

На правах рукописи

Масеца

МАСЕСЕ ПИТЕР МИЧИЕКА

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С
ЭКСТРАКТАМИ ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО (*Eucalyptus viminalis*
Labill.) И ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ (*Echinacea purpurea* Moench.) ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛОСТИ РТА

14.04.01 – Технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

7 ДЕК 2016

Москва – 2017



006661128

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации (ФГАОУ ВО РУДН)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Мизина Прасковья Георгиевна

Официальные оппоненты:

Жилиякова Елена Теодоровна - доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), Министерства образования и науки Российской Федерации, медицинский институт, кафедра фармацевтической технологии, заведующая кафедрой

Молохова Елена Игоревна - доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии, профессор кафедры

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ АО «КГМУ» Минздрава России)

Защита диссертации состоится: «25 января» 2017 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.040.09 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д.13.

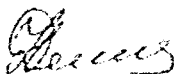
С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте организации <http://www.mma.ru>.

Автореферат разослан « » 2016 г..

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 208.040.09

доктор фармацевтических наук,
профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Важнейшей задачей фармацевтической технологии является создание эффективных и безопасных лекарственных средств, в том числе и из активных фармацевтических субстанций (АФС) растительного происхождения, которые характеризуются способностью комплексно влиять на различные звенья патологического процесса и возможностью длительного применения в различных возрастных группах. Они легче переносятся, значительно реже вызывают побочные эффекты и, как правило, не обладают кумулятивными свойствами (Киселева Т. Л., 2010 г.; Ловкова М.Я. с соавт. 2014 г., Francelino R. do Nascimento с соавт., 2015 г., Старенькая И., 2015 г.). Авторитетные эксперты ВОЗ считают, что около 75% всех больных целесообразно лечить только препаратами растительного происхождения (Гарник Т.П., 2004 г.). К этой группе относятся и пациенты с воспалительно-деструктивными заболеваниями полости рта и глотки (Чистик Т., 2013 г.), на долю которых приходится до 90% всей инфекционной патологии (Заплатников А.Л., 2009 г.; Овчинников А.Ю., 2007 г.). И, несмотря на все последние достижения медицины, наблюдается рост заболеваемости (Fuchs R., Blaas D., 2010 г.; Гринчук О.Н., 2011 г.; Ruperto N., 2011 г.; Roberts A.L., 2012 г.; Гофман В.В.; Плужников Н.Н., 2014 г.). Используемые для таких случаев препараты антибиотиков вызывают микробиологический дисбаланс в ротовой полости, что приводит к грибковой суперинфекции (Гофман В.Р., 2000 г.; Белов Б.С., 2000 г.; Гофман В.В., 2014 г.).

Поэтому по-прежнему являются актуальными поиск и разработка лекарственных средств растительного происхождения, лишенных указанных недостатков. Причем, акцент исследователей должен быть направлен на сочетание в одной лекарственной форме ингредиентов с антимикробной, противовоспалительной и иммуностимулирующей активностью, что позволит оказывать на пораженную слизистую полости рта комплексное лечебное воздействие, а также добиваться коррекции состояния местного иммунитета и повышения устойчивости слизистых оболочек (Иваничкин С.А., 2011 г.).

Степень разработанности темы исследования. Вопросам создания комбинированных лекарственных форм для местного применения посвящены работы ряда авторов (Желонкин Н.Н., 2008 г., Крахмалев И.С., 2013 г., Краснова И. Ю., 2014 г.). Однако комбинированные составы на основе экстрактов эвкалипта прутовидного (эвкалимин) и эхинацеи пурпурной (эстифан) в виде адгезивных спреев и таблеток для рассасывания до настоящего времени не являлись объектами научных исследований. В указанных работах практически нет упоминания о рациональности сочетания в одной лекарственной форме, предназначенной для лечения воспалительных заболеваний полости рта, биологически

активных веществ (БАВ) растительного происхождения, обладающих антимикробным, противовоспалительным и иммуностимулирующим действием, что и определило актуальность темы диссертационного исследования.

Целью исследования явилась разработка комбинированного состава и технологии лекарственных форм с растительными экстрактами антимикробного, противовоспалительного и иммуностимулирующего действия для лечения воспалительных заболеваний полости рта.

Задачи исследования:

- 1) обосновать и разработать состав рациональных лекарственных форм для лечения воспалительных заболеваний полости рта;
- 2) обосновать и разработать оптимальную технологию получения лекарственных форм с растительными экстрактами антимикробного, противовоспалительного и иммуностимулирующего действия;
- 3) исследовать технологические свойства разработанных лекарственных форм;
- 4) разработать методики стандартизации лекарственных форм;
- 5) изучить особенности высвобождения БАВ из лекарственных форм;
- 6) исследовать специфическую активность разработанных лекарственных форм;
- 7) изучить стабильность лекарственных форм при хранении;
- 8) разработать проекты нормативной документации на новые лекарственные формы;
- 9) подать заявки в Роспатент на новые лекарственные формы.

Научная новизна. Впервые дано теоретическое и экспериментальное обоснование рациональности комбинированного состава, включающего экстракты эвкалипта прутовидного и эхинацеи пурпурной в лекарственных формах для лечения воспалительных заболеваний полости рта.

Впервые разработаны и исследованы комбинированные составы мицеллярного раствора и микроэмульсии с экстрактами эвкалипта прутовидного и эхинацеи пурпурной, и доказано преимущество микроэмульсии.

Впервые разработан и исследован комбинированный состав таблеток для рассасывания с экстрактами эвкалипта прутовидного и эхинацеи пурпурной, обладающий антимикробным, противовоспалительным и иммуностимулирующим действием.

На разработанные лекарственные формы получены решения Роспатента о выдаче патентов на изобретение по заявкам № 2015149513 от 19.11.2015 г., «Композиция растительного происхождения в виде липосомальной формы»; №

2015149516 от 19.11.2015 г., «Композиция растительного происхождения в виде мицеллярного раствора» и приоритетная заявка № 2015149515 от 19.11.2015 г., «Противовоспалительная композиция пролонгированного действия для лечения дыхательных путей».

Теоретическая и практическая значимость исследования. Настоящая работа будет способствовать дальнейшему развитию научных исследований по созданию комбинированных составов лекарственных форм для лечения воспалительных заболеваний полости рта. Практическое значение результатов диссертационного исследования заключается в том, что они являются базой для дальнейших аналогичных научных исследований по созданию лекарственных препаратов на основе субстанций растительного происхождения, обладающих антимикробным, противовоспалительным и иммуностимулирующим действием.

Материалы диссертации могут быть использованы в преподавании таких дисциплин, как «Фармацевтическая технология», «Фармацевтическая химия», «Фармакогнозия», «Фармакология», «Коллоидная химия», «Биохимия».

На новые составы лекарственных форм разработаны проекты НД на спрей «Эстилин», таблетки для рассасывания «Эвкафан» и Лабораторные регламенты.

