

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

На правах рукописи

СМЫСЛОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ И СТАНДАРТИЗАЦИИ
КОМПЛЕКСНОГО УРОЛОГИЧЕСКОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук, доцент
Литвинова Татьяна Михайловна

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Распространенность мочекаменной болезни, её роль в структуре урологических заболеваний.....	12
1.2 Этиология и патогенез мочекаменной болезни.....	12
1.3 Фармакотерапия уrolитиаза.....	14
1.4 Лекарственные растительные средства в профилактике и лечении заболеваний мочевыводящих путей.....	20
1.4.1 Листья брусники.....	31
1.4.2 Трава хвоща полевого.....	35
1.4.3 Корни лопуха.....	39
1.4.4 Плоды укропа огородного.....	43
1.4.5 Трава полыни обыкновенной.....	46
1.5 Характеристика сборов, как лекарственных препаратов.....	49
1.6 Сухие экстракты.	52
1.7 Физико-химические методы анализа основных БАВ сбора.....	52
1.7.1 Методы определения фенольных соединений.....	52
1.7.2 Методы определения полисахаридов.....	54
1.7.3 Методы определения эфирных масел.....	54
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	56
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
2.1 Объекты исследования.....	57
2.2 Методы исследования.....	58
2.2.1 Определение показателей качества сбора и экстракта сухого.....	58
2.3 Фитохимические методы изучения сбора и экстракта сухого.....	59
2.3.1 Тонкослойная хроматография.....	61
2.3.2 Газожидкостная хроматография.....	66
2.3.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	67
2.3.4 Спектрофотометрия.....	73
2.3.5 Титриметрические методы.....	76
2.4 Биологические методы исследования.....	77
2.5 Валидация методик.....	79
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА	81
3.1 Разработка состава растительного сбора.....	81
3.2 Выбор оптимального соотношения компонентов сбора.....	83
3.3 Изучение специфической фармакологической активности	

изучаемого сбора	84
3.4 Изучение морфолого-анатомических признаков изучаемого сбора	90
3.4.1 Внешние признаки.....	91
3.4.2 Анатомо-диагностические признаки (Микроскопия).....	92
3.5 Изучение состава БАВ сбора	107
3.5.1 Определение основных БАВ качественными реакциями в сборе.....	107
3.5.2 Идентификация БАВ методом УФ-спектрофотометрии.....	108
3.5.3 Хроматографический анализ изучаемого сбора	112
3.5.3.1 Идентификация БАВ методом тонкослойной хроматографии.....	112
3.5.3.2 Идентификация БАВ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	116
3.5.3.3 Идентификация компонентов эфирного масла методом газожидкостной хроматографии.....	120
3.6 Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в изучаемом сборе.....	121
3.6.1 Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе.....	125
3.7 Количественное определение основных БАВ в сборе	132
3.8 Определение показателей доброкачественности сбора.....	142
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	145
ГЛАВА 4 ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ.....	147
4.1 Получение экстракта сухого из сбора	147
4.2 Лабораторная схема получения экстракта сухого из сбора	150
4.3 Изучение состава БАВ экстракта сухого	153
4.3.1 Определение основных БАВ качественными реакциями в экстракте сухом	153
4.3.2 Идентификация БАВ в экстракте сухом методом УФ-спектрофотометрии.....	152
4.3.3 Хроматографический анализ экстракта сухого.....	154
4.3.3.1 Идентификация БАВ методом ТСХ.....	154
4.3.3.2 Идентификация БАВ методом ВЭЖХ.....	156
4.4 Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в экстракте сухом.....	160
4.4.1 Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в экстракте сухом.....	162
4.5 Количественное определение основных БАВ в экстракте сухом.....	169
4.6 Определение показателей качества экстракта сухого.....	175
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	177

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	178
Практические рекомендации	180
Перспективы дальнейшей разработки темы	180
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	181
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	182
ПРИЛОЖЕНИЯ	202
Приложение 1.....	203
Приложение 2.....	204
Приложение 3.....	205
Приложение 4.....	206
Приложение 5.....	219
Приложение 6.....	220
Приложение 7	223

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Согласно данным медицинской статистики в последние десятилетия наблюдается постоянный рост урологической заболеваемости населения, что связано с одной из основных причин – недостаточной эффективностью системы профилактики и предотвращения заболеваний [41, 42].

В структуре урологических заболеваний одно из ведущих мест занимает мочекаменная болезнь (МКБ, уrolитиаз) [4, 148, 166].

Мочекаменная болезнь приводит к длительной потере трудоспособности и инвалидизации населения. Кроме того, характерной особенностью заболевания является высокая частота рецидивов [132, 137, 143, 191]. Эффективная терапия и профилактика МКБ включает методы воздействия, направленные на устранение этиологических факторов болезни и патогенетических условий камнеобразования. [2, 64]. Для профилактики заболеваний мочевыводящих путей, а также в качестве эффективной составляющей консервативного лечения, особый интерес представляют многокомпонентные средства на основе фармацевтических субстанций растительного происхождения, сборы, обладающие комплексным действием на этиопатогенез заболевания. Растительные сборы отличаются мягким действием, отсутствием побочных эффектов, что делает возможным их длительное применение для обеспечения многонаправленного действия при хроническом течении МКБ [54, 78].

На сегодняшний день в Государственном реестре лекарственных средств зарегистрированы 6 растительных сборов, которые рекомендованы в комплексной терапии урологических заболеваний [30]. Но растительных композиций, предназначенных для консервативного лечения и профилактики мочекаменной болезни, зарегистрированных и официально разрешенных, нет. Таким образом, имеется потребность в расширении ассортимента комплексных растительных препаратов российского производства, что позволит обеспечить индивидуальный подход к выбору фармакотерапии заболеваний мочевыводящих путей и расширить возможности консервативного лечения мочекаменной болезни.

Поэтому разработка и внедрение оригинального сбора, предназначенного для консервативного лечения и профилактики мочекаменной болезни, является актуальной задачей.

Степень разработки темы исследования

Разработкой многокомпонентных растительных сборов, предназначенных для профилактики и лечения группы инфекционно-воспалительных заболеваний мочевыводящих путей, занимались О.А. Елецкая, М.В. Бабаева, А.Д. Таляль. Анализ литературных данных показал, что имеются сведения об изучении доклинических исследований растительной композиции, предназначенной для превентивной терапии уролитиаза (И.С. Бутуханова), без проведения фармакогностических исследований.

В настоящий момент сбор для консервативного лечения и предупреждения мочекаменной болезни отсутствует, что делает разработку и исследование актуальным.

Цель и задачи исследования

Целью исследования диссертационной работы является разработка и стандартизация комплексного урологического растительного средства.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Провести информационно-аналитического исследование урологических лекарственных средств;
2. Обосновать состав растительных компонентов и оптимальное их соотношение в сборе;
3. Провести фармакогностическое исследование растительного сбора (изучение внешних и микроскопических признаков, числовых показателей, методик качественного и количественного анализа);
4. Получить экстракт сухой на основе изучаемого сбора и провести изучение состава БАВ;
5. Разработать методики оценки количественного содержания суммы флавоноидов в сборе и экстракте сухом;

6. Определить показатели качества сбора, экстракта сухого и установить их нормы;
7. Провести изучение специфической фармакологической активности комплексного урологического сбора *in vivo* на экспериментальной модели мочекаменной болезни;
8. На основании результатов исследования разработать проект НД на комплексный урологический сбор - «Фитоурол».

Научная новизна

На основании данных обзора литературных источников, фармакологических и фитохимических исследований впервые был обоснован состав и оптимальное соотношение компонентов сбора «Фитоурол», включающего пять видов растительного сырья: брусники листья, хвоща полевого трава, лопуха корни, укропа огородного плоды, полыни обыкновенной трава.

С использованием различных методик *in vivo*, впервые установлено, что водное извлечение комплексного урологического растительного средства в экспериментально-терапевтической дозе обладает выраженной фармакотерапевтической эффективностью при экспериментальном уrolитиазе, индуцированным внутрижелудочным введением витамина Д₂, способствуя нормализации морфофункционального состояния почек лабораторных животных на стадиях патологического процесса.

С применением современных инструментальных физико-химических методов (ТСХ, ВЭЖХ, СФМ) в сборе идентифицированы: флавоноиды (рутин, гиперозид, лютеолин, лютеолин-7-гликозид, кверцетин, нарингенин), фенологликозид (арбутин), фенолкарбоновые кислоты (галловая, эллаговая), гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая, феруловая, неохлорогеновая, изоферуловая, кофейная, цикориевая, коричная), свободные сахара (фруктоза, сахароза, глюкоза), производные дубильных веществ (эпикатехин, катехин, эпигаллокатехингаллат), кумарины (дикумарин, метоксикумарин) и органические кислоты (янтарная, щавелевая); исследован компонентный состав эфирного масла сбора; проведено определение содержания: экстрактивных веществ, флавоноидов,

арбутина, эфирных масел, полисахаридов (инулина), дубильных веществ, органических кислот.

Получен экстракт сухой из разработанного сбора: установлена зависимость выхода БАВ от условий экстрагирования (тип экстрагента, измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, температурный режим, кратность и время экстракции), определены параметры сушки экстракта сухого; установлен состав БАВ экстракта сухого.

Определены критерии подлинности (внешние признаки, микроскопия, хроматографические характеристики), показатели качества (влажность, зола общая и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, измельченность, примеси), показатели безопасности (радионуклиды, микробиологическая чистота) сбора; определены показатели качества экстракта сухого (описание, потеря в массе при высушивании) и показатели безопасности (радионуклиды). Разработаны и валидированы методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Представленный в исследовании экспериментальный материал может служить теоретической базой для создания и исследования новых урологических лекарственных растительных средств. Результаты исследования используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармации Института фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в работе испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы». На основе проведенных исследований разработан проект НД на комплексный урологический сбор «Фитоурол».

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты разработки состава сбора;
- результаты фармакогностического изучения сбора и его стандартизация;

- результаты идентификации и определения содержания БАВ экстракта сухого;
- результаты стандартизации экстракта сухого;
- результаты изучения на животных фармакологической активности сбора;
- результаты определения показателей качества сбора для включения в проект НД.

Методология и методы исследования

Методология исследования построена на информационном скрининге и анализе литературных данных, оценке степени разработанности и актуальности темы. В процессе выполнения работы были использованы современные методы анализа физико-химического: хроматография в тонком слое сорбента, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-спектрофотометрия, газожидкостная хроматография; химического: титриметрические методы (йодометрия, перманганатометрия, алкалиметрия); биологическая оценка специфической фармакологической активности *in vivo*; фармакопейные методики ГФ XI, XIII изд. Все расчеты производились в стандартных пакетах компьютерных программ Microsoft Office 2008: Microsoft Excel, Microsoft Access с использованием стандартных функций этих программ.

Достоверность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов определяется комплексным характером работы, использованием научных методов исследований, широким перечнем привлеченных источников и видов информации, в том числе данных, полученных в результате экспериментальных исследований. В работе использовалось современное сертифицированное оборудование, экспериментальные исследования проводились в достаточном числе повторностей. Разработанные методики были валидированы, что позволило получить достоверные и воспроизводимые результаты. Проведенная экспертная оценка подтвердила достоверность первичных материалов.

Апробация результатов исследования

Основные результаты исследований доложены на XLI международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы» (Новосибирск, 2015 г.), XXXVI международной заочная научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (Москва, 2015 г.), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы и перспективы развития медицины» (Омск, 2015 г.), Международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях» (Казань, 2015 г.), 6th European Conference on Biology and Medical. «East West» (Vienna, 2015).

Апробация работы состоялась на межкафедральной учебно-методической конференции Института фармации и трансляционной медицины Мультидисциплинарного центра клинических и медицинских исследований Международной школы «Медицина будущего» ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (30.05.2017 г., Москва).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, постановке целей и задач, выборе объекта исследования, проведении экспериментальных исследований, обобщении и статистической обработке полученных результатов. Автором лично проведена разработка, валидация методик определения суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид методом дифференциальной спектрофотометрии, арбутина методом йодометрического титрования в сборе и экстракте сухом. Автором подобраны условия разделения БАВ лекарственного растительного сырья для качественной оценки сбора и экстракта сухого методом ВЭЖХ. Вклад автора является определяющим на всех этапах проводимого исследования: начиная от постановки цели и задач до их практической реализации, обсуждения результатов исследования в научных публикациях и непосредственного внедрения в практику.

Внедрение результатов исследования

Результаты научной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт от 31.05.2017). Материалы исследования внедрены в практику работы испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения г. Москвы» и используются в технологическом процессе получения сухих экстрактов из растительного сырья (акт от 05.06.2017) и для контроля качества многокомпонентных средств на основе фармацевтических субстанций растительного происхождения (акт от 05.06.2017).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а именно, пунктам 2, 3, 6 областей исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста с приложениями и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы. Библиографический указатель содержит 192 наименования (из них отечественных – 138, иностранных – 54). Приведено 72 таблиц и 62 рисунка.

Публикации

Основное содержание, результаты исследования и выводы отражены в 15 публикациях, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 3 статьи в зарубежных изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Распространенность мочекаменной болезни, её роль в структуре урологических заболеваний

В структуре урологических заболеваний одно из ведущих мест занимает мочекаменная болезнь [4]. На долю больных с МКБ в урологических стационарах приходится от 30 до 50% от общего числа пациентов [15, 37, 137].

Заболеваемость МКБ в мире составляет не менее 3% и продолжает прогрессивно возрастать [98, 117, 148, 185, 191]. Так, в Российской Федерации (РФ) за период 2002-2014 гг абсолютное число зарегистрированных больных нефролитиазом увеличилось на 34,5% [41, 98, 179].

Возрастная структура заболеваемости уролитиазом характеризуется высокими показателями среди лиц трудоспособного возраста, особенно отмечается возрастная группа 25-50 лет. Наиболее часто болезнь регистрируется среди мужчин: от 70% до 81% случаев, у женщин: 47-60% [3, 15, 166].

Одной из характерных особенностей заболевания является высокая частота рецидивов – до 38,4% [98, 112, 132].

Учитывая большую распространенность МКБ в структуре урологических заболеваний, увеличение заболеваемости в современном мире, высокую частоту рецидивирования, актуальной задачей остается разработка и внедрение новых эффективных лекарственных средств, предназначенных для лечения и профилактики мочекаменной болезни.

1.2 Этиология и патогенез мочекаменной болезни

Мочекаменная болезнь – это заболевание, наиболее постоянным и существенным признаком которого является образование и присутствие одиночных или множественных камней в системе мочевыводящих путей – почечных чашечках, лоханке, мочеточнике, мочевом пузыре и мочеиспускательном канале [53].

Уролитиаз представляет собой сложный симптомокомплекс, включающий в себя эндогенные и/или экзогенные этиологические факторы, многовариантный патогенез [2, 15, 80].

К экзогенным причинам уролитиаза можно отнести: инфекции мочевыводящих путей, жаркий климат, обезвоживание организма, жесткость питьевой воды, особенности питания, недостаток или передозировка ряда витаминов (А, D и др.), гиподинамию. Передозировка и бесконтрольное применение некоторых лекарственных средств [2, 145, 146, 166, 182].

К эндогенным факторам относят нарушение фосфорно-кальциевого обмена, метаболизма щавелевой кислоты (оксалатов), мочевой кислоты, цистинового обмена, некоторые эндокринопатии (гиперпаратиреоз, гипертиреоз, болезнь Иценко-Кушинга и др.), метаболический синдром, остеопороз, ряд заболеваний желудочно-кишечного тракта, нарушение транспорта литогенных веществ [53, 147, 158].

К настоящему времени предложено большое количество теорий патогенеза МКБ, основными считаются три:

Теория преципитации и кристаллизации (теория нуклеации и насыщения) рассматривает образования конкремента как физико – химический процесс преципитации литогенных солей из мочи перенасыщенной. Кроме того, предполагают, что микрокристалл или чужеродное тело, в перенасыщенной моче вызывает рост конкрементов в кристаллическом состоянии [3, 21, 22].

Ингибиторная теория рассматривает образование камней вследствие нарушения свойств ингибиторов и развитием дисбаланса между активностью ингибиторов (замедлителей) и промоторов (ускорителей) кристаллизации у камнеобразователей [23, 40].

Матричная теория рассматривает камнеобразование вследствие выпадения в осадок органических веществ, которые выполняя роль центров кристаллизации (нуклеол), инициируют кристаллизацию неорганических компонентов. Органический матрикс (матрица), составляющий 2-5% его общего веса, служит ядром формирования камней в кристаллическом состоянии [140, 191].

1.3 Фармакотерапия уролитиаза

Консервативная терапия МКБ – это сложный комплекс различных методов воздействия, направленных на устранение этиологических факторов болезни и патогенетических условий камнеобразования: метаболических нарушений, нарушения секреторно-экскреторной функции почек, уродинамики и физико-химических свойств мочи. Антилитогенная терапия включает соответствующую диету, водный режим и лекарственную терапию с учетом типом камнеобразования: оксалатного, фосфатного, мочекислового, цистинового или смешанного [53].

Фармакотерапия уролитиаза направлена на ликвидацию болевого синдрома, воспалительного процесса, растворение формирующихся конкрементов, воздействие на патогенетический фактор, коррекцию кислотности мочи. А также позволяет снизить риск рецидивного камнеобразования за счет корректирования биохимических изменений в крови, моче и способствует отхождению конкрементов размером до 5 мм [2, 4].

При всех формах уролитиаза назначаются лекарственные препараты (ЛП) различных групп, обладающие следующими эффектами [31, 40, 59]:

- противовоспалительным;
- спазмолитическим;
- мочегонным;
- нефропротекторным;
- антибактериальным;
- обезболивающим;
- антиоксидантным.

Классификация лекарственных веществ, применяемых для лечения и профилактики различных форм МКБ:

1) Диуретики:

– Тиазиды и тиазидоподобные диуретики (ингибиторы симпорта $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$): гидрохлортиазид, индапамид [4].

- Петлевые диуретики (ингибиторы симпорта $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$): фуросемид [124].
- 2) *Спазмолитики миотропные*: дротаверин, бенциклан, папаверин, бендазол [4].
- 3) *м-холинолитики*: атропин, скополамин, метоциния йодид, азаметония бромид, дифенилтропин, платифиллин, апрофен, дицикловерин, гиосцина бутилбромид. [50].
- 4) *Альфа-адреноблокаторы*: тамсулозин, теразозин, доксазозин, альфузозин [50, 175].
- 5) *Блокаторы кальциевых каналов*: нифедипин, диуманкал [11, 175].
- 6) *Ненаркотические анальгетики, нестероидные и другие противовоспалительные средства*: диклофенак, индометацин, кетопрофен, кеторолак, ибупрофен, ацетилсалицилат лизина, кетопрофен, метамизол натрия, декскетопрофен, пироксикам [4, 71].
- 7) *Опиоидные ненаркотические анальгетики*: налоксон, буторфанол, трамадол, фентанил.
- 8) *Противомикробные, противопаразитарные и противоглистные средства*:
 - *Хинолоны/фторхинолоны*: ципрофлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин, оксолиновая кислота, норфлоксацин, гатифлоксацин, налидиксовая кислота, пипедимовая кислота, эноксацин, флероксацин.
 - *Цефалоспорины I, II, III, IV поколений*: цефазолин, цефуроксим, цефтриаксон, цефпиром и др.
 - *Аминогликозиды*: амикацин, гентамицин, тобрамицин, сизомицин, нетилмицин.
 - *Карбапенемы*: имипенем / циластатин, меропенем.
 - *Гликопептиды*: ванкомицин.
 - *Производные нитрофурана*: нитрофурантоин, фуросолидон, фурагин, фурамаг.
 - *Пенициллины*: ампициллин, оксациллин, карбенициллин.
 - *Нитроимидазолы*: метронидазол.
 - *Сульфаниламиды*: сульфаэтидол, сульфаметоксазол, сульфакарбамид.

- Другие синтетические антибактериальные средства: нитроксолин [4, 15, 40].
- 9) *Вакцины, сыворотки, фаги и анатоксины*: бактериофаги колипротейный, протейный, стафилококковый, псевдомонас аэругиноза, поливалентный [53].
- 10) *Средства, препятствующие образованию и способствующие растворению конкрементов в комбинациях*: блемарен, магурлит [32].
- 11) *Средства, препятствующие образованию и способствующие растворению конкрементов*: натрия цитрат, натрия-калия цитрат, калия натрия гидроцитрат, натрия-магния цитрат [33].
- 12) *Корректоры метаболизма костной и хрящевой ткани*: этидроновая кислота, клодроновая кислота, памидроновая кислота, алендроновая кислота, ибандронат.
- 13) *Средства, влияющие на обмен мочевой кислоты*: аллопуринол, бензбромарон, сульфинпиразон [4, 32].
- 14) *Витамины и витаминоподобные средства*: витамины А, Е, В₆, В₁, В₂, С, D, РР.
- 15) *Комбинированные препараты*: аевит, вобэнзим.
- 16) *Вещества из разных групп*: ортофосфаты, метеонин, глутаминовая кислота, аммония хлорид, препараты лития, магния, кальция, аминобифосфонаты, целлюлозы натрия фосфат, натрия гидрокарбонат, D-пеницилламин, меркаптопропионилглицин, дипиридамола, пентоксифиллин, цинарин, фосфолипиды, ненасыщенные жирные кислоты, дипиридамола, верапамил, панангин, аминифиллин [17, 58, 130].
- 17) *Лекарственные растительные препараты, применяемые в терапии заболеваний мочевыводящих путей, с моно- и многокомпонентным составом.*

Монокомпонентные лекарственные растительные препараты, применяемые для лечения и профилактики урологических заболеваний, содержат ЛРС: **брусники листья**, **горца птичьего траву**, **лопуха корни**, можжевельника плоды, ортосифона тычиночного (почечного чая) листья, толокнянки листья, **хвоща полевого траву**, эрвы шерстистой траву; экстракты или индивидуальные соединения (вещества): леспеплан, марены красильной экстракт сухой, урифлорин, ависан и др. [30, 126, 133].

На сегодняшний день в Государственном реестре лекарственных средств зарегистрированы следующие многокомпонентные лекарственные растительные средства, рекомендованные для лечения и профилактики заболеваний мочевыводящих путей: 6 растительных сборов (табл. 1.3.1) и 8 экстракционных препаратов (табл. 1.3.2) [30].

Таблица 1.3.1

Растительные сборы для лечения и профилактики заболеваний почек и мочевыводящих путей, зарегистрированные в Государственном реестре лекарственных средств

№	Наименование лекарственного растительного препарата, лекарственная форма	Состав лекарственного растительного препарата	Страна производитель
1.	Бруснивер – сбор-порошок	<u>1 фильтр-пакет содержит:</u> Брусники листья – 50 %	Россия
2.	Бруснилан – сбор-порошок	Зверобоя продырявленного трава – 20 % Череды трехраздельной трава – 10 % Шиповника плоды – 20 %	Россия
3.	Сбор мочегонный №2 – сбор измельченный	Толокнянки листья – 40% Солодки корни – 20% Можжевельника обыкновенного плоды – 40%	Россия
4.	Фитонефрол (урологический сбор) – сбор-порошок	Толокнянки листья – 40% Ноготков цветки – 20% Укропа огородного плоды – 20% Элеутерококка корневища и корни – 10% Мяты перечной листья – 10%	Россия
5.	Элекасол – сбор-порошок	Солодки корней – 20% Шалфея листьев – 20% Эвкалипта прутовидного листьев – 20% Ноготков цветков – 20% Череды травы – 10% Ромашки цветков – 10%	Россия
6.	Урологический (мочегонный) сбор-ф – сбор-порошок, сбор измельченный	Толокнянки листья – 40% Ноготков цветки – 20% Фенхеля плоды – 20% Элеутерококка корневища и корни – 10% Мяты перечной листья – 10%	Россия

Таблица 1.3.2

Экстракционные комплексные лекарственные растительные препараты для лечения и профилактики заболеваний почек и мочевыводящих путей, зарегистрированные в Государственном реестре лекарственных средств

№	Наименование лекарственного растительного препарата, лекарственная форма	Состав лекарственного растительного препарата	Страна производитель
1	2	3	4
1.	Марелин – таблетки	<u>Состав на 1 таблетку:</u> Салициламид – 35 мг Сухой экстракт марены красильной – 32,5 мг Сухой экстракт золотарника канадского – 25 мг Сухой экстракт хвоща полевого – 15 мг Келлин – 2,5 мг	Россия
2.	Урохолесан – капли	<u>100 г раствора каплеь содержат:</u> Экстракт травы душицы обыкновенной – 23 г Масло касторовое – 11 г Жидкий экстракт семян моркови дикой – 23 г Масло мяты перечной – 2 г Масло пихты – 8 г Экстракт шишек хмеля – 32,995 г	Россия
3.	Гинджалелинг – капсулы	<u>Состав на 1 капсулу:</u> 178 мг густого водного экстракта из ЛРС: Листья стробиланта курчавого (<i>Strobilanthes crispus</i> L.) – 27,7%; Листья ортосифона тычиночного (<i>Orthosiphon stamineus</i> Benth.) – 27,7%; Корневища императы цилиндрической (<i>Imperata cylindrical</i> B.) – 22,3%; Трава филлантуса Нирури (<i>Phyllanthus niruri</i> L.) 22,3%	Индонезия
4.	Канефрон Н – раствор для приема внутрь, драже	<u>100 г раствора содержат:</u> 29 г водно-спиртовой экстракт из ЛРС: Золототысячника трава – 0,6 г Любисток лекарственного корня – 0,6 г Розмарина листья – 0,6 г Вода очищенная – 71 г <u>Состав на 1 драже:</u> Золототысячника трава – 18 мг Любисток лекарственного корня – 18 мг Розмарина листья – 18 мг	Германия

Продолжение таблицы 1.3.2

1	2	3	4
5.	Цистон – таблетки	<u>Состав на 1 таблетку:</u> <i>Экстракты:</i> Цветков двуплодника стебелькового – 65 мг Стеблей камнеломки язычковой – 49 мг Стеблей марены сердцелистной – 16 мг Корневищ сыти пленчатой – 16 мг Семян соломоцвета шероховатого – 16 мг Надземной части оносмы прицветковой – 16 мг Целого растения вероники пепельной – 16 мг <i>Порошки:</i> Мумиё очищенного – 13 мг Силиката извести – 16 мг	Индия
6.	Фитолизин – паста для приготовления суспензии для приема внутрь	<u>100 г пасты содержат:</u> <i>Экстракты:</i> Травы золотарника – 50 мг Травы хвоща полевого – 100 мг Травы горца птичьего – 150 мг Корневищ пырея – 125 мг Шелухи лука репчатого – 100 мг Листьев березы – 50 мг Семян пажитника – 175 мг Плодов петрушки – 175 мг <i>Эфирные масла:</i> Масло апельсина, масло шалфея, масло травы мяты перечной, масло сосны обыкновенной – 1 г	Польша
7.	Роватинекс – капсулы	<u>Состав на 1 капсулу:</u> Пинен ($\alpha+\beta$) – 31 мг, камфен – 15 мг, цинеол – 3 мг, фенхон – 4 мг, борнеол – 10 мг, анетол – 4 мг	Ирландия
8.	Уролесан – капсулы, сироп, капли	<u>Состав на 1 капсулу:</u> Экстракт семян моркови дикой – 1,84 мг Экстракт шишек хмеля – 6,33 мг Экстракт травы душицы обыкновенной – 1,46 мг Масло мяты перечной листьев – 7,46 мг Масло пихты – 25,5 мг <u>100 г раствора капель и сиропа содержат:</u> Масло пихты – 6,76 г Масло мяты перечной – 1,69 г Масло касторовое – 9,295 г Жидкий экстракт семян моркови дикой – 19,435 г Жидкий экстракт шишек хмеля – 27,88 г Жидкий экстракт травы душицы обыкновенной – 19,295 г	Сербия, Украина

Как видно из табл. 1.3.2, имеется потребность в расширении ассортимента комплексных препаратов российского производства, что позволит обеспечить индивидуальный подход к выбору фармакотерапии заболеваний мочевыводящих путей и расширить возможности консервативного лечения мочекаменной болезни.

1.4 Лекарственные растительные средства в профилактике и лечении заболеваний мочевыводящих путей

Официальная медицина использует опыт традиционной медицины, методы которой широко применяются практически всеми социальными группами населения. А также из-за возможного нефротоксического действия синтетических сильнодействующих средств, применяемых для лечения почек и мочевыводящих путей, в настоящее время все большее внимание уделяется фитотерапии. Возможности лечения урологических заболеваний лекарственными растениями используются еще недостаточно полно.

Известно, что в комплексной терапии урологических заболеваний используют лекарственные растительные средства, обладающие как диуретическими свойствами (**брусника обыкновенная**, почечный чай, толокнянка обыкновенная, **хвощ полевой**, береза и др.), спазмолитическими (**укроп огородный**, **полынь обыкновенная**, мята перечная и др.), противовоспалительными (**лопух**, зверобой и др.), антисептическими (календула лекарственная, зверобой, **брусника обыкновенная** и др.) и гемостатическими (дуб, калина обыкновенная, горец птичий, змеиный и почечуйный, зверобой и др.) [7, 14, 53, 65, 82].

Лекарственные растительные препараты, такие как уролесан, урохолесан, широко применяются в качестве составляющей консервативного лечения уrolитиаза после удаления мочевых камней, а также в качестве монотерапии для профилактики первичного уrolитиаза при наличии факторов риска и рецидивного камнеобразования.

Фармакологическое действие лекарственных средств на основе фармацевтических субстанций растительного происхождения обусловлено наличием комплекса биологически активных веществ (БАВ), которые реализуют его различными механизмами, так как относятся к различным классам химических соединений [54, 82, 173].

В значительной степени фармакологические свойства растительных экстрактов, настоев, отваров и иных средств официальной и народной медицины определяются содержанием в них фенольных соединений, таких как флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, катехины и некоторые гликозиды [10, 39, 65, 164].

Флавоноиды – одна из самых распространенных групп фенольных соединений, обладающая широким спектром биологической активности.

Мочегонное действие флавоноидов связывают с расширением почечных сосудов и с увеличением фильтрации первичной мочи [23]. Спазмолитическое действие обусловлено их непосредственным воздействием на гладкомышечные волокна. В суммарном противовоспалительном эффекте флавоноидов имеет значение их непосредственное действие на клеточные и тканевые мембраны – снижение их проницаемости, уплотнение мембран лизосом, ингибирование гиалуронидазы – фермента, разрушающего межклеточное основное вещество тканевых барьеров. Определенное значение имеет также антагонистическое действие по отношению к медиаторам воспаления (кининам, серотонину и гистамину). Показано, что желчегонный эффект флавоноидов обусловлен за счёт расслабления мускулатуры желчного пузыря и желчевыводящих путей, а также вследствие усиления выработки желчи [10].

Известно, что флавоноиды являются растительными антиоксидантами, они участвуют во многих обменных реакциях организма, в частности способствуют эффективному использованию аскорбиновой кислоты. Антиоксидантная активность флавоноидов реализуется разными механизмами. Одним из механизмов антирадикального действия флавоноидов является инактивация супероксидного и гидроксильного радикала за счет наличия гидроксильной группы, присоединенной к ароматическому ядру, что также способствует восстановлению функциональной

активности компонентов антиоксидантной системы организма. Другим механизмом антиоксидантной активности флавоноидов – способность к образованию прочных хелатных комплексов с металлами с переменной валентностью, участие в транспорте электронов, а также их ферментомодулирующая активность. Все эти факторы обуславливают выраженное мембраностабилизирующее действие флавоноидных соединений.

Экспериментально было доказано, что антиоксидантная активность обуславливает повышение антиоксидантного статуса почечной ткани, целостности клеточной мембраны и, как следствие, предупреждение рецидива при заболеваниях почек и мочевыводящих путей: уролитиазе, пиелонефрите, гломерулонефрите, постишемических и реперфузионных повреждениях почек [72].

Одной из причин образования камней в почках является снижение клеточной антиоксидантной способности почечной ткани вследствие снижения экспрессии антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) и антиоксидантов. Кроме того, воздействие кристаллов оксалатов и/или оксалатов кальция на клетки почечного эпителия ведет к образованию активных форм кислорода, развитию окислительного стресса. Что в совокупности приводит к повреждению и воспалению клеток почечного эпителия, а именно, нарушению целостности мембран, что в дальнейшем облегчает удержание кристаллов оксалата кальция и способствует росту камней. Согласно экспериментальным данным, лечение природными антиоксидантами уменьшало повреждение почечной ткани, обусловленное кристаллами оксалата кальция [173].

Другая группа – *дубильные вещества* относятся к высокомолекулярным полифенолам с сильно выраженным дубящим действием, которое обусловлено химическим взаимодействием полифенольных групп растения с молекулами коллагена. Дубильные вещества широко используются как вяжущие, противовоспалительные, бактерицидные, противовирусные и противоопухолевые средства, особенно при лечении урологических заболеваний. Противовоспалительный эффект их основан на образовании защитной пленки белка и полифенола, который оказывает благотворное воздействие на слизистую

оболочку кишечника, уменьшает всасывание кальция из кишечника в кровь, что имеет важное значение при лечении оксалатного уролитиаза. Поэтому лекарственные растительные препараты с высоким содержанием дубильных веществ часто применяют при хронических мочеполовых заболеваниях [2, 54].

Также, природные *кумарины* имеют важное значение в терапии заболеваний почек и мочевыводящих путей. В зависимости от химического строения кумарины обладают различной физиологической активностью: одни проявляют спазмолитическое действие (виснага морковевидная, полынь обыкновенная), другие – капилляроукрепляющий эффект (донник лекарственный, каштан конский). Кроме того, есть кумарины с успокаивающим, противомикробным, мочегонным и обезболивающим действием [54, 78, 82].

Катехины повышают резистентность организма при ультрафиолетовом, особенно ПУВА-терапии больных заболеваниями мочеполовой сферы, усиливают сопротивляемость при воздействии промышленных факторов внешней среды [54].

Известно, что некоторые *гликозиды* под воздействием ферментов, кислот и щелочей организма расщепляются на углеводы и активно действующие вещества – агликоны. Диапазон их действия широк, но общим свойством гликозидов является их способность повышать диурез. Широкое применение в урологии нашли фенологликозиды (например, арбутин), которые помимо мочегонного действия, проявляют бактерицидное действие, и назначаются при пиело- и гломерулонефритах, циститах, уретритах, мочекислых диатезах и нефролитиазе [53, 78, 82].

Такая группа, как *сапонины* – гликозиды тритерпеновой и стероидной структур, не содержат в своем составе азот. ЛРС, содержащее сапонины используют для приготовления общеукрепляющих, стимулирующих и тонизирующих препаратов, что важно в проведении медикаментозной реабилитации больных с урологическими заболеваниями [54].

Важны для успешной терапии МКБ *кремниевые соединения*, которые образуют защитные коллоиды, предохраняющие слизистую оболочку мочевых путей от формирования конкрементов в почках и мочевом пузыре [78].

Алкалоиды содержатся в растениях в виде солей лимонной, щавелевой, яблочной и других органических кислот. Лекарственные формы с алкалоидами используются в урологии в качестве спазмолитических, тонизирующих и болеутоляющих средств [53, 54].

В сборы для лечения и профилактики урологических заболеваний также рекомендуют включать лекарственные растения, содержащие *эфирные масла*, которые обладают антисептическим, спазмолитическим, мочегонным, обезболивающим действием [54, 57].

Органические кислоты участвуют в метаболизме животных организмов. Являясь промежуточными соединениями в процессе окисления жиров, углеводов, аминокислот и белков, они обладают широким спектром биологической активности: антисептической, капилляроукрепляющей, противовоспалительной [68, 82].

Полисахариды содержатся во многих лекарственных растениях. Это сложные углеводы, к которым относятся крахмал, слизи, инулин, пектины, клетчатка и др. Их основное влияние направлено на желудочно-кишечный тракт.

Крахмал и другие полисахариды образуют в желудочно-кишечном тракте слизи (студни). Они предотвращают раздражение слизистой оболочки, влияют на абсорбцию различных компонентов пищи. Обладают обволакивающим действием и противовоспалительным свойством, оказывая положительное влияние в профилактике оксалатного камнеобразования. По мнению ряда авторов, полисахариды могут уменьшать абсорбцию в кишечнике литогенных веществ [53].

Клетчатка и *пектины* улучшают пищеварение, обладают детоксицирующим свойством за счет связывания и выведения токсических веществ из кишечника, снижают гнилостные процессы в нем и предотвращают запор. Поэтому их используют и в профилактике мочеполовых заболеваний [54].

Таким образом видно, что препараты лекарственных растений, применяемые в профилактике и лечении заболеваний мочевыводящих путей, по механизму действия избирательно влияют на кровообращение почек и мочевых путей, вызывают спазмолитический, мочегонный, противовоспалительный и

болеутоляющий эффекты, воздействуют на рН мочи, реабсорбцию и экскрецию литогенных веществ. Считается, что их воздействие синхронно взаимосвязано с влиянием на печень, поджелудочную железу и кишечник по метаболизму и транспорту (выведению) литогенных веществ [53]. Кроме того, препараты некоторых лекарственных растений избирательно действуют при оксалатном, фосфатном и мочекишлом уролитиазе и соответствующей кристаллурии [43, 53, 132].

Так спазмолитическую, болеутоляющую (седативную) активность проявляют препараты лекарственных растений: мяты перечной, виснаги морковевидной, фиалки трехцветной, укропа пахучего, можжевельника обыкновенного, кукурузных рыльцев, полыни обыкновенной, фенхеля обыкновенного и др. Их рекомендуют при литокинетической терапии, кристаллурии, после удаления дренажных систем (стенты, нефростома), при хроническом камневыделении. Спазмолитический эффект направлен на устранение болевого синдрома, развивающегося в результате спастического сокращения мочеточников, мочевого пузыря и уретры в результате раздражения конкрементами. А также за счет спазмолитического действия на мускулатуру желчного пузыря и желчевыводящих протоков облегчается отток желчи. Желчегонное действие дополняет эффективность уролитической терапии за счет выведения части литогенных веществ с желчью.

Лекарственные растения с диуретическим действием это: почечный чай, брусника обыкновенная, хвощ полевой, горец птичий, укроп огородный, марена красильная, лопух большой, толокнянка обыкновенная, эрва шерстистая и др., препараты которых показаны для детоксикации организма, снижения концентрации литогенных веществ в моче и уменьшения их кристаллизации, при небольших периферических отеках, гипертензии, после эндоскопических вмешательств и для литокинетической терапии мелких камней чашечно-лоханочной системы и мочеточников. Растительные диуретики повышают почечный кровоток и/или ускоряют осмотические процессы и, как следствие этого,

повышается гломерулярная фильтрация и увеличивается образование первичной мочи [82, 127].

Лекарственные растительные препараты с мочегонным и нередко желчегонным (одновременно) действием при консервативном лечении МКБ имеют определенные показания – в основном мочекислый и оксалатный уролитиаз с целью выведения части литогенных веществ с желчью в кишечник. При этом желчегонный эффект лекарственных растений дополняет эффективность лечения [53].

Лекарственные растительные препараты с противовоспалительным действием: брусники обыкновенной, мяты перечной, чабреца обыкновенного, толокнянки обыкновенной, фиалки трехцветной, березы, шалфея лекарственного, зверобоя и др., применяются в качестве вспомогательной терапии к основному лечению при хроническом пиелонефрите и других мочевых инфекциях, либо как реабилитационная терапия по завершению лечения воспалительных процессов. Мочевая инфекция при уролитиазе – самое частое сопутствующее проявление или осложнение. В одних случаях она предшествует камнеобразованию и вызывает изменения в почках и/или мочевых путях в виде нарушения кровообращения, лимфооттока, уродинамики или придает литогенные изменения самой моче, особенно при наличии грамотрицательной микрофлоры. А в других случаях уроинфекция присоединяется вторично к уже существующему уролитиазу неинфекционного генеза [53].

Лекарственные растительные препараты такие как, лимонник китайский, женьшень, элеутерококк колючий, шиповник и др., оказывают тонизирующее действие при гипотонии мочевых путей после их деблокады или пластических операций для коррекции уродинамики [57].

Так как мочевая кислота является литогенным веществом, то ее повышенное содержание в тубулярной системе почек ведет к развитию уролитиаза. Так противовоспалительную активность проявляют лекарственные растительные препараты: эрвы шерстистой, горца птичьего, брусники обыкновенной, толокнянки обыкновенной, марены красильной, виснаги морковевидной и др. Препараты

растений (например, настой брусники, толокнянки) являются блокатором синтеза мочевой кислоты, за счет угнетения активности ксантиноксидазы, которая катализирует превращение гипоксантина в ксантин, а также превращение ксантина в мочевую кислоту [23].

Известно, что одним из необходимых условий для предупреждения выпадения солей в осадок является восстановление коллоидной структуры мочи. К этой группе относятся лекарственные растительные препараты с повышенным содержанием кремниевых кислот: хвоща полевого, горца птичьего [43].

