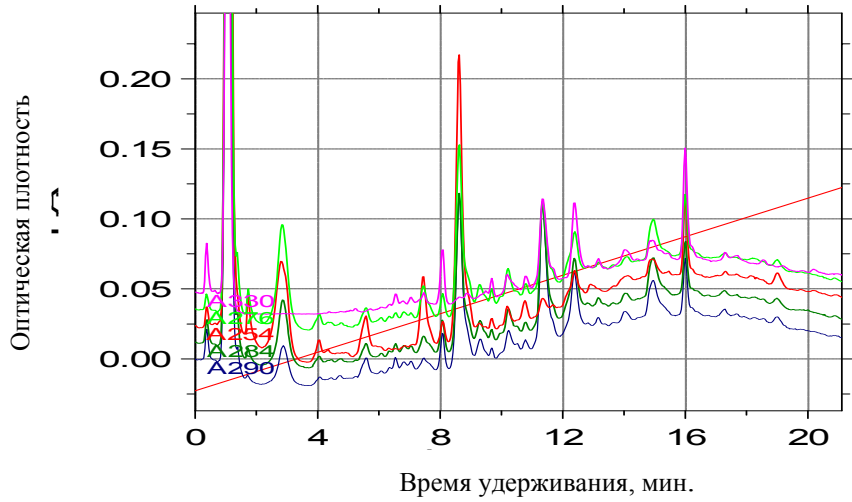


Рис. 2 г.

Хроматограмма спиртового извлечения листьев крапивы

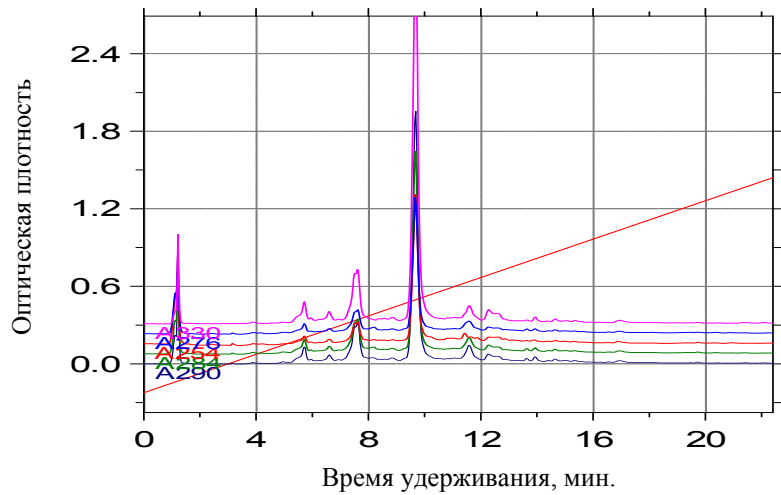


Рис. 2 д.