Основные положения, выносимые на защиту

- обоснование состава и вида лекарственных форм (ЛФ);
- ✓ технология получения адгезивного спрея;
- ✓ технология получения таблеток для рассасывания;
- ✓ результаты исследований технологических характеристик разработанных лекарственных форм;
- ✓ результаты разработки методов стандартизации лекарственных препаратов;
- ✓ результаты исследований специфической активности лекарственных препаратов в опытах *in vitro*;
- ✓ результаты определения стабильности лекарственных препаратов при хранении.

Методология и методы исследования. Методология исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по изучению растительных экстрактов эвкалипта прутовидного, эхинацеи пурпурной, препаратов на их основе и включала сравнительную экспериментальную оценку мицеллярных растворов, микроэмульсий и таблеток для рассасывания. Для оценки качества лекарственных форм использованы тесты, характеризующие вязкость, поверхностное натяжение, размеры мицелл, адгезию мицеллярного раствора и микроэмульсии; сыпучесть, прессуемость, фракционный состав

таблетмасс; механическую прочность, распадаемость таблеток, высвобождение биологически активных веществ в опытах *in vitro*, специфическую активность. Основные показатели качества разрабатываемых лекарственных форм определяли в соответствии с ГФ XII, XIII изданий с помощью ВЭЖХ, световой и электронной микроскопии, фотонной корреляционной спектроскопии, ротационной вискозиметрии, спектрофотометрии, ТСХ, а также микробиологическими методами и с помощью биотест-систем *in vitro*. Содержание действующих ингредиентов определяли спектрофотометрически.

Достоверность научных положений и выводов. Достоверность полученных результатов подтверждена многократной повторностью экспериментов по разработке рациональных составов лекарственных форм и технологии их получения с использованием современных физических и физико-химических методов анализа, а также статистической обработкой полученных результатов и их сопоставлением с данными литературы. В работе применялось сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке.

Апробация результатов исследования. Основные положения работы доложены на III научной конференции молодых ученых и аспирантов «Молодые ученые и фармацевтика» (Москва, 2015); IV Научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», (Москва, 2016); XXIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2016); XII международной научно-практической конференции «Тенденции развития науки и образования» (Самара, 2016); XII Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий» (Белгород, 2016); Международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» (Москва, 2016). Апробация результатов исследования проведена на межкафедральных коллоквиумах РУДН – 26 мая 2016 г. и ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова – 22 июня 2016 г.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач и их реализации до статистической обработки, обобщения, анализа и обсуждения полученных результатов в научных публикациях и написания диссертационной работы.

Внедрение результатов исследования. Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии ФГАОУ ВО РУДН (Акт об использовании в учебном процессе от 25.04.2016 г.).

Методики стандартизации разработанных составов спрея используются в Испытательном Центре ФГБНУ ВИЛАР (Акт внедрения от 05.05.2016 г.).

Технология получения и проекты нормативной документации на таблетки для рассасывания с экстрактами эвкалипта прутовидного и эхинацеи пурпурной внедрены на ЗАО «ВИФИТЕХ» (Акты внедрения от 12.05.2016 г.).

Комбинированный состав и технология получения лекарственного препарата – спрей «Эстилин» с растительными экстрактами для местного применения при воспалительных заболеваниях полости рта внедрен в ЦКП НОЦ РУДН (Акт внедрения от 16 мая 2016 г.).

Результаты работы используются в учебном процессе кафедры биотехнологии и промышленной фармации ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ) Минобрнауки РФ (Акт внедрения от 21.09. 2016 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности Диссертационное исследование проведено в соответствии с Паспортом специальности 14.04.01-Технология получения лекарств, пп. 3, 4, 6.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках Договора № 10 «О создании Научно-образовательного комплекса РУДН–ВИЛАР» от 20.01.2012 г. № темы 0576-2014-0013 «Биофармацевтические аспекты создания инновационных лекарственных средств».

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 176 стр., машиннописного текста, содержит 67 таблиц, 32 рисунка и состоит из введения, обзора литературы (I глава), описания объектов и методов исследования (II глава), обсуждения результатов собственных экспериментальных исследований (главы III-IV), общих выводов, списка литературы, включающего 150 источников, из которых 54 источника на иностранных языках и Приложения.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 7 статей в журналах, включенных ВАК Минобрнауки в перечень рецензируемых научных изданий.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объекты исследования:

В качестве действующих фармацевтических субстанций выбраны:

- эвкалимин (*Eucalimimum* - сухой очищенный экстракт эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill) (ФС 42-3605-98);
- эстифан (*Estiphanum*) - сухой экстракт из травы эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L.) (ВФС 42 – 2372-94).

Вспомогательные вещества:

- альгинат натрия (*Natrium alginatum*) (ФСП 42-0372-3392-06) (Россия);
- вода очищенная (ФС 2.2.0020.15);
- декстрозы моногидрат (JRS Pharma, KG, Германия);
- кислота лимонная (ГОСТ 908-2004);
- метилцеллюлоза (МЦ-100) (Benecel A15C Pharm, Великобритания), (соотв. USP);
- натрия стеарил фумарат (4070-80-8, LubriSanaq, Ph.Eur.);
- нипагин (ФС 42-1460-89);
- сахароза (ФС 2.1.0034.15);
- спирт этиловый (ФС 2.1.0036.15);
- тальк (ФС 2.2.0017.15);
- твин 20 (сорбитон монолаурат) (OLEON (Бельгия) 404030001 (соотв. EP, USP);
- твин 80 (полисорбат 80) (OLEON (Бельгия) OE50226X01 (соответствует EP);
- кремния диоксид коллоидный (aerosol-200 Pharma, Германия);
- соевый лецитин (ТУ 9146-006-576002012) (ООО «Амурагроцентр»);
- рабочие стандартные образцы (PCO) эвкалимина, цикориевой кислоты (ВИЛАР, Россия).

Методы исследования:

Физические методы: световая микроскопия (микроскоп МОВ-1-16, ЛОМО, Россия); электронная микроскопия (сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM – 6490LV, Япония), гравиметрия, вискозиметрия (RheoStress 1 (НААКЕ, Германия), электрофоретическое светорассеяние (Zetasizer Nano ZS, «Malvern» (Великобритания), адгезиометрия (текстуrometer Brookfield СТЗ, США), фотонная корреляционная спектроскопия (Zetasizer Nano ZS «Malvern», Великобритания), тензометрия (Krusk K-100 МК2, Германия).

Использовали технологические процессы растворения, перемешивания, фильтрования, просеивания, прессования.

Физико-химические методы

Хроматографические методы: ТСХ – (пластины «Сорбфил ПТСХ-П-А» 10 × 15 см, система растворителей н-бутанол-вода-уксусная кислота 40:10:10), ВЭЖХ (XBridge C18, внутренний диаметр 2.1 мм, размер пор 3.5 мкм, Waters, Ireland), УЭЖХ (жидкостный хроматограф Agilent 1200 с МСМД, США), спектрофотометрия (Cary 100 Scan Varian, США).

Биохимические *in vitro* (биотест-системы ФГБНУ ВИЛАР на основе индуцибельной NO-синтазы, ксантиноксидазы, НАДФН-оксидазы).

Микробиологические методы *in vitro* - методы серийных разведений и диффузии в агар (метод «агаровых пластин»).