При лечении лекарственными растениями рекомендуется учитывать тип камнеобразования (оксалатный, фосфатный, мочекислый), вид кристаллурии и pH мочи [53].

Уролитиаз оксалатный – образование конкрементов в почках и мочевыводящих путях, преимущественно из оксалатов. В профилактике и метафилактике данного типа камнеобразования рекомендуют лекарственные растения, содержащие магний, витамины А и группу В, калий, имеющие щелочной солевой эквивалент. К ним относят: марену красильную, хвощ полевой, лопух большой, василек полевой, бруснику обыкновенную, кукурузные рыльца, укроп огородный, эрву шерстистую, толокнянку обыкновенную и др. Лучше использовать комплексное лечение, направленное на патогенез заболевания [181].

Основные направления фитотерапии при оксалатурии:

– *Для ощелачивания мочи в лечебном питании рекомендуют:* соки огуречные, тыквенные.

– *Повышение растворимости оксалатов (оксалатолитический эффект) дают:* цветки бузины черной, листья, почки березы, листья брусники, трава горца почечуйного, трава Melissa лекарственной, листья мяты перечной, листья почечного чая, листья толокнянки, плоды фенхеля, трава якорцов стелющихся, плоды виснаги морковевидной, корневище и корень марены красильной и др. [131].

– *Снижение всасывания оксалатов:* плоды укропа огородного, трава якорцов стелющихся, сок каланхоэ, корни стальника, шишки хмеля, плоды кориандра.

– *Уменьшение образования щавелевой кислоты*: трава сушеницы, цветки календулы.

– *Насыщение организма витаминами A, D, B₂, фитином*: плоды облепихи, малины, лимонника, рябины [166].

Уролитиаз уратный – образование конкрементов в почках и мочевыводящих путях, с преимущественным содержанием уратов. Для профилактики и метафилактики мочекислотного уролитиаза назначают растительные средства с урикозурическим (понижение обратного всасывания уратов в канальцах почек и повышение вследствие этого выделения почками мочевой кислоты), мочегонным и щелочным эффектом: цветки бузины черной, траву эрвы шерстистой, корневища и корни марены, траву хвоща полевого, столбики с рыльцами кукурузы, траву спорыша, плоды черники и др. [58, 91].

Основные направления фитотерапии при уратурии:

– *Для ощелачивания мочи в лечебном питании рекомендуют*: соки огуречные, тыквенные, кабачковые.

– *Увеличение растворимости мочевой кислоты и ее солей (уратолитический эффект)*: листья брусники, листья барбариса обыкновенного, плоды, листья земляники, трава золотарника канадского, корневища и корни марены красильной, листья толокнянки, листья ортосифона тычиночного и др. [108].

– *Торможение реабсорбции мочевой кислоты в почечных канальцах, усиление ее выведения*: трава хвоща полевого, листья толокнянки, трава астрагала шерстистоцветкового, листья березы и др.

– *Угнетение синтеза уратов и мочевой кислоты*: плоды лимонника, столбики с рыльцами кукурузы.

– *Насыщение организма витаминами A, B₆, B₁, C*: плоды земляники, смородины черной, черники и др.

Уролитиаз фосфатный – образование конкрементов в почках и мочевыводящих путях, содержащих преимущественно фосфаты кальция, магния. При фосфатном уролитиазе, фосфатурии и щелочной реакции мочи назначаются препараты лекарственных растений: марены красильной, хвоща полевого,

спорыша, брусники обыкновенной, зверобоя, стальника полевого, мяты перечной, можжевельника обыкновенного, ромашки и др. [63].

Основные направления фитотерапии при фосфатурии:

- *Для подкисления мочи в лечебном питании рекомендуют:* соки капустные, яблочные, виноградные.
- *Увеличение выведения фосфатов кишечником:* корни стальника, семена льна, семена подорожника блошного.
- *Повышение растворимости фосфатов (фосфатолитический эффект):* корни лопуха большого, корневища и корни марены красильной, плоды можжевельника, корневища и корни девясила, корневища змеевика и др.
- *Насыщение организма витаминами A, PP, B₁, C, D:* плоды смородины черной, листья крапивы и др.
- *Снижение желудочной секреции:* трава сушеницы топяной, трава горца птичьего, чага [54, 64, 78, 105, 166].

При применении лекарственных растений в комплексной профилактике и метафилактике МКБ всегда необходим контроль – анализ мочи с определением pH мочи, лейкоцитурии, бактериурии и вида кристаллурии не реже 1 раза в месяц. Учитывают сопутствующие болезни печени, желчных путей, функцию кишечника [53].

Несмотря на то, что большинство лекарственных растений обладает многосторонним действием, достичь хорошего клинического эффекта в лечении заболеваний мочевыводящей системы нередко удастся лишь при сочетании нескольких видов ЛРС. Многокомпонентные средства на основе фармацевтических субстанций растительного происхождения, содержащие большое количество БАВ, оказывают комплексное фармакотерапевтическое воздействие на различные звенья патогенеза заболевания, а также способствуют фармакологической регуляции многих функциональных систем и повышают адаптивные возможности организма в целом [81].

Для создания комплексного урологического растительного средства целесообразно включать в состав виды ЛРС, обладающего мочегонным,

спазмолитическим, антимикробным, противовоспалительным, желчегонным, антиоксидантным, нормализующим коллоидную структуру мочи действием, а также иммуномодулирующим, учитывая хронический характер течения урологических заболеваний [62, 64].

Таким образом, в процессе информационно-литературного поиска для будущего сбора нами было отобрано 5 видов ЛРС, обладающего необходимыми фармакологическими эффектами (табл. 1.4.1) и влияющего на различные звенья заболеваний мочевыводящей системы.

Кроме того, источниками ЛРС для сбора являются растения отечественной флоры с достаточной сырьевой базой.

Таблица 1.4.1

Основные фармакологические эффекты ЛРС (данные литературы)

Наименование сырья	Фармакологические эффекты							
	Диуретическая	Антимикробная	Спазмолитическая	Противовоспалительная	Иммуномодулирующая	Нормализующая коллоидную структуру	Антиоксидантная	Желчегонная
Брусники листья	+	+		+			+	
Хвоща полевого трава	+				+	+	+	
Лопуха корни	+						+	+
Укропа пахучего плоды			+	+			+	+
Полыни обыкновенной трава			+	+			+	

Таким образом, в состав растительного сбора нами выбрано сырьё лекарственных растений: *брусника обыкновенная*, *хвощ полевой*, *лопух большой*, *укроп огородный* и *полынь обыкновенная*, которые рекомендованы и применяются для лечения и профилактики заболеваний мочевыводящих путей.

1.4.1 Листья брусники

Брусника обыкновенная – *Vaccinium vitis-idaea* L., семейства вересковые (*Ericaceae*) – вечнозеленый дикорастущий многолетний кустарничек, распространенный в лесной и тундровой зонах России.

Основными районами заготовок являются северные, северо-восточные и западные области России, Сибирь (Томская область, Республика Тува), а также Белоруссия. Сырьевая база достаточна [70, 94].

Традиционно в медицине листья брусники применяли при поносах, болях в пояснице, мочекаменной болезни, остеохондрозе, простудных заболеваниях, катаре верхних дыхательных путей, ревматизме, подагре, артритах, отложении солей, при дизентерии, как антибактериальное, вяжущее, улучшающее пищеварение средство и других распространенных заболеваниях [54, 56, 89, 125, 135].

В современной официальной медицине препараты листьев брусники применяются в качестве диуретического средства с антисептическим, противовоспалительным и диуретическим действием в комплексной терапии воспалительных заболеваний мочевого пузыря и мочевыводящих путей [30]. Лекарственное растительное сырье входит в состав сбора «Бруснивер», обладающего мочегонным, противовоспалительным и противомикробным действием [78, 82, 89].

Из листьев брусники готовят водные извлечения [105].

В листьях брусники основными действующими веществами являются фенологликозиды, главным из которых считается арбутин (до 9%). Кроме арбутина, в листьях брусники содержатся другие фенологликозиды, флавоноиды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты, а также макро- и микроэлементы [56, 60, 61, 135].

Препараты брусники используют как мочегонные, антимикробные и противовоспалительные, что обусловлено высоким содержанием фенологликозидов и дубильных веществ [88, 190].

Известно, что при ферментативном гидролизе кишечной палочкой фенологликозида арбутина в желудочно-кишечном тракте высвобождается гидрохинон, проявляющий антимикробное действие. Другой фенологликозид – метиларбутин – при гидролизе отщепляет эфир метиловый и также свободный гидрохинон. Экспериментальные исследования антимикробного эффекта гидрохинона показали его активность в отношении грамотрицательных микроорганизмов, а также и в отношении антибиотикорезистентных штаммов, так как растворы гидрохинона останавливали рост и размножение не только стандартных, но и клинических штаммов. Подобное действие гидрохинона может быть обусловлено его структурой. Гидрохинон, являющийся фенолом, оказывает токсический эффект на живые клетки, в том числе и на бактериальные. При окислении он превращается в бензохинон, который, также может оказывать бактерицидное действие на микроорганизмы. Антимикробное действие ЛРС, содержащего арбутин, определяется сочетанием высокой активности действующих БАВ и широкого спектра их противомикробного действия с безвредностью для человека в концентрациях, достаточных для подавления роста и размножения микроорганизмов. Мочегонное действие препаратов листьев брусники связывают с арбутином, который повышает гломерулярную фильтрацию и усиливает почечный кровоток и, вследствие этого, увеличивается образование первичной мочи. Экспериментальными данными было подтверждено диуретическое действие арбутина, которое реализуется без нарушения водно-солевого обмена, в частности транспорта ионов натрия и калия [10, 19, 20, 79, 135].

Дубильные вещества листьев брусники благотворно воздействуют на поверхность слизистой кишечника, образуя вместе с белковыми веществами защитный слой благодаря содержащемуся в них танину. У пациентов с уролитиазом это приводит к снижению всасываемости кальция в кишечнике, содержание которого при оксалатном камнеобразовании обычно повышено [54, 57].

В настоящее время экспериментальными работами была подтверждена фармакологическая активность отдельных соединений и суммарных фракций из

листьев брусники: противовоспалительная *in vitro* [186], диуретическая *in vivo animals* [160], антибактериальная *in vitro* [189] и антиоксидантная *in vivo animals* [172].

Нормативный документ (НД), регламентирующий качество лекарственного растительного сырья «*Листья брусники*» – ст. 27 Государственной Фармакопеи России XI издания (ГФ XI изд.), стр. 278 [29].

В 8 издании Европейской фармакопеи статьи, регламентирующие качество листьев брусники, отсутствуют [155].

Показатели качества и нормы для ЛРС «*Листья брусники*», представленные в НД, изложены в табл. 1.4.1.

Таблица 1.4.1

Нормы качества «*Листьев брусники*», регламентируемые нормативным документом

Наименование показателя	Характеристика и нормы качества сырья
	ГФ XI
1	2
Внешние признаки: – цельного сырья – измельченного сырья	имеются имеются
Микроскопические признаки: – цельного сырья – измельченного сырья	имеются имеются
Качественные реакции	арбутин, дубильные вещества
Влажность – цельного сырья, не более – измельченного сырья, не более	13% 13%
Зола общая – цельного сырья, не более – измельченного сырья, не более	7% 7%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – цельного сырья, не более – измельченного сырья, не более	0,5% 0,5%

Продолжение таблицы 1.4.1

1	2
Измельченность	
– цельного сырья: <i>измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более</i>	2%
– измельченного сырья: <i>частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более</i>	5%
Других частей растения	
– цельного сырья, не более	1%
Листьев почерневших и побуревших	
– цельного сырья, не более	7%
– измельченного сырья, не более	7%
Органическая примесь	
– цельного сырья, не более	1%
– измельченного сырья, не более	1%
Минеральная примесь	
– цельного сырья, не более	0,5%
– измельченного сырья, не более	0,5%
Количественное определение	
– цельного сырья, не менее	Арбутин (титриметрия) 4,5%
– измельченного сырья, не менее	
Упаковка	имеется
Срок годности	3 года

Таким образом, в статье ГФ XI изд. «*Листья брусники*» имеется описание внешних, микроскопических признаков цельного и измельченного ЛРС, приведены методики и результаты качественных реакций, подтверждающих наличие БАВ арбутина и дубильных веществ, а также количественное определение содержания арбутина (не менее 4,5%), которое проводится йодометрическим титрованием.

Также представлены разделы: упаковка, срок годности.

Кроме того, в настоящее время в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи России XIII издания (ГФ РФ XIII изд.), для ЛРС нормируются такие показатели как содержание тяжелых металлов, радионуклидов, остаточные количества пестицидов, микробиологическая чистота, требования к которым приведены в соответствующих общих фармакопейных статьях (ОФС) и нормативной документации НД [27].

1.4.2 Трава хвоща полевого

Хвощ полевой – *Equisetum arvense* L., семейство хвощевые (*Equisetaceae*) – многолетнее споровое травянистое растение, произрастающее по всей территории России.

Заготовку травы хвоща полевого в промышленных масштабах осуществляют в Европейской части России: в Ставропольском крае, Псковской, Пермской, Вологодской и Владимирских областях, а также в Томской области и на территории Тувы. Сырьевая база достаточна [70, 92].

Традиционно хвощ полевой использовали как кровоостанавливающее и мочегонное средство. В средние века им лечили кашель, подагру, туберкулез и мочекаменную болезнь, отеки, кровотечения, геморрой, а наружно – для лечения плохо заживающих язв и ран [24].

В официальной медицине препараты травы хвоща полевого применяются в качестве диуретического средства с противовоспалительной и диуретической активностью при отеках различного генеза, при воспалении мочевого пузыря и мочевыводящих путей [30].

Из травы хвоща полевого готовят водные извлечения, экстракты [105].

Известно, что препараты из хвоща полевого эффективны при заболеваниях почек и мочевого пузыря. Они обладают мочегонным действием и способностью тормозить реабсорбцию мочевой кислоты в почечных канальцах, усиливая ее выведение – метафилактика уратурии. ЛРС входит в состав противоастматической микстуры Траскова, а также в состав мочегонных сборов, гипогликемического сбора и сбора по прописи М.Н. Здренко. Экстракт хвоща полевого входит в состав комбинированных препаратов, применяемых для лечения уролитиаза различного генеза [56, 64, 105].

Основным фармакологическим действием травы хвоща полевого считается диуретическая активность. Экспериментально было показано, что препараты хвоща полевого на 68% усиливает мочеотделение, проявляя более выраженный

диуретический эффект, чем почечный чай и некоторые диуретики (например, темисал) [78, 135].

Диуретическое, восстанавливающее коллоидную структуру мочи действие сбора обусловлено включением в состав прописи травы хвоща полевого.

Механизм действия мочегонной активности хвоща до сих пор остается неизученным. В связи с чем, нет единого мнения относительно группы биологически активных соединений, ответственных за диуретический эффект хвоща.

Так, ряд авторов считает, что диуретическая активность обусловлена суммой флавоноидов, усиливающих клубочковую фильтрацию [48, 60]. Другие высказали предположение о том, что мочегонное действие обусловлено комплексом биологически активных веществ (БАД): флавоноидами, фенолкарбоновыми кислотами и соединениями кремния, которые в эксперименте на животных за счет расширения сосудов почек повышают диурез на 65-100% [61, 88, 96]. Согласно другим научным исследованиям, трава хвоща полевого увеличивает мочеотделение в эксперименте благодаря содержанию в ней тритерпеновых соединений [51].

Одним из компонентов травы хвоща полевого является микроэлемент кремний, который в составе растворимых соединений кремниевой кислоты препятствует образованию конкрементов в почках и мочевом пузыре. При прохождении мочевых путей кремниевые кислоты играют роль защитного коллоида, уменьшающего степень кристаллизации минеральных солей, препятствуя тем самым образованию нерастворимого осадка [120].

Выделенный из хвоща 5-гликозид-лютеолин обладает антимикробным и противовоспалительным действием [135].

А также экспериментально была подтверждена фармакологическая активность травы хвоща полевого: диуретическая *in vivo animals* [160], противовоспалительная *in vitro, in vivo animals* [149, 163], антибактериальная *in vitro* [187, 189], литолитическая *in vitro* [131] и антиоксидантная *in vitro* [187].

Нормативные документы, регламентирующие качество лекарственного

растительного сырья в Российской Федерации:

– ГФ РФ XIII изд., ФС.2.5.0045.15 «*Хвоща полевого трава*», стр. 683 (взамен с 2016 года ГФ XI изд., ст. 50 «*Трава хвоща полевого*», стр. 318) [27, 29].

А также качество травы хвоща полевого регламентируется Европейской Фармакопеей 8 издания [155].

Показатели качества и нормы для лекарственного растительного сырья «*Хвоща полевого трава*», представленные в НД, изложены в табл. 1.4.2.

Таблица 1.4.2

Нормы качества «*Травы хвоща полевого*», регламентируемые нормативными документами

Наименование показателя	Характеристика и нормы качества сырья		
	Европейская Фармакопея 8 издание	ГФ XI	ГФ РФ XIII
1	2	3	4
Внешние признаки:			
– цельного сырья	имеются	имеются	имеются
– измельченного сырья	имеются	имеются	имеются
– порошок	имеются	—	имеются
Микроскопические признаки:			
– цельного сырья	—	имеются	имеются
– измельченного сырья	—	—	имеются
– порошок	имеются	—	имеются
Качественное определение	ТСХ в УФ-свете	ТСХ в УФ-свете	ТСХ в УФ-свете
Влажность			
– цельного сырья, не более	10%	13%	13%
– измельченного сырья, не более	10%	13%	13%
– порошок, не более	—	—	13%
Зола общая			
– цельного сырья, не более	27%	24%	24%
– измельченного сырья, не более	27%	24%	24%
– порошок, не более	—	—	24%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте			
– цельного сырья, не более	15%	12%	12%
– измельченного сырья, не более	15%	12%	12%
– порошок, не более	—	—	12%

Продолжение таблицы 1.4.2

1	2	3	4
Измельченность — цельного сырья: <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более</i> — измельченного сырья: <i>частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, не более</i> <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более</i> <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более</i> — порошок: <i>частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более</i> <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более</i>	— — — — — —	— 10% — 15% — — —	5% 5% 5% — 5% 5%
Других частей растения — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более	— —	1% 1%	1% 1%
Других видов хвощей — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более	5% 5%	4% —	— —
Органическая примесь — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более	2% 2%	1% 1%	1% 1%
Минеральная примесь — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более — порошок, не более	— — —	0,5% 0,5% —	0,5% 0,5% 0,5%
Количественное определение — цельное сырье, не менее — измельченное сырье, не менее — порошок, не менее	по сумме флавоноидов в пересчете на изокверцитрозид (СФМ) 0,3%	—	по сумме флавоноидов в пересчете на кверцетин (СФМ) 0,3%
Срок годности	—	4 года	—

Кроме того, в настоящее время в ГФ РФ XIII изд. для хвоща полевого травы нормируются такие показатели как содержание тяжелых металлов, радионуклидов, остаточных количеств пестицидов, микробиологическая чистота, требования к которым приведены в соответствующих ОФС и НД. Также представлены разделы:

упаковка, маркировка, транспортирование, хранение – согласно требованиям, соответствующей ОФС [27].

Таким образом, в статье ГФ РФ XIII изд. «*Хвоща полевого трава*» имеется описание внешних, микроскопических признаков цельного, измельченного ЛРС и порошка, БАВ подтверждаются тонкослойной хроматографией в УФ-свете, количественное определение для проводится спектрофотометрическим методом по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин (не менее 0,3%) [27].

1.4.3 Корни лопуха

Лопух большой – *Arctium lappa* L., лопух войлочный – *A. tomentosum* Mill. и лопух малый – *A. minus* Mill., семейство астровых (*Asteraceae*) – двулетние травянистые растения.

Лопух большой, лопух войлочный и лопух малый являются сорно-рудеральными растениями, широко распространены в европейской части России, в Западной и Восточной Сибири. Сырьевая база достаточна [70, 93].

В народной медицине корни лопуха применяются как мочегонное, желчегонное, жаропонижающее, потогонное средство, при подагре, атеросклерозе, желчнокаменной, мочекаменной болезни, ломоте в суставах, артритах, радикулите, ревматизме, панкреатитах, диабете, хронических гепатитах, циррозе печени [95, 101, 109].

В официальной медицине водные извлечения корней лопуха оказывают мочегонное, умеренное желчегонное и потогонное действие, улучшают минеральный обмен, а также обладают местным противовоспалительным и ранозаживляющим действием. В качестве диуретического средства при заболеваниях мочевыводящих путей, отеках, желчегонного средства при дискинезии желчевыводящих путей по гипомоторному типу, гастритах, холециститах и потогонного – при лихорадке. Для нормализации минерального обмена при подагре, артритах [24, 30, 56].

Наружное применение корней – себорея, при экземах, угревой сыпи, фурункулезе, вялозаживающих ранах [55, 121, 138], для укрепления волос [7, 77].

Корни лопуха содержат лигнанный гликозид арктиин, который микрофлорой кишечника гидролизуется на глюкозу и агликон арктигенин. Арктигенин обладает противовоспалительным, мочегонным действием [61, 88, 135, 156, 192]. Препараты корней лопуха стимулируют выведение мочевой кислоты, повышенное содержание которой может создавать условия для камнеобразования почечного генеза [53, 102]. А также ЛРС обладает фосфатолитическим эффектом – повышение растворимости фосфатов – что имеет значение при образовании конкрементов в почках и мочевыводящих путях, содержащих преимущественно фосфаты кальция, магния [54, 64].

Полисахариды корней лопуха предотвращают раздражение слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, влияют на абсорбцию различных компонентов пищи, обладают обволакивающим и противовоспалительным свойством. По мнению ряда авторов, полисахариды могут уменьшить абсорбцию в кишечнике литогенных веществ (оксалатов), что можно считать положительным в профилактике оксалатного камнеобразования [53].

Фенольные кислоты, флавоноиды, дубильные вещества корней лопуха оказывают противовоспалительное, антиоксидантное действие, обеспечивают диуретический эффект [10, 60, 135, 157, 176]. В корнях так же содержатся слизь, протеины, эфирное масло, минеральные соли [2, 78, 97, 102, 105].

Экспериментальными исследованиями была подтверждена фармакологическая активность корней лопуха: антиоксидантная *in vitro* [157, 176] и предотвращение осаждения кристаллов в почках *in vivo animals* [162].

Нормативные документы, регламентирующие качество лекарственного растительного сырья в РФ:

– ГФ РФ XIII изд., ФС.2.5.0025.15 «*Лопуха корни*», стр. 508 (вместо ФС 42-0143-05 «*Лопуха корни*») [27].

В 8 издании Европейской фармакопеи статьи, регламентирующие качество лопуха корней, отсутствуют [155].

Показатели качества и нормы для ЛРС «*Лопуха корни*», представленные в НД, изложены в табл. 1.4.3.

Таблица 1.4.3

Нормы качества «*Лопуха корней*», регламентируемые нормативными документами

Наименование показателя	Характеристика и нормы качества сырья	
	ФС 42-0143-05	ГФ РФ XIII
1	2	3
Внешние признаки:		
– цельного сырья	имеются	имеются
– измельченного сырья	имеются	имеются
– порошок	имеются	имеются
Микроскопические признаки:		
– цельного сырья	имеются	имеются
– измельченного сырья	имеются	имеются
– порошок	имеются	имеются
Качественное определение	ТСХ	ТСХ
Влажность		
– цельного сырья, не более	14%	14%
– измельченного сырья, не более	14%	14%
– порошок, не более	14%	14%
Зола общая		
– цельного сырья, не более	11%	11%
– измельченного сырья, не более	11%	11%
– порошок, не более	11%	11%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте		
– цельного сырья, не более	4,5%	4,5%
– измельченного сырья, не более	4,5%	4,5%
– порошок, не более	4,5%	4,5%

Продолжение таблицы 1.4.3

1	2	3
Измельченность — цельного сырья: <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более</i> <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более</i> — измельченного сырья: <i>частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, не более</i> <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более</i> — порошок: <i>частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более</i> <i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более</i>	— 10% 10% 10% 10% 10%	5% — 5% 5% 5% 5%
Остатки стеблей, в том числе и отделенные при анализе, и другие части — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более	5% 5%	5% 5%
Корни, потемневшие на изломе — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более	5% 5%	5% 5%
Органическая примесь — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более	0,5% 0,5%	0,5% 0,5%
Минеральная примесь — цельного сырья, не более — измельченного сырья, не более — порошок, не более	1% 1% —	1% 1% 1%
Количественное определение — цельное сырье, не менее — измельченное сырье, не менее — порошок, не менее	по сумме фруктозанов в пересчете на фруктозу (СФМ) (9%) экстрактивных веществ, извлекаемых водой (35%) экстрактивных веществ, извлекаемых ацетоном (1,5%)	по сумме полисахаридов в пересчете на фруктозу (СФМ) (8%) экстрактивных веществ, извлекаемых водой (35%)
Срок годности	4 года	—

Кроме того, в корнях лопуха нормируются такие показатели как содержание тяжелых металлов, радионуклидов, остаточных количеств пестицидов, микробиологическая чистота, требования к которым приведены в соответствующих ОФС и НД. Также представлены разделы: упаковка, маркировка, транспортирование, хранение – согласно требованиям, соответствующей ОФС [27].

Таким образом, в статье ГФ РФ XIII изд. «*Лопуха корни*» имеется описание внешних, микроскопических признаков цельного, измельченного ЛРС и порошка, БАВ подтверждаются тонкослойной хроматографией, количественное определение проводится спектрофотометрическим методом по содержанию суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу (не менее 8%) и экстрактивных веществ, извлекаемых водой (не менее 35%) [27].

1.4.4 Плоды укропа огородного

Укроп огородный – *Anethum graveolens* L., семейство сельдерейные (*Apiaceae*) – однолетнее травянистое растение, в России культивируется повсеместно. Сырьевая база достаточна [70].

В народной медицине семена и траву укропа использовали как мочегонное, желчегонное, отхаркивающее, противорвотное, возбуждающее, укрепляющее, послабляющее, растворяющее камни мочевого пузыря средство, при почечнокаменной, мочекаменной болезни, от газов в желудке и кишечнике, изжоги, бессонницы, головной боли, судорог, боли в сердце, для повышения выделения молока у кормящих матерей, а также для укрепления кровеносных сосудов. Наружно от зуда кожи, глазных болезней [5, 24, 65].

В официальной медицине препараты плодов укропа огородного применяются в качестве спазмолитического средства с противовоспалительным, желчегонным, спазмолитическим, отхаркивающим, гипотензивным и ветрогонным действием [30].

Из плодов укропа огородного готовят водные извлечения [105].

Также была доказана диуретическая активность плодов укропа огородного, которая обусловлена высоким содержанием эфирных масел (ЭМ). Мочегонный эффект ЭМ связывают с расширением сосудов почек, которое способствует улучшению кровоснабжения почечного эпителия, тем самым ЭМ оказывают влияние на функцию эпителия почечных канальцев. Данное влияние проявляется главным образом в уменьшении реабсорбции ионов Na^+ и соответствующего количества воды [18, 54].

Препараты укропа огородного расслабляют гладкие мышцы мочевыводящих путей, облегчая выведение мелких и/или хирургически разрушенных конкрементов, замедляют всасывание оксалатов в кишечнике [54, 64, 131].

Плоды укропа огородного также содержат жирные кислоты, флавоноиды, фуранохромоны, фенольные кислоты [105, 120, 139, 165, 174].

Экспериментальными испытаниями была подтверждена фармакологическая активность плодов укропа огородного: диуретическая *in vivo animals* [171], спазмолитическая *in vivo animals* [159], противовоспалительная *in vivo animals* [174], антиоксидантная *in vivo animals, in vitro* [170, 177] и антибактериальная *in vitro* [167].

Нормативные документы, регламентирующие качество лекарственного растительного сырья в РФ:

– ГФ РФ XIII изд., ФС.2.5.0043.15 «Укропа пахучего плоды», стр. 664 (вместо ГФ XI изд., ст. 29 «Плоды укропа пахучего», стр. 280) [27, 29].

В 8 издании Европейской фармакопеи статьи, регламентирующие качество плодов укропа огородного, отсутствуют [155].

Показатели качества и нормы для лекарственного растительного сырья «Укропа пахучего плоды», представленные в НД, изложены в табл. 1.4.4.

Таблица 1.4.4

Нормы качества «Укропа пахучего плоды», регламентируемые нормативными документами

Наименование показателя	Характеристика и нормы качества сырья	
	ГФ XI	ГФ РФ XIII
Внешние признаки:		
– цельного сырья	имеются	имеются
– порошка	—	имеются
Микроскопические признаки:		
– цельного сырья	имеются	имеются
– порошка	—	имеются
Качественное определение	—	ТСХ
Влажность		
– цельного сырья, не более	12%	12%
– порошок, не более	—	12%
Зола общая		
– цельного сырья, не более	10%	10%
– порошок, не более	—	10%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте		
– цельного сырья, не более	1%	1%
– порошок, не более	—	1%
Измельченность		
– порошок:		
<i>частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более</i>	—	5%
<i>частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более</i>	—	5%
Других частей растения		
– цельного сырья, не более	1%	1%
Органическая примесь		
– цельного сырья, не более	2%	2%
Минеральная примесь		
– цельного сырья, не более	1%	1%
– порошок, не более	—	1%
Количественное определение		
– цельное сырье, не менее	Содержание эфирного масла (перегонка с водяным паром)	Содержание эфирного масла (перегонка с водяным паром)
	2%	2%
– порошок, не менее	—	1%
Срок годности	3 года	—

Кроме того, в плодах укропа огородного нормируются такие показатели как содержание тяжелых металлов, радионуклидов, остаточных количеств пестицидов, микробиологическая чистота, требования к которым приведены в соответствующих ОФС и НД. Также представлены разделы: упаковка, маркировка, транспортирование, хранение – согласно требованиям, соответствующей ОФС [27].

Таким образом, в статье ГФ РФ XIII изд. «Укропа пахучего плоды» дано описание внешних, микроскопических признаков цельного ЛРС и порошка, тонкослойной хроматографией подтверждается наличие БАВ и количественное определение проводится по содержанию эфирного масла в цельном сырье (не менее 2%) и порошке (не менее 1%).

1.4.5 Трава полыни обыкновенной

Полынь обыкновенная – *Artemisia vulgaris* L., семейство астровые (*Asteraceae*) – многолетнее травянистое растение, как сорно-рудеральное растение встречается почти по всей территории России. Сырьевая база достаточна [70, 93].

В народной медицине с лечебной целью траву полыни обыкновенной использовали как общеукрепляющее, жаропонижающее, потогонное, седативное, обезболивающее, диуретическое, антисептическое, противосудорожное, общеукрепляющее, регулирующее обмен веществ, повышающее аппетит средство [49, 73, 83]. А также при атеросклерозе, гипертонической болезни, климаксе, анемии, болезнях сердца, печени, желчного пузыря, мочекаменной и почечнокаменной болезнях [34, 38, 56]. Наружно настой из травы применяли при воспалении слизистых оболочек, для лечения язв, долго незаживающих ран [108].

Настой травы при различных коликах снимал болевые ощущения и обладал легким снотворным действием [73].

Настой из надземной части в народной медицине применяли как мочегонное и солеизгоняющее средство при МКБ [135].

В научной медицине трава полыни обыкновенной используется в качестве сокогонного и повышающего аппетит средства [129], входит в состав сбора №2 для приготовления микстуры по прописи М.Н. Здренко. Из травы полыни обыкновенной готовят водные извлечения [105].

Экспериментально было установлено, что содержание производных кумарина и флавоноидов в траве полыни обыкновенной обуславливает противовоспалительное действие, посредством ингибирования ферментов, катализирующих синтез простагландинов, и болеутоляющее, путем ингибирования рецепторов восприятия боли [10, 141].

Спазмолитическая активность препаратов полыни обыкновенной обусловлена наличием в их составе фенольных соединений – производных 9,10 – бензо- α -пирона. Согласно исследованиям, спазмолитическое действие связано с воздействием на гладкомышечную клетку. Кумарины влияют на образование потенциала действия за счет снижения фазы медленной деполяризации. Установлено, что механизм миотропного действия связан с блокадой кальциевых каналов клеточной мембраны [11]. Согласно другим научным исследованиям, спазмолитическое действие полыни обыкновенной, возможно, обусловлено ингибированием мускариновых рецепторов и блокадой кальциевых каналов [169].

Болеутоляющее и спазмолитическое действие направлено на устранение спазмов мочевыводящих путей в результате раздражения конкрементами и уменьшения выраженности болевого синдрома как следствия.

Кроме того, трава полыни обыкновенной содержит эфирное масло, аскорбиновую кислоту [78, 105].

Экспериментально доказана фармакологическая активность травы полыни обыкновенной: спазмолитическая *in vivo animals* [169], болеутоляющая *in vivo animals* [141], противовоспалительная *in vivo animals*, *in vitro* [141, 186] и антиоксидантная *in vitro* [144, 183].

Нормативный документ, регламентирующий качество лекарственного растительного сырья в РФ:

– ФС 42-2094-83 «Трава полыни обыкновенной» [129].

В 8 издании Европейской фармакопеи статьи, регламентирующие качество травы полыни обыкновенной, отсутствуют [155].

Показатели качества и нормы для ЛРС «Трава полыни обыкновенной», представленные в НД, изложены в табл. 1.4.5.

Таблица 1.4.4

Нормы качества «Травы полыни обыкновенной», регламентируемые нормативными документами

Наименование показателя	Характеристика и нормы качества сырья
	ФС 42-2094-83
Внешние признаки: – цельного сырья	имеются
Микроскопические признаки: – цельного сырья	имеются
Качественные реакции	–
Влажность – цельного сырья, не более	13%
Измельченность – цельного сырья: <i>измельченных частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, не более</i>	3%
Почерневших частей травы – цельного сырья, не более	4%
Стеблей толщиной более 5 мм, не более	10%
Органическая примесь – цельного сырья, не более	2%
Минеральная примесь – цельного сырья, не более	1,5%
Количественное определение	–

Ранее были проведены исследования по углубленному изучению травы полыни обыкновенной с разработкой норм качества сырья.

В проекте дополнений к ФС 42-2094-83 приведена методика качественного обнаружения в сырье аминокислот и кумаринов на хроматограмме 70% спиртового извлечения, нанесенного на пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ в системе изопропанол – вода (7:3) со стандартными образцами: аргинин, гистидин,

аспарагин, пролин, лизин, аланин, аспарагиновая кислота, метионин и в системе толуол – этилформиат – муравьиная кислота (5:4:1) со стандартными образцами эскулетин, ксантотоксол, кумарин, императорин [69].

А также, предлагается проводить спектрофотометрическим методом количественное определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 0,5%) [67, 68].

Таким образом, в ФС 42-2094-83 *«Трава полыни обыкновенной»* дано описание внешних, микроскопических признаков цельного ЛРС, нормируется содержание влажности, органической и минеральной примеси, имеется норма к измельченности сырья. В разработанном проекте дополнений к имеющейся ФС 42-2094-83 добавлены нормы содержания золы общей, золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте; приведены методики качественного обнаружения БАВ (кумаринов и аминокислот) методом тонкослойной хроматографии и количественного определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 0,5%) методом спектрофотометрии.

Из обзора литературы и других информационных источников видно, что основными БАВ в сборе, обеспечивающими фармакологическое действие, являются флавоноиды, фенологликозид арбутин, дубильные вещества, полисахариды и эфирные масла.

1.5 Характеристика сборов, как лекарственных препаратов

Сборы лекарственные – самая древняя лекарственная форма, сохранившая свое значение до настоящего времени благодаря ряду достоинств: наличие действующих веществ в сырье практически в нативном виде, простота приготовления водных извлечений (настоев, отваров), имеющих высокое сродство к организму благодаря характеру экстрагента и природному происхождению биологически активных веществ, дешевизна [45].

Сборы лекарственные представляют собой смеси двух и более видов ЛРС различных способов переработки, возможно с добавлением субстанций минерального, синтетического, растительного и животного происхождения.

ЛРС и субстанции, используемые для приготовления сборов, должны соответствовать требованиям соответствующих Фармакопейных статей (ФС) или НД [27, 28].

При составлении сборов наиболее важной проблемой является рациональное сочетание лекарственных растений со специфической активностью. Существует несколько подходов к составлению сбора. Так, один из них направлен на суммирование положительных эффектов используемых сочетаний. Другой подход основан на подборе растений, исходя из данных о химическом составе, фармакологическом действии, опыте применения их в официальной и народной медицине. Считается, что оптимальным является сочетание лекарственных растений, которое направлено на этиологию заболевания, уменьшение патогенетических изменений и усиление защитных, компенсаторно-приспособительных механизмов организма. А также известно, что комплексное действие БАВ в сборе, имеет более широкий спектр терапевтического действия, чем его компоненты по отдельности [44, 46, 47, 54, 78, 87, 103].

В настоящее время требования к качеству сборов определяются действующей ГФ РФ XIII изд., которая создана с учетом ФС предшествующих изданий.

В ОФС.1.4.1.0020.15 «Сборы» [27] регламентируют подлинность и доброкачественность сборов по таким показателям:

- внешние признаки,
- микроскопические признаки,
- качественные микрохимические и гистохимические реакции,
- качественные реакции,
- хроматография,
- спектр (УФ-спектр),

- числовые показатели (содержание биологически активных веществ; влажность; зола общая; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте; измельченность и содержание примесей),
- однородность массы для дозированного и недозированного сбора,
- зараженность вредителями запасов,
- радионуклиды,
- тяжелые металлы,
- остаточные количества пестицидов,
- микробиологическая чистота,
- количественное определение.

Лекарственные сборы могут быть дозированными и недозированными и выпускаться в однократных или многократных упаковках.

Также, они предназначены как для наружного, так и для внутреннего применения и используются для приготовления водных извлечений, качество которых регламентируется ОФС.1.4.1.0018.15 «*Настои и отвары*», реже в чистом виде, как присыпки, порошки для вдываний или приема внутрь и др. [27].

К недостаткам лекарственных форм, содержащих ЛРС, относят: неполное извлечение БАВ при самостоятельном приготовлении водных извлечений в домашних условиях, отсутствие четких критериев качества, неточность дозировки, которая может быть обусловлена расслоением сборов при их неправильном приготовлении и/или хранении [12, 45].

Поэтому рациональным и перспективным будет перевод многокомпонентных лекарственных сборов в суммарные экстракционные препараты, содержащие в концентрированном виде сумму БАВ, необходимых для обеспечения фармакотерапевтического эффекта [36, 136].

1.6 Сухие экстракты

Наиболее рациональным видом экстрактов являются сухие экстракты. Их получают на фармацевтическом производстве, в условиях сохранения стабильности соотношения и фармакологической активности БАВ. К преимуществам сухих экстрактов относятся удобство при хранении и применении, возможность более точного дозирования, стойкость к микробной контаминации и расширение ассортимента лекарственных форм, произведённых из ЛРС [36, 106].

Нормативный документ, регламентирующий качество сухих экстрактов – ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0021.15 «*Экстракты*» [25], согласно которому, сухие экстракты стандартизуют по:

- содержанию экстрактивных веществ,
- потере массы при высушивании,
- содержанию тяжелых металлов.

1.7 Физико-химические методы анализа основных БАВ сбора

На основании данных литературы о химическом составе лекарственного растительного сырья, входящего в предложенный сбор, можно выделить основные группы БАВ, ответственных за фармакотерапевтический эффект это: флавоноиды, фенологликозид арбутин, полисахариды, дубильные вещества и эфирные масла.

1.7.1 Методы определения фенольных соединений

В настоящее время для анализа фенольных соединений широко применяются современные физико-химические методы, основными из которых являются хроматографические методы: тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, которая позволяет оценивать не только качественный

состав, но и количественное содержание отдельных компонентов [27, 28, 29, 150-153, 155].

Для количественного определения **флавоноидов** используют методы: титриметрические, фотоколориметрические, спектрометрические, люминесцентные, полярографические. В последнее время предпочтение отдается спектрометрическим методам анализа, а, именно, дифференциальной спектрофотометрии [25, 26, 150-153, 155, 194]. Этот метод является наиболее доступным и основан на реакции комплексообразования флавоноидов с алюминием хлоридом (III), в результате которой происходит bathochromный сдвиг полос поглощения флавоноидов с 330-350 до 390-410 нм. Спектрофотометрия позволяет определить суммарное содержание флавоноидов и оценить их количественно по доминантному соединению данной группы веществ.

Количественное содержание **арбутина** согласно ГФ XI изд. осуществляют йодометрическим титрованием [29], в Европейской фармакопее проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [150-153, 155]. Также в литературе встречается фотоэлектроколориметрический метод, который основан на реакции арбутина с диазореактивом [84]; спектрофотометрический, основанный на конденсации арбутина с 4-аминоантипирином в щелочной среде в присутствии окислителя [66]; хроматоспектрофотометрический, основанный на применении алюминия оксида для очистки арбутина от сопутствующих примесей [1, 128]; метод ВЭЖХ с УФ и флюориметрическим детектированием [79, 134].