Хроматограмма спиртового извлечения корней солодки

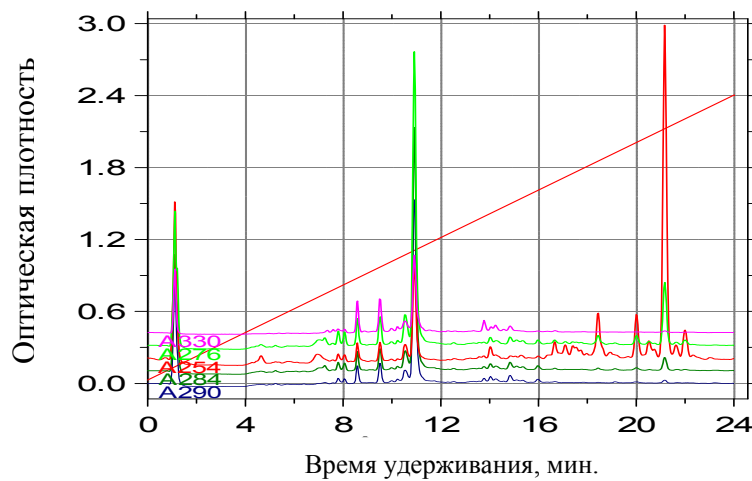
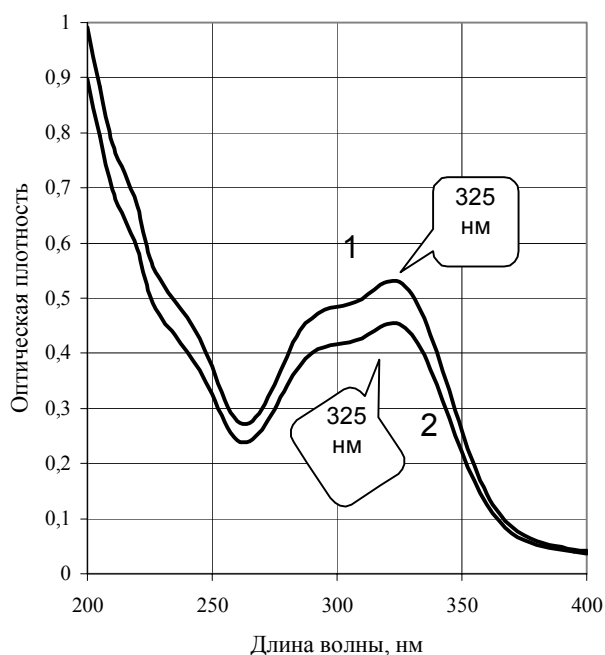


Рис. 2 е

УФ – спектры спиртовых извлечений из травы эхинацеи пурпурной и сбора «Эхиносол»



1 – УФ-спектр спиртового извлечения (40% этанол) из травы эхинацеи пурпурной
2 – УФ-спектр спиртового извлечения (40% этанол) из сбора «Эхиносол»

Рис. 4.

Содержание водорастворимых полисахаридов определяли гравиметрическим методом. Их содержание в сборе колебалось от 9,80% до 10,83%. В проекте ФСП норма содержания суммы водорастворимых полисахаридов составляет не менее 9,00 %. Метрологическая характеристика методики, показала, что относительная ошибка определения при доверительной вероятности 95,00% находится в пределах $\pm 0,18$. Ошибка методики составляет 1,68%.

В связи с тем, что сбор рекомендуется для получения препаратов методом экстракции водно-спиртовым раствором, представляло практический интерес определение оптимального экстрагента, позволяющего извлечь максимальное количество экстрактивных веществ. На основании полученных данных рекомендуем проводить получение экстракционных препаратов из сбора «Эхиносол» 40%-ным этанолом. В проекте ФСП этот показатель будет составлять не менее 20,00%.

Для оценки качества сбора «Эхиносол» нами определены его основные товароведческие показатели по методикам Государственной фармакопеи 11 издания (влажность, зольность, примеси и измельченность).

Изучение морфологических и микроскопических признаков сбора

Кроме разработанных числовых показателей и методик качественного обнаружения и количественного определения БАВ нами изучены и определены

морфологические и микроскопические признаки сбора, включенные в проект ФСП.

Изучение внешних признаков сбора проводили в 2 этапа: в начале осматривали невооруженным глазом, отмечая общую структуру, цвет и запах растительной смеси; вкус водного извлечения. Затем сбор изучали под стереомикроскопом, выделяя все составляющие каждого компонента и детально их характеризую. При этом все компоненты сбора четко диагностируются по характерным видовым и групповым признакам.

Микроскопические признаки сбора «Эхиносол» установлены на основании анатомического исследования его компонентов. Для микроскопического исследования использовали как общепринятые методики, так и разработанные нами приемы подготовки препаратов. Препараты исследовали под микроскопом МИКМЕД – 1 (увеличения 7x1,5x8; 7x1,5x40), фотографировали фотоаппаратом «Зенит» с помощью фотонасадки МФН-3 и цифровым фотоаппаратом «LG». Негативы сканировали и обрабатывали на компьютере в программе «Photoshop 7.0».