Математические методы. Для оптимизации состава лекарственной формы использован метод обобщённой функции желательности Харрингтона.

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программ Statistica MS Excel, OriginPro 7.5.

Результаты исследований

Разработка комбинированного состава адгезивного спрея

Учитывая сложность химического состава смеси двух экстрактов (эвкалимина и эстифана), методом ВЭЖХ изучили их поведение в смеси. Провели анализ исходных экстрактов и смесь их спиртовых растворов через 0,5 и 24 часа после смешивания и инкубации при комнатной температуре (Рисунок 1).

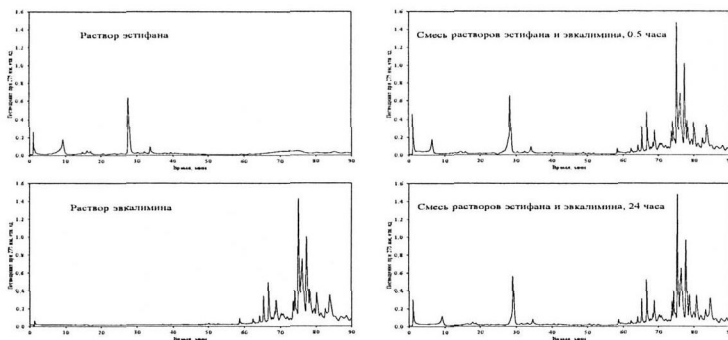


Рисунок 1 – ВЭЖХ-УФ (275 нм) профили фенольных соединений растворов растительных экстрактов эстифан и эвкалимин и их смеси через 0,5 и 24 часа.

Результаты исследования подтверждают отсутствие каких-либо изменений в смеси спиртовых растворов экстрактов, что позволяет прогнозировать отсутствие химического взаимодействия и в лекарственных формах.

Реологические характеристики ЛФ. Для обеспечения адгезии и пролонгированного действия лекарственной формы – нами использованы мукоадгезивные полимеры: метилцеллюлоза (МЦ-100) и альгинат натрия (АН). С помощью вискозиметра RheoStress 1 (НААКЕ, Германия) установлено, что оптимальной концентрацией растворов МЦ-100 и АН является 3%. Причем, в исследованном диапазоне концентраций растворы МЦ-100 и АН характеризуются как неньютоновские жидкости.

Получение мицеллярного раствора и микроэмульсии с эвкалимином и эстифаном

А) Мицеллярный раствор

Учитывая нерастворимость в воде растительных экстрактов эвкалипта прутовидного и эхинацеи пурпурной, проведена их солюбилизация в смешанных мицеллах ПАВ (твин 20 и твин 80 при их соотношении 1:4), которое позволяет получать смешанные мицеллы ПАВ с большим объемом гидрофобного ядра.

Для установления оптимальной концентрации ПАВ, методом Вильгельми (тензиометр Kruss K-100 МК2, Германия), получены изотермы поверхностного натяжения растворов индивидуальных ПАВ, их смеси и многокомпонентного раствора на их основе с растительными экстрактами (эвкалимин и эстифан 1:1) (Рисунок 2).

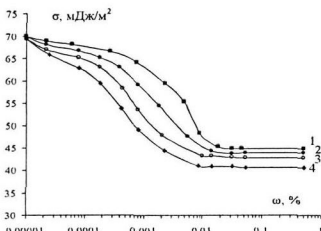


Рисунок 2 – Изотермы поверхностного натяжения: твин 80 (1), твин 20 (2), смесь твин 20 и твин 80 в соотношении 1:4 (3); системы, содержащей твин 20/твин 80 в смеси с растительными экстрактами эвкалимин и эстифан (1:1) (4) (соотношение ПАВ/экстракты 1:1).

Полученные изотермы показывают, что при переходе от растворов индивидуальных ПАВ к их смеси поверхностное натяжение водных растворов снижается во всем исследованном диапазоне концентраций. Введение спиртового раствора растительных экстрактов эвкалимин и эстифан (1:1) в раствор смеси твинов, приводит к еще большему уменьшению поверхностного натяжения. В этих условиях на фотонном анализаторе частиц (Zetasizer Nano ZS «Malvern», Великобритания) проведены исследования влияния солюбилизированного количества растительных экстрактов на размер рассеивающих свет частиц (мицелл), находящихся в водной фазе. Результаты представлены на Рисунке 3.

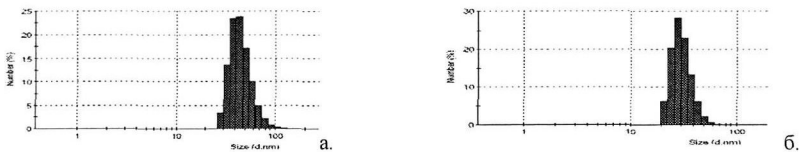


Рисунок 3 – Распределение мицелл в растворе по их размерам (а.-концентрация смеси твин 20/твин 80 (1:4) - 0,1%, растительных экстрактов 0,2%; б. - концентрация ПАВ 0,1%, растительных экстрактов 0,3%).

Полученные результаты показывают, что с увеличением концентрации растительных экстрактов наблюдается увеличение размера мицелл в водной фазе.

Дальнейшее их увеличение может привести к снижению устойчивости системы. Концентрация смеси ПАВ, близкой к ККМ и равной 0,1% связана с требованием минимизации содержания ПАВ в растворе.

Таким образом, для сохранения устойчивости мицеллярного раствора при концентрации ПАВ 0,1%, суммарная концентрация экстрактов не должна превышать 0,2%.

Технология получения мицеллярного раствора с растительными экстрактами эвкалимин и эстифан осуществляется добавлением в предварительно приготовленный их 0,2% спиртовый раствор 0,1% смеси ПАВ (твин 20/твин 80 1:4), с последующим добавлением к ним 3% водного раствора МЦ-100 или АН, что позволяет получить узкое распределение мицелл по размерам при высокой степени солюбилизации растительных экстрактов в них. Мицеллы, полученные в указанных условиях, имеют размеры в пределах 80 нм, что обеспечивает коллоидную устойчивость лекарственного препарата в процессе его хранения, так как такого размера мицеллы, участвующие в броуновском движении, седиментационно устойчивы.

Б) Микроэмульсия. Другим способом обеспечения высокой эффективности взаимодействия БАВ растительных экстрактов с поверхностью бактериальных клеток, является использование микроэмульсионной системы из смеси соевого лецитина (СЛ) (фосфолипиды) и водорастворимых ПАВ. Ранее использованная смесь твин-20/твин-80 (1:4) показала свою эффективность при получении мицеллярного раствора. Этот же состав был использован для получения микроэмульсии на основе СЛ, введение которого в мицеллярный раствор смеси твинов приводит к образованию нового типа смешанных мицелл, солюбилизующих растительные экстракты. На Рисунке 4 показана зависимость размеров мицелл в микроэмульсии от концентрации растительных экстрактов.