Для количественного определения **дубильных веществ** ГФ XI изд. предлагает использовать перманганатометрическое титрование [28], ГФ РФ XIII изд.: перманганатометрическое титрование и/или спектрофотометрический метод (СФМ) [27], Европейская фармакопея: СФМ в пересчете на пирогаллол [150-153, 155].

1.7.2 Методы определения полисахаридов

Для качественного обнаружения полисахаридов широко используется тонкослойная хроматография. В качестве подвижной фазы чаще используют системы, состоящие из двух или трех растворителей различной полярности, что дает лучшую картину разделения: бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:5), этилацетат-кислота уксусная-вода (9:2:2), пиридин-этилацетат-вода (20:60:40) и др.; в качестве детектирующих реагентов – кислоту серную концентрированную, растворы анисового альдегида, ванилина, фенола, тимола и карбазола в кислоте серной концентрированной и др. [150-153, 155].

Количественное определение *полисахаридов* согласно ГФ XI изд. [28] и ГФ РФ XIII изд. [27] проводят гравиметрическим методом, основанным на экстракции суммы полисахаридов из сырья водой с последующим осаждением их спиртом этиловым 95-96%. Также ГФ РФ XIII изд. предлагает спектрофотометрический метод, основанный на измерении оптической плотности окрашенных продуктов взаимодействия моносахаридов, образовавшихся после гидролиза полисахаридов, с пикриновой кислотой в щелочной среде в пересчете на глюкозу и с резорцином в кислой среде в пересчете на фруктозу [27].

1.7.3 Методы определения эфирных масел

Для анализа состава эфирного масла применяют тонкослойную хроматографию (ТСХ). В качестве подвижной фазы используют хлороформ, гексан, бензол, диэтиловый эфир, петролейный эфир; в качестве детектирующих реагентов – кислоту серную концентрированную, растворы анисового альдегида и ванилина в кислоте серной концентрированной и др. [150-153, 155].

Фармакопейным методом количественного определения *эфирного масла* в сырье является метод перегонки с водяным паром с последующим измерением объема полученного масла. В ГФ XI изд. [28] и ГФ РФ XIII изд. [27] приведены 4

метода определения содержания эфирного масла. Метод определения эфирных масел перегонкой основан на их способности не смешиваться с водой и перегоняться с водяным паром при температуре меньшей, чем температура их кипения и разложения.

Также важным методом как качественного, так и количественного анализа компонентов эфирного масла является газожидкостная хроматография (ГЖХ) [27, 28, 29, 150-153, 155].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Согласно данным литературы, несмотря на значительные успехи, достигнутые в последние годы при оказании помощи больным с МКБ, уролитиаз занимает одно из ведущих мест в структуре урологических заболеваний, характеризуется высоким уровнем заболеваемости и выраженной тенденцией к увеличению частоты случаев заболевания.

2. В настоящее время многокомпонентным средствам на основе фармацевтических субстанций растительного происхождения уделяется большее внимание, так как они обладают комплексным действием на этиопатогенез заболеваний мочевыводящих путей и применяются в качестве эффективной составляющей консервативного лечения, а также в качестве монотерапии для профилактики при наличии факторов риска.

3. На основании полученных результатов информационно-литературного поиска о применении лекарственных растений для лечения и профилактики МКБ в народной медицине, в современной медицинской науке, а также на основании данных обзора литературы и нормативной документации о фармакологической активности отдельных видов сырья, были отобраны компоненты в сбор: листья брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.), трава хвоща полевого (*Equisetum arvense* L.), корни лопуха (*Arctium lappa* L., *A. tomentosum* Mill., *A. minus* Mill.), плоды укропа огородного (*Anethum graveolens* L.), трава полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris* L.).

4. В настоящее время, в соответствии с инструкцией по применению, из сборов рекомендовано готовить водные извлечения.

5. Оптимальной формой переработки ЛРС и сборов являются сухие экстракты, содержащие в концентрированном виде сумму БАВ, необходимых для обеспечения фармакотерапевтического эффекта.

6. Основными группами БАВ предложенного сбора являются: фенольные соединения, полисахариды и эфирные масла.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись:

1. Сбор, состоящий из лекарственного растительного сырья:

Листья брусники (*Folia Vaccinii vitis-idaeae*) – ГФ XI изд., ст. 27, стр. 278;

Трава хвоща полевого (*Herba Equiseti arvensis*) – ГФ XI изд., ст. 50, стр. 318;

Лопуха корни (*Arctii radices*) – ФС 42-0143-05;

Плоды укропа огородного (*Fructus Anethi graveolentis*) – ГФ XI изд., ст. 29, стр. 280;

Трава полыни обыкновенной (*Herba Artemisiae vulgaris*) – ФС 42-2094-83.

Сырье для составления сбора было приобретено в аптечных организациях г.Москвы.

2. Экстракт сухой – лабораторный образец, полученный из сбора.

Сбор как объект исследования готовили в условиях лаборатории в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи «Сборы», ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.10020.15; изучение внешних признаков – ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.10020.15; изучение анатомо-диагностических признаков проводили согласно ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0003.15 на микроскопе МБИ-3 (при увеличении 7×8; 7×20; 7×40, 10×10) [27, 28]. Результаты документировали с помощью фотоаппарата «Canon PowerShot G16» и микрофотонасадки МФН-12.

Экстракт сухой как объект исследования готовили в условиях лаборатории в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи «Экстракты», ГФ XI изд., вып. 2 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0021.15 [27, 29].

2.2 Методы исследования

Для идентификации и количественного определения БАВ изучаемого сбора и экстракта сухого были использованы известные методики с подбором, для некоторых из них, условий проведения.

2.2.1 Определение показателей качества сбора и экстракта сухого

Показатели качества сбора растительного проводили общепринятыми методами в соответствии со статьями ГФ, определяли:

- внешние и анатомо-диагностические признаки изучаемого сбора ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.10020.15, ОФС.1.5.3.0003.15 [27, 28];
- экстрактивные вещества, извлекаемые водой – ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0006.15 [27, 28];
- влажность – ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0007.15 [27, 28];
- золу общую – ГФ XI изд., вып. 2 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.2.2.2.0013.15 [27, 29];
- золу, нерастворимую в хлористоводородной кислоте – ГФ XI изд., вып. 2 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0005.15 [27, 29];
- измельченность – ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0004.15 [27, 28];
- органическую примесь – ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0004.15 [27, 28];
- минеральную примесь – ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0004.15 [27, 28];
- микробиологическую чистоту – ГФ РФ XII изд., ОФС 42-0067-07 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.2.4.0002.15 [26, 27];
- радиоактивность – ОФС 42-0011-03 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0001.15 [27, 86].

Показатели качества экстракта сухого проводили согласно фармакопейным статьям, определяли:

- описание – ГФ XI изд., вып. 2 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0021.15 [27, 29];
- потерю в массе при высушивании – ГФ XI изд., вып. 2 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0021.15 [27, 29];
- тяжёлые металлы – ГФ РФ XII изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.2.2.2.0012.15 [26, 27].

2.3 Фитохимические методы изучения сбора и экстракта сухого

Для подтверждения основных групп БАВ в растительном сборе и экстракте сухом были проведены качественные реакции согласно фармакопейным и общепринятым методикам с водным извлечением из сбора и раствором экстракта сухого [27, 29, 155].

Приготовление водного извлечения сбора:

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 10,0 г, помещали в круглодонную колбу (объемом 200 мл), добавляли 100 мл воды очищенной. Колбу с навеской в водной смеси соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течение 30 мин. Для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу. Экстракцию повторяли дважды, водные извлечения объединяли и упаривали под вакуумом до 25 мл.

Приготовление раствора экстракта сухого:

Точную навеску сухого экстракта массой 0,5 г помещали в колбу (объемом 100 мл), прибавляли 20 мл воды очищенной, перемешивали до растворения.

С полученными водными извлечениями сбора и раствором экстракта сухого проводили качественные реакции на присутствие основных групп БАВ:

Флавоноиды:

К 1 мл водного извлечения прибавляли 1 мл 95% спирта, 0,1 г порошка магния и 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Постепенно появлялось красное окрашивание [117].

Арбутин:

3 мл водного извлечения пропускали через колонку, заполненную алюминия оксидом (нейтральный) размером 0,5×2 см. К фильтрату прибавляли 0,1 мл 2% раствора натрия карбоната и 0,1 мл 2% спиртовой раствор дихлорхинонахлоримида. Появлялось синее окрашивание [117].

Дубильные вещества:

К 2 мл водного извлечения добавляли несколько капель железоаммониевых квасцов. Наблюдала черно-синее окрашивание (гидролизуемые) [117].

Полисахариды:

К 10 мл водного извлечения добавляли 30 мл 95% спирта этилового и перемешивали. Появлялись белые хлопьевидные сгустки, которые при стоянии выпадали в осадок [117].

Сахара:

К 1 мл водного извлечения добавляли 2 мл реактива Феллинга и нагревали до кипения. Происходило выпадение кирпично-красного осадка [117].

С целью подтверждения основных групп БАВ в сборе была проведена микрохимическая реакция на инулин:

Инулин:

При нанесении раствора йода на коровую часть кусочка корня или порошок, не должно быть синего окрашивания (отсутствие крахмала);

При нанесении на порошок корней лопуха нескольких капель 20% спиртового раствора тимола и капли кислоты серной концентрированной наблюдали оранжево-красное окрашивание [117].

2.3.1 Тонкослойная хроматография

Анализ веществ в изучаемом сборе и экстракте сухом проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Kieselgel 60 F₂₅₄», «TLC Silicagel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 20×20 см, 15×20 см. Хроматографирование выполняли в закрытых стеклянных камерах в соответствующих системах растворителей. Величины R_f идентифицированных веществ являются средними из пяти измерений. В ходе применения ТСХ анализа применялись методики Государственной, Европейской Фармокопеи и методы, доступные в научной литературе [27, 28, 122, 155].

Фенольные соединения

Качественное определение фенольных соединений в сборе

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 10,0 г, помещали в колбу (объемом 100 мл), добавляли 40 мл 70% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течении 1 ч. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор) [118, 180].

На линию старта хроматографической пластины «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 20×20 см наносили точкой 20 мкл испытуемого раствора и по 20 мкл растворов стандартных образцов (СО): апигенина, гиперозида, лютеолин-7-гликозида, лютеолина, рутина, нарингенина, кверцетина, галловой кислоты, хлорогеновой кислоты, феруловой кислоты. Предварительно камеру для восходящей тонкослойной хроматографии насыщали смесью растворителей хлороформ-этилацетат-метанол-5% раствор уксусной кислоты в воде (20:20:20:5) –

подвижная фаза, затем размещали пластину «Kieselgel 60 F₂₅₄» с нанесенными пробами. Окончание элюирования фиксировали визуально по финишной линии, когда растворитель прошел 80-90% от линии старта. Далее пластину вынимали из камеры, высушивали при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного улетучивания растворителей. Затем пластинку обрабатывали 5% раствором фосфорно-молибденовой кислоты в 95% этаноле, выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 5 мин. Более подробно условия представлены в работах [118, 180].

Качественное определение фенольных соединений в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 2,0 г помещали в колбу (объемом 100 мл), прибавляли 40 мл 70% этилового спирта. Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (испытываемый раствор). Далее проводили хроматографирование и детектирование по вышеприведенной методике качественного определения фенольных соединений в сборе.

Приготовление растворов стандартных образцов для ТСХ анализа фенольных соединений: точную навеску стандартного образца массой 0,05 г апигенина, гиперозида, лютеолин-7-гликозида, лютеолина, рутина, нарингенина, кверцетина, галловой кислоты, хлорогеновой кислоты, феруловой кислоты растворяли в мерной колбе (объемом 100 мл) в 50 мл 70% этилового спирта и доводили тем же растворителем до метки – 70% этиловым спиртом, перемешивали.

Свободные сахара

Качественное определение свободных сахаров в сборе

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 1,0 г, помещали в колбу (объемом 200 мл), добавляли 70 мл 50% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяли с

обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течении 1 ч. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 50 мл. Полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем – 50% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластины «TLC Silicagel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 15×20 см наносили точкой 20 мкл испытуемого раствора и по 20 мкл растворов стандартных образцов: глюкозы, фруктозы, сахарозы, маннозы, арабинозы, галактозы, рамнозы. Предварительно камеру для восходящей тонкослойной хроматографии насыщали смесью растворителей пиридин-этилацетат-вода (20:60:40) – подвижная фаза, затем размещали пластину «TLC Silicagel 60 F₂₅₄» с нанесенными пробами. Окончание элюирования фиксировали визуально по финишной линии, когда растворитель прошел 80-90% от линии старта. Далее пластину вынимали из камеры, высушивали на воздухе и обрабатывали проявляющим реагентом: тимол-серная кислота конц.-спирт этиловый 95% (0,5:5:95), выдерживали 10 мин в сушильном шкафу при 100-105°C. Более подробно условия представлены в работах [113, 180].

Качественное определение свободных сахаров в экстракте сухом

Для этого около 0,2 г (точная навеска) экстракта сухого помещали в колбу (объемом 200 мл), добавляли 20 мл 50% этилового спирта, колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Полученный раствор фильтровали в мерную колбу (объемом 50 мл) через бумажный фильтр и объем доводили тем же растворителем до метки – 50% этиловым спиртом (испытуемый раствор). Далее проводили хроматографирование и детектирование по вышеприведенной методике качественного определения свободных сахаров в сборе.

Приготовление растворов стандартных образцов для ТСХ анализа свободных сахаров: около 0,05 г (точная навеска) СО глюкозы, фруктозы, сахарозы, маннозы, арабинозы, галактозы, рамнозы растворяли в мерной колбе (объемом 100

мл) в 5 мл воды очищенной и доводили до метки 50% этиловым спиртом, перемешивали.

Флавоноиды

Хроматографическое определение флавоноидов проводили, используя водно-спиртовые извлечения сбора и экстракта сухого, полученные по вышеописанным методикам при хроматографировании фенольных соединений.

Качественное определение флавоноидов в сборе

10 мл испытуемого раствора упаривали на водяной бане и остаток растворяли в 2 мл смеси этилацетат-метанол (95:5). На линию старта хроматографической пластины «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 20×20 см наносили точкой 20 мкл испытуемого раствора и по 20 мкл растворов стандартных образцов: апигенина, гиперозида, лютеолин-7-гликозида, лютеолина, рутина, нарингенина, кверцетина. Предварительно камеру для восходящей тонкослойной хроматографии насыщали смесью растворителей изопропанол-муравьиная кислота-вода (2:5:5) – подвижная фаза, затем размещали пластину «Kieselgel 60 F₂₅₄» с нанесенными пробами. Окончание элюирования фиксировали визуально по финишной линии, когда растворитель прошел 80-90% от линии старта. Далее пластину вынимали из камеры, высушивали при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного улетучивания растворителей. Затем обрабатывали 2% раствором алюминия хлорида (III) в 95% этаноле и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 5 мин. Более подробно условия представлены в работах [178, 180].

Качественное определение флавоноидов в экстракте сухом

Для этого около 0,2 г (точная навеска) экстракта сухого растворяли в 2 мл смеси этилацетат-метанол (95:5). Далее проводили хроматографирование и детектирование по вышеприведенной методике качественного определения флавоноидов в сборе.

Приготовление растворов стандартных образцов для ТСХ анализа флавоноидов: точную навеску СО (массой 0,05 г) апигенина, гиперозида, лютеолин-7-гликозида, лютеолина, рутина, нарингенина, кверцетина растворяли в

мерной колбе (объемом 100 мл) в 50 мл смеси растворителей: этилацетат-метанол (95:5) и полученный раствор доводили до метки тем же растворителем, перемешивали.

Арбутин

Качественное определение арбутина в сборе

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 2,5 г, помещали в колбу (объемом 50 мл), добавляли 25 мл смеси метанол-вода (1:1) Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течении 10 мин. Для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводили до метки тем же растворителем (испытуемый раствор) [102].

На линию старта хроматографической пластины «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 15×20 см наносили 20 мкл испытуемого раствора и 10 мкл растворов СО: арбутина, гидрохинона, галловой кислоты. Предварительно камеру для восходящей тонкослойной хроматографии насыщали смесью растворителей муравьиная кислота-вода-этилацетат (6:6:88) – подвижная фаза, затем размещали пластину «Kieselgel 60 F₂₅₄» с нанесенными пробами. Окончание элюирования фиксировали визуально по финишной линии, когда растворитель прошел 80-90% от линии старта. Далее пластину вынимали из камеры, помещали в сушильный шкаф и растворитель удаляли при температуре 100-105°C. Хроматограмму вначале обрабатывали 1% раствором дихлорхинонахлоримида в метаноле и затем 2% раствором натрия карбоната безводным. Более подробно условия представлены в работах [102].

Качественное определение арбутина в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 0,5 г помещали в колбу (объемом 50 мл), прибавляли 25 мл смеси метанол-вода (1:1). Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню

на 20 мин. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 25 мл. Полученный объем раствора доводили до метки тем же растворителем (испытуемый раствор). Далее проводили хроматографирование и детектирование по вышеприведенной методике качественного определения арбутина в сборе.

Приготовление растворов стандартных образцов для ТСХ анализа арбутина: точную навеску СО массой 25 мг арбутина, гидрохинона, галловой кислоты растворяли в мерной колбе (объемом 100 мл) в 10 мл метанола, перемешивали.

2.3.2 Газожидкостная хроматография

Для анализа получали эфирное масло изучаемого сбора по методике ГФ [25, 26], метод 1. Более подробно условия представлены в работе [119].

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 20,0 г, помещали в широкогорлую плоскодонную колбу (объемом 1 л), добавляли 300 мл воды очищенной. Затем колбу закрывали резиновой пробкой с обратным холодильником, к пробке снизу прикрепляли приемник Гинзберга. Колбу с содержимым нагревали и кипятили в течении 2 ч. Полученное при перегонке эфирное масло количественно перемещали в мерную колбу (объемом 10 мл) прибавляли 8 мл спирта этилового 96%. Перемешивали до растворения и полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем – 96% этиловым спиртом [119].

Компонентный состав эфирных масел, полученный из сбора, проводили методом ГЖХ на хроматографе «Кристаллюкс-4000М» (Мета-хром, Россия) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы «NetChrom, V2.1» для «Windows». В качестве неподвижной фазы

использовалась кварцевая капиллярная колонка HP-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм), заполненная 5%-фенил-95%-метилполисилоксаном. В качестве подвижной фазы использовался азот. Скорость потока 1 мл/мин, температура: испарителя – 200°C, детектора – 250°C. Исходная температура термостата на момент начала анализа 100°C. В процессе эксперимента она изменяется со скоростью 5 град/мин и достигает 150°C. Детектор пламенно-ионизационный. Время анализа 10 мин. Объём пробы 1 мкл раствора с разделением потока 1:27 [119].

1 мкл полученного спиртового раствора эфирного масла и по 5 мкл растворов стандартных образцов хроматографировали при вышеуказанных условиях.

В качестве *растворов стандартных образцов* были использованы следующие растворы в спирте 96%:

- цинеола спиртовой раствор 0,01%;
- камфоры спиртовой раствор 0,01%;
- терпинеола спиртовой раствор 0,01%;
- анетола спиртовой раствор 0,01%;
- туйона спиртовой раствор 0,01%;
- лимонена спиртовой раствор 0,01%;
- борнилацетата спиртовой раствор 0,01%;
- L-пинена спиртовой раствор 0,01%;
- камфоры спиртовой раствор 0,01%;
- гераниола спиртовой раствор 0,01%;
- борнилацетата спиртовой раствор 0,01%.

2.3.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография

В высокоэффективной жидкостной хроматографии анализ фенольных соединений, органических кислот, сахаров и арбутина проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «Gilson» (Gilson, Франция) с ручным инжектором «Rheodyne», модель 7125 (Rheodyne, США) с последующей

компьютерной обработкой результатов с помощью программы «Мультихром» для «Windows». Более подробно условия представлены в работах [108, 109, 112, 180].

В качестве неподвижной фазы для фенольных соединений и арбутина была использована металлическая колонка «Kromasil C18» размером $4,6 \times 250$ мм, 5 мкн; для сахаров и органических кислот – металлическая колонка «Altech OA-1000 Organic Acids» размером $6,5 \times 300$ мм [112, 118].

В качестве подвижной фазы для фенольных соединений и арбутина: метанол – вода – фосфорная кислота (конц.) (400:600:5); для сахаров и органических кислот: 0,005 М раствор серной кислоты [112, 118].

Исследование проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента и продолжительность анализа для фенольных соединений и арбутина – 0,8 мл/мин и 70 мин; для сахаров и органических кислот – 1 мл/мин и 20,38 мин. Объем пробы 50 мкл [110, 112, 118].

Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора «Gilson» UV/VIS модель 151, при длине волны для фенольных соединений и арбутина – 254 нм; для сахаров и органических кислот – 190 нм [110, 112, 118, 180].

Идентификацию разделенных веществ проводили путем сопоставления времен удерживания пиков, полученных на хроматограмме компонентов смеси, со временами удерживания стандартных образцов.

Фенольные соединения

Качественное определение фенольных соединений в сборе

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 3,0 г, помещали в колбу (объемом 150 мл), добавляли 60 мл 70% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течении 1 ч. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрацию через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводили до метки

соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (испытываемый раствор) [118].

По 50 мкл испытываемого раствора и СО образцов вводили в хроматограф и хроматографировали при вышеуказанных условиях.

Качественное определение фенольных соединений в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 0,5 г помещали в колбу (объемом 150 мл), прибавляли 20 мл 70% этилового спирта. Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (испытываемый раствор).

По 50 мкл испытываемого раствора и растворов СО вводили в хроматограф и хроматографировали при вышеуказанных условиях.

Приготовление растворов стандартных образцов для ВЭЖХ анализа фенольных соединений: точную навеску СО массой по 0,05 г рутина, кофейной кислоты, кверцетина, лютеолина, цикориевой кислоты, лютеолин-7-гликозида, галловой кислоты, хлорогеновой кислоты, изоферуловой кислоты, эллаговой кислоты, коричной кислоты, неохлорогеновой кислоты, гиперозида, геспередина, апигенина, нарингенина, феруловой кислоты, эпикатехина, катехина, кемпферола, дикумарина, метоксикумарина, арбутина, эпигаллокатехингаллата помещали в мерные колбы (объемом 100 мл), растворяли в 50 мл 70% этилового спирта и доводили тем же растворителем до метки – 70% этиловым спиртом.

Органические кислоты и сахара

Качественное определение органических кислот и сахаров в сборе

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 4,0 г, помещали в колбу (объемом 100 мл), добавляли 80 мл воды очищенной. Колбу с навеской в водной смеси соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в

течении 1 ч. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводили до метки соответствующим растворителем – водой очищенной (испытуемый раствор) [110].

По 50 мкл испытуемого раствора и растворов СО сахаров: рамнозы, ксилозы, мальтозы, сорбитола, глюкозы, арабинозы, сахарозы, фруктозы, галактозы и СО органических кислот: аскорбиновой, лимонной, щавелевой, яблочной (маликовой), янтарной, виннокаменной кислот вводили в хроматограф и хроматографировали при вышеуказанных условиях [110].

Качественное определение органических кислот и сахаров в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 0,5 г помещали в колбу (объемом 50 мл), прибавляли 20 мл воды очищенной. Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем – водой очищенной (испытуемый раствор).

По 50 мкл испытуемого раствора и растворов СО сахаров: рамнозы, ксилозы, мальтозы, сорбитола, глюкозы, арабинозы, сахарозы, фруктозы, галактозы и СО органических кислот: аскорбиновой, лимонной, щавелевой, яблочной (маликовой), янтарной, виннокаменной вводили в хроматограф и хроматографировали при вышеуказанных условиях.

Приготовление растворов стандартных образцов для ВЭЖХ анализа сахаров: точную навеску СО массой по 0,60 г рамнозы, ксилозы, мальтозы, сорбитола, глюкозы, арабинозы, сахарозы, фруктозы, галактозы помещали в мерную колбу (объемом 50 мл), растворяли в 25 мл 0,005М раствора серной кислоты и доводили тем же растворителем до метки, перемешивали.

Приготовление растворов стандартных образцов для ВЭЖХ анализа органических кислот: точную навеску СО массой по 0,025 г аскорбиновой, лимонной, щавелевой, яблочной (маликовой), янтарной, виннокаменной кислот помещали в мерную колбу (объемом 50 мл), растворяли в 25 мл 0,005М раствора серной кислоты и доводили тем же растворителем до метки.

Арбутин

Количественное определение арбутина в сборе

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 3,0 г, помещали в колбу (объемом 150 мл), добавляли 60 мл 70% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течении 1 ч. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

По 50 мкл испытуемого раствора и раствора СО арбутина вводили в хроматограф и хроматографировали при вышеуказанных условиях.

Расчёт количественного содержания арбутина в сборе производили методом абсолютной калибровки с помощью компьютерной программы «Мультихром для «Windows» и по формуле (1):

$$C (\%) = \frac{S_{\text{ис.}} \times C_{\text{ст.}} \times 100 \times 100 \times 100}{S_{\text{ст.}} \times 25 \times a \times (100 - W)}, \quad (1)$$

где

$S_{\text{ис.}}$ – площадь пика арбутина в испытуемом растворе;

$S_{\text{ст.}}$ – площадь пика раствора СО арбутина;

$C (\%)$ – концентрация арбутина, %;

$C_{\text{ст.}}$ – масса СО арбутина, г;

a – масса навески изучаемого сбора, г;

W – потеря массы при высушивании изучаемого сбора, % [112].

Количественное определение арбутина в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 0,5 г помещали в колбу (объемом 150 мл), прибавляли 20 мл 70% этилового спирта. Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводили фильтрацию через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

По 50 мкл испытуемого раствора и растворов СО вводили в хроматограф и хроматографировали при вышеуказанных условиях.

Расчёт количественного содержания арбутина в экстракте сухом производили методом абсолютной калибровки с помощью компьютерной программы «Мультихром для «Windows» и по формуле (2):

$$C (\%) = \frac{S_{\text{ис.}} \times C_{\text{ст.}} \times 100 \times 100 \times 100}{S_{\text{ст.}} \times 25 \times a \times (100 - W)}, \quad (2)$$

где

$S_{\text{ис.}}$ – площадь пика арбутина в испытуемом растворе;

$S_{\text{ст.}}$ – площадь пика раствора СО арбутина;

$C (\%)$ – концентрация арбутина, %;

$C_{\text{ст.}}$ – масса навески СО арбутина, г;

a – масса навески экстракта сухого, г;

W – потеря в массе при высушивании экстракта сухого, %.

Приготовление растворов стандартных образцов для ВЭЖХ анализа арбутина: точную навеску СО массой 0,0103 г арбутина помещали в мерную колбу (объемом 25 мл), растворяли в 20 мл 70% спирта этилового и доводили тем же растворителем до метки – 70% этиловым спиртом, перемешивали.

2.3.4 Спектрофотометрия

Спектрофотометрический анализ фенольных соединений, полисахаридов (инулина), флавоноидов проводили на саморегистрирующем спектрофотометре «Helios Alfa» (Spectronic Unicam, Великобритания). Кювета с толщиной слоя 10 мм.

Фенольные соединения

Обнаружение фенольных соединений в сборе

Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряли точную навеску сбора массой 10,0 г, помещали в колбу (объемом 200 мл), добавляли 70 мл 70% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течение 1 ч. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (раствор А).

10 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили соответствующим растворителем до метки, перемешивали и снимали спектр поглощения в диапазоне длин волн 220-360 нм.

Параллельно снимались УФ-спектры растворов СО: арбутина, рутина, кверцетина, галловой кислоты, лютеолина, кофейной кислоты, лютеолин-7-гликозида, кемпферола, хлорогеновой кислоты, апигенина, гиперозида и водно-спиртовых извлечений компонентов, входящих в сбор.

Обнаружение фенольных соединений в сырье – компонентах сбора

Пробы сырья травы хвоща полевого, листьев брусники, травы полыни обыкновенной, плодов укропа огородного, корней лопуха измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отвешивали точные навески сырья массой по 10,0 г, помещали в колбы (объемом 200 мл), добавляли 70 мл 70% этилового спирта. Колбы с навесками в спиртоводной смеси

соединяли с обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане с момента закипания в течение 1 ч. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (раствор А).

10 мл раствора А помещали в мерную колбу (объемом 100 мл), доводили соответствующим растворителем до метки – 70% этиловым спиртом, перемешивали (растворы компонентов) и снимали спектр поглощения в диапазоне длин волн 220-360 нм.

Обнаружение фенольных соединений в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 0,5 г помещали в колбу (объемом 100 мл), прибавляли 50 мл 70% этилового спирта. Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводили фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (раствор А).

В мерную колбу (объемом 100 мл) помещали 1,0 мл раствора А, доводили этим же растворителем до метки, перемешивали и снимали спектр поглощения в диапазоне длин волн 190-360 нм.

Приготовление растворов стандартных образцов для спектрофотометрических методик фенольных соединений: по 0,05 г СО рутина, кверцетина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, гиперозида, апигенина, кемпферола, арбутина помещали в мерные колбы (объемом 100 мл), растворяли в 50 мл 70% этилового спирта и доводили тем же растворителем до метки – 70% этиловым спиртом, перемешивали.

Флавоноиды

Спектрофотометрический анализ флавоноидов проводили, используя водно-спиртовые извлечения сбора и экстракта сухого, полученные по вышеописанным методикам при спектрофотометрировании фенольных соединений. Более подробно условия представлены в работах [115, 180].

Полисахариды (инулин)

Определение содержания полисахаридов (инулина) проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на фруктозу по методике, изложенной в ГФ XIII, ФС.2.5.0025.15 «*Лопуха корни*» [27].

При проведении методик качественного и количественного определения БАВ были использованы стандарты фирмы Sigma-Aldrich:

- лютеолин-7-гликозид – CAS № 5373-11-5
- арбутин – CAS № 84380-01-8
- рутин – CAS № 207671-50-9
- кверцетин – CAS № 6151-25-3
- кофейная кислота – CAS № 331-39-5
- галловая кислота – CAS № 5995-86-8
- хлорогеновая кислота – CAS № 327-97-9
- лютеолин – CAS № 491-70-3
- кемпферол – CAS № 520-18-3
- апигенин – CAS № 520-36-5
- гиперозид – CAS № 482-36-0
- фруктоза – CAS № 57-48-7

2.3.5 Титриметрические методы

Арбутин

Количественное определение арбутина в сборе и экстракте сухом

Количественное определение арбутина проводили методом йодометрического титрования по ГФ XI изд., вып. 2, ст. 27 [29].

Органические кислоты

Количественное определение органических кислот в сборе

Определение содержания суммы свободных органических кислот проводили титриметрическим методом в пересчёте на яблочную кислоту, описанным в ГФ XI изд., вып. 2, ст. 38 [29].

Количественное определение органических кислот в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 0,6 г помещали в коническую колбу (объемом 200 мл), прибавляли 100 мл воды очищенной. Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Далее проводили количественное определение согласно методике ГФ XI, вып. 2 [29].

Дубильные вещества

Количественное определение дубильных веществ в сборе

Определение содержания дубильных веществ проводили перманганометрическим методом в пересчете на танин по ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.5.3.0008.15, метод 1 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [27, 28]. Более подробно условия представлены в работах [114, 180].

Количественное определение дубильных веществ в экстракте сухом

Точную навеску экстракта сухого массой 0,6 г помещали в коническую колбу (объемом 100 мл), прибавляли 50 мл воды очищенной. Колбу оставляли на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещали в ультразвуковую баню на 20 мин. Охлаждали при комнатной температуре в естественных условиях. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводили

фильтрацию через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем раствора доводили до метки соответствующим растворителем. Далее проводили количественное определение согласно методике ГФ XI изд. и ГФ РФ XIII изд. [27, 28].

2.4 Биологические методы исследования

Экспериментальные исследования были проведены на белых крысах линии Wistar обоего пола (масса 180-200 г.) в осенне-зимний период. Содержание животных соответствовало:

- Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»;
- «Правилам лабораторной практики» (GLP);
- Правилам, принятым «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST №123» от 18.03.1986 (Страсбург, 18 марта 1986).

Протокол исследования согласован с этической комиссией Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН (протокол №6 от 25.10.2016). Методом мгновенной декапитации осуществляли эвтаназию животных под легким эфирным наркозом.

Объектом исследования служил сбор состоящий из:

- листьев брусники – 30%;
- травы хвоща полевого – 30%;
- корней лопуха – 15%;
- плодов укропа огородного – 15%;
- травы полыни обыкновенной – 10%.

Экспериментальную модель уrolитиаза воспроизводили путем введения внутрижелудочно витамина D₂ в дозе 12000 ЕД/кг массы 1 раз в сутки в течение 20 дней (контроль) по методу Higgens H.G. (1965). Одновременно с введением

витамина Д₂ животным опытной группы интрагастрально вводили отвар изучаемого сбора в объеме 10 мл/кг. Введение испытуемого комплексного растительного средства проводили один раз в сутки с начала эксперимента и на протяжении 20 дней. Водные извлечения испытуемого средства готовили по требованиям ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» [27].

Животным контрольной группы вводили по аналогичной схеме эквивалентное количество дистиллированной воды.

Функциональное состояние почек у животных оценивалось по определению:

- диуреза без нагрузки по общепринятому методу и с 2,5% водной нагрузкой [13];
- концентрации катионов калия, натрия и кальция в моче – методом пламенной фотометрии на приборе «Flapho-4» (Германия);
- концентрации фосфора – по Хаями Тадаси [8];
- концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови и моче – унифицированными методами с использованием наборов реактивов Био-Ла-Тест «Ляхема» (Чехия);
- концентрации белка в моче – по реакции с сульфосалициловой кислотой [75];
- скорости клубочковой фильтрации – по клиренсу эндогенного креатинина;
- pH мочи на универсальном иономере ЭВ-74 (Россия) с использованием приспособления для малых объемов.

Для определения минутного диуреза осуществляли сбор мочи в течение 3 часов в обменных клетках, которые представляют собой металлические цилиндры с перфорированным дном и воронкой, предназначенной для стока собираемой мочи.

Для микроскопии мочевого осадка готовили микропрепарат из свежей порции мочи путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин. Затем надосадочную жидкость удаляли, оставшийся осадок помещали на предметное стекло и рассматривали под микроскопом в 100 окнах при увеличении ($\times 20$) [76].

Для определения концентрации малонового диальдегида в сыворотке крови [123] и в гомогенате почек [168] была использована методика, основанная на реакции взаимодействия малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой и

последующем спектрофотометрировании образованного окрашенного комплекса при длине волны 532 нм и 580 нм.

Спектрофотометрическим методом определяли активность каталазы сыворотки крови [161].

Полученные экспериментальные данные статистически обработаны общепринятыми методами для малой выборки с определением средней величины (M) и средней ошибки (m). Оценку значимости различий исследований осуществляли с применением параметрического t -критерия Стьюдента. Различия средних величин контроля и опытов считали существенными при вероятности 95% ($P \leq 0,05$).

2.5 Валидация методик

Валидацию методик в объектах исследования проводили в соответствии с указаниями ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [27], согласно ГОСТу [25] и методическим указаниям [6, 100].

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с требованиями ГФ XI изд., вып. 1 и ГФ XIII изд., ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [27, 28]. Статистическая обработка результатов анализа проводилась при n повторных анализов однородного материала, где:

n – число измерений;

x_i – данные отдельных определений;

$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ – среднее значение из n определений;

$f = n - 1$ – число степеней свободы;

$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{f}$ – дисперсия;

- $s = \sqrt{s^2}$ – средняя квадратичная ошибка отдельного определения (выборочное стандартное отклонение);
- $s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$ – средняя квадратичная ошибка среднего арифметического или стандартное отклонение среднего результата;
- P – коэффициент надежности (доверительная вероятность);
- $t(P, f)$ – критерий Стьюдента, зависящий от надежности и числа определений;
- $\Delta x = \pm t(P, f) \cdot S$ – абсолютная ошибка результата отдельного определения;
- $E = \pm \frac{\Delta x}{x} \cdot 100\%$ – относительная ошибка результата отдельного (единичного) определения

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА

3.1 Разработка состава растительного сбора

Несмотря на то, что большинство лекарственных растений обладает многосторонним действием, достичь хорошего клинического эффекта нередко удастся лишь при сочетании нескольких средств растительного происхождения. Применение растительных сборов в комплексе с другими лекарственными средствами и физиотерапией у больных мочекаменной болезнью в большинстве случаев сопровождалось положительным лечебным эффектом.

Предлагаемый нами состав растительного сбора был подобран с учетом изучения сведений об этиологии и патогенезе МКБ, опыте применения в официальной и народной медицине выбранных растений при терапии уролитиаза и данных о химическом составе их БАВ.

В сбор растительный было включено сырье лекарственных растений с диуретическим, спазмолитическим, антимикробным, противовоспалительным, иммуномодулирующим, антиоксидантным и нормализующим коллоидную структуру мочи действием. Химический состав ЛРС отличен, поэтому фармакологическая активность реализуется различными механизмами, что позволяет достичь комплексного действия.

В состав сбора было предложено включить:

- ***брусники листья*** с доказанной диуретической, противовоспалительной, антибактериальной и антиоксидантной активностью;
- ***хвоща полевого траву*** с доказанной диуретической, противовоспалительной, антибактериальной, литолитической и антиоксидантной активностью;
- ***лопуха корни*** с доказанным действием по предотвращению осаждения кристаллов в почках и антиоксидантной активностью;

- *укропа пахучего плоды* с доказанной диуретической, спазмолитической, противовоспалительной, антиоксидантной и антибактериальной активностью;
- *полыни обыкновенной траву* с доказанной спазмолитической, болеутоляющей, противовоспалительной и антиоксидантной активностью.

Также, одними из основных причин уролитиаза являются нарушения обмена веществ, инфекции мочевыводящих путей, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, это также учитывалось при выборе компонентов сбора.

Доля каждого вида лекарственного растительного сырья, рациональность их сочетания определялись с учетом многоуровневого и многоэтапного механизма развития мочекаменной болезни.

Все выбранное ЛРС давно используется в традиционной и официальной медицине как мочегонное, спазмолитическое, антисептическое, противовоспалительное, желчегонное средство и имеет обеспеченную сырьевую базу. Лекарственные растения, входящие в состав предложенного сбора, содержат флавоноиды, фенольные кислоты, фенологликозид арбутин, дубильные вещества, кумарины, полисахариды (инулин), эфирные масла.

Таким образом, брусника обыкновенная, хвощ полевой, лопух большой, укроп огородный, полынь обыкновенная подходят для создания многокомпонентного растительного средства, обладающего диуретическим, спазмолитическим, антимикробным, противовоспалительным, иммуномодулирующим, антиоксидантным и нормализующим коллоидную структуру мочи действием, необходимым для лечения и профилактики уролитиаза.

3.2 Выбор оптимального соотношения компонентов сбора

Для выбора оптимального соотношения компонентов прописи, нами были изучены 5 составов сбора (табл. 3.2.1), которые оценивались по количественному содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых водой. Результаты представлены в табл. 3.2.2.

Таблица 3.2.1

Варианты состава сбора

№ п/п	Наименование компонентов сбора	Состав сборов (количество входящих компонентов, г)				
		1	2	3	4	5
1	Листья брусники	30,0	20,0	30,0	30,0	35,0
2	Трава хвоща полевого	30,0	20,0	20,0	10,0	20,0
3	Корни лопуха	15,0	30,0	20,0	30,0	20,0
4	Плоды укропа огородного	15,0	20,0	20,0	20,0	20,0
5	Трава полыни обыкновенной	10,0	10,0	10,0	10,0	5,0

Таблица 3.2.2

Результаты определения содержания экстрактивных веществ пяти составов сбора

Состав сбора	Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, % (n=10)
1	23,17±0,49
2	21,64±0,47
3	22,28±0,39
4	22,96±0,43
5	21,16±0,35

На основании проведенных исследований был выбран состав сбора №1, так как в нем содержится наибольшее количество водорастворимых экстрактивных веществ. Для дальнейших исследований составу сбора №1 было присвоено условное название «Фитоурол».

3.3 Изучение специфической фармакологической активности изучаемого сбора

Сбор «Фитоурол» был изучен на экспериментальной модели уролитиаза (см. глава 2, п. 2.4).

Для оценки функционального состояния почек у лабораторных животных на фоне проводимого превентивно-курсового введения исследуемого средства определяли диурез, скорость клубочковой фильтрации (СКФ), биохимические показатели крови и мочи, проводили микроскопическое исследование осадка мочи (глава 2, п. 2.4).

Влияние изучаемого сбора на диуретическую и салуретическую функцию почек intactных крыс определяли при однократном интрагастральном введении испытуемого средства в объеме 10 мл/кг с 2,5% водной нагрузкой. Сбор мочи осуществляли в течение 3 часов после их введения фитосредств по общепринятой методике. В полученной моче определяли концентрацию катионов Na^+ , K^+ . Результаты исследований представлены в табл. 3.3.1.