Диагностические признаки всех компонентов определялись и соответствовали описанию в частных статьях ГФ Х, XI и ВФС. Кроме того, детальное исследование препаратов эхинацеи пурпурной позволило уточнить ее диагностические признаки. В результате проведенного микроскопического и гистохимического исследования нами выявлен ряд признаков, которые наиболее достоверно определяют присутствие каждого компонента сбора (диагностически значимые признаки).

Получение экстракционного препарата из сбора «Эхиносол», его стандартизация

Для выбора рационального метода получения экстракта из сбора «Эхиносол» нами был проведен сравнительный анализ влияния экстрагента и степени измельчения сырья на выход биологически активных веществ.

При выборе экстрагента нами изучена динамика извлечения фенолкарбоновых кислот и экстрактивных веществ из сбора водой, 40% и 70% этанолом. Определение суммы экстрактивных веществ проводили по методике Ю.Г. Пшукова. Экстрагирование проводили в течение 4-х часов со степенью измельчения сырья 0,25 мм. Результаты полученных исследований показали, что наиболее рациональным экстрагентом является 40%-й этанол.

При изучении влияния степени измельчения растительного сбора на выход ФКК и ЭВ использовали сбор, измельченный до следующих размеров частиц: 2, 3 и 5 мм. В ходе исследований использовали ту же методику, что и при выборе оптимального экстрагента, с той лишь разницей, что в качестве экстрагента применяли 40% этанол, а степень измельчения сбора варьировала в указанных пределах. Результаты проведенных исследований показали, что при разработке технологии жидкого экстракта наиболее целесообразно использовать степень измельчения сбора 3 мм.

Для изучения полноты и скорости экстрагирования, определения расходных норм сбора и экстрагента, а также для управления процессом

экстрагирования были определены следующие технологические свойства сбора: содержание ФКК и влажность сбора, содержание экстрактивных веществ, доброкачественность сырья, насыпная масса, коэффициенты наполнения сухого и набухшего сырья, коэффициент вытеснения, коэффициент образования внутреннего сока и коэффициент поглощения. С помощью полученных коэффициентов наполнения сухого и набухшего сырья осуществляли подбор рабочего объема диффузоров. Основываясь на данных литературы и используя коэффициенты вытеснения, образования внутреннего сока, поглощения сырья и насыпную массу, определяли количество экстрагента, необходимое для настаивания и перколяции.

Кроме того, нами изучена возможность получения жидкого экстракта методами перколяции, реперколяции и мацерации с динамизацией процесса экстрагирования и исследовано влияние способа экстрагирования на выход суммы фенолкарбоновых кислот и экстрактивных веществ. Наибольший выход суммы фенолкарбоновых кислот был отмечен в жидком экстракте, полученном реперколяцией, при этом по действующим веществам сырье истощается на 81,79% и только на 78,04% по экстрактивным веществам. В результате проведенных исследований нами была предложена технология получения жидкого экстракта методом реперколяции по Н.А. Чулкову.

Стандартизацию готового экстракта проводили по внешнему виду, содержанию этанола, сухому остатку и сумме фенолкарбоновых кислот в пересчете на цикориевую кислоту. При анализе пяти опытных образцов экстракта содержание суммы фенолкарбоновых кислот в них составляло не менее 0,11%.

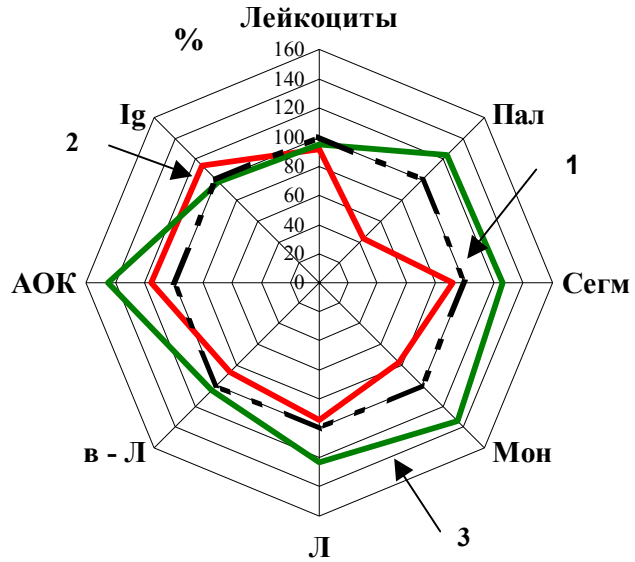
Для стандартизации экстракта по БАВ использовали принцип сквозной стандартизации: лекарственное сырье – субстанция – лекарственная форма.