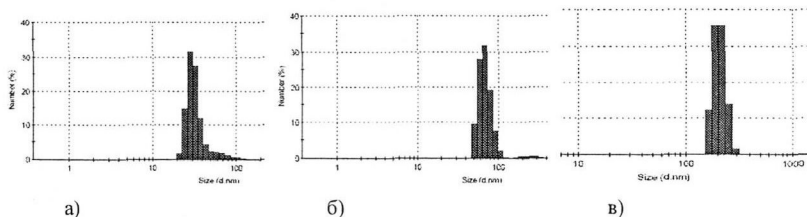


Рисунок 4 – Распределение мицелл в микроэмульсии по их размерам (а) - концентрация ПАВ - 0,1%, СЛ - 0,1%, растительных экстрактов - 0,1%; (б) - концентрация ПАВ - 0,1%, СЛ - 0,1%, растительных экстрактов - 0,2%; (в) - концентрация ПАВ - 0,1%, СЛ - 0,1%, растительных экстрактов - 0,3%).

Полученные результаты показали, что увеличение содержания экстрактов до 0,3% вызывает резкий рост размера мицелл, порядка 200 нм, что может привести к потере агрегативной устойчивости. Следовательно, оптимальным составом микроэмульсии является содержание смеси ПАВ - 0,1%; СЛ - 0,1%; растительных экстрактов - 0,2%. Размеры мицелл при этом находятся в пределах 100 нм (Рисунок 4, б).

Технология получения микроэмульсии включает те же основные стадии, что и у мицеллярного раствора, с дополнительным введением СЛ в смесь спиртового раствора экстрактов и ПАВ, в количестве 1:1 по отношению к суммарному количеству твинов. Учитывая микробную нестабильность систем с водной дисперсионной средой, в разработанные составы ЛФ - введено 0,05% нипагина. Далее до 100,0 % добавляется 3% водный раствор МЦ-100 или АН. Обе ЛФ представляют собой однородные густоватые жидкости светло-коричневого цвета, со слабым специфическим запахом, которые были использованы для дальнейших сравнительных исследований.

Адгезивные свойства разработанных составов лекарственных форм

На текстурометре Brookfield СТЗ (США) определены адгезивные свойства по усилиям отрыва индентора от тонких пленок, полученных из 4% раствора муцина (модель поверхности слизистой), мицеллярных растворов и микроэмульсий на основе МЦ-100 и АН. Усилие отрыва индентора от пленки, полученной из 4% раствора муцина, составляет $6,8 \pm 0,5 \cdot 10^3$ Па. Для мицеллярных растворов на МЦ-100 и АН – $5,8 \pm 0,7 \cdot 10^3$ Па и $6,8 \pm 0,8 \cdot 10^3$ Па (соответственно). Для микроэмульсий на МЦ-100 - $4,3 \pm 0,5 \cdot 10^3$ Па и АН - $6,3 \pm 0,7 \cdot 10^3$ Па. Таким образом, разработанные лекарственные композиции имеют близкие к муциновому раствору адгезивные свойства, следовательно, являются мукоадгезивными.

Разработка методик оценки подлинности и количественного содержания основных групп БАВ в ЛФ

Качественную и количественную оценку ЛФ осуществляли по фенольным соединениям, являющихся доминирующей группой БАВ в растительных экстрактах эвкалимин и эстифан. Качественное обнаружение фенольных соединений осуществляли методом ТСХ и спектрофотометрии. В качестве критериев подлинности при ТСХ выбраны - наличие зон адсорбции с R_f около 0,60 (РСО цикориевой кислоты), с R_f около 0,70 (РСО эвкалимина) (Рисунок 5) и характерных максимумов поглощения при спектрофотометрии (длина волн 280 ± 1 нм (эвкалимин), 392 ± 1 нм и плечо при 328 ± 1 нм (эстифан) (Рисунок 6).

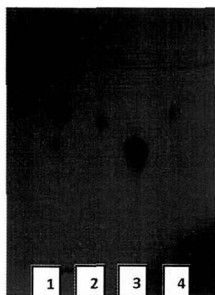


Рисунок 5. Хроматограмма испытуемых растворов ЛФ и РСО: 1- на основе АН; 2 – на основе МЦ-100, раствор РСО цикориевой кислоты (3), раствор РСО эвкалимина (4) в системе н-бутанол-вода-уксусная кислота (40:10:10). Обнаружение в УФ-свете при 365 нм.

ТСХ – анализ показал, что на хроматограммах испытуемых растворов наблюдаются зоны адсорбции на уровне стандартных образцов эвкалимина и цикориевой кислоты. Дополнительных зон адсорбции не обнаружено ни в одном из исследованных растворов.

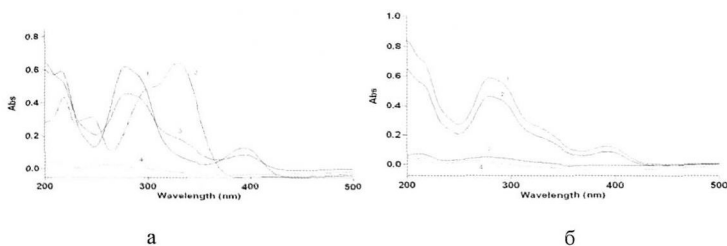


Рисунок 6. УФ-спектры: а: 1 - раствор РСО эвкалимина, 2- раствор РСО цикориевой кислоты, 3 – ЛФ с АН, 4 - плацебо ЛФ с АН; б- 1 – ЛФ с МЦ-100; 2- ЛФ с АН; 3 – плацебо ЛФ с МЦ-100; 4 – плацебо ЛФ с АН.

Определение количественного содержания проводили спектрофотометрически в кювете с толщиной слоя 10 мм: суммы фенолоальдегидов в пересчете на эвкалимин – при длине волны 280 ± 1 нм; суммы фенолкарбоновых кислот (эстифан) в пересчете на цикориевую кислоту – при длине волны 328 ± 1 нм. Для расчета количественного содержания в ЛФ суммы БАВ в пересчете на РСО в процентах (X) использовали формулу (1)

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 50 \cdot 25},$$

где A_0 - оптическая плотность раствора РСО;

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

m_0 - масса РСО, г,

m - масса ЛФ, г.

Содержание суммы фенолоальдегидов в пересчете на эвкалимин в образцах ЛФ с АН и МЦ-100 составило от 0,039 до 0,051%. Установлено, что относительная погрешность среднего результата разработанной методики не превышает $\pm 2,2\%$.

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на цикориевую кислоту в образцах ЛФ с АН и МЦ-100 составило от 0,0030 до 0,0045%. Относительная погрешность среднего результата разработанной методики не превышает $\pm 4,6\%$. Валидационные результаты методик анализа оценивают их положительно по параметрам: правильность, прецизионность, сходимость, воспроизводимость, линейность, специфичность.

Высвобождение БАВ из ЛФ *in vitro* через полупроницаемую мембрану по методу Л. Крувчинского проведено в трех повторностях для водорастворимых фенолкарбоновых кислот. По полученным значениям оптической плотности диализной жидкости (Рисунок 7) рассчитывали концентрацию БАВ. Установлено, что высвобождение суммы фенолкарбоновых кислот (в пересчете на РСО цикориевой кислоты) из микроэмульсий на основе МЦ-100 и АН на 18% больше, чем из мицеллярных растворов на тех же основах.