Таблица 3.3.1

Влияние изучаемого сбора на скорость диуреза и содержание Na^+ , K^+ в моче белых крыс

Группы животных	Показатели		
	Диурез, мл/100 г/ч	K^+ в моче, мМ/л	Na^+ в моче, мМ/л
Контрольная (n=8)	$1,17 \pm 0,033$	$63,9 \pm 3,83$	$43,5 \pm 2,61$
Изучаемый сбор (n=8)	$2,24 \pm 0,021^*$	$76,7 \pm 1,28^*$	$86,9 \pm 4,34^*$

Примечание: * – здесь и далее, различия значимы в группах контроль-опыт при $P \leq 0,05$; n – количество животных

Как видно из представленных данных (табл. 3.3.1) однократное введение испытуемого комплексного растительного средства оказывало выраженное мочегонное действие, повышая выделительную функцию почек на 91% по сравнению с данными у животных контрольной группы. При этом, однократное

введение белым крысам комплексного растительного средства оказывало существенное влияние на экскрецию ионов натрия, увеличивая их концентрацию в моче в 2 раза по сравнению с данными у животных контрольной группы. Полученные результаты свидетельствуют о высокой диуретической активности изучаемого сбора.

При определении влияния изучаемого сбора на образование уролитов в мочевых путях крыс установлено, что введение сублетальных доз витамина D₂ сопровождается развитием воспалительной реакции в почках животных, о чем свидетельствует лейкоцитурия и эпителийурия, а также появление кристаллов солей фосфорной кислоты в осадке мочи. Установлено, что курсовое введение испытуемого средства крысам в указанном объеме ограничивает воспалительный процесс в почках. Полученные результаты приведены в табл. 3.3.2.

Таблица 3.3.2

Влияние изучаемого сбора на состав осадка мочи белых крыс при экспериментальном уролитиазе, индуцированном введением витамина D₂ (20 сутки)

Показатели	Группы животных		
	Интактная	Контрольная	Изучаемый сбор
Лейкоциты, ед в п/зр	3,5±0,24	20,8±1,5	6,4±0,52*
Эпителий, ед в п/зр	2,3±0,12	17,5±1,34	5,5±0,26*
Соли (фосфаты)	-	++++	++

Примечание: + - означает выраженность наличия в осадке солей фосфорной кислоты

Установлено, что на 20 сутки у контрольных животных повышается степень лейкоцит- и эпителийурии, а содержание фосфатов в моче увеличивается, в то время как курсовое введение животным изучаемого сбора в указанном объеме уменьшает количество лейкоцитов и эпителия в среднем в 3 раза по сравнению данными животных контрольной группы, а количество фосфатов снижает практически в 2 раза.

В табл. 3.3.3 приведены результаты исследования влияния комплексного растительного средства на показатели функционального состояния почек животных при экспериментальном уролитиазе, индуцированного введением витамина Д₂.

Таблица 3.3.3

Влияние изучаемого сбора на показатели функциональной активности почек крыс при экспериментальном уролитиазе (20 сутки)

Показатели	Группы животных		
	Интактная (n=8)	Контрольная (n=8)	Изучаемый сбор (n=8)
Диурез, мл/100 г/ч	1,2±0,03	0,8±0,04	1,3±0,08*
Na ⁺ в моче, мМ/л	65,2±1,74	34,8±1,86	62,8±3,14*
K ⁺ в моче, мМ/л	53,7±2,15	46,1±1,09	57,7±2,16*
СКФ, мкл/мин	96,2±4,65	72,4±3,92	89,2±4,68*
Белок в моче, г/л	0,93±0,012	2,06±0,13	1,04±0,09*
рН мочи, усл.ед.	6,7±0,25	8,8±0,56	5,9±0,46*

Как следует из результатов (табл. 3.3.3) внутрижелудочное введение сублетальных доз витамина Д₂ сопровождается нарушением функционального состояния почек. На 20 сутки диурез у крыс контрольной группы был снижен на 34%, а у животных, получавших отвар изучаемого сбора, был на уровне показателей интактной группы. Концентрация ионов натрия и калия также находилась на уровне показателей интактной группы животных. При этом скорость клубочковой фильтрации у крыс контрольной группы снижена на 25%, а у животных опытной группы незначительно отличается от данных интактных животных. К этому сроку наблюдения отмечается повышение концентрации ионов водорода в моче животных опытной группы, рН мочи отклоняется в сторону закисления.

В табл. 3.3.4 приведены результаты исследование влияния изучаемого сбора на показатели фосфорно-кальциевого обмена при экспериментальном уролитиазе у белых крыс.

Таблица 3.3.4

Влияние изучаемого сбора на концентрацию кальция и фосфора в сыворотке крови и в моче белых крыс на фоне экспериментального уrolитиаза, индуцированного введением витамина Д₂ (20 сутки)

Показатели	Группы животных		
	Интактная (n=8)	Контрольная (n=8)	Изучаемый сбор (n=8)
Кальций в сыворотке крови, мкмоль/мл	2,2±0,01	3,3±0,18	2,4±0,09*
Кальций в моче, мкмоль/мл	2,5±0,18	3,0±0,20	2,5±0,09
Фосфор в сыворотке крови, мкмоль/мл	0,8±0,06	6,2±0,43	2,1±0,15*
Фосфор в моче, мкмоль/мл	1,5±0,01	8,3±0,86	4,5±0,32*

Согласно представленным результатам (табл. 3.3.4) введение витамина Д₂ сопровождается нарушениями фосфорно-кальциевого обмена, на что указывает выраженное повышение концентрации фосфора как в сыворотке крови, так и моче животных контрольной группы; при чем в моче этот показатель превышал в 5,5 раз аналогичные данные у интактных животных. Установлено, что курсовое введение крысам комплексного растительного средства способствовало снижению уровня кальция в сыворотке крови на 27,3%, фосфора в крови и в моче в 3 и 1,8 раза соответственно, по сравнению с данными у животных контрольной группы.

Результаты, приведенные в табл. 3.3.5, свидетельствуют, что введение животным витамина Д₂ сопровождается индукцией процесса свободно-радикального окисления липидов и снижением антиоксидантного статуса организма, о чем свидетельствует повышение концентрации малонового диальдегида (МДА) в сыворотке и в гомогенате почек, и снижение активности каталазы в сыворотке крови у крыс контрольной группы. У животных, получавших отвар изучаемого сбора, наблюдали снижение МДА в сыворотке крови и гомогенате почек на 16 и 25% соответственно, а также повышение активности каталазы на 15%.

Таблица 3.3.5

Влияние изучаемого сбора на содержание МДА в сыворотке крови и гомогенате почек и активность каталазы сыворотки крови при экспериментальном уролитиазе, индуцированном введением витамина Д₂ (20 сутки)

Показатели	Группы животных		
	Интактная (n=8)	Контрольная (n=8)	Исследуемый сбор (n=8)
МДА в сыворотке, мкмоль/л	0,42±0,025	0,56±0,026	0,47±0,009*
МДА в почках, нмоль/г ткани	3,14±0,284	4,17±0,257	3,55±0,186*
Каталаза, kU/L	54,0±2,45	44,2±3,94	52,1±2,15*

При исследовании секционного материала установлено, что видимых уролитов (лупа) во всех группах не установлено. На рисунках 3.3.6-3.3.8 приведены снимки микроскопии осадков мочи.



Рис. 3.3.6 Осадок мочи крысы интактной группы (20×).
Отсутствие уролитов.

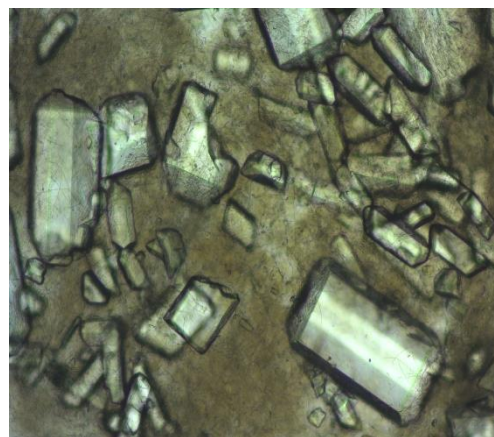


Рис. 3.3.7 Осадок мочи крысы группы контроля (40×).
Кристаллы-трипельфосфаты (фосфорнокислый кальций).



Рис. 3.3.8 Осадок мочи крысы
опытной группы (20×).
Оксалаты кальция.

Согласно полученным результатам (рис. 3.3.7) внутрижелудочное введение витамина Д₂ инициирует процесс кристаллообразования в мочевыводящей системе у животных контрольной группы. Показано (рис. 3.3.8), что превентивно-курсовое введение испытуемого средства снижает процесс кристаллообразования.

В ходе исследований установлено, что изучаемый сбор оказывает диуретическое, салуретическое, противовоспалительное, антиоксидантное, нефропротекторное, нормализующее фосфорно-кальциевый обмен действие, а также выраженное литолитическое влияние при экспериментальном уrolитиазе у лабораторных животных, вызванного интрагастральным введением сублетальных доз витамина Д₂. По-видимому, уrolитолитический эффект обусловлен способностью сбора подкислять мочу, ускорять диурез, оказывать антиоксидантное действие, препятствуя тем самым разрушению клеточных и субклеточных мембранных структур, а также ограничивает образование уrolитов.

Полученные результаты характеризуют широкий спектр фармакологических эффектов у изучаемого сбора и представлены в табл. 3.3.9.

Фармакологические эффекты сбора №1 (экспериментальный уролитиаз, индуцированный введением витамина Д₂)

Объект исследования	Фармакологические эффекты
Сбор №1	диуретический
	салуретический
	противовоспалительный
	нефропротекторный
	нормализующий фосфорно-кальциевый обмен
	антиоксидантный
	литолитический

Таким образом, на основании полученных данных комплексный растительный сбор, имеет широкий спектр фармакологической активности, которая обеспечивает его выраженную фармакотерапевтическую эффективность при экспериментальном уролитиазе, индуцированной введением сублетальных доз витамина Д₂, что является перспективным для использования в урологической практике.

3.4 Изучение морфолого-анатомических признаков изучаемого сбора

Сбор исследовали «невооруженным глазом», с помощью лупы (10×) и стереомикроскопа (15×), в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья», статья «Сборы» (ГФ XI изд., вып. 1, с. 252; ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0020.12) [25, 28].

Для микроскопического анализа делали серию микропрепаратов в глицерине. Для длительного хранения сырья, предназначенного для микроскопического исследования, часть образцов помещали в спиртоглицериновую смесь.

3.4.1 Внешние признаки

Сбор изучаемый, состоящий из лекарственного растительного сырья:

Брусники листья (*Vaccinii vitis-idaeae folia*) – 30 г;

Хвоща полевого трава (*Equiseti arvensis herba*) – 30 г;

Лопуха корни (*Arctii radices*) – 15 г;

Укропа огородного плоды (*Anethi graveolentis fructus*) – 15 г;

Полыни обыкновенной трава (*Artemisiae vulgaris herba*) – 10 г.



Рис. 3.4.1.1 Внешний вид изучаемого сбора.

Изучаемый сбор представляет собой смесь неоднородных кусочков растительного сырья: измельчённых листьев, стеблей, соцветий, корней и цельных плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм (рис. 3.4.1.1).

Цвет желтовато-коричневато-зелёный со светло-зелёными и тёмно-коричневыми вкраплениями. Запах слабый своеобразный. Вкус водного извлечения горьковатый слегка пряный.

При просмотре сбора под лупой (10×) и в стереомикроскоп (16×) видны:

- кусочки листьев различной формы кожистых, голых, с одной стороны зеленых, а с другой стороны светло-зеленых с тёмно-коричневыми точками (желёзки) (*брусники листья*);
- кусочки стеблей и ветвей продолговатых жестких, членистых, ребристых частично с узлами и влагалищами серовато – зеленого цвета, иногда расщеплённых со светлой желтоватой сердцевинкой (*хвоща полевого трава*);
- кусочки корней в поперечном и продольном сечении с остатками коричневой и серовато-коричневой пробки, серовато-белого, иногда желтоватого цвета на изломе (*лопуха корни*);
- кусочки листьев различной формы: тонких, с одной стороны голых и зелёных, а с другой стороны сильно опушённых тонкими белыми волосками

(серебристых); кусочки стеблей зелёных в поперечном и продольном сечении с белой губчатой сердцевинкой; а также целые и частично измельчённые соцветия – корзинки светло-зелёные с опушёнными листочками обвёртки (*полыни обыкновенной трава*);

- целые и частично измельчённые полуплодики длиной до 5 мм, шириной до 3 мм, широкоэллиптические, с одной стороны (спинка) – слабовыпуклые с тремя нитевидными и с двумя боковыми плоскими крыловидными рёбрами, а с другой стороны плоские; зеленовато-коричневые с желтоватыми рёбрами. Реже встречаются не распавшиеся вислоплодники (рис. 3.4.1.2) (*укропа огородного плоды*).



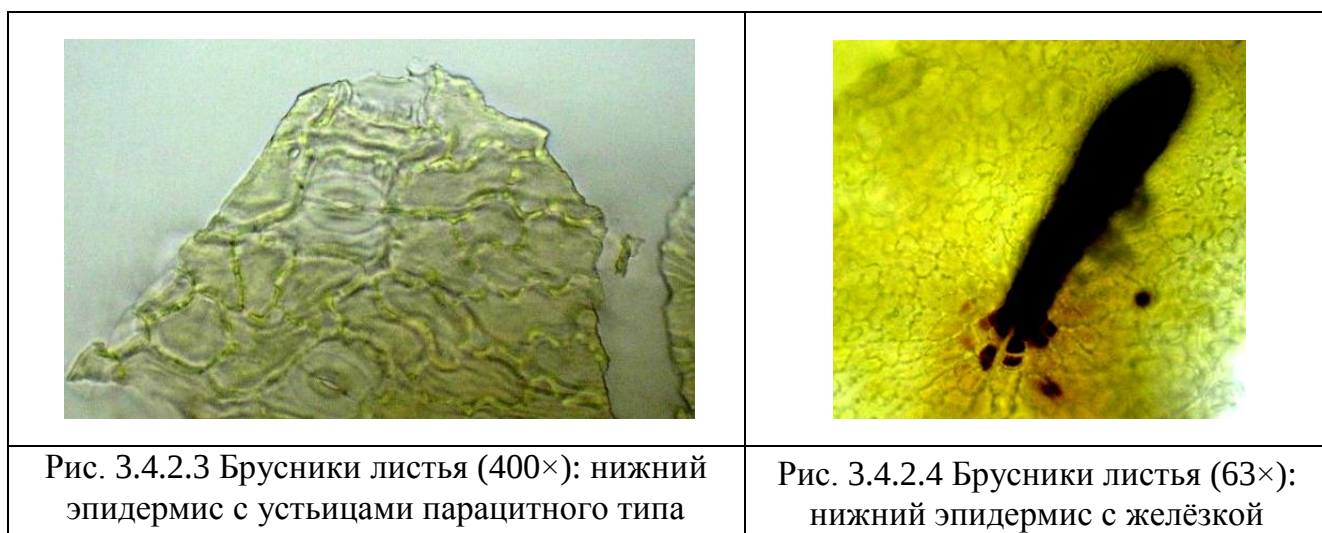
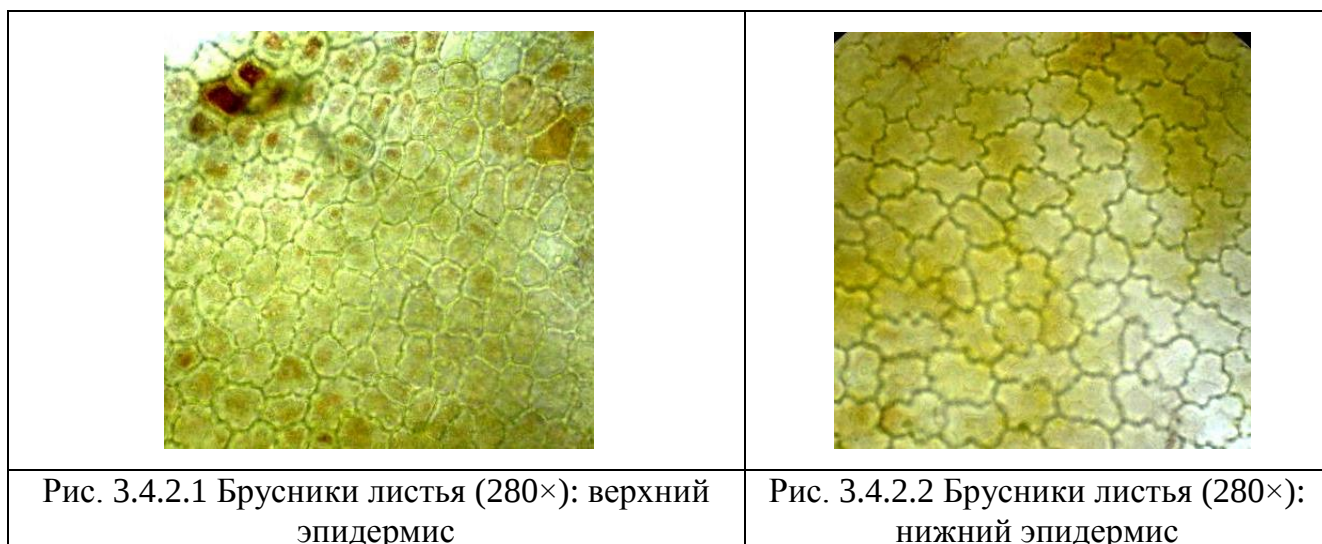
Рис. 3.4.1.2 Укропа огородного плоды (40×): Полуплодики: с нижней и с верхней стороны и не распавшийся вислоплодник

3.4.2 Анатомо-диагностические признаки (Микроскопия)

Для микроскопического анализа готовили микропрепараты листа с поверхности, препараты поперечного и продольного среза и «давленные» препараты корней, а также использовали сырье фиксированное в спиртоглицериновой смеси.

При рассматривании кусочков *листа брусники* с поверхности видно, что клетки эпидермиса с более или менее извилистыми стенками, что соответствует

нижнему и верхнему эпидермису листа брусники (рисунки 3.4.2.1, 3.4.2.2). Устьица парацитного типа, мелкие, с двумя околоустьичными клетками, расположенными параллельно устьичной щели (рис. 3.4.2.3). На эпидермисе встречаются желёзки с коричневым содержимым, состоящие из многоклеточной ножки, постепенно переходящей в овальную многоклеточную головку (рис. 3.4.2.4). В мезофилле встречаются редкие одиночные призматические кристаллы оксалата кальция.



При рассматривании кусочков *листья полыни обыкновенной* с поверхности видно, что с одной стороны они почти голые (верхняя сторона), с другой сильно опушённые (нижняя сторона), видны группы оторванных и спутанных волосков (рис. 3.4.2.5, 3.4.2.6). Клетки эпидермиса с тонкими извилистыми стенками часто плохо различимы. Устьица, аномоцитного типа, видны на нижней стороне – они

овальные с хорошо заметной устьичной щелью.

Волоски трёх типов: Т-образные – на 2-3-х клеточной ножке и с 2-х конечной длинной тонкой клеткой, прикреплённой к ножке в средней части и часто перекрученной с другими волосками; волоски многоклеточные (бичевидные) – на короткой 2-4-х клеточной ножке с длинной тонкой клеткой и волоски короткие из 2-3х коротких клеток с небольшой головкой (рисунки 3.4.2.7, 3.4.2.8). На верхней стороне изредка встречаются Т-образные и короткие волоски (рис. 3.4.2.7). На нижней стороне различного строения волосков много.

На нижней стороне встречаются редкие желёзки – овальные, разделённые перегородкой на две части (рис. 3.4.2.9).

При рассматривании соцветия (корзинки) видны отдельные цветки и цветоложа с листочками обвёртки (рис. 3.4.2.10). Листочки обвёртки продолговатые, с плёчатыми краями и зелёной центральной частью (рис. 3.4.2.11, 3.4.2.12).

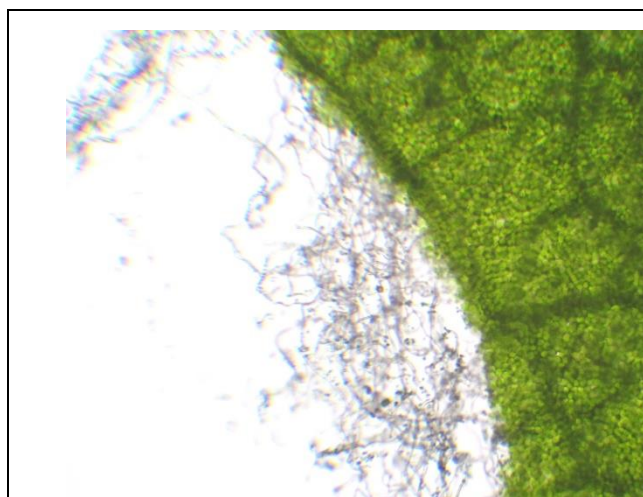
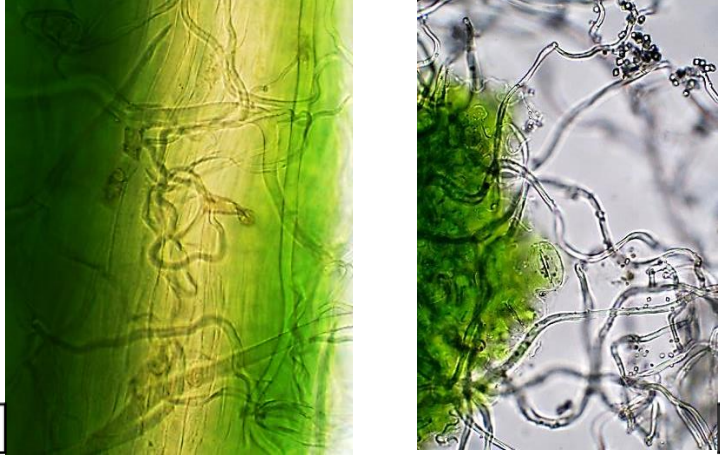
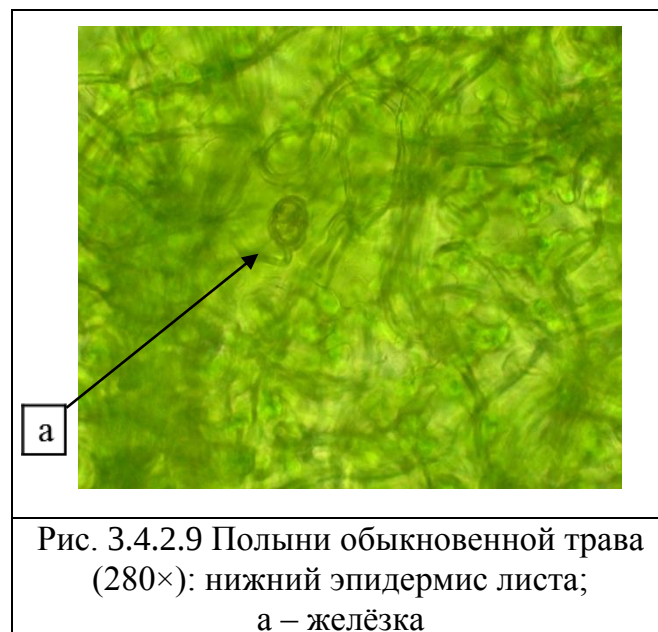


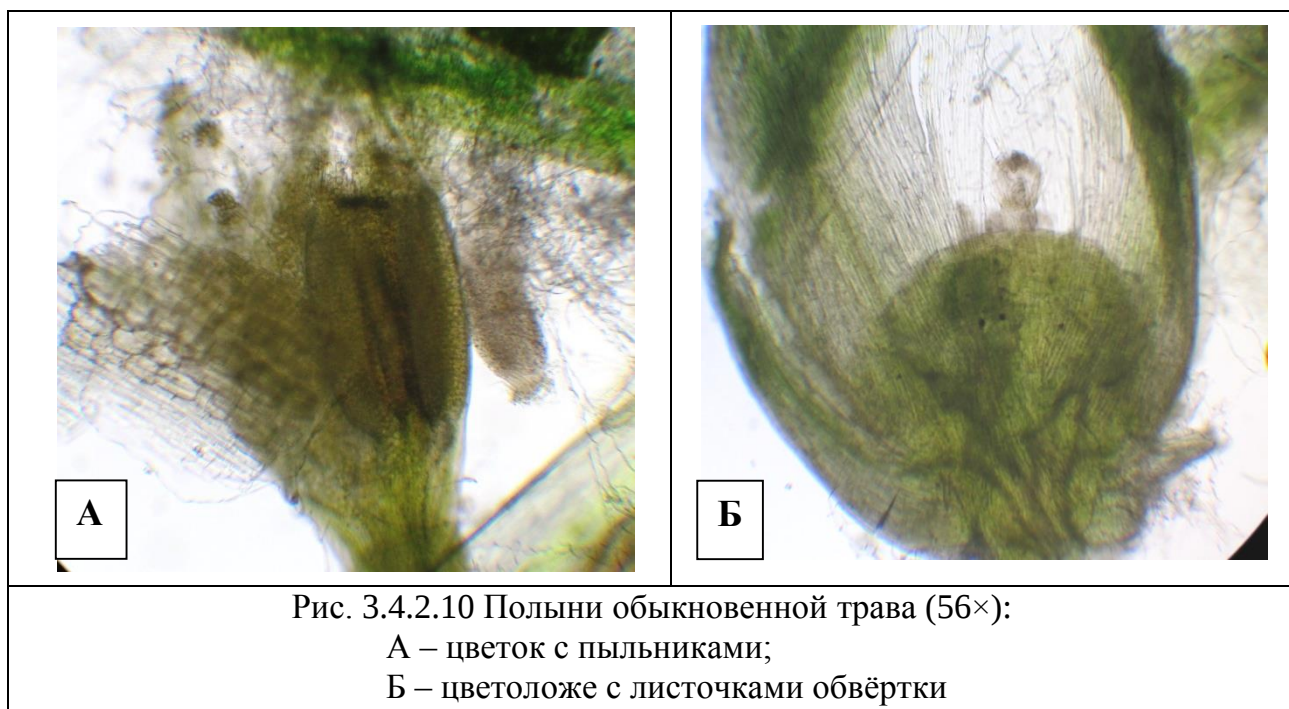
Рис. 3.4.2.5 Полыни обыкновенной трава (53×): общий вид фрагмента листовой пластинки

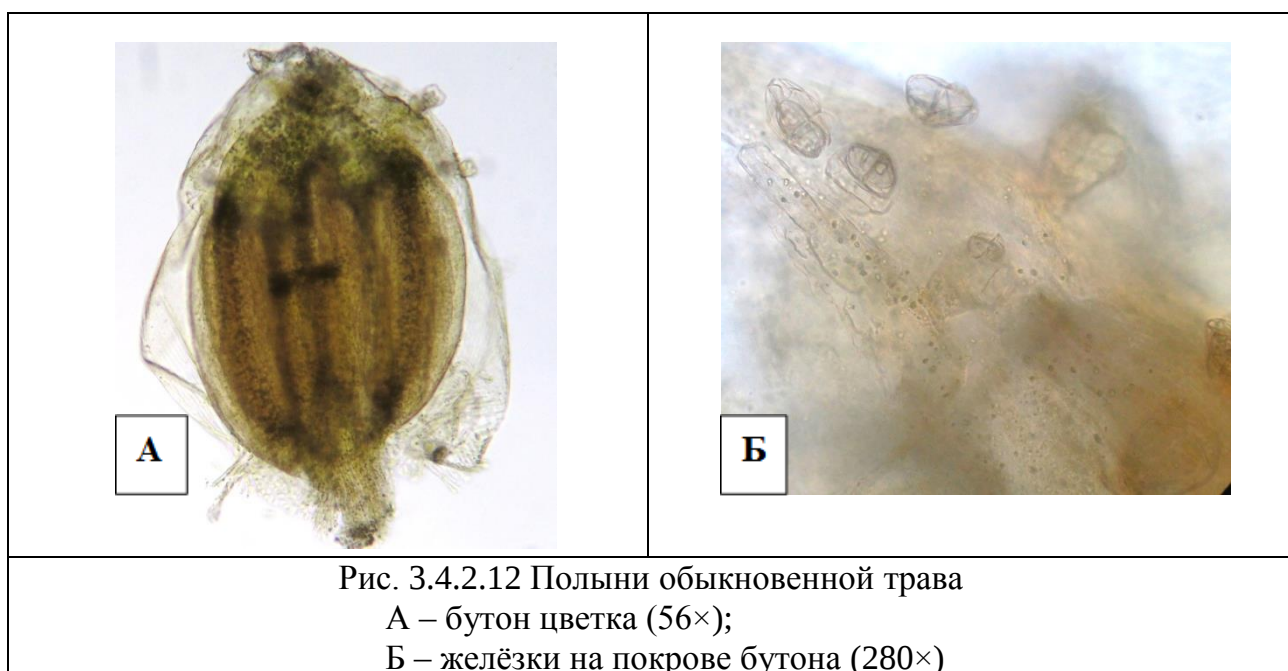


Рис. 3.4.2.6 Полыни обыкновенной трава (280×): видны отдельные, спутанные волоски

	 а б
Рис. 3.4.2.7 Полыни обыкновенной трава (280×): верхний эпидермис листа; редкие волоски по жилке	Рис. 3.4.2.8 Полыни обыкновенной трава (280×): нижний эпидермис листа; а - головчатый и Т-образные волоски по жилке листа; б - устьица в месте обрыва листовой пластинки (нижняя сторона)







Из кусочков *лопуха корней* готовили поперечные, продольные срезы и давленные препараты из прогретых и не прогретых кусочков. А также нами были собраны и зафиксированы в спирто-водо-глицериновой смеси корни лопуха свежие (не подвергавшиеся сушке и размачиванию с нагреванием).

При рассматривании **поперечных срезов** корней видна неровная линия пробки, состоящая из нескольких слоёв клеток с коричневыми стенками. Иногда в нижней части пробки видны клетки (секреторных ходов) с коричневым содержимым (рис. 3.4.2.13; 3.4.2.14).

Кора широкая. В размоченных кусочках корней видно много полостей, которых мало в корнях зафиксированных свежими.

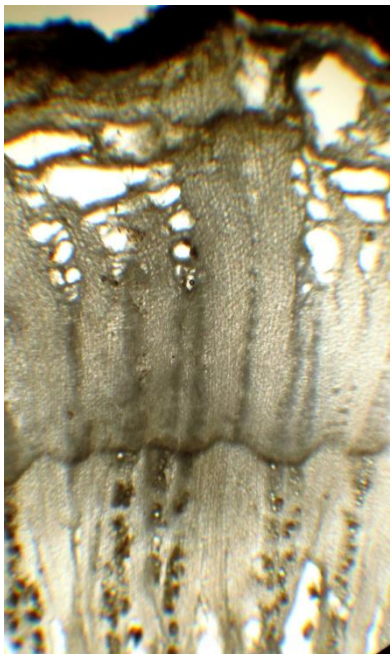
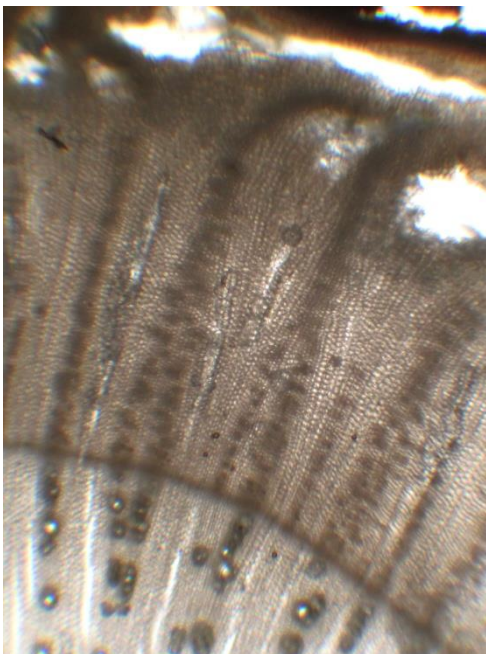
Сердцевинные лучи широкие многорядные, расширяющиеся к периферии, идут почти от пробки через кору в древесину к сердцевине корня.

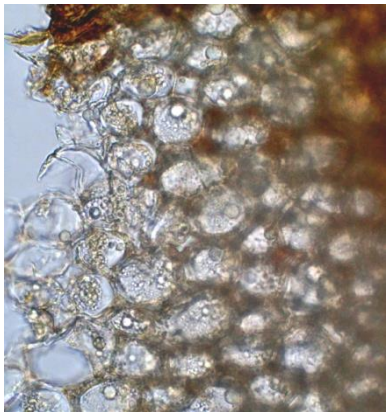
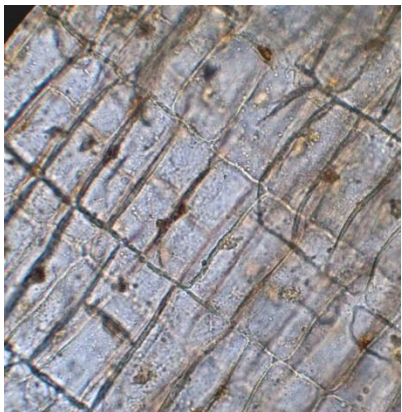
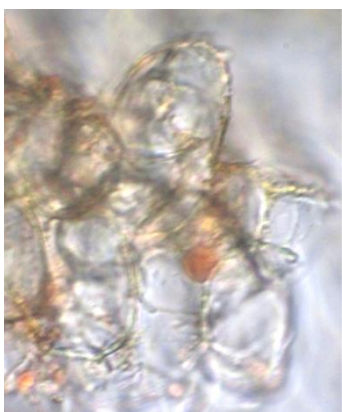
При рассматривании паренхимы коры видно, что клетки содержат капли (окрашиваемые Суданом III) и какие-то другие включения (рис. 3.4.2.15, 3.4.2.16, 3.4.2.17).

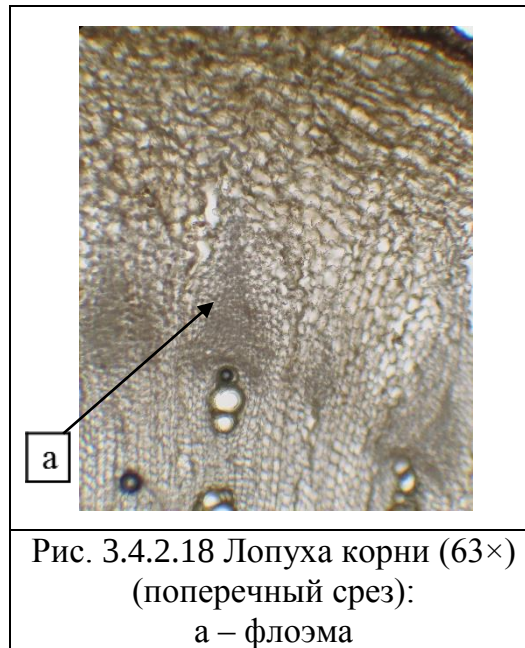
Камбий виден как извилистая узкая полоска из тонкостенных слегка коричневатых клеток, отделяющая коровую часть от древесной. К наружи от камбия видна флоэма (функционирующий луб) – клетки мелкие с сильно извилистыми стенками, а внутри корня, лучами, расположены одиночно или

небольшими группами сосуды и трахеиды ксилемы в «обкладке» из клеток древесной паренхимы со слегка утолщенными стенками (рис. 3.4.2.18).

Сердцевина рыхлая, а в старых корнях имеется полость.

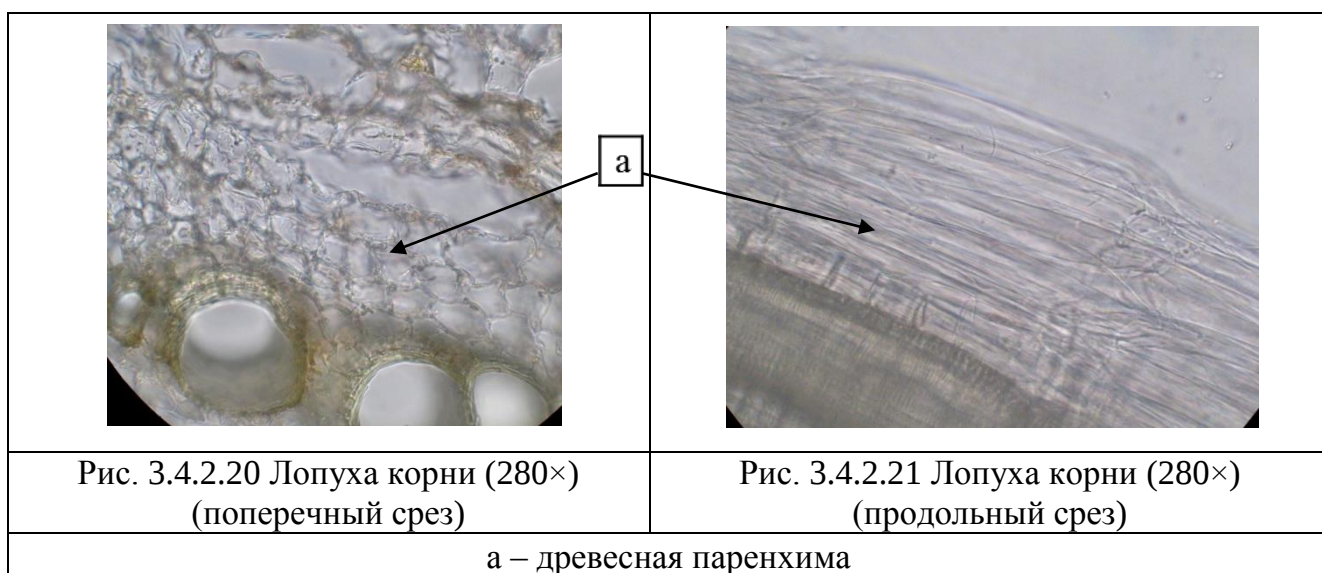
	
Рис. 3.4.2.13 Лопуха корни (40×): поперечный срез корня размоченного без нагревания	Рис. 3.4.2.14 Лопуха корни (40×): поперечный срез корня свежий корень

		
Рис. 3.4.2.15 Лопуха корни (280×): клетки паренхимы (поперечный срез)	Рис. 3.4.2.16 Лопуха корни (280×): клетки паренхимы (продольный срез)	Рис. 3.4.2.17 Лопуха корни (280×): капли жирного масла в паренхиме (Судан III) (давленный препарат)

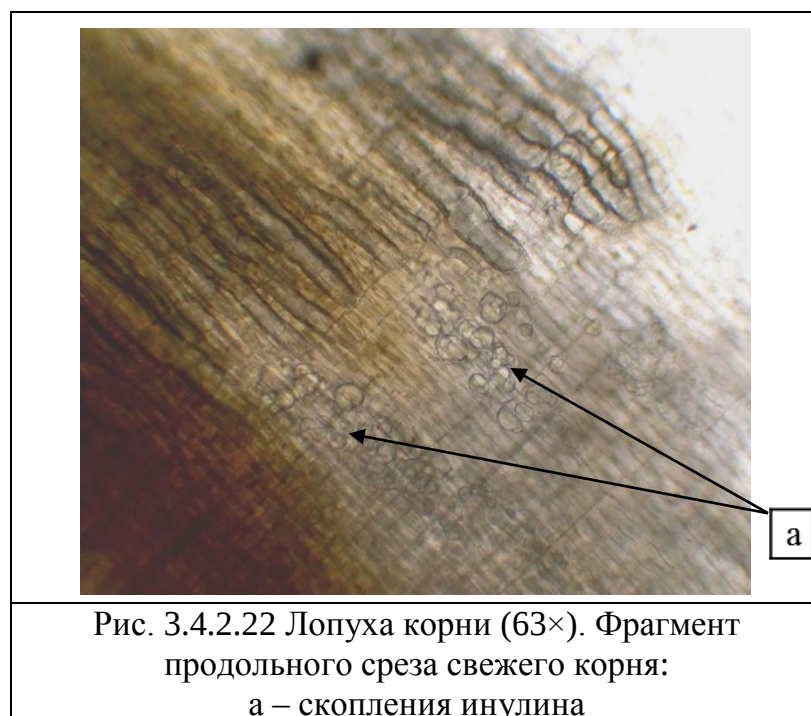


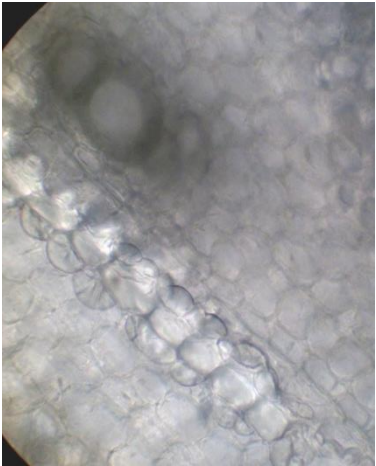
При рассматривании продольных срезов видны клетки паренхимы коры с включениями (рис. 3.4.2.16). Сосуды длинные и короткие с пористой и сетчатой стенкой и трахеиды короткие более узкие с сетчатой иногда лестничной стенкой (рис. 3.4.2.19, 3.4.2.20, 3.4.2.21).