Оценка иммунокорригирующей эффективности жидкого экстракта «Эхиносол»

В эксперименте определяли влияние растительного экстракта на индуктивную и продуктивную фазы иммунного ответа, формирование гуморальной иммунной памяти, Т-клеточный иммунный ответ- ГЗТ, факторы неспецифической резистентности.

В ходе проведенных экспериментов установлено, что жидкий экстракт влияет на первоначальные этапы иммунного ответа: увеличивает количество АОК в селезенке и синтез иммуноглобулинов в индуктивную фазу иммунного ответа, стимулирует выход лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов в кровь, миграцию моноцитов в перитониальный экссудат, экспрессию С3b- и Fcγ – рецепторов на макрофагах и поглотительную способность через эти рецепторы. Кроме того, повышает переваривающую активность нейтрофилов. В отличие от препарата «Иммунал», оказывающего влияние только на формирование Т-клеток предшественников, жидкий экстракт «Эхиносол» стимулирует образование зрелых Т – клеток эффекторов (рис. 5 – 8).

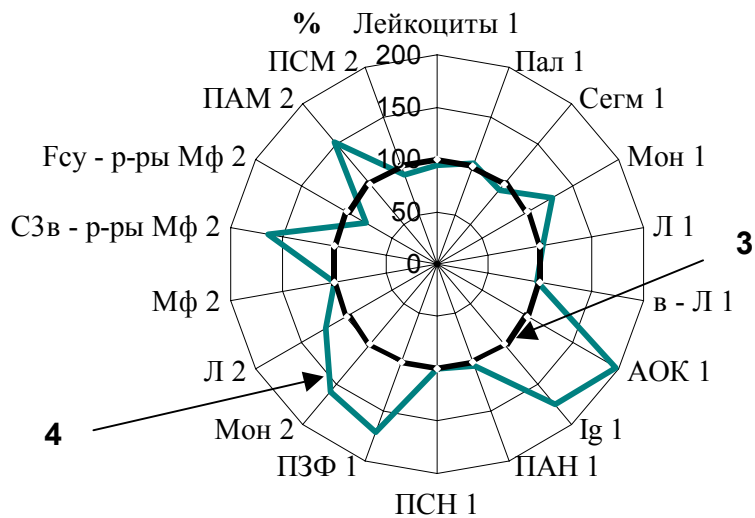
**Влияние экстракта "Эхиносол"
на индуктивную и продуктивную фазы гуморального
иммунного ответа через 3 и 6 дней после иммунизации**



- 1 - контроль;
- 2 - индуктивная фаза иммунного ответа;
- 3 - продуктивная фаза иммунного ответа.

Рис. 5.

Цитограмма крови и перитонеального экссудата, показатели гуморального иммунного ответа и фагоцитоза через 8 дней применения экстракта "Эхиносол"



- 1 - показатели крови;
- 2 - показатели перитонеального экссудата;
- 3 - контроль;
- 4 - опыт.

Рис. 6.

Состав периферической крови и показатели гуморального иммунного ответа после вторичной иммунизации на фоне применения экстракта "Экстракта"