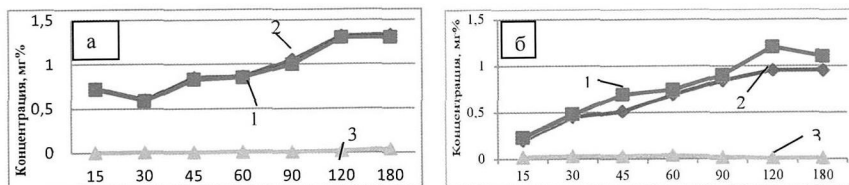


Рисунок 7 – Профили высвобождения суммы фенолкарбоновых кислот из микроэмульсий (а) и мицеллярных растворов (б) за 180 мин эксперимента (№1 основа – МЦ-100; №2 – основа – АН, 3 – плацебо).

Исследование специфической активности ЛФ

При проведении микробиологических исследований методами «серийных разведений» установлено, что микроэмульсия на основе АН оказывала бактериостатическое действие на *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) в разведении 1:64 (19,5 мкг/мл в пересчете на эвкалимин); а на *Esherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027- в разведении 1:4-1:8 (312-156 мкг/мл). Микроэмульсия на основе МЦ-100 показала активность в разведении 1:16 (78 мкг/мл) на *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P); а на *Esherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027- в разведении 1:4-1:8 (625 -156 мкг/мл). Мицеллярные растворы проявили активность в разведении 1:2-1:4 в дозах 625-312 мкг/мл. Полученные результаты антимикробной активности ЛФ свидетельствуют о перспективности именно микроэмульсии на основе АН.

С помощью ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы в условиях *in vitro* по влиянию на скорость ферментативной реакции, определяемой по изменению оптической плотности исследуемых растворов, установлено достоверное

ингибирование скорости iNOS-реакции в присутствии раствора растительных экстрактов на 27-32% независимо от концентрации по сравнению с контролем, что свидетельствует о **противовоспалительной активности** смеси растительных экстрактов эстифан, эвкалимин в спиртовом растворе при их соотношении 1:1 в диапазоне концентраций 2,0 мг/мл – 0,2 мг/мл.

Для подтверждения иммуностимулирующей активности ЛФ, проводили сравнительную количественную оценку величины активизирующего влияния изучаемых объектов на скорость НАДФН оксидазной реакции *in vitro*. В ходе исследований скорости НАДФН-оксидазной реакции по изменению оптической плотности растворов изучаемых образцов, установлено, что микроэмульсия на основе АН в количестве 10 мкл увеличивала скорость НАДФН-оксидазной реакции на 31,8% от эффекта препарата сравнения - протимозина-а. Другие образцы показали активность в пределах 9,6-27,7%.

Указанный состав микроэмульсии выбран нами как окончательный и назван «Эстилин» (Таблица 1).

Таблица 1

Состав микроэмульсии «Эстилин»	
Ингредиенты	Количество, %
эвкалипта прутовидного экстракт сухой (эвкалимин)	0,10
эхинацеи пурпурной экстракт сухой (эстифан)	0,10
спирт этиловый 96%	1,00
смесь ПАВ твин 20 и твин 80 в соотношении 1:4	0,10
соевый лецитин	0,10
альгинат натрия	2,96
нипагин	0,05
вода очищенная	95,59

Для первичной упаковки разработанного состава микроэмульсии (в качестве спрея) использованы стеклянные матовые спрей-флаконы 15/35 мл с механическим насосом, предназначенные для распыления водного содержимого флакона.

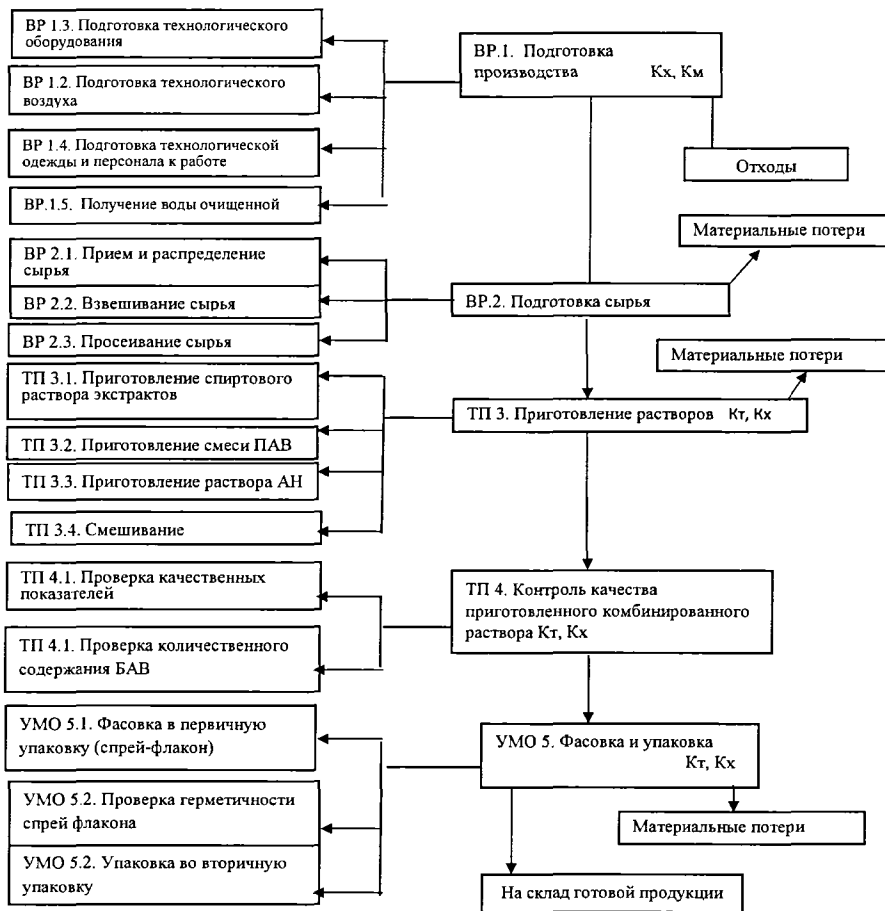
При определении дозы в распыле установлено, что в среднем распыляется 0,120 г. микроэмульсии, что составляет по 0,100 мг каждого экстракта. Учитывая результаты антимикробной активности - можно прогнозировать терапевтический эффект при 3-х кратном распыле препарата в дозе 0,300 мг. Полнота эвакуации содержимого спрей-флакона составила 90,4% содержимого, что отвечает требованиям ОФС 1.1.1.0002.15 «Аэрозоли и спреи» (ГФ XIII).

Исследование стабильности спрея «Эстилин» при хранении

Хранение разработанного состава спрея «Эстилин» осуществляли в течение 24

месяцев при температуре 25 ± 2 °С и относительной влажности окружающего воздуха $60 \pm 5\%$. Исследованы химическая стабильность, микробиологическая чистота и определена потеря массы содержимого спрей-флакона. Полученные результаты свидетельствуют о неизменности показателей и стабильности лекарственной формы на протяжении всех изученных сроков хранения.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили разработать проекты НД и технологическую схему производства препарата (Рисунок 8).