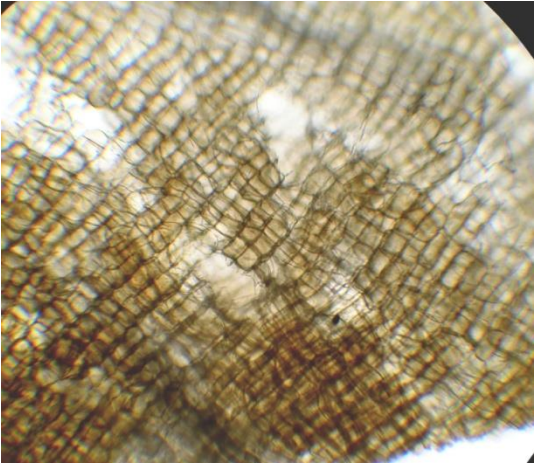
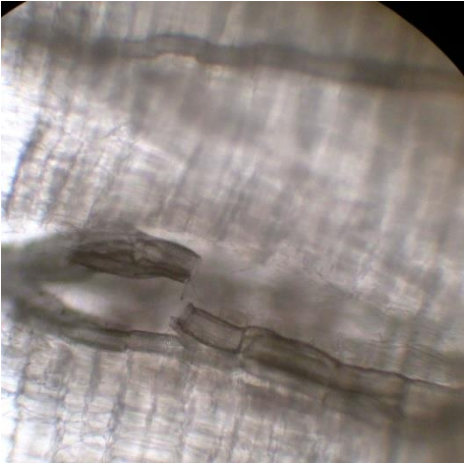


Инулин образует тяжи из групп сфер и полусфер, которые хорошо видны в свежесобранных корнях лопуха, фиксированных в спирто-водно-глицериновой смеси (рис. 3.4.2.22, 3.4.2.23). Небольшими глыбками инулин встречается в размоченных без нагревания корнях (рис. 3.4.2.24) и не виден в корнях, прогретых для давленных препаратов.



		
Рис. 3.4.2.23 Лопуха корни (280×). Поперечный и продольный срез свежего корня: скопления инулина (сферы и полусферы)		Рис. 3.4.2.24 Лопуха корни (280×). Продольный срез корня размоченного без прогрева: инулин – мелкие скопления

При рассматривании давленного препарата видна сетчатая пробка из тонкостенных клеток с коричневыми стенками (рис. 3.4.2.25). Клетки паренхимы с содержимым и без. Сосуды и трахеиды (рис. 3.4.2.26).

	
Рис. 3.4.2.25 Лопуха корни (56×): пробка (давленный препарат)	Рис. 3.4.2.26 Лопуха корни (63×): сосудистые тяжи (давленный препарат)

При рассматривании с поверхности эпидермиса кусочков стеблей, ветвей и редуцированных листьев хвоща полевого видно, что клетки, на ребрах сильно удлиненные (вытянутые по оси роста) с утолщенными прямыми или слегка извилистыми, пористыми стенками (рис. 3.4.2.27). Клетки в бороздках короче, их длинные стенки извилистые (угловато и округло зазубренные), пористые (рис.

3.4.2.28). Выросты гребней рёбер имеют форму наклонных острых перегородженных зубцов (рис. 3.4.2.29, 3.4.2.30).

Устьица расположены в основании ребер, обычно в два – три ряда (реже в четыре и один ряд) и сопровождают бороздку. Они слегка погруженные, с характерной лучистой складчатостью кутикулы (рис. 3.4.2.28).

У редуцированных листьев (зубцов влагалищ) с наружной стороны над жилкой расположен ряд парных устьиц, иногда с внутренней стороны на верхушке над жилкой имеется крупное устьице (гидатода).

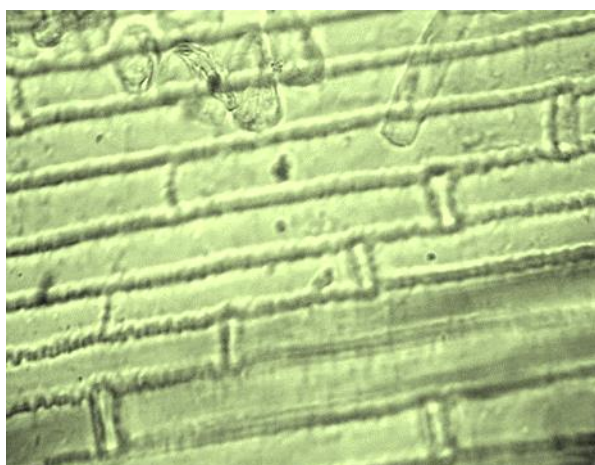


Рис. 3.4.2.27 Хвоща полевого трава (280×): эпидермис ребер стеблей и ветвей

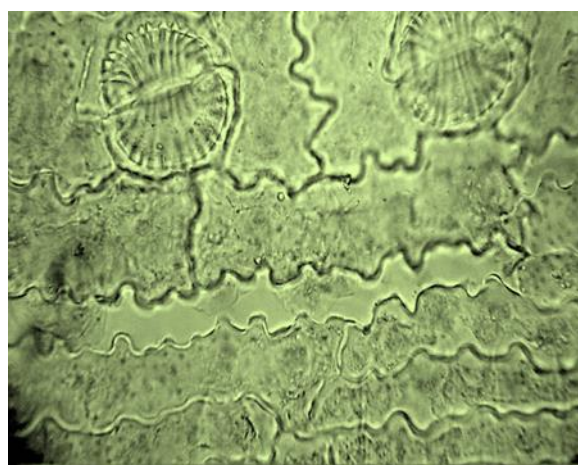


Рис. 3.4.2.28 Хвоща полевого трава (280×): эпидермис бороздок стеблей и ветвей; устьица

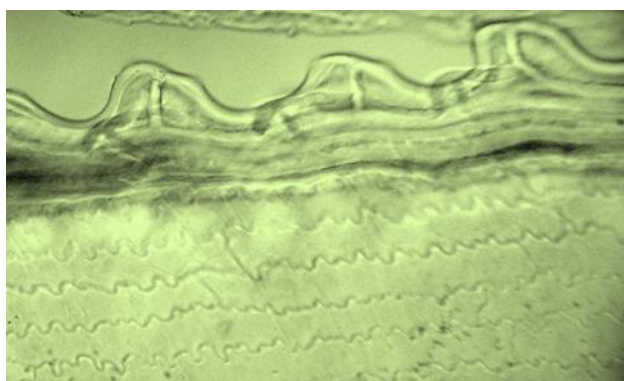


Рис. 3.4.2.29 Хвоща полевого трава (100×): выросты гребней ребер стеблей

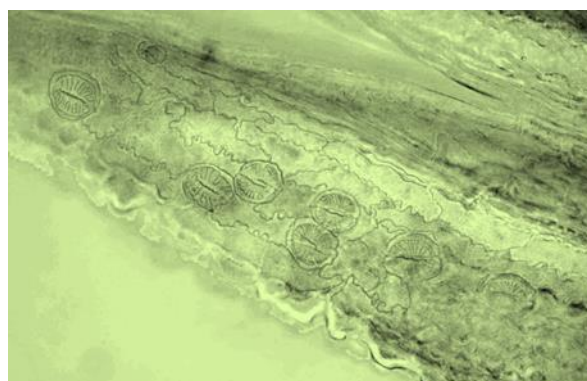


Рис. 3.4.2.30 Хвоща полевого трава (100×): фрагмент зубчика (редуцированный лист)

Таким образом видно, что полученные нами результаты морфолого-анатомического исследования компонентов изучаемого сбора хорошо согласуются с сведениями, опубликованными ранее, в информационных источниках [27, 28, 69, 104].

Поэтому, для раздела «Внешние признаки» проекта НД предлагаем следующее описание изучаемого сбора.

Смесь неоднородных кусочков растительного сырья: измельчённых листьев, стеблей, соцветий, корней и цельных плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет желтовато-коричневато-зелёный со светло-зелёными и тёмно-коричневыми вкраплениями.

При просмотре сбора под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны:

- кусочки листьев различной формы кожистых, голых, с одной стороны зеленых, а с другой стороны светло-зеленых с тёмно-коричневыми точками (желёзки) (*брусники листья*);

- кусочки стеблей и ветвей ребристых, продолговатых жестких, членистых, частично с узлами и влагалищами серовато – зеленого цвета, иногда расщеплёнными со светлой желтоватой сердцевинкой (*хвоща полевого трава*);

- кусочки корней в поперечном и продольном сечении с остатками коричневой и серовато-коричневой пробки, серовато – белого, иногда желтоватого цвета на изломе (*лопуха корни*);

- кусочки листьев различной формы: тонких, с одной стороны голых и зелёных, а с другой стороны сильно опушённых тонкими белыми волосками (серебристых); кусочки зелёных стеблей в поперечном и продольном сечении с белой губчатой сердцевинкой; а также целые и частично измельчённые корзинки светло-зелёные с опушёнными листочками обвёртки (*полыни обыкновенной трава*);

- цельные и частично измельчённые полуплодики длиной до 5 мм, шириной до 3 мм, широкоэллиптические, с одной стороны (спинка) - слабовыпуклые с тремя нитевидными и с двумя боковыми плоскими крыловидными рёбрами, а с другой

стороны плоские; зеленовато-коричневые с желтоватыми рёбрами. Реже встречаются не распавшиеся вислоплодники (*укропа огородного плоды*).

Запах слабый своеобразный. Вкус горьковатый слегка пряный.

Для раздела «Микроскопия» нормативного документа предлагаем следующее описание с иллюстрациями изучаемого сбора (рис. 3.4.2.31):

При рассмотрении микропрепаратов под микроскопом видны:

- фрагменты кусочков листа с поверхности с клетками эпидермиса с более или менее извилистыми стенками, что соответствует нижнему и верхнему эпидермису листа брусники. Устьица парацидного типа, мелкие, с двумя околоустьичными клетками, расположенными параллельно устьичной щели. На эпидермисе встречаются желёзки с коричневым содержимым, состоящие из многоклеточной ножки, постепенно переходящей в овальную многоклеточную головку. В мезофилле встречаются редкие одиночные призматические кристаллы оксалата кальция (*брусники листья*);

- фрагменты кусочков листа с поверхности, с одной стороны они сильно опушённые (нижняя сторона), с другой почти голые (верхняя сторона). Клетки эпидермиса с тонкими извилистыми стенками – плохо различимы. Устьица, аномоцитного типа, видны на нижней стороне – они овальные с хорошо заметной устьичной щелью.

Волоски трёх типов: Т-образные - на 2-3-х клеточной ножке и с 2-х конечной длинной тонкой клеткой, прикреплённой к ножке в средней части и часто перекрученной с другими, волосками; волоски многоклеточные (бичевидные) – на короткой 2-4-х клеточной ножке с длинной тонкой клеткой и волоски короткие из 2-3х коротких клеток с небольшой головкой. На нижней стороне волосков много, на верхней редко встречаются Т-образные и короткие волоски.

Встречаются редкие желёзки - овальные, разделённые перегородкой на две части.

Цветки пятизубчатые, содержат пять продолговатых пыльников, сидят на цветоножке, окружённым листочками обвёртки; листочки обвёртки продолговатые с плёчатой прозрачной частью и центральной частью зелёного цвета; опушены

снаружи волосками такими же, как и листья; желёзок много (*полыни обыкновенной трава*);

- фрагменты кусочков стеблей, ветвей и редуцированных листьев с клетками эпидермиса на ребрах сильно удлинённые (вытянутые по оси роста) с утолщёнными прямыми или слегка извилистыми, пористыми стенками. Клетки в бороздках короче, их длинные стенки извилистые (угловато и округло зубчатые), пористые. Выросты гребней рёбер имеют форму наклонных острых перегородочных зубцов.

Устьица расположены в основании ребер, обычно в два – три ряда (реже в четыре и один ряд) и сопровождают бороздку. Они слегка погруженные, с характерной лучистой складчатостью кутикулы.

У редуцированных листьев (зубцов влагалищ) с наружной стороны над жилкой расположен ряд парных устьиц, иногда с внутренней стороны на верхушке над жилкой имеется крупное устьице (гидатода) (*хвоща полевого трава*);

- фрагменты сетчатой пробки, состоящей из тонкостенных клеток с коричневыми стенками. Клетки паренхимы с содержимым и без. Сосуды и трахеиды (*лопуха корни*).

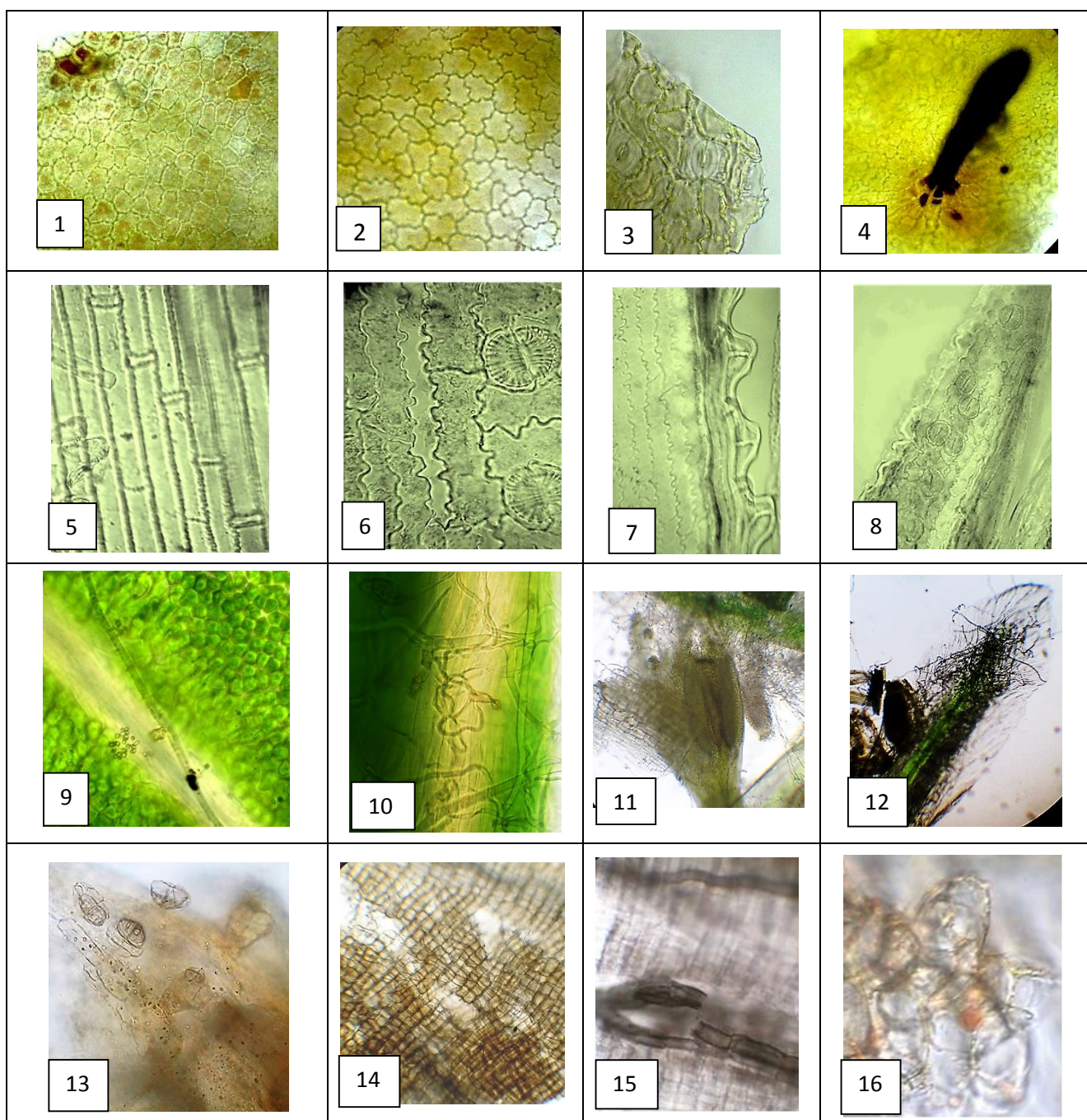


Рис. 1

Брусники листья: 1 – верхний эпидермис (280×); 2 – нижний эпидермис (280×); 3 – нижний эпидермис с устьицами паразитного типа (400×); 4 – нижний эпидермис с желёзкой (63×).

Хвоща полевого трава: 5 – эпидермис ребер стеблей и ветвей (280×); 6 – эпидермис бороздок стеблей и ветвей, устьица (280×); 7 – выросты гребней ребер стеблей (100×); 8 – фрагмент зубчика (редуцированный лист) (100×).

Полыни обыкновенной трава: 9 – верхний эпидермис (280×), Т-образный волосок на жилке; 10 – нижний эпидермис (280×), Т-образный волосок; 11 – цветок с пыльниками (56×); 12 – листочек обвёртки (56×); 13 – желёзки на покрове бутона (280×).

Лопуха корни (давленный препарат): 14 – пробка (56×); 15 – сосудистые тяжи (63×); 16 – капли жирного масла в паренхиме (Судан III) (280×).

3.5 Изучение состава БАВ сбора

Согласно литературным данным, в предлагаемом растительном сборе биологически активными соединениями, ответственными за фармакотерапевтический эффект, являются: флавоноиды, арбутин, полисахариды (инулин), дубильные вещества и эфирные масла, поэтому нами были подобраны химические и физико-химические методы анализа, позволяющие провести фитохимическое изучение сбора.

3.5.1 Определение основных БАВ качественными реакциями в сборе

Для идентификации основных групп БАВ был проведен анализ извлечений изучаемого сбора с использованием общепринятых качественных реакций. На основании результатов реакций, проведенных по выше указанным методикам (глава 2, п. 2.3), предварительно заключили о наличии в сборе основных групп БАВ: флавоноидов, полисахаридов, дубильных веществ, свободных сахаров, арбутина и инулина.

Идентификацию основных групп БАВ в извлечениях из сбора проводили с использованием общепринятых качественных реакций (глава 2, п. 2.3).

Было подтверждено наличие в сборе основных групп биологически активных веществ:

- ✓ флавоноидов – цианидиновая реакция (появление красного окрашивания) (глава 2, п. 2.3);
- ✓ полисахаридов – осаждение спиртом из водного извлечения (появление белых хлопьевидных сгустков) (глава 2, п. 2.3);
- ✓ дубильных веществ – появление черно-синего окрашивания с железоаммониевыми квасцами (глава 2, п. 2.3);
- ✓ свободных сахаров – выпадение кирпично-красного осадка с реактивом Феллинга (глава 2, п. 2.3);

- ✓ арбутина – появление синего окрашивания со спиртовым раствором дихлорхинонахлоримида (глава 2, п. 2.3);
- ✓ инулина – появление оранжево-красного окрашивания с раствором тимола в кислой среде после отрицательной реакции на крахмал с раствором йода (глава 2, п. 2.3).

3.5.2 Идентификация БАВ методом УФ-спектрофотометрии

Для обнаружения фенольных соединений готовили водно-спиртовые извлечения (этанол 70%) из изучаемого сбора растительного и сравнивали их с водно-спиртовыми извлечениями компонентов сбора с использованием спектрофотометра (глава 2, п. 2.3.4).

Нами были получены спектры с характерными максимумами поглощения (рис. 3.5.2.1.1 – 3.5.2.1.6):

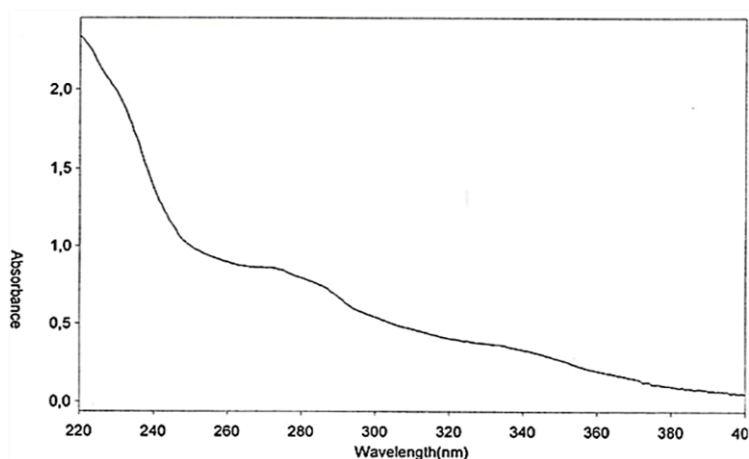


Рис. 3.5.2.1.1 УФ-спектр поглощения водно-спиртового извлечения из сбора

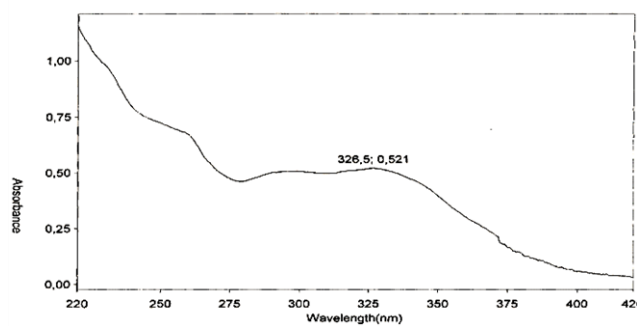


Рис. 3.5.2.1.2 УФ-спектр поглощения водно-спиртового извлечения из травы хвоща

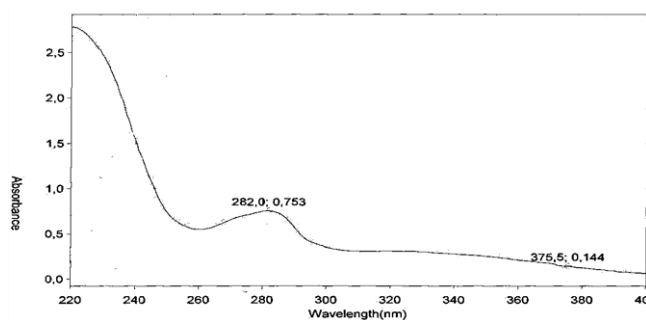


Рис. 3.5.2.1.3 УФ-спектр поглощения водно-спиртового извлечения из листьев брусники

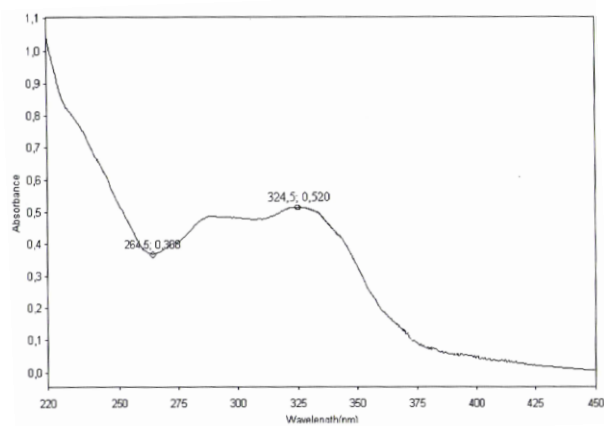


Рис. 3.5.2.1.4 УФ-спектр поглощения водно-спиртового извлечения из травы полыни обыкновенной

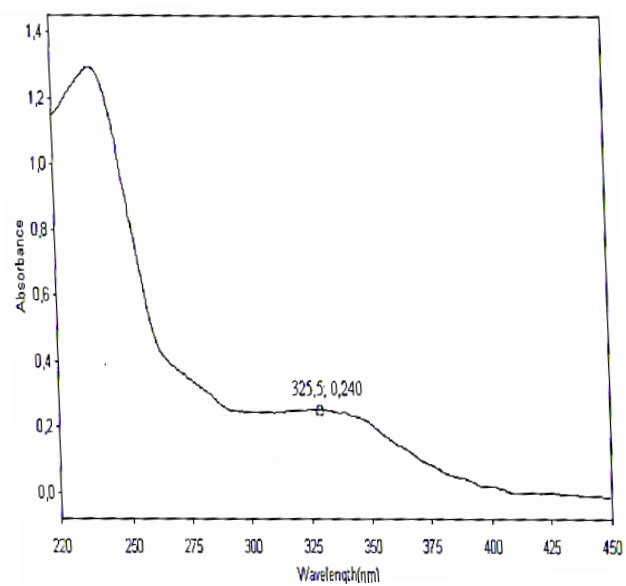


Рис. 3.5.2.1.5 УФ-спектр поглощения водно-спиртового извлечения из плодов укропа огородного

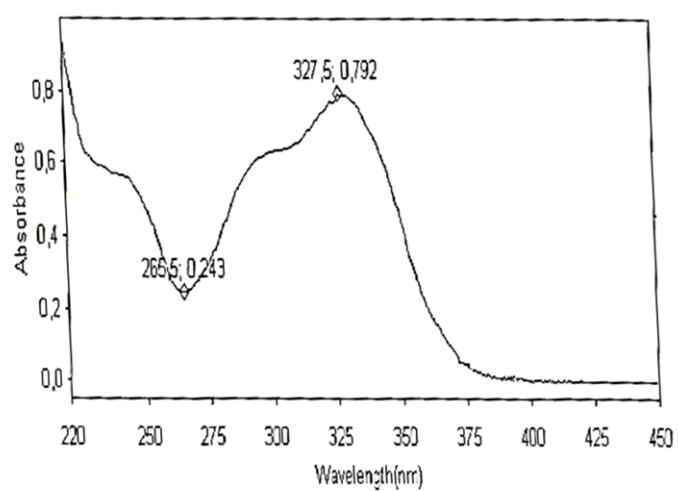


Рис. 3.5.2.1.6 УФ-спектр поглощения водно-спиртового извлечения из корней лопуха

Результаты проведенных исследований приведены в табл. 3.5.2.1.7 и 3.5.2.1.8.

Таблица 3.5.2.1.7

Результаты спектрофотометрического исследования водно-спиртовых извлечений изучаемого сбора, компонентов сбора

Водно-спиртовые извлечения	Максимумы, нм
Водно-спиртовое извлечение из сбора	Плечо 260-280
Водно-спиртовое извлечение из травы хвоща полевого	326,5
Водно-спиртовое извлечение из травы полыни обыкновенной	324,5
Водно-спиртовое извлечение из листьев брусники	282,0; 375,5
Водно-спиртовое извлечение из плодов укропа огородного	325,5
Водно-спиртовое извлечение из корней лопуха	327,5

Таблица 3.5.2.1.8

Спектральные характеристики стандартных образцов

Стандартные образцы	Спектральные характеристики
Лютеолина	255,51; 291,51; 349,51
Рутина	258; 290; 358
Кверцетина	256; 291; 371
Кофейной кислоты	290; 309
Хлорогеновой кислоты	235; 244; 324
Лютеолин-7-гликозида	221; 254; 267; 291,51; 349
Галловой кислоты	267
Кемпферола	222; 265; 323; 366,51
Апигенина	267,51; 324,51
Гиперозида	257; 357,51
Арбутина	221; 285,5

Из полученных данных видно, что некоторые максимумы спектров поглощения стандартных образцов индивидуальных флавоноидов и фенолокислот, а также спектров поглощения извлечений компонентов сбора совпадают с плечом максимума поглощения сбора.

Таким образом, можно предположить о присутствии в изучаемом сборе группы фенольных соединений. Также, полученные сведения могут служить дополнительным источником информации при определении подлинности сбора.

3.5.3 Хроматографический анализ изучаемого сбора

Для детального анализа и подтверждения подлинности БАВ изучаемого сбора нами также было проведено хроматографическое исследование.

3.5.3.1 Идентификация веществ методом тонкослойной хроматографии

Фенольные соединения

Для хроматографического определения фенольных соединений использовали 70% спиртовое извлечение из сбора. Получение водно-спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

Результаты приведены на рис. 3.5.3.1.1.

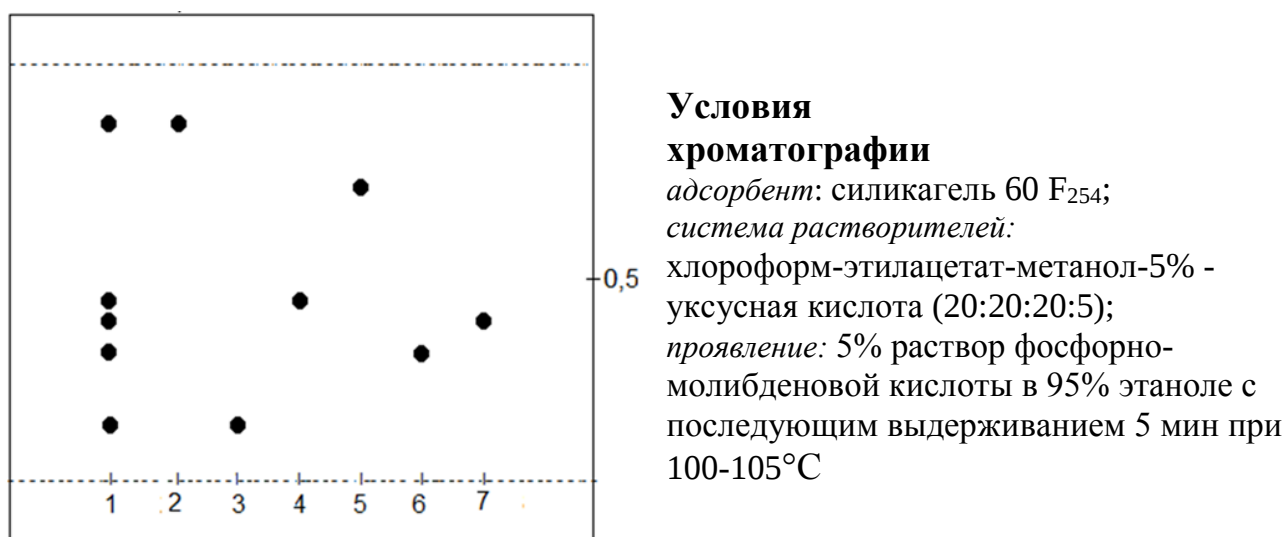


Рис. 3.5.3.1.1 Схема хроматограммы фенольных соединений:

1 – спиртовое извлечение из изучаемого сбора;

Растворы стандартных образцов:

2 – феруловой кислоты; 3 – хлорогеновой кислоты; 4– рутина; 5 – лютеолина; 6– галловой кислоты; 7 – гиперозида

При просматривании хроматограмм извлечения из сбора наблюдали 5 зон, окрашенных в сине-фиолетовые цвета с $R_f \sim 0,12$ (хлорогеновая кислота); $R_f \sim 0,38$ (галловая кислота); $R_f \sim 0,44$ (гиперозид); $R_f \sim 0,47$ (рутин); $R_f \sim 0,85$ (феруловая кислота), соответствующие хроматограммам стандартных образцов (флавоноидов – рутин, гиперозид и производным фенолкарбоновых кислот – хлорогеновая, галловая, феруловая).

Свободные сахара

Для хроматографического обнаружения свободных сахаров в качестве исследуемого раствора использовали 50% спиртовое извлечение из сбора. Получение водно-спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

Результаты приведены на рис. 3.5.3.1.2.

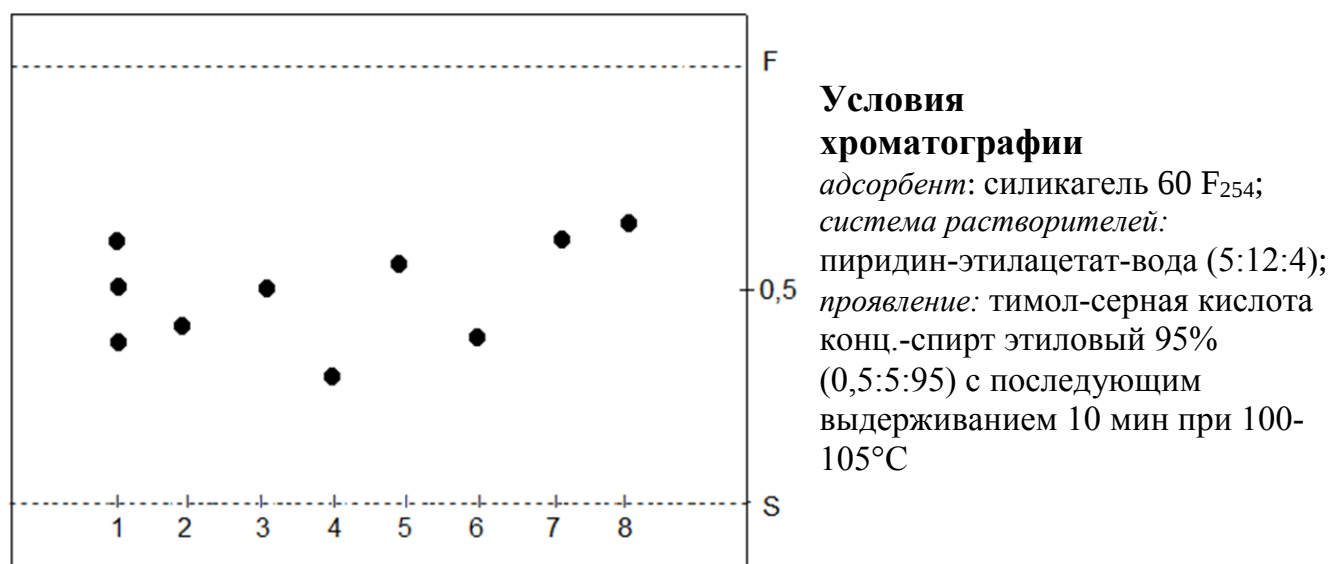


Рис. 3.5.3.1.2 Схема хроматограммы сахаров:

1 – спиртовое извлечение из изучаемого сбора;

Растворы стандартных образцов:

2 – рамнозы; 3 – глюкозы; 4 – галактозы; 5 – сахарозы; 6 – арабинозы; 7 – фруктозы; 8 – маннозы

На хроматограмме исследуемого образца сбора обнаружено 3 красно-фиолетовые зоны с $R_f \sim 0,39$ (сахароза); $R_f \sim 0,50$ (глюкоза); $R_f \sim 0,55$ (фруктоза).

Флавоноиды

Для хроматографического разделения флавоноидов в качестве исследуемого раствора использовали 70% спиртовое извлечение из сбора. Получение водно-

спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

Результаты приведены на рис. 3.5.3.1.4.

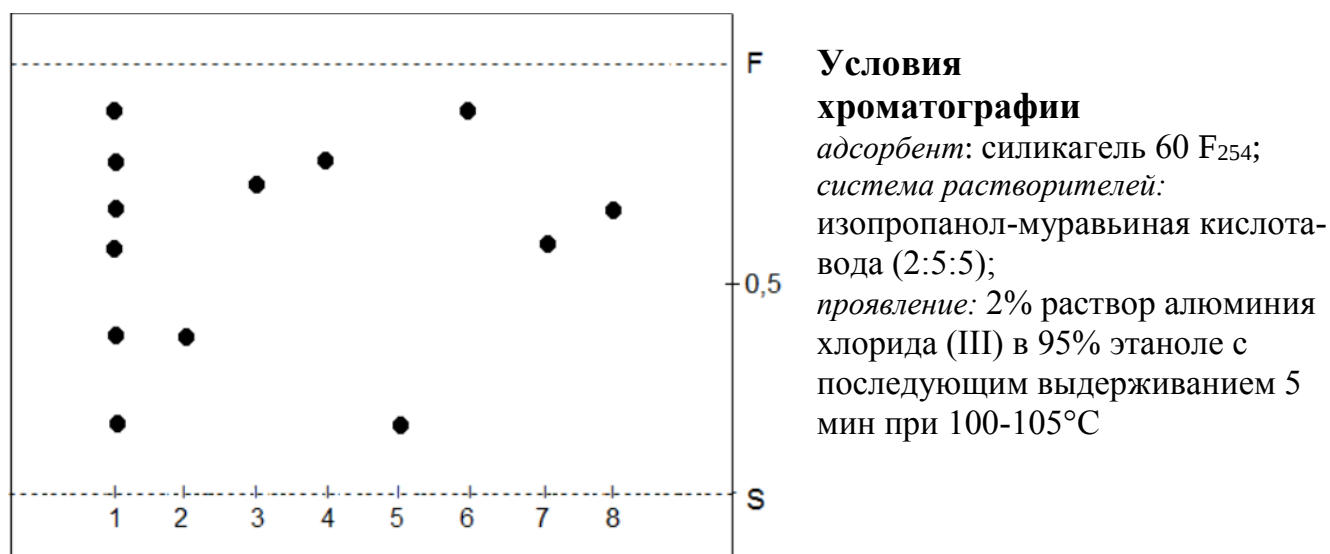


Рис. 3.5.3.1.4 Схема хроматограммы флавоноидов:

1 – спиртовое извлечение из изучаемого сбора;

Растворы стандартных образцов:

2 – лютеолина; 3 – апигенина; 4 – рутина; 5 – кверцетина; 6 – нарингенина; 7 – лютеолин-7-гликозида; 8 – гиперозида

После проявления хроматограммы и просматривании в УФ-свете, наблюдали 5 зон адсорбции, окрашенных в желтый цвет с $R_f \sim 0,14$ (кверцетин); $R_f \sim 0,42$ (лютеолин); $R_f \sim 0,62$ (лютеолин-7-гликозид); $R_f \sim 0,70$ (гиперозид); $R_f \sim 0,78$ (рутин); $R_f \sim 0,88$ (нарингенин).

Арбутин

Для хроматографического анализа арбутина в качестве исследуемого раствора использовали извлечения из сбора метиловым спиртом.

Получение спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

Результаты приведены на рис. 3.5.3.1.5.

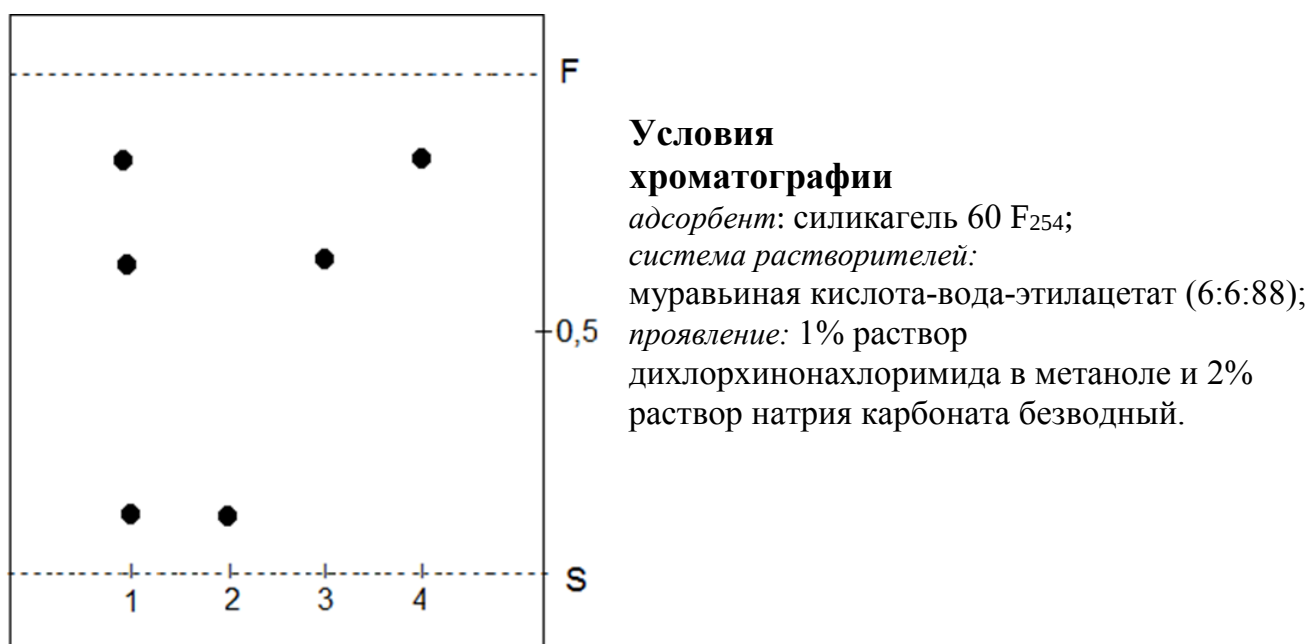


Рис. 3.5.3.1.5 Схема хроматограммы арбутина:

1 – спиртовое извлечение из изучаемого сбора;

Растворы стандартных образцов:

2 – арбутина; 3 – галловой кислоты; 4 – гидрохинона

После детектирования хроматограммы наблюдали появление 2-х зон голубого цвета с $R_f \sim 0,2$ (арбутин), $R_f \sim 0,85$ (гидрохинон) и зоны коричневого цвета с $R_f \sim 0,67$ (галловая кислота).

Из полученных результатов видно, что в водно-спиртовых и водных извлечениях сбора идентифицированы флавоноиды (рутин, гиперозид, лютеолин, лютеолин-7-гликозид, кверцетин, нарингенин), фенолкарбоновые кислоты (галловая), гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая, феруловая), свободные сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза), фенологликозид (арбутин).