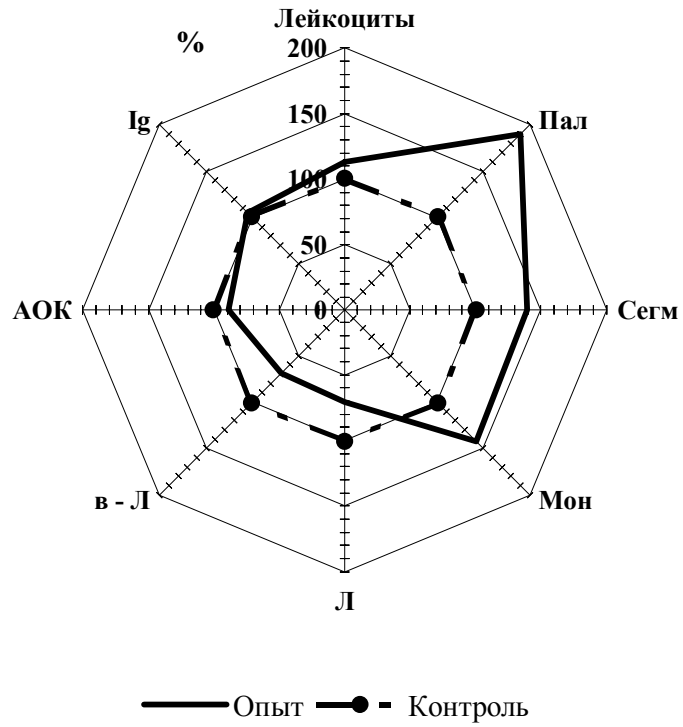


Рис. 7.

Показатели клеточного иммунного ответа

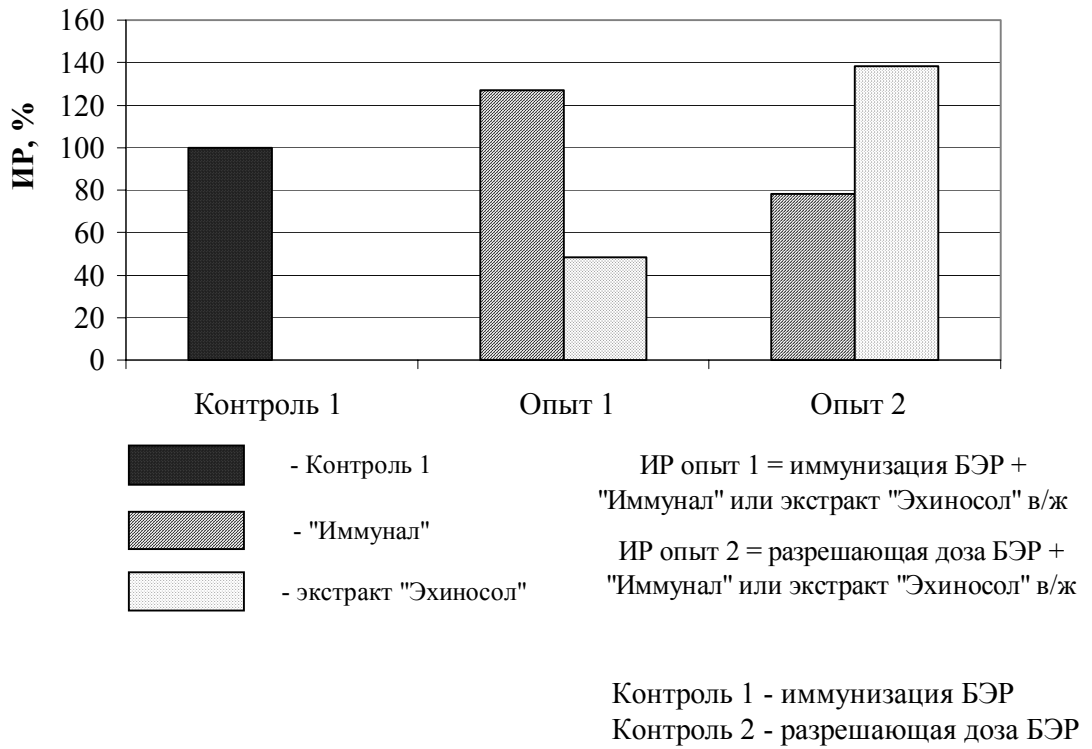


Рис. 8.

Исследование антимикробного действия
жидкого экстракта «Эхиносол»

Для обоснования иммунокорректирующих свойств жидкого экстракта «Эхиносол» нами были определены его антимикробные свойства в отношении следующих тест-штаммов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 885-653, полученных в Государственном НИИ контроля бактериальных препаратов имени Тарасевича.