Кт – контроль технологический,
Кх – контроль химический

Рисунок 8 – Технологическая схема производства спрея «Эстилин» с растительными экстрактами эвкалимин и эстифан.

**Разработка состава и технологии твердой лекарственной формы - таблеток
для рассасывания с эвкалипминном и эстифаном**
Физико-химические и технологические свойства экстрактов

При определении технологических характеристик установлено, что как самостоятельно, так и в смеси – растительные экстракты эвкалипмин и эстифан не обладают достаточной сыпучестью и прессуемостью. Поэтому возникает необходимость в использовании разных групп вспомогательных веществ для улучшения технологических характеристик прессуемых порошков.

Из существующих в настоящее время способов таблетирования – технология прямого прессования является наиболее рациональной технологией производства таблеток. Поэтому нами выбраны вспомогательные вещества, которые наиболее часто используются для этого типа прессования. В качестве наполнителей для разных экспериментальных составов таблетмасс использованы декстроза моногидрат и сахараза. Из вспомогательных веществ, способствующих скольжению таблетмассы, выбраны крахмал, тальк и кремния диоксид. В качестве антифрикционных (противопрilпающих) вспомогательных веществ – натрия стеарил фумарат и кальция стеарат. Использована и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), которая является одним из высокопрессуемых материалов и совмещает в себе связующие, скользящие и разрыхляющие свойства при достаточной текучести и высокой прессуемости.

Количество активных ингредиентов в одной таблетке (по 0,025 г каждого растительного экстракта) рассчитано с учетом высокой антимикробной активности фармацевтической композиции эвкалипмин-эстифан в опытах *in vitro* и инструкции по применению таблеток для рассасывания. Как правило, таблетки для рассасывания назначают 4 раза в день. Следовательно, средняя суточная доза каждого экстракта составит 1,4 мг/кг (25мгх4):70.

При проведении исследований были приготовлены 8 экспериментальных составов (модельных смесей) таблетмасс с разными вспомогательными веществами (Таблица 2).

Таблица 2

Составы модельных смесей для таблетирования

Наименование ингредиента	Количество ингредиентов, %							
	Номера экспериментальных составов							
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8
Эвкалипмин	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	3,5
Эстифан	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0	3,5
Натрия стеарил фумарат	0,5	0,5	0,7	1,00	0,9	1,0	1,50	-
Кремния диоксид коллоидный	0,5	0,5	0,7	1,00	0,9	1,0	1,50	-
Декстроза моногидрат	97,0	92,4	85,0	81,3	78,4	71,6	63,7	-

Сахароза	-	-	-	-	-	-	-	78,85
Лимонная кислота	-	-	-	-	-	-	-	7,0
Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ)	-	-	-	-	-	-	-	5,0
Кальция стеарат	-	-	-	-	-	-	-	1,0
Тальк	-	-	-	-	-	-	-	1,0

Полученные смеси анализировали:

- до прессования по показателям сыпучести (тестер сыпучести порошков ВТ 1000, Россия), фракционного состава (фармакопейный набор сит), прессуемости (гидравлический пресс для ручного прессования, Россия);

- после таблетирования - по показателям распадаемости («качающаяся корзинка», Россия); прочности на истирание (фрибиллятор, Россия) и на раздавливание (сжатие) («Эрвека», Германия). Результаты представлен в Таблице 3.

Таблица 3

Результаты определения технологических характеристик экспериментальных таблеточных масс и таблеток из них

Номера исследованных составов	Таблетмассы			Таблетки		
	Сыпучесть, г/с	Содержание фракции с размером частиц от 0,5 до 2 мм, %	Прессуемость, г/см	Прочность на сжатие, Н	Прочность на истирание, %	Распадаемость, мин
1	11,8±0,9	90,0±0,7	0,6±0,03	50±1,0	99,9±0,1	12,0±2,0
2	10,0±0,8	850±1,0	0,55±0,05	48,0±1,0	99,9±0,1	13,0±1,0
3	9,9±1,0	80±0,75	0,76±0,05	40,0±0,5	99,9±0,1	13,0±0,5
4	9,0±0,5	80±0,8	0,6±0,01	35,0±0,5	99,9±0,1	19,0±0,5
5	3,0±1,0	70±1,0	0,56±0,04	25,0±0,5	80,0±0,2	14,0±0,5
6	3,0±0,9	60±1,0	0,6±0,05	20,0±0,5	85,0±1,0	14,0±0,5
7	2,0±1,9	55±0,5	0,55±0,04	15,0±0,5	75,0±0,2	14,0±0,5
8	11,0±0,5	90±1,0	1,4±0,03	49,0±1,0	99,8±0,1	37,0±1,0

Прямое прессование таблетмассы осуществляли на роторной таблеточной машине РТМ-10 (Россия) со скоростью оборотов ротора - 8 об/мин и силой давления 15-17 кН.

Для выбора оптимального состава из 8 модельных, применили математическую функцию желательности Харрингтона (D) (Таблица 4).

Таблица 4

Распределение показателей функции желательности Харрингтона для экспериментальных составов таблеток

№№ составов	До прессования (таблетмасса)			D_1	После прессования (таблетки)			D_2
	d_1	d_2	d_3		d_1	d_2	d_3	
1	0,90	0,70	0,90	0,83	0,60	0,85	0,90	0,77
2	0,70	0,80	0,70	0,73	0,65	0,65	0,75	0,68
3	0,80	0,85	0,80	0,82	0,70	0,70	0,80	0,73
4	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
5	0,55	0,80	0,60	0,64	0,65	0,50	0,50	0,55

6	0,50	0,75	0,50	0,57	0,60	0,45	0,45	0,505
7	0,35	0,70	0,50	0,50	0,50	0,45	0,40	0,45
8	0,90	0,95	0,95	0,93	0,90	0,90	0,90	0,90

При анализе полученных результатов установлено, что среди исследованных модельных смесей неудовлетворительных составов нет, так как значение D во всех случаях больше 0.

Из модельного ряда с применением математической функции желательности Харрингтона для дальнейших исследований нами выбраны 2 состава: №4 и №8, так как их значения наиболее близки к 1 ($D = 0,90$).

Разработка методик стандартизации таблеток

Оценка подлинности и количественного содержания БАВ

При проведении исследования были использованы стандартные образцы (РСО эвкалимина и цикориевой кислоты), полученные в лаборатории фитохимии ВИЛАР.

Подлинность. Для определения подлинности выбраны те же методы и показатели, что и для спрея (ТСХ, спектрофотометрия), а также качественные реакции на фенолкарбоновые кислоты с раствором железа(III) хлорида (окрашивание от фиолетово-красного до красно-коричневого с фиолетовым оттенком) и с раствором ванилина в серной кислоте на дитерпены (окрашивание от фиолетово-красного до красно-коричневого цвета с фиолетовым оттенком).

Количественное содержание: для эвкалимин – гравиметрический способ определения массы сухого остатка хлороформного извлечения из таблеток. Количественное содержание эвкалимина в одной таблетке рассчитывали по формуле:

$$X = (m \cdot 100 \cdot b \cdot 1000) / (a \cdot 80) \quad (2)$$

m – масса сухого остатка, г;

a – навеска препарата, г;

b – средняя масса таблетки, г.