3.5.3.2 Идентификация веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Фенольные соединения

Результаты исследования качественного состава флавоноидов, фенологликозидов, фенолкарбоновых кислот в изучаемом сборе были подтверждены и дополнены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для исследования использовали водно-спиртовое извлечение из сбора, полученное экстракцией 70% этанолом. Получение водно-спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.3).

Результаты проведенного ВЭЖХ анализа исследуемого водно-спиртового извлечения сбора представлены на рис. 3.5.3.2.1 – 3.5.3.2.2 и в табл. 3.5.3.2.3.

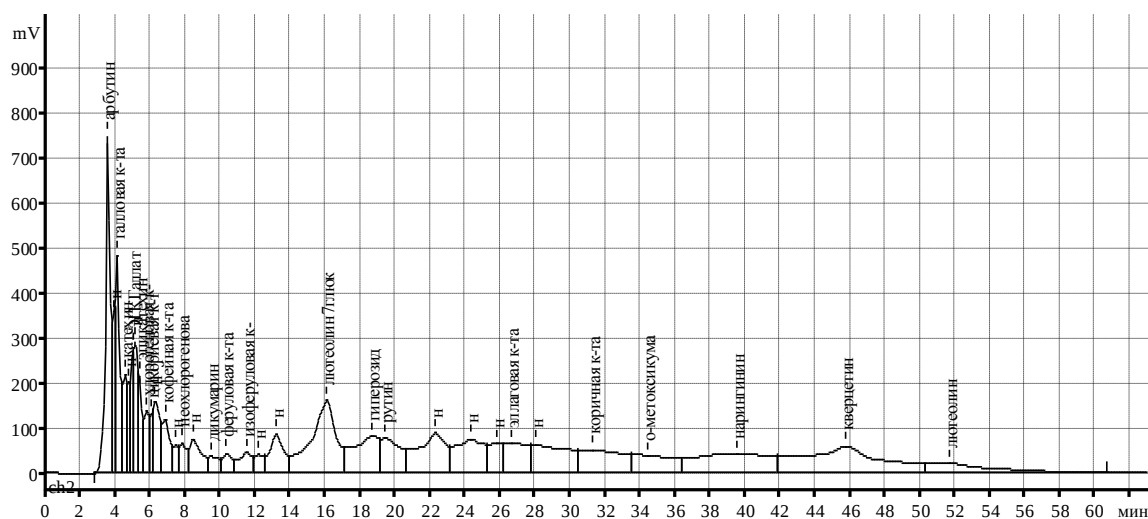


Рис. 3.5.3.2.1 ВЭЖХ-хроматограмма фенольных соединений водно-спиртового извлечения изучаемого сбора

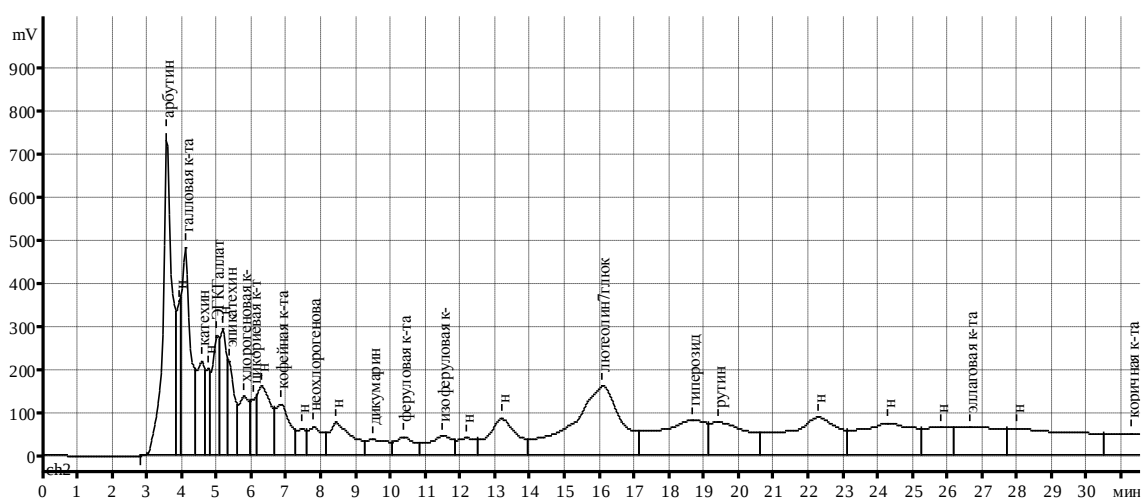


Рис. 3.5.3.2.2 ВЭЖХ-хроматограмма фенольных соединений водно-спиртового извлечения изучаемого сбора

Таблица 3.5.3.2.3

Компонентный состав фенольных соединений изучаемого сбора методом ВЭЖХ

№	Время, мин	Высота, mV	Площадь, mV*сек	Название
1	2	3	4	5
1.	3,543	750,23	13571,88	Арбутин
2.	3,878	353,71	3021,63	Неидентифиц.
3.	4,072	485,42	8342,63	Галловая к-та
4.	4,541	219,65	3576,67	Катехин
5.	4,718	200,92	1642,30	Неидентифиц.
6.	4,986	278,92	3753,88	ЭКГГаллат
7.	5,146	293,81	3772,91	Неидентифиц.
8.	5,337	216,18	2920,52	Эпикатехин
9.	5,759	136,84	2667,54	Хлорогеновая к-та
10.	6,021	131,34	1595,12	Цикориевая к-та
11.	6,248	161,40	4090,54	Неидентифиц.
12.	6,829	120,17	3652,42	Кофейная к-та
13.	7,414	61,75	1132,44	Неидентифиц.
14.	7,75	65,08	1941,11	Неохлорогеновая к-та
15.	8,405	76,25	3578,12	Неидентифиц.
16.	9,432	37,33	1569,26	Дикумарин
17.	10,33	43,19	1706,49	Феруловая к-та
18.	11,47	44,86	2302,84	Изоферуловая к-та
19.	12,14	40,47	1452,85	Неидентифиц.

Продолжение таблицы 3.5.3.2.3

1	2	3	4	5
20.	13,16	84,92	4860,71	Неидентифиц.
21.	16,06	160,85	16032,53	Лютеолин-7-гликозид
22.	18,66	83,55	8130,76	Гиперозид
23.	19,39	76,66	5996,24	Рутин
24.	22,25	88,47	9720,98	Неидентифиц.
25.	24,28	75,52	8531,89	Неидентифиц.
26.	25,81	64,77	3518,88	Неидентифиц.
27.	26,62	64,91	5893,48	Эллаговая к-та
28.	27,98	61,67	9245,05	Неидентифиц.
29.	31,29	50,78	8452,20	Коричная к-та
30.	34,44	38,71	6261,28	о-метоксикумарин
31.	39,51	41,81	12778,97	Нарингенин
32.	45,69	58,69	18180,92	Кверцетин
33.	51,61	21,70	5202,74	Лютеолин

В изучаемом сборе методом ВЭЖХ идентифицировано наличие 21 соединения фенольной природы, которые представлены фенологликозидом (арбутин); флавоноидами (рутин, гиперозид, лютеолин, кверцетин, нарингенин, лютеолин-7-гликозид); фенолкарбоновыми кислотами (галловая, эллаговая); гидроксикоричными кислотами (хлорогеновая, феруловая, неохлорогеновая, изоферуловая, кофейная, цикориевая, коричная кислоты); производными дубильных веществ (эпикатехин, катехин, эпигаллокатехингаллат); кумаринами (дикумарин, метоксикумарин).

Таким образом, нами был подтвержден и дополнен качественный состав флавоноидов, фенологликозидов, фенолкарбоновых кислот в изучаемом сборе.

Свободные сахара и органические кислоты

Для идентификации свободных сахаров и органических кислот методом ВЭЖХ в качестве исследуемого раствора использовали водное извлечение из сбора. Получение водного извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.3).

Результаты хроматографического анализа исследуемого водного извлечения сбора представлены на рис. 3.5.3.2.4 и в табл. 3.5.3.2.5.

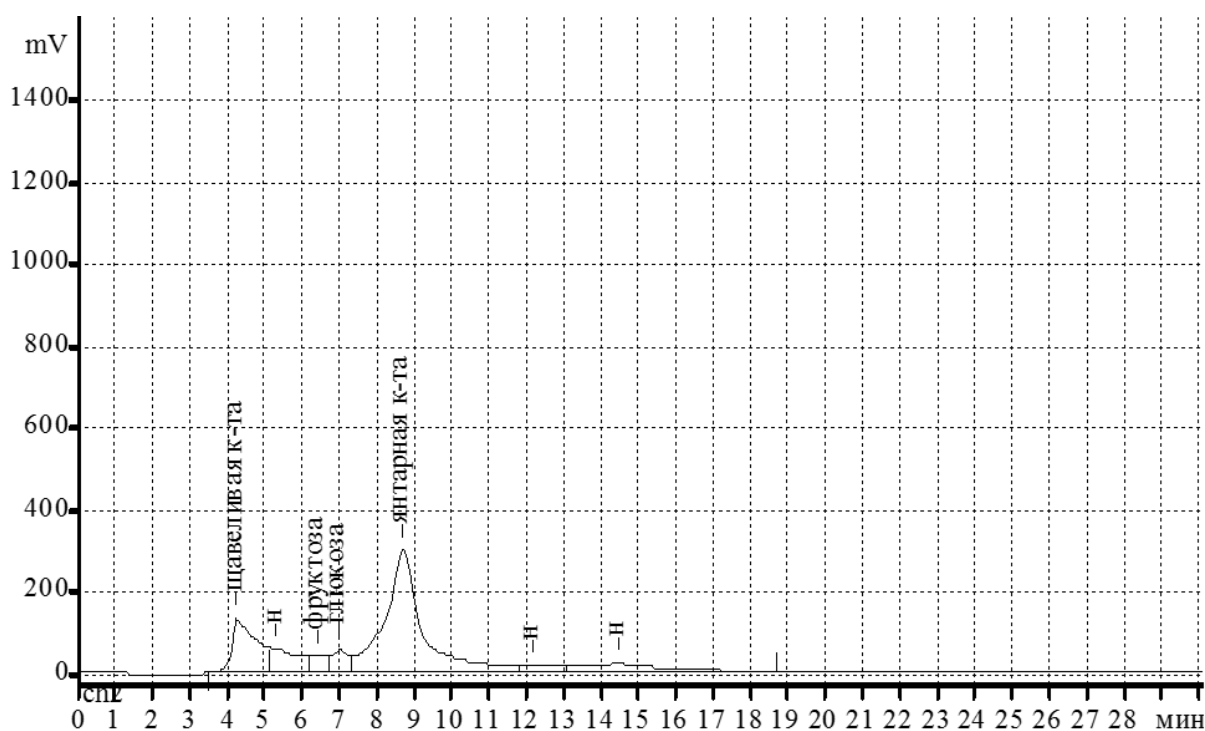


Рис. 3.5.3.2.4 ВЭЖХ-хроматограмма свободных сахаров и органических кислот водного извлечения изучаемого сбора

Таблица 3.5.3.2.5

Компонентный состав свободных сахаров и органических кислот изучаемого сбора методом ВЭЖХ

№	Время, мин	Высота, mV	Площадь, mV*сек	Название
1.	4,221	132,64	6138,85	Щавелевая к-та
2.	5,294	58,97	2992,95	Неидентифиц.
3.	6,412	43,76	1294,90	Фруктоза
4.	6,987	54,40	1759,09	Глюкоза
5.	8,684	300,03	21298,00	Янтарная к-та
6.	12,15	13,68	950,58	Неидентифиц.
7.	14,44	19,76	2857,88	Неидентифиц.

Таким образом, проведенный анализ показал, что в водном извлечении изучаемого сбора идентифицированы органические кислоты (янтарная – 57,11%, щавелевая – 16,46%) и свободные сахара (фруктоза – 3,47%, глюкоза – 4,72%), что подтверждает и дополняет полученные результаты метода тонкослойной хроматографии.

3.5.3.3 Идентификация компонентов эфирного масла методом газожидкостной хроматографии

С целью изучения качественного состава эфирного масла изучаемого сбора методом ГЖХ было получено эфирное масло методом перегонки с водяным паром (глава 2, п. 2.3.2). Более подробно условия анализа представлены в работе [119].

Спиртовой раствор эфирного масла сбора и растворы стандартных образцов компонентов эфирного масла хроматографировали по выше приведенной методике (глава 2, п. 2.3.2).

Результаты проведенного исследования представлены на рис. 3.5.3.3.1 и в табл. 3.5.3.3.2.

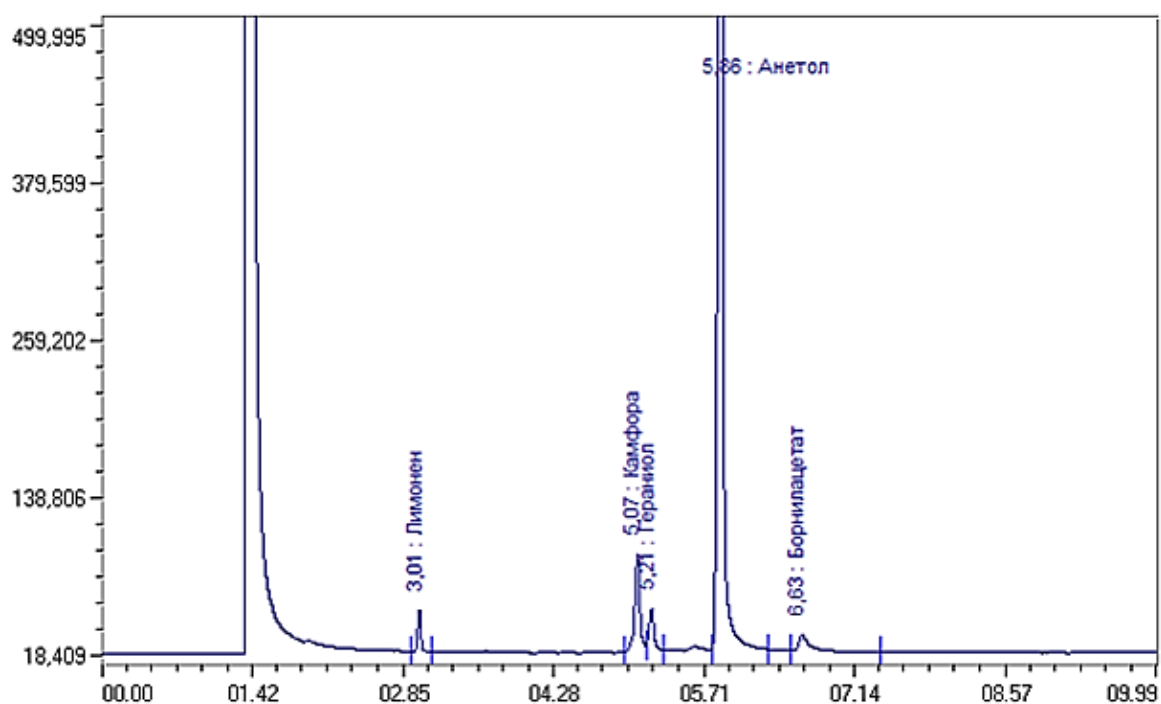


Рис. 3.5.3.3.1 ГЖХ-хроматограмма спиртового раствора эфирного масла изучаемого сбора

Таблица 3.5.3.3.2

Компонентный состав эфирного масла изучаемого сбора методом ГЖХ

№	Наименование	Время, мин	Содержание, %
1.	Лимонен	3,01	1,74
2.	Камфора	5,07	6,88
3.	Гераниол	5,21	2,47
4.	Анетол	5,86	86,13
5.	Борнилацетат	6,63	2,79

Таким образом, нами в результате проведенного исследования были идентифицированы компоненты эфирного масла, полученного из сбора: монотерпеноиды (лимонен – 1,74%, камфора – 6,88%, гераниол – 2,47%); фенилпропаноид (анетол – 86,13%); сложный эфир (борнилацетат – 2,79%) [119].

3.6 Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в изучаемом сборе

Для определения флавоноидов широко используемым является метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования с алюминием хлоридом (III), в результате которой происходит bathochromный сдвиг полос поглощения флавоноидов. Также, этот метод является пригодным для анализа и стандартизации сборов [99]. Более подробно условия анализа представлены в работе [115].

В качестве СО был выбран лютеолин-7-гликозид, который с алюминием хлоридом (III) имеет аналогичную кривую и близкий максимум поглощения в одной области 402 ± 5 нм с максимумом поглощения флавоноидов сбора с тем же комплексообразователем (рис. 3.6.1.1).

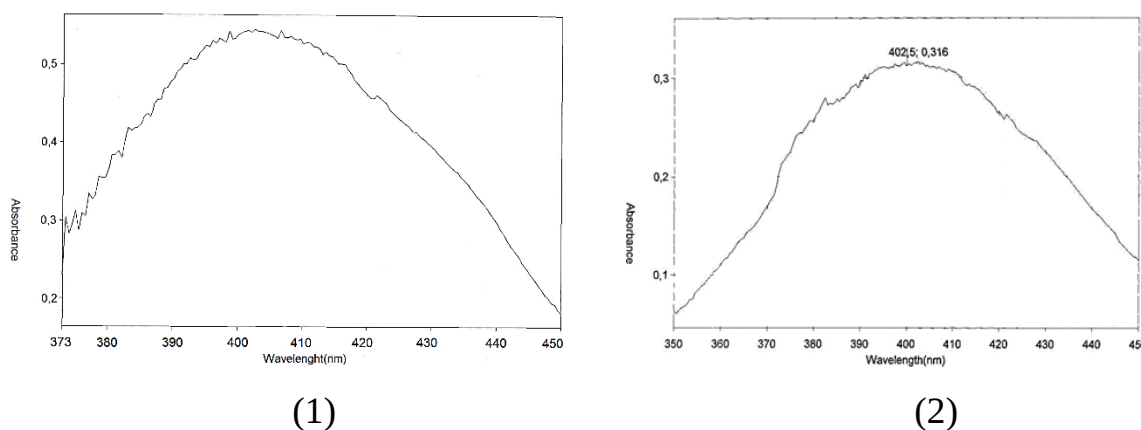


Рис. 3.6.1.1 Спектры поглощения комплексов флавоноидов изучаемого сбора (1) и СО лютеолин-7-гликозида с алюминием хлорида (2)

Для выбора оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов из разработанного сбора изучено влияние ряда параметров: характер экстрагента, измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, время и кратность экстракции.

Экстракцию проводили на кипящей водяной бане с обратным холодильником из навески сбора массой 5,0 г.

В табл. 3.6.1.2 приведены средние значения из пяти определений.

Таблица 3.6.1.2

Содержание суммы флавоноидов в извлечениях изучаемого сбора в зависимости от условий экстракции

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, %
1	2
Концентрация спирта, %	
40% спирт	0,33±0,01
50% спирт	0,41±0,01
60% спирт	0,43±0,02
70 % спирт	0,47±0,02
80% спирт	0,46±0,01
96% спирт	0,34±0,01

Продолжение таблицы 3.6.1.2

1	2
Измельченность сбора, мм	
0,5	0,39±0,01
1	0,41±0,01
2	0,46±0,02
3	0,42±0,02
5	0,41±0,01
Соотношение сырья: экстрагента	
1:5	0,42±0,01
1:10	0,48±0,02
1:15	0,45±0,01
1:20	0,43±0,01
Время экстракции, мин	
15	0,38±0,01
30	0,41±0,01
60	0,47±0,02
75	0,45±0,01
90	0,43±0,01
Кратность экстракции	
однократная	0,39±0,01
двухкратная	0,46±0,01
трехкратная	0,44±0,01

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оптимальными условиями анализа являются: экстрагент – 70% спирт, соотношение сырья и экстрагента – 1:10, измельченность сбора – 2 мм, двухкратная экстракция по 60 минут [115].

Экспериментально установленные оптимальные условия экстракции легли в основу методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в изучаемом сборе и приведены в описании методики.

Методика. Пробу сырья (анализируемый сбор) измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отвешивают точную навеску сбора массой 10,0 г, помещают в колбу (объемом 200 мл), добавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане с момента закипания в течение 1 ч. После охлаждения для отделения частиц сырья

от полученной вытяжки проводят фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу (объемом 100 мл). Экстракцию повторяют с 50 мл 70% этилового спирта в течение 1 ч. После охлаждения спиртоводной вытяжки фильтруют в ту же мерную колбу, полученный объем доводят до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (раствор А).

В мерную колбу (объемом 25 мл) отмеряют 1,0 мл раствора А, добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III) и полученный объем доводят до метки 70% этиловым спиртом [115].

Раствор сравнения: в мерную колбу (объемом 25 мл) отмеряют 1 мл раствора А, добавляют 0,1 мл разведенной уксусной кислоты и доводят до метки – 95% этиловым спиртом (раствор должен быть свежеприготовленным).

Оптическую плотность полученных растворов измеряют на саморегистрирующем спектрофотометре «Helios Alfa» (Spectronic Unicam, Великобритания) через 40 минут при длине волны 402 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО лютеолин-7-гликозида (при длине волны 402 ± 5 нм): 1,0 мл СО лютеолин-7-гликозида отмеряют в колбу (объемом 25 мл), добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III), полученный объем доводят до метки 70% этиловым спиртом. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1,0 мл СО лютеолин-7-гликозида, 0,1 мл разведенной уксусной кислоты и 95% этиловый спирт до 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в анализируемом сборе в пересчете на лютеолин-7-гликозид и абсолютно сухое сырьё в процентах (X) вычисляют по формуле (1):

$$X = \frac{D^* \times 100 \times 25 \times M \times 1 \times 100 \times 100}{D \times M^* \times 100 \times 1 \times 25 \times (100 - W)} \quad (1)$$

где

D^* – оптическая плотность испытуемого раствора;

D – оптическая плотность СО лютеолин-7-гликозида;

M^* – масса навески анализируемого сбора, г;

M – масса СО лютеолин-7-гликозида, г;

W – потеря массы при высушивании изучаемого сбора, %.

Приготовление раствора стандартного образца лютеолин-7-гликозида: точную навеску СО лютеолин-7-гликозида (массой 0,03 г) помещают в мерную колбу (объемом 100 мл), растворяют в 50 мл 70% этанола и доводят тем же растворителем до метки – 70% этиловым спиртом, перемешивают [115].

3.6.1 Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в изучаемом сборе

На следующем этапе была проведена валидационная оценка разработанной методики по критериям: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), специфичность, линейность [6, 5, 25, 28, 184, 188].

Правильность методики устанавливали путем проверки метода на модельных растворах СО лютеолин-7-гликозида. Модельные растворы готовили трёх концентраций с содержанием лютеолин-7-гликозида в % к исходной концентрации 80%, 100%, 120%. Исходная концентрация лютеолин-7-гликозида составляла 0,4 мг в 25 мл. Определение проводилось в трёх повторностях для каждой концентрации. Критерием приемлемости являлся средний % восстановления при использовании растворов концентраций 80%, 100%, 120%, скорректированный на 100% и его средняя величина должна находиться в пределах 98,0-102,0%.

Согласно нашим результатам % восстановления находился в пределах от 99,49% до 101,99% и его средняя величина составила – 99,93% (табл. 3.6.1.1).

Таблица 3.6.1.1

Результаты проверки правильности методики

№	Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси в мг	Экспериментально найденное значение	
		Абсолютная величина, мг	Процент восстановления, %
1.	0,32		
1.1		0,323	100,9
1.2		0,319	99,57
1.3		0,316	98,77
среднее			99,75
2.	0,4		
2.1		0,394	98,49
2.2		0,402	100,43
2.3		0,408	101,99
среднее			100,3
3.	0,48		
3.1		0,485	101,02
3.2		0,475	98,9
3.3		0,401	100,29
среднее			99,74
Средний процент восстановления для 3-х концентраций в трёх повторностях			99,93

Определение *сходимости* проводили в разные дни с использованием спектрофотометра «Helios Alfa» (Spectronic Unicam, Великобритания) одним и тем же специалистом на одном образце изучаемого сбора в 6 повторностях с содержанием суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид 0,43%. Оценка сходимости проводилась по коэффициенту вариации (CV). Согласно нашим результатам CV находится в интервале от 1,22% до 1,26%. Критерием приемлемости являлся коэффициент вариации для 6 измерений, который должен быть не более 2%. Он составил 1,26% (табл. 3.6.1.2).

Таблица 3.6.1.2

Результаты проверки сходимости методики

Дата испытаний	Изучаемый сбор с содержанием суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид 0,43%			
	№	Результаты определения	Стандартное отклонение S	Коэффициент вариации CV, %
1-ый день				
	1	0,42		
	2	0,42		
	3	0,43		
	4	0,42		
	5	0,42		
	6	0,43		
Среднее		0,425	0,00516	1,22
2-ой день				
	1	0,43		
	2	0,43		
	3	0,43		
	4	0,43		
	5	0,42		
	6	0,42		
Среднее		0,43	0,00516	1,26

Воспроизводимость устанавливали по результатам анализа одного образца разработанного сбора в двух лабораториях в 6 повторностях с содержанием суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид 0,43%. Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации для 6 измерений, который должен быть не более 2%. Он составил 1,35% (табл. 3.6.1.3).

Таблица 3.6.1.3

Результаты проверки воспроизводимости методики

Лаборатория	Изучаемый сбор с содержанием суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид 0,43%			
	№	Результаты определения	Стандартное отклонение S	Коэффициент вариации CV, %
1	1	0,42		
	2	0,42		
	3	0,43		
	4	0,43		
	5	0,43		
	6	0,42		
Среднее		0,425	0,00548	1,35
2	1	0,42		
	2	0,43		
	3	0,43		
	4	0,43		
	5	0,43		
	6	0,42		
Среднее		0,43	0,00516	1,27

Определение *линейности* проводили на пяти концентрациях СО лютеолин-7-гликозида. Для анализа отвешивали точную навеску 0,02 г СО лютеолин-7-гликозида, помещали в мерную колбу (объемом 25 мл), прибавляли 20 мл 70% спирта этилового и доводили объем раствора тем же спиртом до метки (раствор А). Далее в пять мерных колб вместимостью 25 мл вносили по 1 мл; 2 мл; 3 мл; 4 мл; 5 мл раствора А. К растворам во всех пяти колбах прибавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III) и доводили до метки 70% спиртом этиловым, перемешивали. Оптическую плотность каждого из полученных растворов измеряли на саморегистрирующем спектрофотометре «Helios Alfa» (Spectronic Unicam, Великобритания) при длине волны 402 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Критерием приемлемости линейности являлся коэффициент корреляции, величина которого между рядом полученных значений должна быть не ниже 0,98, и совокупность данных можно описать прямой линией. В эксперименте линейность

метода наблюдается в интервале концентраций 0,32-1,6 мг%, что подтверждается высоким коэффициентом корреляции ($r=0,999$) (табл. 3.6.1.4, рис. 3.6.1.5).

Таблица 3.6.1.4

Результаты проверки линейности методики

Оптическая плотность D	Концентрация СО лютеолин-7-гликозида, мг %	Коэффициент корреляции	$y=b \times x+a$	
			b	a
0,130	0,32	0,999	0,397	0,006
0,265	0,64			
0,385	0,96			
0,515	1,28			
0,640	1,60			

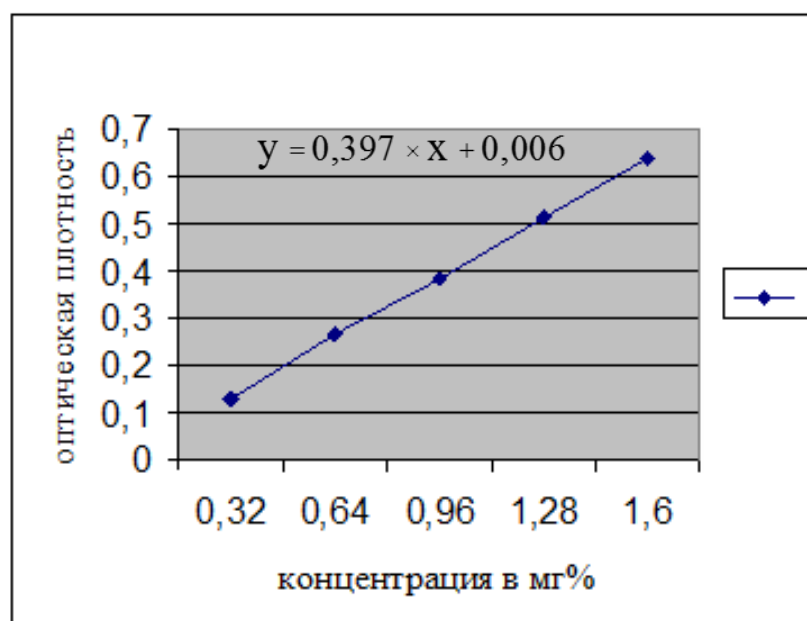


Рис. 3.6.1.5 График зависимости оптической плотности от концентраций СО лютеолин-7-гликозида

Специфичность методики подтверждали доказательством того, что способность к светопоглощению флавоноидов при определенной длине волны, сравнивается с аналогичной способностью стандартного образца. По методике количественного определения суммы флавоноидов были получены окрашенные комплексы изучаемого сбора и СО лютеолин-7-гликозида. Спектры поглощения полученных комплексов снимали на саморегистрирующем спектрофотометре «Helios Alfa» (Spectronic Unicam, Великобритания) в интервале длин волн от 350 до 460 нм. Критерием приемлемости являлась идентичность спектра поглощения СО лютеолин-7-гликозида с алюминием хлорида со спектром поглощения сбора с тем же комплексообразователем. Представленные спектры поглощения (рис. 3.7.1.1) визуально подтверждают идентичность, что позволяет признать специфичность удовлетворительной.

Специфичность методики также была доказана методом с добавками. Испытание проводилось на одном образце сбора в 3-х концентрациях с добавками СО лютеолин-7-гликозида. Критерием приемлемости являлась величина относительной ошибки опытов с добавками, которая должна находиться в пределах случайной ошибки методики. Величина относительной ошибки опытов с добавками находится в пределах случайной ошибки методики, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при определении суммы флавоноидов и о специфичности данной методики (табл. 3.6.1.6-3.6.1.7).

Таблица 3.6.1.6

Результаты проверки специфичности методики

№	Содержание флавоноидов в сборе (мг)	Добавлено СО лютеолин-7-гликозида (мг)	Ожидаемое содержание флавоноидов (мг)	Полученное содержание флавоноидов (мг) (среднее из 3-х определений)	Ошибка	
					абс., (мг)	отн., (%)
1	0,75	0,03	0,78	0,79	+0,01	+1,28
2	0,75	0,04	0,79	0,81	+0,02	+2,5
3	0,75	0,05	0,80	0,79	-0,01	-1,25

Таблица 3.6.1.7

Результаты проверки специфичности методики

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	0,47	0,00013	0,0114	0,0141	3,04

На основании результатов, полученных при оценке методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид в изучаемом сборе, можно оценить метод положительно по параметрам: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), специфичность, линейность (табл. 3.6.1.8).

Таблица 3.6.1.8

Результаты валидационной оценки методики количественного определения суммы флавоноидов в изучаемом сборе в пересчёте на лютеолин-7-гликозид

№ п/п	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	Правильность	Процент восстановления 98,0-102%	99,93%
2	Сходимость	Коэффициент вариации не более 2%	1-ый день CV=1,22% 2-ой день CV=1,26%
3	Воспроизводимость	Коэффициент вариации не более 2%	1-ая лаборатория: CV=1,35 2-ая лаборатория: CV=1,27
4	Специфичность	1. Близость спектров поглощения 2. Относительная ошибка опытов с добавками должна находиться в пределах случайной ошибки методики, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.	1. Доказана близость спектров поглощения окрашенных комплексов водно-спиртового извлечения изучаемого сбора и СО лютеолин-7-гликозида. 2. Относительная ошибка опытов с добавками находится в пределах случайной ошибки методики, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

5	Линейность и диапазон	Коэффициент корреляции должен быть не ниже 0,98	0,999 0,32-1,6 мг%
---	-----------------------	---	-----------------------

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид в изучаемом сборе. Данная методика может быть использована при разработке проекта Фармакопейной статьи на комплексный урологический сбор «Фитоурол» и установлении норм.

3.7 Количественное определение основных БАВ в сборе

Количественная оценка содержания основных групп БАВ в сборе является важным этапом фармакогностического изучения. Данный анализ необходим для научного обоснования фармакологической активности растительного средства, определения варьирования содержания БАВ в разных образцах сбора, а также для обоснования стандартизации сбора. Государственная Фармакопея [27, 28] для листьев брусники предлагает стандартизацию по арбутину, для травы хвоща полевого – по сумме флавоноидов в пересчете на кверцетин, для корней лопуха – по сумме полисахаридов в пересчете на фруктозу и содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых водой, для плодов укропа огородного – по количеству эфирного масла, а для травы полыни обыкновенной – количественный показатель вообще не регламентируется. Фармакотерапевтический эффект водного извлечения сбора обуславливает сумма всех БАВ компонентов. Нами было определено содержание в сборе экстрактивных веществ, извлекаемых водой, флавоноидов, полисахаридов (инулина), арбутина, эфирного масла, дубильных веществ, а также органических кислот.

Определение экстрактивных веществ

Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой, в изучаемом сборе проводили по методике Государственной Фармакопеи [27, 28].

Результаты количественного определения экстрактивных веществ в сборе приведены в табл. 3.7.1.

Таблица 3.7.1

Результаты количественного определения экстрактивных веществ в изучаемом сборе (n=5, p=0,95)

№	Содержание экстрактивных веществ, %
1	21,2
2	23,7
3	21,1
4	22,7
5	23,1
Среднее из 5-ти определений	22,36±1,44

Как видно из табл. 3.7.1, содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, в разных образцах изучаемого сбора составляет от 21,1 до 23,7%.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.7.2.

Таблица 3.7.2

Метрологические характеристики методики количественного определения экстрактивных веществ в изучаемом сборе

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	22,36	1,348	1,161	1,44	6,45

Среднее содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, в изучаемом сборе составляет 22,36±1,44%.

Определение флавоноидов

Анализ исследуемых образцов изучаемого сбора по разработанной нами методике (см. глава 3, п. 3.6) показал, что в проанализированных образцах сбора содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид варьирует от 0,45 до 0,48% (табл. 3.7.3). Рекомендуем установить норму содержания суммы флавоноидов в сборе не менее 0,4%.

Таблица 3.7.3

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в изучаемом сборе (n=5, p=0,95)

№	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, %
1	0,46
2	0,47
2	0,45
4	0,47
5	0,48
Среднее из 5-ти определений	0,466±0,014

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.7.4.

Таблица 3.7.4

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в изучаемом сборе

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	0,466	0,00013	0,0114	0,0141	3,04

Среднее содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в изучаемом сборе составляет 0,47±0,01%.

Определение арбутина

Согласно нашим ранее проведенным фитохимическим исследованиям изучаемого сбора и данным литературы, было установлено, что одной из основных групп фенольных соединений является фенологликозид арбутин. Количественное определение арбутина проводили методом йодометрического титрования по ГФ XI изд. [29] и методом ВЭЖХ (см. глава 2, п. 2.3.3) [155].

Результаты проведенных исследований количественного определения арбутина в сборе приведены в табл. 3.7.5.

Таблица 3.7.5

Результаты количественного определения арбутина в изучаемом сборе разными методами (n=5, p=0,95)

№	Содержание арбутина найденное методом, %	
	ГФ XI	ВЭЖХ
1	1,39	0,79
2	1,49	0,76
3	1,48	0,82
4	1,35	0,76
5	1,41	0,80
Среднее из 5-ти определений	1,424±0,0743	0,786±0,0324

Как видно из табл. 3.7.4, содержание арбутина в разных образцах сбора методом йодометрического титрования колеблется от 1,35 до 1,49%, а методом ВЭЖХ – от 0,76 до 0,82%. Так, сравнение результатов определения арбутина разными методами показало, что фармакопейным методом результат почти в два раза выше, по сравнению с полученными результатами, найденными ВЭЖХ методом.

Метрологические характеристики методик представлены в табл. 3.7.6 и 3.7.7.

Таблица 3.7.6

Метрологические характеристики методики количественного определения арбутина в изучаемом сборе фармакопейным методом

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S ²	S	$\Delta\bar{X}$	E, %
5	4	95	2,78	1,424	0,00358	0,05983	0,0743	5,61

Таблица 3.7.7

Метрологические характеристики методики количественного определения арбутина в изучаемом сборе методом ВЭЖХ

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S ²	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	0,786	0,00068	0,02608	0,0324	4,12

Таким образом, согласно проведенным исследованиям среднее количественное содержание арбутина в изучаемом сборе фармакопейным методом составило $1,42 \pm 0,07\%$; ВЭЖХ – $0,79 \pm 0,03\%$.

Определение полисахаридов (инулина)

Определение содержания суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в изучаемом сборе проводили по методике ГФ РФ XIII изд. (см. глава 2, п. 2.3.4) [27].

В процессе исследования нами была уточнена длина волны максимума поглощения комплекса с резорцином водного извлечения из изучаемого сбора и водного раствора стандартного образца фруктозы.

При добавлении спиртового раствора резорцина в спектре водного извлечения сбора появлялся максимум поглощения при $478,5 \pm 2$ нм, который совпадал с максимумом поглощения комплекса стандартного образца фруктозы с резорцином $479,5 \pm 2$ нм, поэтому в наших исследованиях мы использовали длину волны 480 нм (рис. 3.7.8).

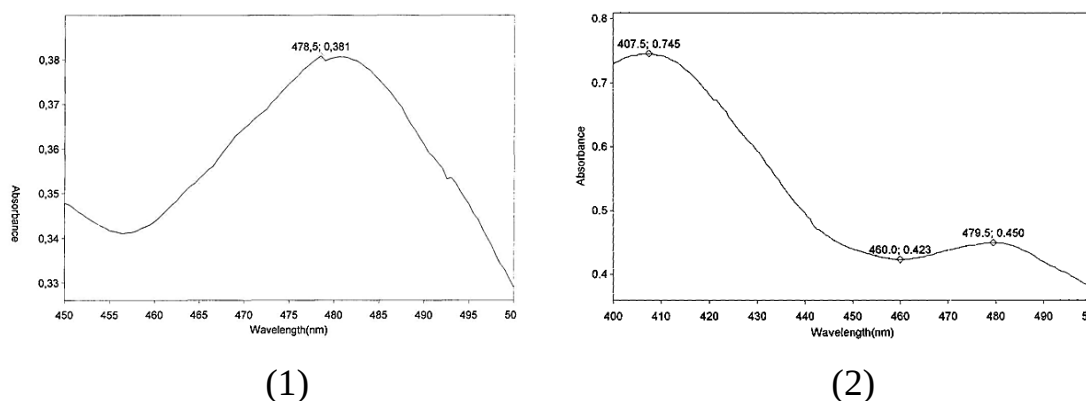


Рис. 3.7.8 – Спектры поглощения комплексов водного извлечения изучаемого сбора и раствора стандартного образца фруктозы с резорцином

Результаты по количественному определению суммы полисахаридов в сборе приведены в табл. 3.7.9.

Таблица 3.7.9

Результаты количественного определения суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в изучаемом сборе ($n=5$, $p=0,95$)

№	Содержание полисахаридов в пересчете на фруктозу, %
1	1,77
2	1,72
3	1,83
4	1,84
5	1,74
Среднее из 5-ти определений	$1,78 \pm 0,066$

Как видно из табл. 3.7.9, в разных образцах изучаемого сбора содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу варьирует от 1,72 до 1,84%.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.7.10.

Таблица 3.7.10

Метрологические характеристики количественного определения суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в изучаемом сборе

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta \bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	1,78	0,00285	0,0534	0,066	3,72

Согласно проведенным исследованиям среднее содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в изучаемом сборе составляет $1,78 \pm 0,07\%$.

Определение эфирного масла

Количественное определение эфирного масла проводили из навески массой 20,0 г, согласно Государственной Фармакопеи метод 1 (см. глава 2, п. 2.3.2) [27, 28].

Результаты проведенных испытаний представлены в табл. 3.7.11 и 3.7.12.

Таблица 3.7.11

Результаты количественного определения эфирного масла в изучаемом сборе
($n=5$, $p=0,95$)

№	Содержание эфирного масла, %
1	0,36
2	0,34
3	0,33
4	0,35
5	0,33
Среднее из 5-ти определений	$0,342 \pm 0,016$

Как видно из табл. 3.7.11, в разных образцах изучаемого сбора содержание эфирного масла варьирует от 0,33 до 0,36%.

Таблица 3.7.12

Метрологические характеристики количественного определения эфирного масла
в изучаемом сборе

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta \bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	0,342	0,00017	0,013	0,0161	4,73

Таким образом, среднее содержание эфирного масла в изучаемом сборе составляет $0,34 \pm 0,02\%$.