Таблица 1.

Антимикробное действие жидкого экстракта в разведении 1:10
на рост различных тест-штаммов микроорганизмов

	St. aureus	Ps. aeruginosa	E. coli	Candida albicans
Микробная нагрузка тест-штамма перед внесением его в жидкий экстракт (в 1 мл)	$2,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
Остаточное количество микробных тел тест-штамма после инкубации в жидком экстракте (в 1 мл)	$1,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	$1,2 \times 10^3$
Подавление роста тест-штамма	в 233 раза	в 100 раз	в 275 раз	в 16 раз

Установлено, что исследуемый экстракт в разведении 1:10 обладает антибактериальным действием *in vitro* в отношении следующих тест-штаммов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и антигрибковым действием в отношении *Candida albicans* (табл. 1). Антибактериальное действие в присутствии 10% нормальной лошадиной сыворотки не производили.

Оценка безвредности (острой токсичности)
жидкого экстракта «Эхиносол»

Испытание острой токсичности жидкого экстракта из сбора «Эхиносол» проведено на 12 белых беспородных мышках-самцах массой 18-20г. Препарат вводили внутривенно в виде водного раствора в дозах от 5000 до 10000 мг/кг. При наблюдении в течении 14 суток у животных всех групп не отмечали изменений поведенческих реакций, признаков диареи, каких-либо других токсических патологических проявлений. Гибель животных не наступила. Следовательно, жидкий экстракт сбора «Эхиносол» согласно ГОСТ 121007-76 (Государственный стандарт на вредные вещества) можно отнести к 4 классу: «вещества малоопасные».

Получение гранулированной лекарственной формы «Эхиносол» и ее стандартизация

На основе жидкого экстракта нами была получена твердая лекарственная форма – гранулы, являющиеся рациональной лекарственной формой благодаря наличию ряда положительных свойств: хорошая распадаемость, высокая биологическая доступность, удобство применения и точность дозирования.

Для этого полученный жидкий экстракт лиофилизировали до содержания влаги не более 25%. На основе густого экстракта получали гранулы. Для этого были выбраны прописи, содержащие в качестве вспомогательных веществ глюкозу, сахарозу, лактозу, аэросил, поливинилпирролидон (ПВП), метилцеллюлозу (МЦ).

Количество густого экстракта для получения гранул рассчитывали исходя из предварительного исследования активности сухого экстракта. Всего было получено 9 вариантов прописей гранул. Полученные гранулы подвергали контролю качества. Критериями качества гранул явились: внешний вид, фракционный состав, прочность гранул на истирание, распадаемость и гигроскопичность.

Оценку качества гранул, полученных по наиболее рациональной прописи, проводили спектрофотометрическим методом по содержанию суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на цикориевую кислоту, используя метод сквозной стандартизации.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа банка данных литературы и собственных исследований предложена пропись нового лекарственного растительного сбора «Эхиносол», обладающего комплексным иммунокорректирующим действием.

2. Установлено в составе сбора «Эхиносол» содержание: фенольных соединений – 4,55%, в том числе фенолкарбоновых кислот (ФКК) – 2,75%, флавоноидов – 0,10%, кумаринов – 0,35%; полисахаридов: водорастворимых полисахаридов – 9,80%, пектиновых веществ – 1,93%, гемицеллюлозы А – 12,30%, гемицеллюлозы В – 23,00%; аскорбиновой кислоты – 0,35%; витамина К – 0,16%; каротиноидов 2,27 мг %; глицирризиновой кислоты – 1,82%; бетаинов – 0,085%.

3. Разработаны методики качественного обнаружения и количественного определения основных групп БАВ в сборе «Эхиносол»: ФКК – спектрофотометрическим методом; ВРПС – гравиметрическим методом.

4. Разработаны показатели определения доброкачественности сбора «Эхиносол», включенные в проект ФСП: содержание суммы ФКК в пересчете на цикориевую кислоту не менее 2%; суммы водорастворимых полисахаридов не менее 9%; экстрактивных веществ, извлекаемых 40% этанолом не менее 20%; показатели влажности, зольности и примесей.