Содержание эвкалимина в одной таблетке - от 21,25 мг/табл. до 28,75 мг/табл.

Сумма фенолкарбоновых кислот в пересчете на РСО цикориевой кислоты – спектрофотометрически при длине волны 328 ± 1 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (содержание не менее 4,5 мг/табл.). В качестве раствора сравнения использовали раствор кислоты хлористоводородной 0,1 моль/л.

Полученные результаты по валидации аналитических методик удовлетворяют установленным требованиям.

Высвобождение БАВ из модельных составов таблеток

Сравнительные исследования проводили для 2 модельных составов (№№4 и 8) по методике ГФ XIII (показатель «Растворение») в тестере растворения «Pharmatest»

(Германия) при температуре 37 °С. Растворяющая среда – вода очищенная; объем – 500 мл. Определение проводили для водорастворимых компонентов - суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на РСО цикориевой кислоты (Таблица 5).

Таблица 5

Результаты определения высвобождения БАВ из таблеток

Время растворения	Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на цикориевую кислоту, мг		Высвобождение, %	
	Состав №4	Состав №8	Состав №4	Состав №8
15 мин	0,8±0,01	0,98±0,01	40,17	49,21
30 мин	0,9±0,01	1,28±0,01	45,22	64,32
45 мин	0,95±0,01	1,47±0,01	47,74	73,87
60 мин	0,98±0,01	1,89±0,01	49,21	95,00

Полученные результаты показывают, что экспериментальный состав №4 за 60 мин высвобождает всего 49,2% БАВ, а состав №8 - 95% БАВ.

Изучение специфической активности ЛФ в опыте *in vitro*

Антимикробная активность таблеток для рассасывания

Методом «серийных разведений» установлена антимикробная активность в отношении *Staphylococcus aureus* 209-Р модельного состава №4 - в концентрации 31,2 мкг/мл, а для таблеток состава №8 - 15,6 мкг/мл. Метод «агаровых пластин» («метод лунок») показал, что зона подавления роста *Staphylococcus aureus* 209 Р для состава № 4 - 4,5 мм. а для состава № 8 – 8 мм.

Таким образом, из всех изученных образцов - экспериментальный состав под №8 по антимикробной активности является наиболее перспективным.

Противовоспалительную активность таблеток для рассасывания определяли *in vitro* по изменению оптической плотности НАДФН при температуре 37°С и длине волны 340 нм до (контроль) и после (опыт) добавления в реакционную среду 20 мкл тестируемых спиртоводных растворов из таблеток (состав №8). Оценивали их ингибирующее действие на скорость ферментативной реакции, катализируемой индуцибельной NO-синтазой и по активности ксаинтиоксидазы. Установлено, что растворы таблеток достоверно снижают скорость ферментативной iNOS-реакции на 26% по сравнению с диклофенаком и активность ксаинтиоксидазы на 11 % по сравнению с контролем (фермент +плацебо), что свидетельствует об их эффективной противовоспалительной активности.

Иммуностимулирующую активность таблеток для рассасывания определяли *in vitro* в гомогенатах свежих клеток полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЛ) макрофагов, измеряя на анализаторе Clima MC-15 («RAL», Испания) скорость НАДФН-оксидазной реакции по уменьшению оптической плотности растворов при длине волны 340 нм. Установлено, что в дозе 6,6 мкг/мл таблетки состава № 8 оказывают

иммуностимулирующий эффект на 80% по сравнению с препаратом сравнения - протинозин- α. Таблетки состава №4 в той же дозе показали активность в 4,5%.

Таким образом, состав таблеток для рассасывания №8 (Таблица 6) выбран как окончательный и назван «Эвкафан».

Таблица 6

Экспериментальный состав таблеток «Эвкафан»

Наименование ингредиентов	Количество ингредиентов на одну таблетку, г
<i>Активные компоненты:</i>	
Эвкалимин	0,025
Эстифан	0,025
<i>Вспомогательные вещества:</i>	
Сахарная пудра (сахароза)	0,551
Лимонная кислота	0,05
Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ)	0,035
Кальция стеарат	0,007
Тальк	0,007
<i>Масса одной таблетки</i>	<i>0,7</i>

Полученные таблетки имеют круглую плоскоцилиндрическую форму, гладкую поверхность, без риски; диаметр 12 мм, высота – 45 мм. Цвет таблеток светло-серый с зеленоватым или коричневатым оттенком, с характерным запахом и кисловатым вкусом, на изломе - однородные. На основании экспериментальных исследований и полученных результатов разработана технологическая схема производства таблеток «Эвкафан» (Рисунок 9).

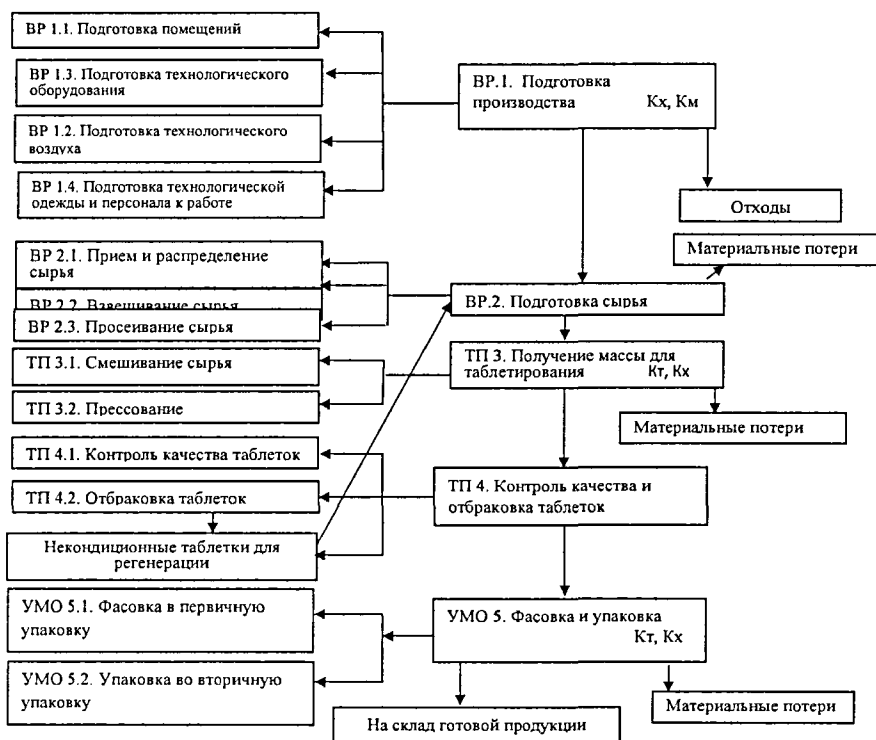
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных диссертационных исследований разработаны 2 лекарственные формы – адгезивный спрей в форме микрозумьсни и таблетки для рассасывания с растительными экстрактами эвкалипта прутовидного (эвкалимин) и эхинацеи пурпурной (эстифан), обладающие антимикробным, противовоспалительным и иммуностимулирующим действием, которые могут найти применение в практической медицине для лечения воспалительных заболеваний полости рта.