Определение дубильных веществ

Определение содержания дубильных веществ в изучаемом сборе проводили методом перманганометрического титрования в пересчёте на танин согласно Государственной Фармакопеи (см. глава 2, п. 2.3.5) [27, 28].

Результаты проведенных исследований количественного определения дубильных веществ в сборе приведены табл. 3.7.13.

Таблица 3.7.13

Результаты количественного определения дубильных веществ в пересчете на танин в изучаемом сборе (n=5, p=0,95)

№	Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %
1	3,38
2	3,43
3	3,39
4	3,34
5	3,33
Среднее из 5-ти определений	3,37±0,05

Как видно из табл. 3.7.13, в разных образцах изучаемого сбора содержание дубильных веществ в пересчете на танин колеблется от 3,33 до 3,43%.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.7.14.

Таблица 3.7.14

Метрологические характеристики результатов количественного определения дубильных веществ в изучаемом сборе

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S ²	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	3,37	0,00163	0,0404	0,0502	1,49

Показано, что среднее содержание суммы дубильных веществ в изучаемом сборе составляет 3,37±0,05%.

Определение органических кислот

Определение содержания суммы свободных органических кислот в изучаемом сборе проводили титриметрическим методом в пересчете на яблочную кислоту по методике Государственной Фармакопеи (см. глава 2, п. 2.3.5) [27, 29].

Как видно из табл. 3.7.15, в разных образцах изучаемого сбора содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту составляет от 1,02 до 1,10%.

Таблица 3.7.15

Результаты количественного определения органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в изучаемом сборе (n=5, p=0,95)

№	Содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту, %
1	1,02
2	1,07
3	1,10
4	1,07
5	1,03
Среднее из 5-ти определений	1,058±0,04

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 3.7.16.

Таблица 3.7.16

Метрологические характеристики методики количественного определения органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в изучаемом сборе

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	1,058	0,00107	0,0327	0,040	3,78

Согласно проведенным исследованиям содержание среднее суммы органических кислот в изучаемом сборе составляет 1,06±0,04%.

Проведенные исследования позволили определить, что в образцах изучаемого сбора содержание экстрактивных веществ варьирует от 21,1 до 23,7%, флавоноидов от 0,45 до 0,48%, арбутина от 1,35 до 1,49%, полисахаридов (инулина)

от 1,72 до 1,84%, эфирного масла от 0,33 до 0,36%, дубильных веществ от 3,33 до 3,43%, органических кислот от 1,02 до 1,10% (табл. 3.7.17).

С учетом фармакологической направленности изучаемого сбора, целесообразно, проводить стандартизацию по количественному содержанию флавоноидов и арбутина. Кроме того, так как сбор предназначен для приготовления водных извлечений, то целесообразно проводить стандартизацию по содержанию экстрактивных веществ.

Таблица 3.7.17

Количественное содержание экстрактивных и БАВ в изучаемом сборе
(n=5, p=0,95)

№	Содержание, %						
	Экстрактивные вещества, извлекаемые водой	Сумма флавоноидов	Арбутин	Сумма полисахаридов (инулин)	Эфирное масло	Сумма дубильных веществ	Сумма органических кислот
1	21,2	0,46	1,39	1,77	0,36	3,38	1,02
2	23,7	0,47	1,49	1,72	0,34	3,43	1,07
3	21,1	0,45	1,48	1,83	0,33	3,39	1,10
4	22,7	0,47	1,35	1,84	0,35	3,34	1,07
5	23,1	0,48	1,41	1,74	0,33	3,33	1,03
среднее	22,36±1,44	0,466±0,01	1,42±0,07	1,78±0,06	0,34±0,02	3,37±0,05	1,06±0,04

Таким образом, стандартизацию сбора «Фитоурол», по нашему мнению, целесообразно проводить по количественному содержанию флавоноидов, арбутина и экстрактивных веществ, извлекаемых водой.

Полученные данные могут быть использованы при разработке проекта Фармакопейной статьи на комплексный урологический сбор - «Фитоурол» и установлении норм.

3.8 Определение показателей доброкачественности сбора

Проведено изучение показателей качества пяти образцов разработанного измельченного сбора. Анализ включал определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой; влажности; золы общей; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты; измельченности; примесей (органических, минеральных).

Результаты проведенных исследований приведены в табл. 3.8.1.

Таблица 3.8.1

Результаты изучения показателей качества изучаемого сбора
(n=5, p=0,95)

№ п/п	Экстрактивные вещества, извлекаемые водой, %	Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% HCl, %	Измельченность		Примеси	
					Частич, не проходящих через сито 7 мм, %	Частич, проходящих через сито 0,18 мм, %	Органическая, %	Минеральная, %
1	21,2	8,13	12,57	3,16	4,5	3,8	1,43	0,87
2	23,7	7,36	11,65	4,25	5,0	3,3	1,23	0,91
3	21,1	6,56	10,37	3,88	3,6	3,9	1,32	0,81
4	22,7	7,85	12,54	3,75	5,1	4,5	1,37	0,95
5	23,1	9,45	12,63	4,99	4,8	4,0	1,49	0,97
среднее	22,36±1,44	7,87±1,32	11,95±1,20	4,01±0,84	4,6±0,75	3,9±0,5	1,37±0,12	0,9±0,08

Анализ исследуемых образцов сбора показал, что содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой варьирует от 21,1 до 23,7%. Предлагаем норму по показателю содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, для изучаемого сбора установить не менее 21%.

Значение показателя влажности в образцах сбора составило от 6,56 до 9,45%. Предлагаем норму по показателю влажности для изучаемого сбора установить не более 12%.

При анализе образцов сбора значение показателя золы общей составило от 10,37 до 12,63%, золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, изменялось от 3,16 до 4,99%. Предлагаем нормы по этим показателям для изучаемого сбора установить не более 14% и не более 5%, соответственно.

Анализ измельченных образцов сбора показал, что показатель частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм изменялся от 3,6 до 5,1 %; а частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – от 3,3 до 4,5%. В связи с этим предлагаем нормы по этим показателям для изучаемого сбора установить не более 5%.

Значение показателя органической примеси изменялось от 1,23 до 1,49%, минеральной примеси – 0,81 до 0,97%. Предлагаем нормы по этим показателям для изучаемого сбора установить не более 1,5% и не более 1%, соответственно.

Полученные данные могут быть использованы при разработке проекта Фармакопейной статьи на сбор «Фитоурол».

Проведено изучение показателей безопасности разработанного сбора измельченного: определение содержания радионуклидов и микробиологической чистоты. Результаты приведены в табл. 3.8.2 – 3.8.3.

Таблица 3.8.2

Результаты содержания радионуклидов в изучаемом сборе
(n=5, p=0,95)

№ п/п	Радионуклиды, Бк/кг	
	Цезий-137	Стронций-90
1	1,23	1,6
2	1,24	1,04
3	1,35	1,17
4	1,67	0,98
5	1,22	0,98
среднее	1,34±0,24	1,15±0,32

Итак, содержание радионуклидов цезия-137 (от 1,2 до 1,67 Бк/кг) и стронция-90 (0,98 до 1,6 Бк/кг) колеблется в пределах допустимых норм [27, 86, 107].

Таблица 3.8.3

Результаты определения микробиологической чистоты изучаемого сбора

№	Испытания на микробиологическую чистоту	Результат испытаний	Рекомендуемые требования (нормы)
1	Общее число аэробных микроорганизмов в 1 г	$2,5 \cdot 10^5$	не более 10^7 КОЕ
2	Общее число дрожжевых и плесневых грибов в 1 г	$3,5 \cdot 10^3$	не более 10^5 КОЕ
3	<i>Escherichia coli</i> в 1 г	отсутствие	не более 10^2 КОЕ

Как следует из данных, приведенных в табл. 3.8.3, изученные образцы сбора по микробиологической чистоте соответствовали требованиям, предъявляемым к лекарственным средствам категории 4А [26, 27].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. На основании изучения сведений об этиологии и патогенезе уролитиаза, химическом составе биологически активных веществ растений, опыте их применения в официальной и народной медицине, а также фитохимических и фармакологических исследований впервые был подобран состав и обосновано оптимальное соотношение компонентов сбора, включающего лекарственное растительное сырье: брусники листья – 30%; хвоща полевого трава – 30%; лопуха корни – 15%; укропа огородного плоды – 15%; полыни обыкновенной трава – 10%.

2. Установлено, что изучаемый сбор оказывает диуретическое, салуретическое, противовоспалительное, антиоксидантное, нефропротекторное, нормализующее фосфорно-кальциевый обмен действие, а также выраженное литолитическое влияние при экспериментальном уролитиазе у лабораторных животных, вызванного интрагастральным введением сублетальных доз витамина D₂.

3. Изучены и установлены морфолого-анатомические признаки разработанного сбора. Получены фотографии внешних признаков и микроскопии, которые могут быть использованы как иллюстративный материал разделов нормативной документации, регламентирующей качество сырья.

4. Качественными реакциями, а также методами УФ-спектрофотометрии и ТСХ установлено и подтверждено наличие в сборе «Фитоурол»: **флавоноидов** (рутин, гиперозид, лютеолин, кверцетин, лютеолин-7-гликозид, нарингенин), **фенолкарбоновой кислоты** (галловая), **гидроксикоричных кислот** (хлорогеновая, феруловая), **свободных сахаров** (сахароза, глюкоза, фруктоза), **фенологликозида** (арбутин), **дубильных веществ и полисахаридов** (инулина). С использованием ВЭЖХ-анализа в сборе были подтверждены ранее идентифицированные соединения и также обнаружены: **фенолкарбоновая кислота** (эллаговая); **гидроксикоричные кислоты** (неохлорогеновая, изоферуловая, кофейная, цикориевая, коричная кислоты); **производные дубильных веществ** (эпикатехин, катехин, эпигаллокатехингаллат); **кумарины** (дикумарин, метоксикумарин) и **органические кислоты** (янтарная, щавелевая).

5. С использованием ГЖХ в изучаемом сборе впервые установлены в составе эфирного масла терпеноиды: *монотерпеноиды* лимонен – 1,74%, камфора – 6,88%, гераниол – 2,47%; *фенилпропаноид*: анетол – 86,13% и *сложный эфир*: борнилацетат – 2,79%.

6. Изучены и установлены показатели качества комплексного урологического сбора: содержание влажности составило от 6,56 до 9,45%; золы общей от 10,37 до 12,63%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, от 3,16 до 4,99%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, от 3,6 до 5,1 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, от 3,3 до 4,5%; органической примеси от 1,23 до 1,49%; минеральной примеси – 0,81 до 0,97%. Полученные данные могут быть использованы при утверждении норм качества в проекте НД на комплексный урологический сбор «Фитоурол».

7. Рекомендовано, в проект НД на сбор «Фитоурол» в раздел «Микробиологическая чистота» включить оценку изучаемого сбора на соответствие требованиям по категории 4А.

8. Для изучаемого сбора разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид. Методика может быть включена в проект НД на комплексный урологический сбор «Фитоурол».

9. В сборе «Фитоурол» определено содержание: экстрактивных веществ, извлекаемых водой, $22,36 \pm 1,44\%$, флавоноидов $0,47 \pm 0,01\%$, арбутина $1,42 \pm 0,07\%$, эфирных масел $0,34 \pm 0,03\%$, полисахаридов (инулина) $1,78 \pm 0,02\%$, дубильных веществ $3,38 \pm 0,08\%$, органических кислот $1,09 \pm 0,13\%$.

ГЛАВА 4 ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Одной из наиболее перспективных форм переработки сборов и ЛРС являются сухие экстракты. Сухой водорастворимый экстракт сбора можно применять в качестве концентрата для приготовления водного извлечения (настоя/отвара) сбора, что позволит получить точно дозированную лекарственную форму, обладающую специфической активностью.

4.1 Получение экстракта сухого из сбора

Для получения лабораторного образца экстракта сухого использовали воду очищенную и был проведен подбор условий для максимального извлечения БАВ: тип экстрагента, измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, температурный режим, кратность и длительность экстракции. Количественная оценка полученного экстракта велась по содержанию экстрактивных веществ, извлекаемых водой и суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, более подробно условия анализа представлены в работе [111].

Для получения экстракта использовали воду очищенную.

Для выбора оптимального измельчения растительного сырья для получения экстракта, сырьё измельчали да частиц, проходящих через сито с размером отверстий до 1, 2, 3, 5 мм и использовали сырьё без дополнительного измельчения – проходящее через сито с отверстиями 7 мм.

В табл. 4.1.1 приведены результаты определения оптимальной измельченности изучаемого сбора.

Таблица 4.1.1

Содержание суммы экстрактивных веществ и флавоноидов в извлечениях изучаемого сбора в зависимости от размера частиц

Измельченность, мм	Содержание суммы экстрактивных веществ, %	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, %
1	18,12	0,39
2	25,79	0,47
3	24,15	0,45
5	20,31	0,38
7	17,78	0,32

Согласно экспериментальным данным (табл. 4.1.1) нами выбрана измельченность для сбора 2 мм, которая обеспечивает максимальный выход суммы экстрактивных веществ и флавоноидов.

Следующим этапом было определение влияния соотношения сырья и экстрагента на выход экстрактивных веществ и флавоноидов. Результаты представлены в табл. 4.1.2.

Таблица 4.1.2

Содержание суммы экстрактивных веществ и флавоноидов в извлечениях изучаемого сбора в зависимости от соотношения сырья: экстрагента

Соотношение сырья: экстрагента	Содержание суммы экстрактивных веществ, %	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, %
1:5	18,25	0,32
1:10	23,94	0,46
1:15	22,69	0,44

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оптимальным соотношением сырья и экстрагента является 1:10.

С целью определения влияния температуры на выход экстрактивных веществ и суммы флавоноидов было изучено 7 температурных режимов (табл. 4.1.3).

Таблица 4.1.3

Содержание суммы экстрактивных веществ и флавоноидов в извлечениях изучаемого сбора в зависимости от температурного режима экстракции

Температура, °С	Содержание экстрактивных веществ, %	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, %
20	19,37	0,26
40	21,64	0,33
50	23,15	0,38
60	24,18	0,41
70	24,39	0,44
80	24,41	0,45
90	24,43	0,43

Показано, что с увеличением температуры повышается выход биологически активных соединений и выбрана оптимальная температура экстракции 70°C. При температуре выше 70°C содержание извлекаемых веществ увеличивается незначительно, однако имеет место увеличение энергозатрат, что делает процесс нецелесообразным [111].

Для определения продолжительности и кратности числа экстракций изучено время достижения равновесной концентрации. Для этого проводили экстракцию измельченного сбора водой очищенной в соотношении 1:10 на водяной бане при температуре 70°C с обратным холодильником. Нагревание проводили 30 мин, 45 мин, 60 мин, 75 мин, 90 мин, 105 мин. По истечении времени извлечения охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и определяли содержание экстрактивных веществ и суммы флавоноидов

Экстракцию повторяли трижды, заливая сырье новой порцией экстрагента в количестве, равном слитому извлечению. Полученные данные приведены в табл. 4.1.4.

Таблица 4.1.4

Содержание экстрактивных веществ и флавоноидов в извлечениях изучаемого сбора в зависимости от времени экстрагирования и количества экстракций

Время экстракции, мин	Содержание экстрактивных веществ, %			Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, %		
	I	II	III	I	II	III
30	17,98	3,49	0,83	0,29	0,04	$0,10 \times 10^{-1}$
45	18,54	3,63	0,86	0,32	0,05	$0,11 \times 10^{-1}$
60	20,26	3,96	0,93	0,35	0,09	$0,21 \times 10^{-1}$
75	20,04	3,93	0,94	0,34	0,08	$0,19 \times 10^{-1}$
90	20,16	3,94	0,93	0,35	0,08	$0,20 \times 10^{-1}$
105	20,17	3,92	0,93	0,34	0,09	$0,19 \times 10^{-1}$

На основании полученных результатов исследования можно заключить, что оптимальными условиями экстракции являются: время – 60 мин, кратность – 3. При этом вовремя I стадии экстракции выделяется 75-80% от общего количества извлекаемых веществ, при II выход 15-20%, при III – до 5%.

В результате проведенных исследований установлены оптимальные параметры экстрагирования изучаемого сбора: экстрагент – горячая вода (70°C), соотношение сырья и экстрагента – 1:10, измельченность сбора – 2 мм, кратность и время экстракции – трехкратно, 60 мин.

4.2 Лабораторная схема получения экстракта сухого из сбора

Общая лабораторная схема получения экстракта сухого из изучаемого сбора включает основные стадии технологического процесса: измельчение растительного сырья до определенной величины, получение водного экстракта, упаривание водного экстракта и сушки.

Изложение технологического процесса

ТП.1. *Измельчение растительного сырья.* Сбор, состоящий из лекарственного растительного сырья: корней лопуха, травы полыни обыкновенной,

листьев брусники, травы хвоща полевого, плодов укропа огородного измельчали на универсальной лабораторной мельнице до частиц, проходящих через сито с размером отверстий 2 мм. Затем отвешивали необходимое количество измельченного сырья и переходили к следующей стадии технологического процесса.

ТП.2.1. *Экстракция сбора.* Экстракцию вели водой очищенной в соотношении 1:10 при перемешивании на магнитной мешалке при температуре 70°C. Экстрагирование проводили трехкратно, при двух последующих экстракциях экстрагент добавляли в количестве, равном предыдущему отпуску. Время экстракции при первом, втором и третьем контакте фаз – 60 минут.

ТП.2.2. *Фильтрация экстракта.* После трехкратной экстракции водные извлечения объединяли и фильтровали в сборник через слой ваты гигроскопической, находящийся между двумя листами бумаги фильтровальной, помещенной на перфорированную пластинку воронки Бюхнера.

ТП.2.3. *Концентрирование экстракта.* Объединенный экстракт порциями переносили в круглодонную колбу, которую соединяли с роторным испарителем. Упаривание вели при температуре реакционной массы (60±5) °C и давлении 0,09 МПа (0,9 кгс/см²) приблизительно до 1/16 первоначального объема.

ТП.2.4. *Сушка экстракта.* Экстракт сушили в вакуумном сушильном шкафу при температуре (60±5)°C и остаточном давлении 0,1 кгс/см². Удаление влаги происходило под вакуумом при нагревании водного экстракта в мягких условиях.

ТП.2.5. *Измельчение сухого экстракта.* Полученный твердый остаток высушенного экстракта измельчали при помощи ступки и пестика, после чего измельченный экстракт сухой просеивали через капроновое сито. Полученный готовый экстракт сухой расфасовывали в банки из темного стекла с навинчиваемыми пластмассовыми крышками. Хранение экстракта сухого в защищенном от света месте при температуре от 15 до 25°C [27].

Лабораторная схема получения экстракта сухого из сбора представлена на рис. 4.2.1.

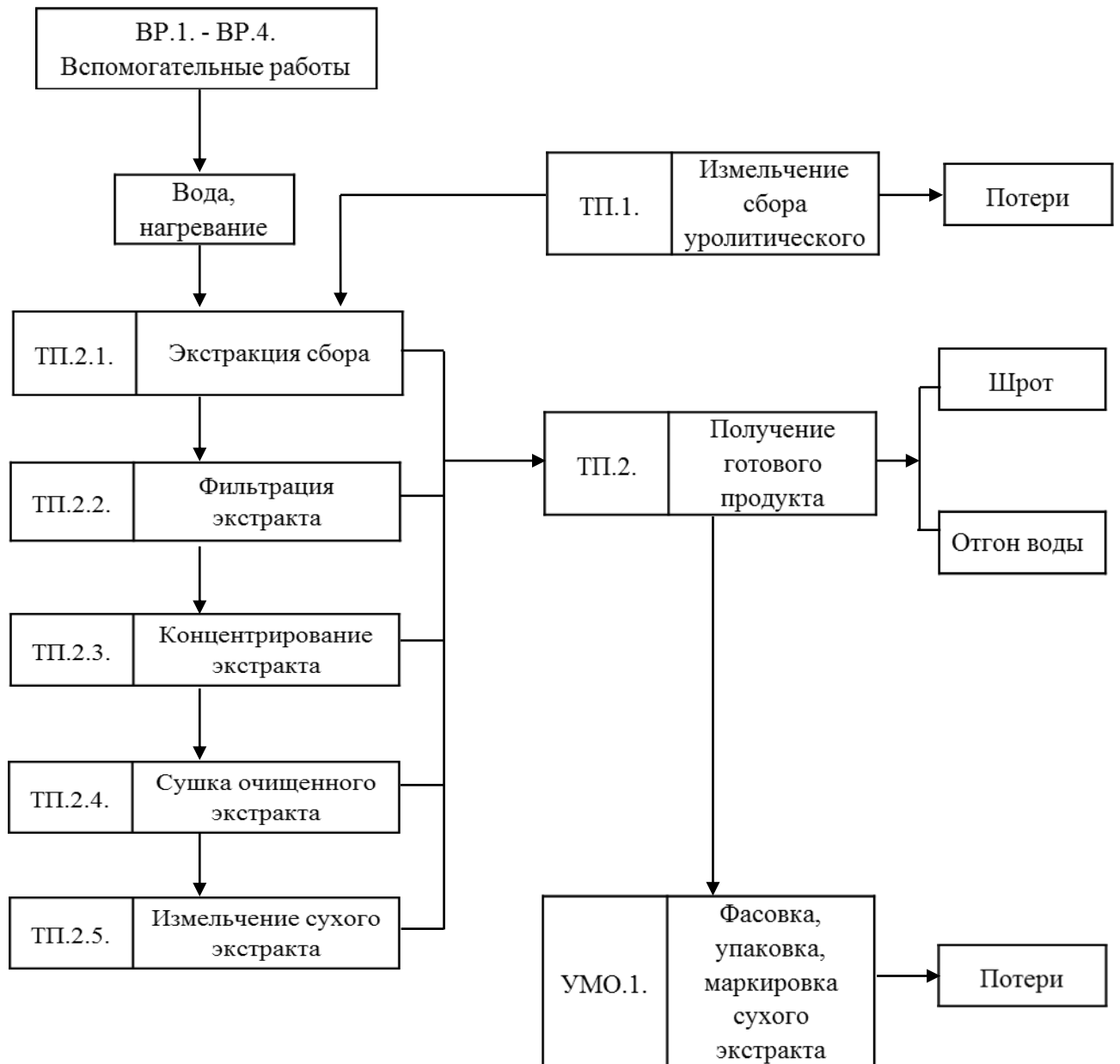


Рис. 4.2.1 Лабораторная схема получения экстракта сухого из сбора.

Экспериментально установленные оптимальные параметры экстракции сбора (гл. 4, п. 4.1), обеспечивающие максимальное извлечение БАВ, положены в основу лабораторной схемы получения экстракта сухого (рис. 4.2.1).

4.3 Изучение состава БАВ экстракта сухого

4.3.1 Определение основных БАВ качественными реакциями в экстракте сухом

В экстракте сухом проводили идентификацию тех же основных групп БАВ, что в растительном сборе. Для исследования использовали водное извлечение экстракта сухого, приготовленное по выше приведенной методике (глава 2, п. 2.3).

Было подтверждено наличие в экстракте сухом:

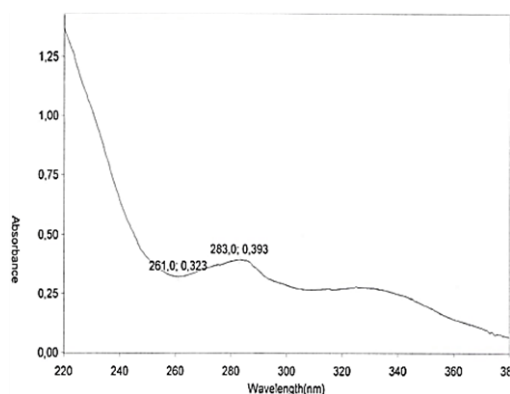
- ✓ флавоноидов – цианидиновая реакция (появление красного окрашивания) (глава 2, п. 2.3);
- ✓ полисахаридов – осаждение спиртом из водного извлечения (появление белых хлопьевидных сгустков) (глава 2, п. 2.3);
- ✓ дубильных веществ – появление черно-синего окрашивания с железоаммониевыми квасцами (глава 2, п. 2.3);
- ✓ свободных сахаров – выпадение кирпично-красного осадка с реактивом Феллинга (глава 2, п. 2.3);
- ✓ арбутина – появление синего окрашивания со спиртовым раствором дихлорхинонахлоримида (глава 2, п. 2.3);

Таким образом, было установлено, что в экстракте сухом содержатся те же БАВ, что и в исходном сборе.

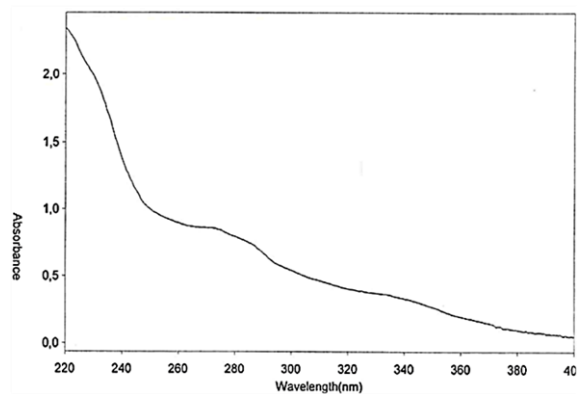
4.3.2 Идентификация веществ в экстракте сухом методом УФ-спектрофотометрии

Подтверждение наличия фенольных соединений в сухом экстракте методом спектрофотометрии проводили с использованием водно-спиртового раствора экстракта, приготовленного по выше указанной методике (глава 2, п. 2.3.4)

Нами были получены спектры с характерными максимумами поглощения (рис. 4.3.2.1).



(1)



(2)

Рис. 4.3.2.1 УФ-спектры поглощения водно-спиртовых извлечений: 1 – экстракта сухого изучаемого сбора и 2 – изучаемого сбора

Согласно полученным результатам исследований спектр поглощения водно-спиртового извлечения экстракта сухого практически идентичен спектру поглощения водно-спиртового извлечения из сбора. Что свидетельствует о близости составов экстракта сухого и исходного сбора.

4.3.3 Хроматографический анализ экстракта сухого

4.3.3.1 Идентификация веществ методом ТСХ

Фенольные соединения

Для хроматографического определения фенольных соединений использовали 70% спиртовое извлечение экстракта сухого. Получение водно-спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

При просмотривании хроматограммы извлечения экстракта сухого наблюдали 7 зон, окрашенных в сине-фиолетовые цвета с $R_f \sim 0,12$ (хлорогеновая кислота); $R_f \sim 0,38$ (галловая кислота), $R_f \sim 0,44$ (гиперозид); $R_f \sim 0,47$ (рутин); $R_f \sim 0,85$ (феруловая кислота), идентичных зонам на хроматограмме исходного сбора.

Свободные сахара

Для хроматографического обнаружения свободных сахаров в качестве исследуемого раствора использовали 50% спиртовое извлечение экстракта сухого.

Получение водно-спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

На хроматограмме исследуемого образца экстракта сухого обнаружено 3 красно-фиолетовые зоны с $R_f \sim 0,39$ (сахароза); $R_f \sim 0,50$ (глюкоза); $R_f \sim 0,55$ (фруктоза), идентичные зонам на хроматограмме исходного сбора.

Арбутин

Для хроматографического анализа арбутина в качестве исследуемого раствора использовали извлечения из экстракта сухого метиловым спиртом.

Получение спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

После детектирования хроматограммы исследуемого образца экстракта сухого наблюдали появление 2-х зон голубого цвета с $R_f \sim 0,2$ (арбутин), $R_f \sim 0,85$ (гидрохинон) и зоны коричневого цвета с $R_f \sim 0,67$ (галловая кислота), идентичных зонам на хроматограмме исходного сбора.

Флавоноиды

Для хроматографического разделения флавоноидов в качестве исследуемого раствора использовали 70% спиртовое извлечение экстракта сухого. Получение водно-спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.1).

После проявления хроматограммы и просматривании в УФ-свете, наблюдали 5 зон адсорбции, окрашенных в желтый цвет с $R_f \sim 0,14$ (кверцетин); $R_f \sim 0,42$ (лютеолин); $R_f \sim 0,62$ (лютеолин-7-гликозид); $R_f \sim 0,70$ (гиперозид); $R_f \sim 0,78$ (рутин); $R_f \sim 0,88$ (нарингенин), идентичных зонам на хроматограмме исходного сбора.

Проведенные исследования водно-спиртовых и водных извлечений из экстракта сухого вышеуказанными методами хроматографии в тонком слое сорбента показали, что качественный состав исследуемого образца экстракта идентичен исходной растительной смеси. В ходе работы в экстракте сухом были идентифицированы: флавоноиды (рутин, гиперозид, лютеолин, лютеолин-7-гликозид, кверцетин, нарингенин) и фенолкарбоновые кислоты (галловая кислота),

гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая, феруловая), свободные сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза), фенологликозид (арбутин).

Из полученных результатов видно, в полученном экстракте имеется переход и обнаруживаются те же группы БАВ, которые обнаружены в исходном растительном сборе.

4.3.3.2 Идентификация веществ методом ВЭЖХ

Фенольные соединения

Полученные результаты исследования качественного состава флавоноидов, фенологликозидов, фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом были подтверждены и дополнены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для исследования использовали водно-спиртовое извлечение экстракта сухого, полученное экстракцией 70% этанолом. Получение водно-спиртового извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.3).

Результаты проведенного ВЭЖХ анализа исследуемого водно-спиртового извлечения экстракта представлены на рис. 4.3.3.2.1 и 4.3.3.2.2 и в табл. 4.3.3.2.3.

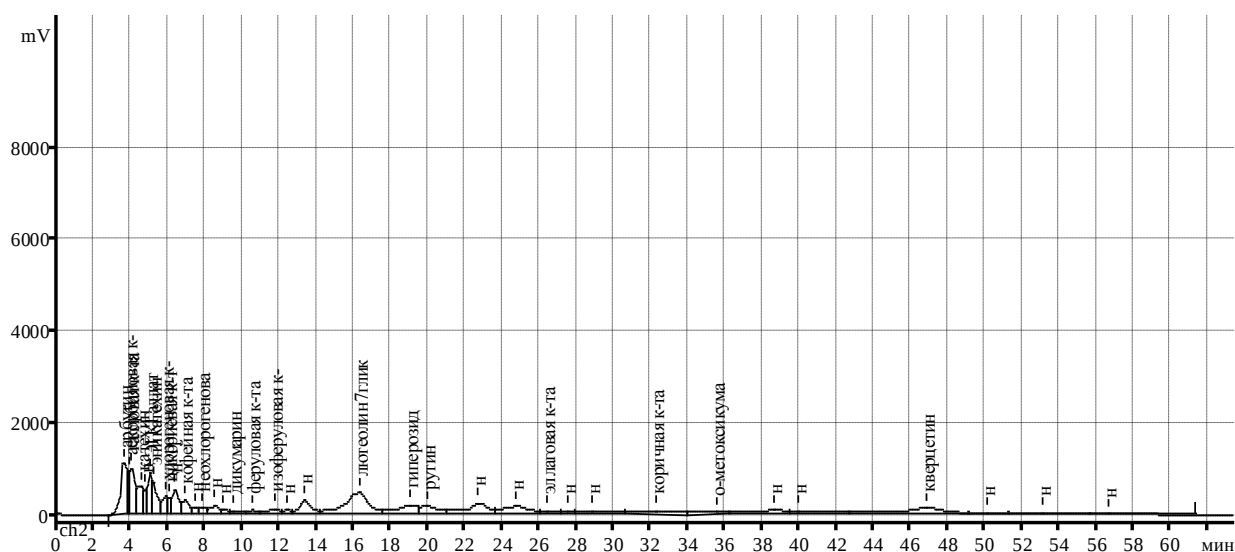


Рис. 4.3.3.2.1 ВЭЖХ-хроматограмма фенольных соединений водно-спиртового извлечения экстракта сухого изучаемого сбора

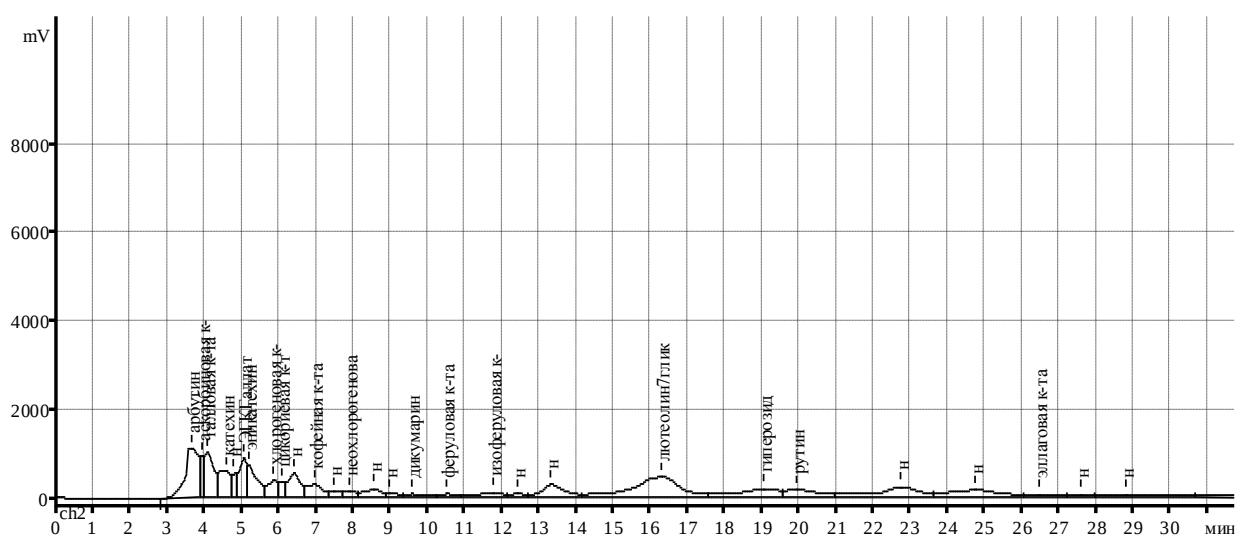


Рис. 4.3.3.2.2 ВЭЖХ-хроматограмма фенольных соединений водно-спиртового извлечения экстракта сухого изучаемого сбора

Таблица 4.3.3.2.3

Компонентный состав фенольных соединений экстракта сухого изучаемого сбора методом ВЭЖХ

№	Время, мин	Высота, mV	Площадь, mV*сек	Название
1	2	3	4	5
1.	3,622	1109,84	27954,46	Арбутин
2.	3,9	941,82	5062,97	Аскорбиновая к-та
3.	4,049	1018,30	18906,59	Галловая к-та
4.	4,547	604,85	13392,77	Катехин
5.	4,78	546,49	4562,70	Неидентифиц.
6.	5,029	890,25	13575,00	ЭГКГаллат
7.	5,184	717,53	12696,16	Эпикатехин
8.	5,843	390,19	8133,08	Хлорогеновая к-та
9.	6,082	365,08	3935,15	Цикориевая к-та
10.	6,39	568,40	12576,77	Неидентифиц.
11.	6,938	312,48	9348,23	Кофейная к-та
12.	7,467	154,15	3224,40	Неидентифиц.
13.	7,869	150,19	3659,63	Неохлорогеновая к-та
14.	8,518	213,54	7024,17	Неидентифиц.
15.	8,977	101,74	2588,94	Неидентифиц
16.	9,567	88,10	4116,91	Дикумарин
17.	10,52	91,19	3064,85	Феруловая к-та

Продолжение таблицы 4.3.3.2.3

1	2	3	4	5
18.	11,76	129,90	6929,83	Изоферуловая к-та
19.	12,41	92,07	2863,94	Неидентифиц.
20.	13,32	306,00	14280,54	Неидентифиц.
21.	16,3	478,17	45802,53	Лютеолин-7-гликозид
22.	19,02	210,66	17684,12	Гиперозид
23.	19,93	187,79	12274,29	Рутин
24.	22,73	753,78	22911,94	Неидентифиц.
25.	24,75	182,03	18954,18	Неидентифиц.
27.	26,45	77,66	5270,81	Эллаговая к-та
28.	27,57	65,67	2922,40	Неидентифиц.
29.	28,8	77,53	10311,05	Неидентифиц
30.	32,33	70,33	11973,52	Коричная к-та
31.	35,55	64,37	8328,14	о-метоксикумарин
32.	38,66	89,93	15351,54	Неидентифиц
33.	39,96	86,90	14185,00	Неидентифиц
34.	46,86	151,06	31527,52	Кверцетин
35.	50,16	36,63	4654,39	Неидентифиц
36.	53,07	38,92	7246,19	Неидентифиц
37.	56,67	11,46	2362,39	Неидентифиц

В сухом экстракте изучаемого сбора метод ВЭЖХ доказал присутствие в нем идентифицированных ранее веществ, а также дополнил состав фенольных соединений за счет обнаружения – аскорбиной кислоты, катехина, ЭГКГаллата, эпикатехина, цикориевой кислоты, кофейной кислоты, неохлорогеновой кислоты, дикумарина, эллаговой кислоты, коричной кислоты, о-метоксикумарина.

Свободные сахара и органические кислоты

Для идентификации свободных сахаров и органических кислот методом ВЭЖХ в качестве исследуемого раствора использовали водное извлечение экстракта сухого. Получение водного извлечения и хроматографическое исследование проводили по выше приведенным методикам (глава 2, п. 2.3.3).

Результаты хроматографического анализа исследуемого водного извлечения экстракта сухого представлены на рис. 4.3.3.2.4 и в табл. 4.3.3.2.5.

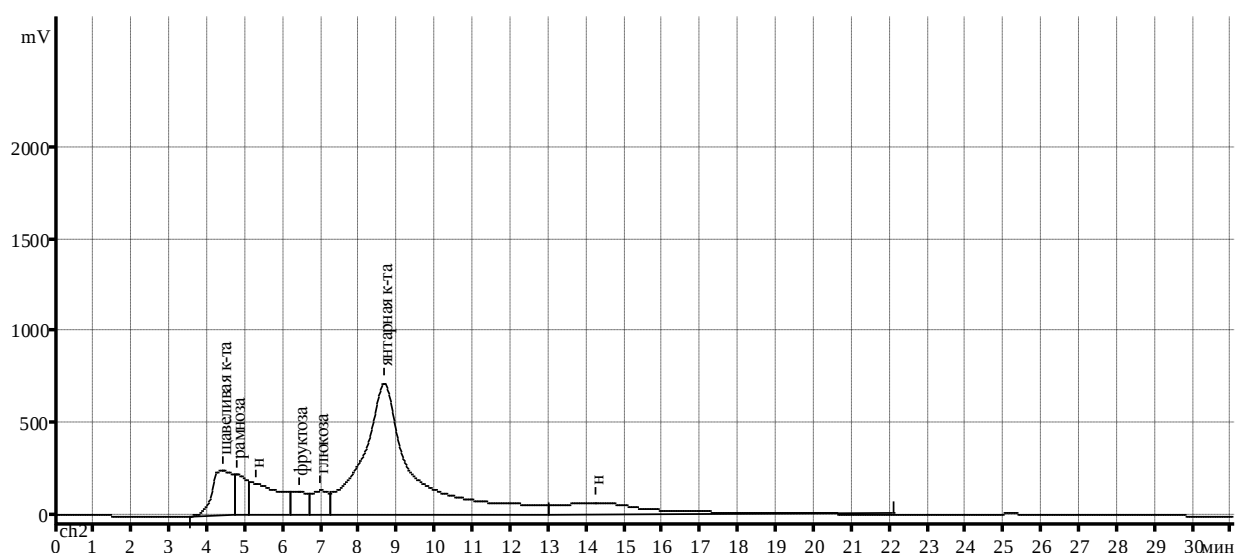


Рис. 4.3.3.2.4 ВЭЖХ-хроматограмма сахаров и органических кислот водного извлечения экстракта сухого изучаемого сбора

Таблица 4.3.3.2.5

Компонентный состав моносахаридов и органических кислот экстракта сухого изучаемого сбора методом ВЭЖХ

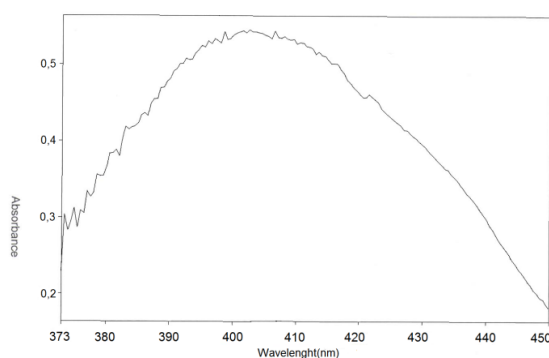
№	Время, мин	Высота, mV	Площадь, mV*сек	Название
1.	4,384	244,13	9139,53	Щавелевая к-та
2.	4,75	228,18	4886,25	Рамноза
3.	5,267	173,62	9747,49	Неидентифиц
4.	6,376	128,82	3875,83	Фруктоза
5.	6,962	136,69	4279,18	Глюкоза
6.	8,643	717,75	67186,26	Янтарная к-та
7.	14,25	68,66	12964,62	Неидентифиц.