5. Для идентификации сбора «Эхиносол» предложены внешние и микроскопические диагностические признаки, входящих в него ингредиентов (структура эпидермальной ткани, волосков и минеральных включений).

6. Разработан рациональный способ получения жидкого экстракта из сбора «Эхиносол», защищенный патентом РФ; проведена стандартизация жидкого экстракта по общепринятым показателям и содержанию ФКК.

7. Установлено влияние жидкого экстракта «Эхиносол» на первоначальные этапы иммунного ответа: увеличивает количество АОК в селезенке и синтез иммуноглобулинов в индуктивную фазу иммунного ответа, стимулирует выход лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов в кровь, миграцию моноцитов в перитониальный экссудат, экспрессию С3b- и Fcγ – рецепторов на макрофагах и поглотительную способность через эти рецепторы, стимулирует образование зрелых Т – клеток эффекторов. Проведенные исследования дают основание рекомендовать жидкий экстракт «Эхиносол» для дальнейших экспериментальных исследований при малых аномалиях иммунитета, проявляющихся частыми острыми респираторными заболеваниями.

8. Установлено антимикробное действие жидкого экстракта сбора «Эхиносол» в отношении следующих тест-штаммов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и антигрибковое действие в отношении *Candida albicans*.

9. Разработана рациональная пропись гранулированной лекарственной формы на основе экстракта сбора «Эхиносол», а так же методики контроля их качества по общепринятым показателям и содержанию ФКК.

10. На основании выполненных исследований разработан проект фармакопейной статьи предприятия «Сбор Эхиносол».

Основные результаты материалов исследования отражены в опубликованных работах:

1. Исайкина Н.В. Исследование клинической эффективности растительного препарата «Эхиносол» при малых аномалиях иммунитета / Н.В. Исайкина, В.В. Климов, Г.И. Калинкина // Бюллетень СО РАМН. – Новосибирск, 2001. - №3. – С. 15-18.

2. Исайкина Н.В. Перспективы поиска и создания иммуностропных средств на основе лекарственного растительного сырья / Н.В. Исайкина, Г.И. Калинкина, В.В. Климов // Новая Аптека. – 2002. - №3. – С. 57-61.

3. Оценка клинической эффективности препарата «Солхинол» / Н.В. Исайкина, В.В. Климов, Г.И. Калинкина, В.Н. Буркова // Материалы докл. на Международной науч. конф. по разработке и внедрению новых лекарственных средств и организационным формам фармацевтической деятельности, 2000 г. – Томск, 2000. – С. 156-157.

4. Патент на изобретение. Положительное решение, МПК А61К 35/78. Лекарственное средство, обладающее иммунокорректирующим действием / Н.В. Исайкина, В.В. Климов, Г.И. Калинкина, В.Н. Буркова (Россия). - Заявлено 17.07.01., № 2001119911. – Положительное решение 26.11.02.

5. Перспективы разработки противоаллергического и иммунокорректирующего средства на основе растительного сбора / Н.В.

Исайкина, Г.И. Калинкина, В.В. Климов // Тез. докл. на науч. – практич. конф., посвященной 20-летию фармацевтического факультета КГМА: Фармацевтическая наука и практика, 1999 г. – Кемерово, 1999. – С. 102-103.

6. Разработка технологии и параметров качества комплексного иммунокорректирующего средства «Эхиносол» / Н.В. Исайкина, Г.И. Калинкина, И.С. Кониевская // Тез. докл. на Всероссийской науч. – технической конф. по лекарственным средствам и пищевым добавкам на основе растительного сырья, 13-14 сентября, 2001 г. – Бийск, 2001. – С. 56–58.

7. Экологические проблемы иммунодефицита и перспективы разработки растительного лекарственного средства / Н.В. Исайкина, Г.И. Калинкина, В.В. Климов // Тез. докл. на Южносибирской международной науч. конф. студентов и молодых ученых: Экология Южной Сибири, 1-4 ноября, 1999 г. – Абакан, 1999. – С. 25.