Практические рекомендации. Разработанные проекты нормативной документации на спрей «Эстилин» и таблетки для рассасывания «Эвкафан» могут быть внедрены в производственный процесс фармацевтических предприятий. Результаты диссертационных исследований могут быть внедрены в учебный процесс для студентов по дисциплинам «Фармацевтическая технология», «Коллоидная химия», «Фармацевтическая химия», «Фармацевтическая микробиология».

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в создании и клиническом исследовании новых комбинированных составов лекарственных форм на основе

субстанций растительного происхождения для оказания комплексного антимикробного, противовоспалительного и иммуностимулирующего действия.



Kt – контроль технологический. Kx – контроль химический

Рисунок 9 – Технологическая схема производства таблеток для рассасывания «Эвцафан».

Общие выводы

1. Обоснованы и разработаны комбинированные составы лекарственных форм с растительными экстрактами эвкалипта прутовидного и эхинацеи пурпурной в виде 0,2% спрея и таблеток для рассасывания, массой 0,7 г (по 0,025 г действующих веществ в каждой таблетке) для лечения воспалительных заболеваний полости рта.
2. Доказано, что оптимальной технологией получения спрея в виде микроэмульсии является солюбилизация водонерастворимых растительных экстрактов в 0,1% растворе ПАВ (твин 20/твин 80 при их соотношении 1:4) с последующим введением 0,1% лецитина, 0,05% нипагина и 3% раствора альгината натрия до 100,0 г; а таблеток для рассасывания -

прямое прессование с использованием таких вспомогательных веществ, как микрокристаллическая целлюлоза, сахароза, тальк, кальция стеарат, кислота лимонная.

3. Установлено, что разработанный состав спрея обладает адгезивными свойствами, а размеры мицелл, солюбилизирующих растительные экстракты, находятся в пределах 100 нм. Таблетки для рассасывания по таким технологическим показателям, как распадаемость (37 мин.) прочность на истирание (99,8%), прочность на сжатие (49,0 Н), соответствуют нормативным значениям.

4. Разработаны методики качественного анализа БАВ лекарственных форм (ТСХ - в системе бутанол-вода-кислота уксусная (40:10:10) и УФ-спектрофотометрия (при 280 ± 1 , 392 ± 1 ; 328 ± 1 нм), а также количественного определения БАВ (УФ-спектрофотометрия при 280 ± 1 и 328 ± 1 нм).

5. Установлено, что в течение 3 часовой экспозиции в опытах *in vitro* высвобождение БАВ из микроэмульсии на 18% больше, чем из мицеллярного раствора. Высвобождение водорастворимых БАВ из таблеток для рассасывания (состав №8) составило 95% от их содержания в таблетке.

6. Подтверждена специфическая активность лекарственных форм в опытах *in vitro* (антимикробное действие – методами серийных разведений и "агаровых пластинок"; противовоспалительное и иммуностимулирующее действие – с помощью специфических ферментных биотест-систем).

7. Установлена химическая стабильность и микробиологическая чистота разработанных лекарственных препаратов при хранении в течение 24 месяцев.

8. Разработаны проекты нормативной документации (НД и 2 лабораторных регламента) на комбинированные составы 0,2% спрея «Эстилин» и таблеток для рассасывания «Эвкафан», массой 0,7 г.

9. Поданы заявки в Роспатент на изобретения и получены решения о выдаче патентов по заявкам №2015149513 от 19.11.2015 г. «Композиция растительного происхождения в виде липосомальной формы»; №2015149516 от 19.11.2015 г. «Композиция растительного происхождения в виде мицеллярного раствора» и приоритетная справка № 2015149515 от 19.11.2015 г. «Противовоспалительная композиция пролонгированного действия для лечения дыхательных путей».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Массе, П. М. Фитопрепараты эвкалипта (*Eucalyptus*) и эхинацеи (*Echinacea*) в терапии воспалительных заболеваний полости рта (на англ. яз.). / П.М. Массе, П.Г. Мизина, С.Н.

- Суслина, Т.Ю. Владимирова. //Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 6. – С. 35 – 41.
2. Масесе, П. М., Микроскопия растительных экстрактов эстифан и эвкалимин. / Р.М. Masese, А.С. Хомик, П.Г. Мизина // Сборник научных трудов III научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века». – Москва. – 2015. – С. 425 – 428.
3. Исследование химического состава и совместимости фитопрепаратов эвкалимин и эстифан методом ВЭЖХ. / П.Г. Мизина, В.И. Осипов, П.М. Масесе, Н.И. Сидельников // **Биофармацевтический журнал**. – 2016. – Т.8. – №1. – С. 30 – 34.
4. Масесе, П.М. Перспективные фармацевтические фитосубстанции для лечения воспалительных заболеваний полости рта. /П.М. Масесе // **Современные тенденции развития науки и технологий**. Периодический научный сборник материалов XII международной научно-практической конференции. –г. Белгород. –2016. –№3– 2. – С.18–20.
5. Масесе, П.М. Обоснование рационального состава, комбинированного лекарственного фитосредства антимикробного и иммуностимулирующего действия. / П.М. Масесе, П.Г. Мизина, И.Н. Зилфикаров // **Материалы XII международной конференции – Тенденции развития науки и образования**. – Самара. – 2016. – Ч. 5. – С. 38-40.
6. Исследование антимикробной активности лекарственной композиции с экстрактами эвкалипта и эхинацеи. / П.М. Масесе, Т.В. Фатеева, П.Г. Мизина, И.Н. Зилфикаров // **Фармация**. – 2016. – Т. 65. – №3. – С. 40 – 42.
7. Изучение солюбилизации растительных экстрактов в смесях сорбитанов различного строения. / П.Г. Мизина, С.М. Левачев, П.М. Масесе и др. // **Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии**. – 2016. – № 5. –С. 3 – 8.
8. Масесе, П.М. Анализ современного ассортимента ЛОР-препаратов для местного применения. /П.М. Масесе, П.Г. Мизина, Т.Ю. Владимирова // **Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии**. –2016. –№ 6. –С. 36–39.
9. Копытько, Я.Ф. Разработка методик количественного определения фенолальдегидов и фенолкарбоновых кислот в жидких лекарственных формах для наружного применения, содержащих растительные экстракты. /Я.Ф. Копытько, П.Г. Мизина, П.М. Масесе, Н.И. Сидельников // **Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии**. –2016. –№ 8. –С. 3–9.
10. Мизина, П.Г. Исследование противовоспалительной активности фармацевтической композиции растительных экстрактов эхинацеи и эвкалипта с помощью специфической ферментной биотест-системы. /П.Г. Мизина, Л.Б. Стрелкова, П.М. Масесе, И.Н. Зилфикаров, В.Н. Давыдова // **Все материалы. Энциклопедический справочник**. – 2016. – №10. – С. 9-14.

Подписано в печать: 17.11.2016

Заказ № 11700 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(977) 518-13-77 (499) 788-78-56

www.autoreferat.ru