Как видно из табл. 4.3.3.2.5 в водном извлечении экстракта сухого были обнаружены такие же соединения органических кислот (янтарная, щавелевая) и свободных сахаров (рамноза, глюкоза), как и в сборе, а также был идентифицирован моносахарид – фруктоза.

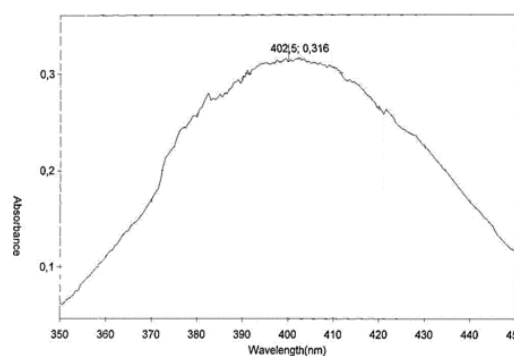
Таким образом, на основании полученных данных, можно заключить, что по качественному составу обнаружен полный переход БАВ из сбора в экстракт, что в свою очередь подтверждает рациональность разработанной ранее схемы получения экстракта сухого.

4.4 Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в экстракте сухом

Определение содержания суммы флавоноидов в экстракте сухом проводили на основе методики разработанной для исходного сбора. Поскольку максимумы поглощения комплексов 70% спиртовых растворов экстракта сухого и лютеолин-7-гликозида с раствором алюминия хлорида находятся в одной области 402 ± 5 нм, то в качестве стандартного образца использовали СО лютеолин-7-гликозид (рис. 4.4.1).



(1)



(2)

Рис. 4.4.1 Спектры поглощения комплексов спиртового извлечения «Фитоурол» экстракта сухого (1) и раствора стандартного образца лютеолин-7-гликозида с раствором алюминия хлорида (2)

Методика.

Точную навеску экстракта сухого массой 2,0 г помещают в колбу (объемом 150 мл), прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу оставляют на вибрационном встряхивателе на 30 мин, далее помещают в ультразвуковую баню на 20 мин. Для отделения нерастворившихся частиц экстракта от полученного раствора проводят фильтрацию через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем раствора доводят до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (раствор А).

В мерную колбу (объемом 25 мл) отмеряют 1,0 мл раствора А, добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III) и полученный объем доводят до метки 70% этиловым спиртом.

Раствор сравнения: в мерную колбу (объемом 25 мл) отмеряют 1 мл раствора А, добавляют 0,1 мл разведенной уксусной кислоты и доводят до метки – 95% этиловым спиртом (раствор должен быть свежеприготовленным).

Оптическую плотность полученных растворов измеряют на саморегистрирующем спектрофотометре «*Helios Alfa*» (Spectronic Unicam, Великобритания) через 40 минут при длине волны 402 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО лютеолин-7-гликозида (при длине волны 402 ± 5 нм): 1,0 мл СО лютеолин-7-гликозида отмеряют в колбу (объемом 25 мл), добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III), полученный объем доводят до метки 70% этиловым спиртом. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1,0 мл СО лютеолин-7-гликозида, 0,1 мл разведенной уксусной кислоты и 95% этиловый спирт до 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в экстракте сухом в пересчете на лютеолин-7-гликозид в процентах (X) вычисляют по формуле (1):

$$X = \frac{D^* \times 100 \times 25 \times M \times 1 \times 100 \times 100}{D \times M^* \times 100 \times 1 \times 25 \times (100 - W)} \quad (1)$$

где

D^* – оптическая плотность испытуемого раствора;

D – оптическая плотность СО лютеолин-7-гликозида;

M^* – масса экстракта сухого, г;

M – масса СО лютеолин-7-гликозида, г;

W – потеря в массе при высушивании экстракта сухого, %.

Приготовление раствора стандартного образца лютеолин-7-гликозида: точную навеску СО лютеолин-7-гликозида (массой 0,03 г) помещают в мерную колбу (объемом 100 мл), растворяют в 50 мл 70% этанола и доводят тем же растворителем до метки – 70% этиловым спиртом, перемешивают.

4.4.1 Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в экстракте сухом

Методика количественного определения суммы флавоноидов в экстракте сухом валидирована по критериям: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), специфичность, линейность [6, 5, 25, 28, 184, 188].

Правильность методики устанавливали путем проверки метода на модельных растворах СО лютеолин-7-гликозида. Модельные растворы готовили трёх концентраций с содержанием лютеолин-7-гликозида в % к исходной концентрации 80%, 100%, 120%. Исходная концентрация лютеолин-7-гликозида составляла 0,4 мг в 25 мл. Определение проводилось в трёх повторностях для каждой концентрации. Критерием приемлемости являлся средний % восстановления при использовании растворов концентраций 80%, 100%, 120%, скорректированный на 100% и его средняя величина должна находиться в пределах 98,0-102,0%.

Согласно нашим результатам % восстановления находился в пределах от 99,49% до 101,99%, и его средняя величина составила – 99,93% (табл. 4.4.1.1).

Таблица 4.4.1.1

Результаты проверки правильности методики

№	Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси в мг	Экспериментально найденное значение	
		Абсолютная величина, мг	Процент восстановления, %
1	2	3	4
1.	0,32		
1.1		0,323	100,9
1.2		0,319	99,57
1.3		0,316	98,77
среднее			99,75
2.	0,4		
2.1		0,394	98,49
2.2		0,402	100,43
2.3		0,408	101,99
среднее			100,3

Продолжение таблицы 4.4.1.1

1	2	3	4
3.	0,48		
3.1		0,485	101,02
3.2		0,475	98,9
3.3		0,401	100,29
среднее			99,74
Средний процент восстановления для 3-х концентраций в трёх повторностях			99,93

Определение *сходимости* проводили в разные дни с использованием спектрофотометра «*Helios Alfa*» (Spectronic Unicam, Великобритания) одним и тем же специалистом на одном образце экстракта сухого в 6 повторностях с содержанием суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид 3,3%. Оценка сходимости проводилась по коэффициенту вариации (CV). Согласно нашим результатам CV находится в интервале от 1,56% до 1,6%. Критерием приемлемости являлся коэффициент вариации для 6 измерений, который должен быть не более 2%. Он составил 1,6% (табл. 4.4.1.2).

Таблица 4.4.1.2

Результаты проверки сходимости методики

Дата испытаний	Сбор изучаемый с содержанием суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид 0,43%			
	№	Результаты определения	Стандартное отклонение S	Коэффициент вариации CV, %
1	2	3	4	5
1-ый день				
	1	3,2		
	2	3,3		
	3	3,3		
	4	3,3		
	5	3,3		
	6	3,2		
Среднее		3,27	0,00516	1,56

Продолжение таблицы 4.4.1.2

1	2	3	4	5
2-ой день				
	1	3,3		
	2	3,3		
	3	3,2		
	4	3,2		
	5	3,2		
	6	3,2		
Среднее		3,23	0,00516	1,26

Воспроизводимость устанавливали по результатам анализа одного образца экстракта сухого в двух лабораториях в 6 повторностях с содержанием суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид 3,3%. Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации для 6 измерений, который должен быть не более 2%. Он составил 1,25% (табл. 4.4.1.3).

Таблица 4.4.1.3

Результаты проверки воспроизводимости методики

Лаборатория	Экстракт сухой с содержанием суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид 3,3%			
	№	Результаты определения	Стандартное отклонение S	Коэффициент вариации CV, %
1.	1	3,20		
	2	3,30		
	3	3,30		
	4	3,30		
	5	3,25		
	6	3,25		
Среднее		3,27	0,0408	1,25
2.				
	1	3,25		
	2	3,25		
	3	3,25		
	4	3,20		
	5	3,20		
	6	3,30		
Среднее		3,24	0,0376	1,16

Определение *линейности* проводили на пяти концентрациях СО лютеолин-7-гликозида. Для анализа отвешивали точную навеску 0,02 г СО лютеолин-7-гликозида помещали в мерную колбу (объемом 25 мл), прибавляли 20 мл 70% спирта этилового и доводили объем раствора тем же спиртом до метки (раствор А). Далее в пять мерных колб вместимостью 25 мл вносили по 1 мл; 2 мл; 3 мл; 4 мл; 5 мл раствора А. К растворам во всех пяти колбах прибавляли 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III) и доводили до метки 70% спиртом этиловым, перемешивали. Оптическую плотность каждого из полученных растворов измеряли на саморегистрирующем спектрофотометре «Helios Alfa» (Spectronic Unicam, Великобритания) при длине волны 402 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Критерием приемлемости линейности являлся коэффициент корреляции, величина которого между рядом полученных значений должна быть не ниже 0,98, и совокупность данных можно описать прямой линией. В эксперименте линейность метода наблюдается в интервале концентраций 0,32-1,6 мг%, что подтверждается высоким коэффициентом корреляции ($r=0,999$) (табл. 4.4.1.4, рис. 4.4.1.5).

Таблица 4.4.1.4

Результаты проверки линейности методики

Оптическая плотность D	Концентрация СО лютеолин-7-гликозида, мг %	Коэффициент корреляции	$y=b \times x+a$	
			b	a
0,132	0,32	0,999	0,398	0,003
0,260	0,64			
0,380	0,96			
0,510	1,28			
0,644	1,60			

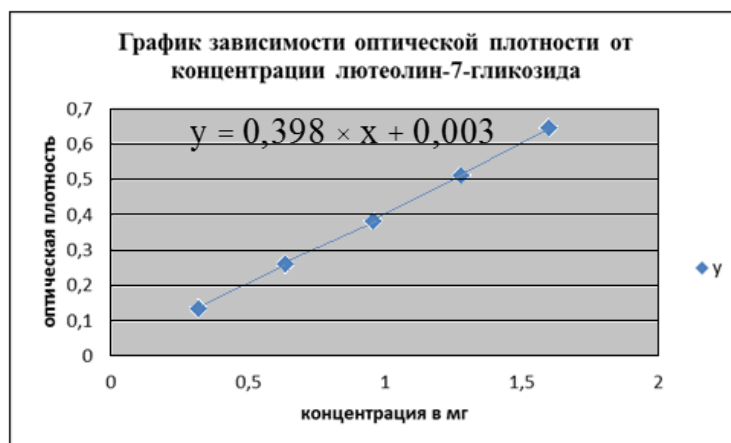


Рис. 4.4.1.5 График зависимости оптической плотности от концентраций СО лютеолин-7-гликозида

Специфичность методики подтверждали доказательством того, что способность к светопоглощению флавоноидов при определенной длине волны, сравнивается с аналогичной способностью стандартного образца. По методике количественного определения суммы флавоноидов были получены окрашенные комплексы экстракта сухого и СО лютеолин-7-гликозида. Спектры поглощения полученных комплексов снимали на саморегистрирующем спектрофотометре «Helios Alfa» (Spectronic Unicam, Великобритания) в интервале длин волн от 350 до 460 нм. Критерием приемлемости являлась идентичность спектра поглощения СО лютеолин-7-гликозида с алюминием хлорида со спектром поглощения экстракта сухого с тем же комплексообразователем. Представленные спектры поглощения (рис. 4.4.1) визуально подтверждают идентичность, что позволяет признать специфичность удовлетворительной.

Специфичность методики также была доказана методом с добавками. Испытание проводилось на одном образце экстракта в 3-х концентрациях с добавками СО лютеолин-7-гликозида. Критерием приемлемости являлась величина относительной ошибки опытов с добавками, которая должна находиться в пределах случайной ошибки методики. Величина относительной ошибки опытов с добавками находится в пределах случайной ошибки методики, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при определении суммы флавоноидов и о специфичности данной методики (табл. 4.4.1.6 и 4.4.1.7).

Таблица 4.4.1.6

Результаты проверки специфичности методики

№	Содержание флавоноидов в 1 мл (мг)	Добавлено СО лютеолин-7-гликозида (мг)	Ожидаемое содержание флавоноидов (мг)	Полученное содержание флавоноидов (мг) (среднее из 3-х определений)	Ошибка	
					абс., (мг)	отн., (%)
1.	29,56	1,00	30,56	31,17	+0,61	+2,0
2.	29,56	1,05	31,06	31,84	+0,78	+2,5
3.	29,56	2,0	31,56	30,93	-0,63	-2,0

Таблица 4.4.1.7

Результаты проверки специфичности методики

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	2,956	0,0108	0,104	0,047	4,39

На основании результатов, полученных при оценке методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид в экстракте сухом изучаемого сбора, можно оценить метод положительно по параметрам: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), специфичность, линейность (табл. 4.4.1.8).

Таблица 4.4.1.8

Результаты валидационной оценки методики количественного определения суммы флавоноидов в экстракте сухом в пересчёте на лютеолин-7-гликозид

№ п/п	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	2	3	4
1.	Правильность	Процент восстановления 98,0-102%	99,93%
2.	Сходимость	Коэффициент вариации не более 2%	1-ый день CV=1,56% 2-ой день CV=1,60%

Продолжение таблицы 4.4.1.8

1	2	3	4
3.	Воспроизводимость	Коэффициент вариации не более 2%	1-ая лаборатория: CV=1,25 2-ая лаборатория: CV=1,6
4.	Специфичность	1.Совпадение спектров поглощения 2.Относительная ошибка опытов с добавками должна находиться в пределах случайной ошибки методики, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.	1.Доказана идентичность спектров поглощения окрашенных комплексов водно-спиртового извлечения экстракта сухого изучаемого сбора и СО лютеолин-7-гликозида. 2.Относительная ошибка опытов с добавками находится в пределах случайной ошибки методики, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.
5.	Линейность и диапазон	Коэффициент корреляции должен быть не ниже 0,98	0,999 0,32-1,6 мг%

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин-7-гликозид в экстракте сухом изучаемого сбора. Данная методика в дальнейшем может быть использована при разработке проекта Фармакопейной статьи на «Фитоурол» экстракт сухой и установлении норм.

4.5 Количественное определение основных БАВ в экстракте сухом

Определение флавоноидов

Анализ исследуемых образцов экстракта сухого по разработанной нами методике (см. глава 4, п. 4.4) показал, что в проанализированных образцах экстракта сухого содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид варьирует от 2,83 до 3,07% (табл. 4.5.1). Рекомендуем установить норму содержания суммы флавоноидов в экстракте сухом не менее 2,8%

Таблица 4.5.1

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в «Фитоурол» экстракте сухом (n=5, p=0,95)

№	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид, %
1	2,83
2	3,05
2	2,95
4	3,07
5	2,88
Среднее из 5-ти определений	2,956±0,13

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 4.5.2.

Таблица 4.5.2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в «Фитоурол» экстракте сухом

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S ²	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	2,956	0,01088	0,1043	0,13	4,39

Среднее содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в экстракте сухом изучаемого сбора составляет 2,9±0,13%.

Определение арбутина

Количественное определение арбутина в сухом экстракте изучаемого сбора проводили методом йодометрического титрования по ГФ XI изд. [29] и методом ВЭЖХ (см. глава 2, п. 2.3.3) [155].

Результаты проведенных исследований количественного определения арбутина в экстракте сухом приведены в табл. 4.5.3.

Таблица 4.5.3

Результаты количественного определения арбутина в «Фитоурол» экстракте сухом разными методами (n=5, p=0,95)

№	Содержание арбутина найденное методом, %	
	ГФ XI	ВЭЖХ
1	4,03	2,23
2	4,14	2,25
3	4,06	2,28
4	4,17	2,29
5	4,21	2,24
Среднее из 5-ти определений	4,12±0,09	2,258±0,03

Как видно из табл. 4.5.3, содержание арбутина в разных образцах экстракта сухого методом йодометрического титрования колеблется от 4,03 до 4,21%, а методом ВЭЖХ – от 2,23 до 2,29%. Так, сравнение результатов определения арбутина разными методами показало, что фармакопейным методом результат в 1,5 раза выше, по сравнению с полученными результатами, найденными ВЭЖХ методом.

Метрологические характеристики методик представлены в табл. 4.5.4 и 4.5.5.

Таблица 4.5.4

Метрологические характеристики методики количественного определения арбутина в экстракте сухом изучаемого сбора фармакопейным методом

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	4,116	0,00183	0,04278	0,053	1,29

Таблица 4.5.5

Метрологические характеристики методики количественного определения арбутина в экстракте сухом изучаемого сбора методом ВЭЖХ

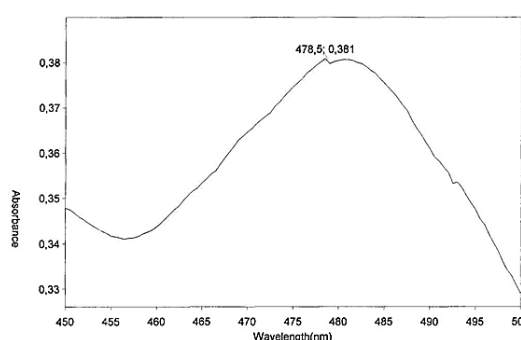
n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	2,258	0,00067	0,0258	0,032	1,43

Таким образом, согласно проведенным исследованиям среднее количественное содержание арбутина в экстракте сухом изучаемого сбора фармакопейным методом составило $4,12 \pm 0,09\%$; ВЭЖХ – $2,26 \pm 0,03\%$.

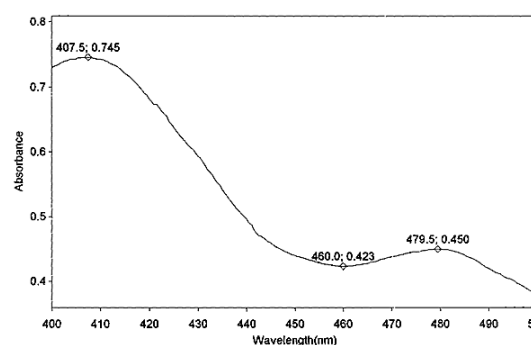
Определение полисахаридов (инулина)

Определение содержания суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в экстракте сухом изучаемого сбора проводили по методике ГФ РФ XIII изд. (см. глава 2, п. 2.3.4) [27].

В качестве стандартного образца использовали стандартный образец фруктозы, так как максимумы поглощения водных растворов стандартного образца фруктозы и экстракта сухого находятся в одной области 480 ± 2 нм (рис. 4.5.6).



(1)



(2)

Рис. 4.5.6 Спектры поглощения комплексов водного извлечения экстракта сухого и раствора стандартного образца фруктозы с резорцином

Результаты по количественному определению суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в экстракте приведены в табл. 4.5.7.

Таблица 4.5.7

Результаты количественного определения полисахаридов в пересчете на фруктозу в «Фитоурол» экстракте сухом (n=5, p=0,95)

№	Содержание полисахаридов в пересчете на фруктозу, %
1	3,60
2	3,89
3	3,74
4	3,64
5	3,89
Среднее из 5-ти определений	3,752±0,17

Как видно из табл. 4.5.7, в изученных образцах экстракта сухого содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу варьирует от 3,60 до 3,89%.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 4.5.8.

Таблица 4.5.8

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в экстракте сухом изучаемого сбора

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S ²	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	3,752	0,01847	0,1359	0,169	4,5

Таким образом, среднее содержание суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу в экстракте сухом составляет 3,75±0,17%.

Определение дубильных веществ

Определение дубильных веществ в пересчёте на танин в экстракте сухом изучаемого сбора проводили методом перманганометрического титрования согласно Государственной Фармакопеи (глава 2, п. 2.3.5) [27, 28].

Результаты проведенных исследований приведены в табл. 4.5.9.

Таблица 4.5.9

Результаты количественного определения дубильных веществ в пересчете на танин в «Фитоурол» экстракте сухом ($n=5$, $p=0,95$)

№ образца	Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %
1	3,93
2	3,98
3	4,09
4	4,11
5	3,95
Среднее из 5-ти определений	$4,012 \pm 0,04$

Как видно из табл. 4.5.9, в разных образцах экстракта сухого содержание дубильных веществ в пересчете на танин колеблется от 3,93 до 4,11%.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 4.5.10.

Таблица 4.5.10

Метрологические характеристики методики количественного определения дубильных веществ в экстракте сухом изучаемого сбора

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta \bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	4,012	0,00682	0,0826	0,11	2,56

Таким образом, среднее содержание суммы дубильных веществ в экстракте сухом составляет $4,01 \pm 0,11\%$.

Определение органических кислот

Определение содержания суммы свободных органических кислот в экстракте сухом проводили титриметрическим методом в пересчете на яблочную кислоту по методике Государственной Фармакопеи (см. глава 2, п. 2.3.5) [27, 28].

Анализ исследуемых образцов экстракта сухого показал, что содержание суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту варьирует от 1,93 до 2,10% (табл. 4.5.11).

Таблица 4.5.11

Результаты количественного определения органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в «Фитоурол» экстракте сухом (n=5, p=0,95)

№	Содержание органических кислот в пересчете на яблочную кислоту, %
1	2,01
2	1,93
3	2,10
4	1,96
5	2,04
Среднее из 5-ти определений	2,008±0,04

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 4.5.12.

Таблица 4.5.12

Метрологические характеристики методики количественного определения органических кислот в пересчете на яблочную кислоту в экстракте сухом изучаемого сбора

n	f	P, %	t (P,f)	$\bar{X}$, %	S^2	S	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E}$, %
5	4	95	2,78	2,008	0,00447	0,06685	0,083	4,13

Согласно проведенным исследованиям среднее содержание суммы органических кислот в экстракте сухом составляет 2,0±0,08%.

Проведенные исследования позволили определить, что в образцах экстракта сухого изучаемого сбора содержание флавоноидов от 2,83 до 3,07%, арбутина от 4,03 до 4,21%, полисахаридов (инулина) от 3,60 до 3,89%, дубильных веществ от 3,93 до 4,11%, органических кислот от 1,93 до 2,10% (табл. 4.5.13). Количественная стандартизация экстракта сухого может проводится по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид и арбутину.

**Количественное содержание БАВ в экстракте сухом изучаемого сбора
(n=5, p=0,95)**

№	Содержание, %				
	Сумма флавоноидов	Арбутин	Сумма полисахаридов (инулин)	Сумма дубильных веществ	Сумма органических кислот
1	2,83	4,17	3,60	3,93	2,01
2	3,05	4,14	3,89	3,98	1,93
3	2,95	4,06	3,74	4,09	2,10
4	3,07	4,12	3,64	4,11	1,96
5	2,88	4,09	3,89	3,95	2,04
среднее	2,96±0,13	4,12±0,05	3,75±0,17	4,01±0,11	2,01±0,08

Таким образом, стандартизация экстракта сухого «Фитоурол» проводится по количественному содержанию флавоноидов и арбутина.

Полученные данные могут быть использованы при разработке проекта Фармакопейной статьи на экстракт сухой «Фитоурол» и установлении норм.

4.6 Определение показателей качества экстракта сухого

Определение показателей качества экстракта сухого изучаемого сбора проводили согласно общей фармакопейной статье «*Экстракты*» ГФ XI изд., вып. 2 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.4.1.0021.15 [27, 28].

Определение внешнего вида экстракта сухого проводилось органолептически. На образцах пяти серий установлено, что экстракт сухой представляет собой аморфный порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета со специфическим запахом, горьковатого слегка вяжущего вкуса. Гигроскопичен, слегка комкуется.

Определение потери в массе при высушивании. Около 0,5000 г (точная навеска) экстракта сухого сушили при температуре от 85 до 100°C до постоянной массы.

Определение тяжёлых металлов проводилось в зольном остатке по ГФ РФ XII изд., вып. 1 и ГФ РФ XIII изд., ОФС.1.2.2.2.0012.15 [26, 27].

Результаты испытаний по пяти образцам экстракта сухого представлены в табл. 4.6.1.

Таблица 4.6.1

Результаты испытаний показателей качества экстракта сухого изучаемого сбора

Образец	Описание	Потеря в массе при высушивании, %	Тяжёлые металлы
1	соответствует	3,7	соответствует
2	соответствует	3,2	соответствует
3	соответствует	2,7	соответствует
4	соответствует	2,9	соответствует
5	соответствует	3,3	соответствует

Насыпная масса экстракта сухого «Фитоурол» при свободном падении – 0,48 г/см³, при уплотнении – 0,76 г/см³. Сыпучесть – 1,90 г/сек, угол естественного откоса 35-37°. Потеря в массе при высушивании не превышает 5%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Установлены оптимальные параметры экстрагирования изучаемого сбора для получения экстракта сухого: экстрагент – горячая вода (70°C), соотношение сырья и экстрагента – 1:10, измельченность сбора – 2 мм, кратность и время экстракции – трехкратно, 60 мин.; разработана лабораторная схема получения экстракта сухого из исходного сбора.

2. Качественными реакциями, а также методами УФ-спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ проведено изучение качественного состава экстракта сухого. Подтверждено наличие в экстракте: флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, гидроксикоричных кислот, свободных сахаров, арбутина, дубильных веществ, кумаринов, полисахаридов, а также идентифицирована аскорбиновая кислота.

3. Для экстракта сухого разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид. Методика может быть включена в проект НД на экстракт сухой «Фитоурол».

4. Установлено количественное содержание БАВ в «Фитоурол» экстракте сухом: флавоноидов $2,9 \pm 0,13\%$, арбутина $4,12 \pm 0,09\%$, полисахаридов (инулина) $3,75 \pm 0,17\%$, дубильных веществ $4,01 \pm 0,11\%$, органических кислот $2,0 \pm 0,08\%$.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое исследование урологических лекарственных средств. Установлена перспективность использования в качестве лекарственного растительного сырья: листьев брусники, травы хвоща полевого, корней лопуха, плодов укропа огородного, травы полыни обыкновенной.

2. На основании полученных экспериментальных данных обоснован и предложен оптимальный состав сбора: листья брусники – 30%; трава хвоща полевого – 30%; корни лопуха – 15%; плоды укропа огородного – 15%; трава полыни обыкновенной – 10%.

3. Проведено фармакогностическое исследование сбора «Фитоурол». Изучены и установлены морфолого-анатомические признаки изучаемого сбора. Получены фотографии внешних признаков и микроскопии, которые могут быть использованы как иллюстративный материал разделов нормативной документации, регламентирующей качество сырья. Определен состав и содержание БАВ в изучаемом сборе: флавоноидов $0,47 \pm 0,01\%$, арбутина $1,4 \pm 0,07\%$, полисахаридов (инулина) $1,78 \pm 0,07\%$, дубильных веществ $3,37 \pm 0,05\%$, органических кислот $1,06 \pm 0,04\%$, эфирных масел $0,34 \pm 0,02\%$, кумаринов, свободных сахаров.

4. Получен экстракт сухой на основе изучаемого сбора. Подобраны оптимальные условия экстрагирования сбора, обеспечивающие максимальный выход действующих веществ: экстрагент – горячая вода (70°C), соотношение сырья и экстрагента – 1:10, измельченность сбора – 2 мм, кратность и время экстракции – трехкратно, 60 мин. Определены параметры сушки экстракта сухого на ротационном испарителе: температура 60°C и давлении $0,1 \text{ кгс/см}^2$. Проведено изучение состава БАВ экстракта сухого и установлено содержание: флавоноидов $2,9 \pm 0,13\%$, арбутина $4,12 \pm 0,09\%$, полисахаридов (инулина) $3,75 \pm 0,17\%$, дубильных веществ $4,01 \pm 0,11\%$, органических кислот $2,0 \pm 0,08\%$, определены кумарины, аскорбиновая кислота.

5. Разработаны и валидированы (по параметрам: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), специфичность, линейность) спектрофотометрические методики количественного определения суммы

флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид в сборе (включена в проект НД на сбор «Фитоурол») и экстракте сухом.

6. Определены показатели качества сбора (экстрактивные вещества, извлекаемые водой, влажность, измельченность, зола общая, зола, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, органическая и минеральная примеси) и экстракта сухого (описание, потеря массы при высушивании), установлены их нормы; разработаны характеристики подлинности (внешние и микроскопические признаки, качественные реакции, ТСХ, УФ-спектр).

7. Проведено фармакологическое изучение комплексного урологического сбора. Установлено, что водное извлечение сбора «Фитоурол» обладает мочегонным, противовоспалительным, антиоксидантным действием. Определено, что превентивно-курсовое введение лабораторным животным отвара изучаемого сбора в объеме 10 мл/кг на фоне экспериментального уrolитиаза, индуцированного внутрижелудочным введением витамина Д₂, сопровождается снижением выраженности процесса камнеобразования и явлений воспалительного процесса в паренхиме почек.

8. Разработан проект НД на комплексный урологический сбор «Фитоурол».

Практические рекомендации

По результатам экспериментальных данных разработаны методики, которые целесообразно использовать в контрольно-аналитических лабораториях для контроля качества многокомпонентных средств на основе фармацевтических субстанций растительного происхождения. Результаты полученных исследований могут быть рекомендованы к использованию в учебном процессе студентов по дисциплинам фармакогнозия, фармацевтическая химия. Результаты фармакогностических и физико-химических исследований включены в проект НД на комплексный урологический сбор «Фитоурол».

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в клиническом исследовании предложенного растительного сбора. Также представляет интерес доклинические и клинические исследования экстракта сухого, полученного из разработанного сбора. Разработка инструкции по медицинскому применению и приготовлению отвара из сбора для лечения и профилактики мочекаменной болезни, что является, в настоящее время, перспективным направлением в клинической практике.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГОСТ – Государственный отраслевой стандарт

ГФ – Государственная Фармакопея

ЛП – лекарственный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МКБ – мочекаменная болезнь

НД – нормативная документация

ОСТ – Отраслевой стандарт

ОФС – Общая фармакопейная статья

РФ – Российская Федерация

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

ФЗ – Федеральный закон

ФС – Фармакопейная статья

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллина, С.Г. Фармацевтический анализ / под ред. Г.К. Будникова, С.Ю. Гармонова. – М.: Аргамак-медиа, 2013. – С. 316-319.
2. Александров, В.П. Фитотерапия в урологии / В.П. Александров. – СПб: Изд. д. СПбМАПО, 2013. – 153 с.
3. Аляев, Ю.Г. Мочекаменная болезнь: современные методы диагностики и лечения: руководство / Ю.Г. Аляев, М.А. Газимиев, В.И. Руденко, Н.И. Сорокин, В.С. Саенко. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 224 с.
4. Аляев, Ю.Г. Современные аспекты медикаментозного лечения пациентов с мочекаменной болезнью / Ю.Г. Аляев, В.И. Руденко // Эффективная фармакотерапия. Урология и нефрология. – 2016. – №5 (41) – С. 10-15.
5. Арзамасцев, А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4 – С.3-6.
6. Арзамасцев, А.П. Валидация фармакопейных методов (проект общей фармакопейной статьи) / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2001. – № 1. – С. 28-29.
7. Артамонов, В. Лопух - символ навязчивости / В. Артамонов // Наука и жизнь. – 1996. – №3. – С. 157-160.
8. Асатиани, В.С. Новые методы биохимической фотометрии / В.С. Асатиани. – М.: Наука, 1965. – 543 с.
9. Багирова, В.Л. Сборник методических рекомендаций по стандартизации лекарственных средств / В.Л. Багирова, Г.Н. Гильдеева, В.В. Косенко и др.; под ред. проф. Хабриева Р.У. – М.: Пеликан, 2006. – 392 с.
10. Барабой, В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. – М.: Наука, 1984. – 160 с.
11. Батько, А.Б. Экспериментальное обоснование применения блокаторов кальциевых каналов у больных с мочекаменной болезнью / А.Б. Батько, Б.К.

Комяков, Г.И. Дьячук, С.В. Выходцев, Р.А. Осешнюк // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 398-401.

12. Белоусов, В.В. Основы дозирования и таблетирования лекарственных порошков / В.В. Белоусов, М.В. Вальтер. – М.: Медицина, 1980. – 214 с.

13. Берхин, Е.Б. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Е.Б. Берхин, Ю.И. Иванов. – Барнаул: Алт. кн. изд-во, 1972. – 196 с.

14. Блинова, К.Ф. Растения для нас: справочное пособие / К.Ф. Блинова, В.В. Вандышев, М.Н. Комарова и др.; под ред. К.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб: Учебная книга, 1996. – 653 с.

15. Борисов, В.В. Мочекаменная болезнь. Терапия больных камнями почек и мочеточников / В.В. Борисов, Н.К. Дзеранов. – М.: Изд-во Российского общества урологов, 2011. – 88 с.

16. Величко, В.В. Лопух войлочный и лопух большой – перспективные источники гепатопротекторных средств / В.В. Величко, М.А. Ханина // Сб. науч. тр. Пятигор. гос. фармац. акад. Вып. 68. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск: Пятигор. ГФА, 2010. – С. 20-21.

17. Венгеровский, А.И. Лекции по фармакологии для врачей и провизоров: учебное пособие / А.И. Венгеровский. – Томск: СТТ, 1998. – 480 с.

18. Верткин, А.Л. Основные принципы фармакотерапии рецидивирующих инфекций мочевых путей / А.Л. Верткин, А.В. Носова // Эффективная фармакотерапия. – 2012. – №39. – С. 38-43.

19. Волобой, Н.Л. Изучение антимикробного действия арбутина и гидрохинона в отношении некоторых представителей грамотрицательной флоры / Н.Л. Волобой, Л.Ю. Бутакова, И.В. Смирнов // Химия растительного сырья. – 2013. – № 1. – С. 179-182.

20. Волобой, Н.Л. Особенности мочегонной активности арбутина и гидрохинона / Н.Л. Волобой, И.В. Смирнов, А.А. Бондарев // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27, № 3. – С. 131-133.

21. Вощула, В. И. Морфологические изменения в почке при мочекаменной болезни / В.И. Вощула, Т.Э. Владимирская, Н.К. Сугак // Медицина. – 2007. – № 3. – С. 66-70.
22. Вощула, В.И. Мочекаменная болезнь: этиотропное и патогенетическое лечение, профилактика: монография / В.И. Вощула. – Мн.: ВЭВЭР, 2006. – С. 6.
23. Вязова, А.В. Методические подходы к разработке медицинских технологий для больных хроническим бронхитом, сочетанным с нефропатиями / А.В. Вязова // Бюллетень. – 2013. – № 13. – С. 75-80.
24. Гитун, Т.В. Лекарственные травы и корни / Т.В. Гитун. – М.: Мир книги, 2007. – 256 с.
25. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений: в 6-ти ч. – Введ. 23.04.02. – М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2002.
26. Государственная фармакопея Российской Федерации XII издание. – ч. 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
27. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М.: 2015. Федеральная электронная медицинская библиотека. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>
28. Государственная фармакопея СССР. Одиннадцатое издание. Выпуск 1. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987 – 334 с.
29. Государственная фармакопея СССР. Одиннадцатое издание. Выпуск 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье – М.: Медицина, 1990 – 385 с.
30. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>
31. Дзеранов, Н.К. Лечение мочекаменной болезни – комплексная медицинская проблема / Н.К. Дзеранов, Д.А. Бешлиев // Consilium-medicum. – 2003. – Т.5. – №1 – С. 18-22.

32. Дзеранов, Н.К. Мочекаменная болезнь / Н.К. Дзеранов, О.В. Константинова; под ред. Н.А. Лопаткина, Т.С. Перепановой. – М.: Литтерра, 2006. – 824 с.
33. Дзеранов, Н.К. Цитратная терапия мочекаменной болезни / Н.К. Дзеранов // Медицинский совет. – 2011. – №9-10. – С. 95-97.
34. Дикорастущие полезные растения России / Отв. ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Издательство СПХФА, 2001. – С. 453-455.
35. Дроздова, И.Л. Исследование растительных источников полисахаридов и фенольных соединений и перспективы их практического использования в фармации: автореф. дис. ... докт. фарм. наук: 15.00.02 / Дроздова Ирина Леонидовна. – Пятигорск, 2006 – 47 с.
36. Дубашинская, Н.В. Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация (часть II) / Н.В. Дубашинская, О.М. Хишова, О.М. Шимко // Вестник фармации. – 2007. – №2 (36). – С. 70-79.
37. Дутов, В.В. Мочекаменная болезнь единственной почки: современные аспекты лечения: учебное пособие / В.В. Дутов, Э.А. Мамедов, И.Г. Паршенкова. – М.: МОНИКИ, 2015. – 23 с.
38. Ефремов, А.П. Травник для мужчин / А.П. Ефремов, А.И. Шретер. – М.: Асададь, 1996. – С. 204-205.
39. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения / М.Н. Запрометов. М.: Наука, 1993. – 271 с.
40. Кадыров, З.А. Мочекаменная болезнь: клинико-биохимические аспекты патогенеза, диагностики и лечения / З.А. Кадыров, В.Г. Истратов, С.И. Сулейманов, В.Ш. Рамишвили, И. Нусратуллоев. – М.: БИНОМ, 2013. – 184 с.
41. Каприн, А.Д. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за период 2002-2014 гг. по данным официальной статистики / А.Д. Каприн, О.И. Аполихин, А.В. Сивков, Т.В. Солнцева, В.А. Комарова // Экспериментальная и клиническая урология. – 2016. – №3. – С. 4-13.

42. Каприн, А.Д. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за 2003-2013 гг / А.Д. Каприн, О.И. Аполихин, А.В. Сивков, Н.Г. Москалева, Т.В. Солнцева, В.А. Комарова // Экспериментальная и клиническая урология. – 2015. – №2. – С. 4-12.

43. Карпеев, А.А. Фитотерапия: методические рекомендации МЗ РФ 2000/63 / А.А. Карпеев, Т.Л. Киселева, Ю.И. Коршикова, Е.Е. Лесиовская, Е.И. Саканян; под общ. ред. А.А. Карпеева, Т.Л. Киселевой. – М.: изд-во ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2006. – С. 9-42.

44. Кириллова, Е.С. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства при экспериментальном уrolитиазе: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Кириллова Елена Сергеевна. – Улан-Удэ, 2001. – 26 с.

45. Киселева, Т.Л. Краткая энциклопедия современной фитотерапии с основами гомеопатии: справочник практического врача / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова, И.Л. Блинков, М.А. Дронова, Е.В. Цветаева; под редакцией Т.Л. Киселевой. – М.: Изд-во Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2010. – 592 с.

46. Киселева, Т.Л. Разработка алгоритма действия по составлению сборов на основе опыта традиционной медицины России / Т.Л. Киселева, А.В. Чаузова, А.А. Карпеев // Фармация. – 2000. – №2. – С.15-18.

47. Кискина, Л.П. ККСА-метод прогнозирования биологической активности химических веществ / Л.П. Кискина, В.А. Долгополова, Т.В. Плетнева и др. // Мат. 2 межд. конф. «Здоровье и образование в XXI веке», Москва. – 2001. – С.95-96.

48. Клиническая нефрология: в 2-х т. / под ред. Е.М. Тареева. – М.: Медицина, 1983. – Т.1. – 464 с.

49. Ковалёва, Н.Г. Лечение растениями / Н.Г. Ковалева. – М.: Советский спорт, 1993. – С. 180-182.

50. Коздоба, А.С. Спазмолитическая терапия мочекаменной болезни / А.С. Коздоба // Рус. мед. журн. – 2012. – №18. – С. 898-904.

51. Колб, В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 316 с.
52. Коломиец, Н.Э. Фармакогностическое исследование рода *Equisetum* L. флоры сибиря как источника лекарственных средств: автореф. дис. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / Коломиец Наталья Эдуардовна. – М., 2010 – 42 с.
53. Колпаков, И.С. Мочекаменная болезнь / И.С. Колпаков. – М.: Мед. инф. аген-во, 2014. – 368 с.
54. Корсун, В.Ф. Клиническая фитотерапия в урологии / В.Ф. Корсун, Е.В. Корсун, А.П. Суворов. – М.: МК, 2011. – 336 с.
55. Корсун, В.Ф. Лечение кожных болезней препаратами растительного происхождения / В.Ф. Корсун, А.Е. Ситкевич, В.В. Ефимов. – Минск: Беларусь, 1995. – 383 с.
56. Кортиков, В.Н. Полная энциклопедия лекарственных растений / В.Н. Кортиков, А.В. Кортиков. – Ростов н/Д: Феникс, 2008. – 797 с.
57. Кругляк, Л.Г. Камни в почках, нефрит, цистит: Травы и сборы / Л.Г. Кругляк. – СПб.: ИД «ВЕСЬ», 2002. – 134 с.
58. Кулес, В.Г. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / В.Г. Кулес. – М.: Медицина, 1999. – 192 с.
59. Кутлуев, М.М. Новые аспекты каузального и формального генеза уrolитиаза / М.М. Кутлуев, И.Л. Пулин, Р.Р. Фархутдинов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2015. – Т. 10, №3. – С. 270-275.
60. Лагеръ, А.А. Фитотерапия заболеваний внутренних органов / А.А. Лагеръ. – Красноярск: Изд-во Краснояр. ун-та, 1985. – 144 с.
61. Лагеръ, А.А. Фитотерапия некоторых заболеваний / А.А. Лагеръ; под ред. проф. Г. В. Крылова. – Красноярск: Изд-во Краснояр. ун-та, 1986. – 112 с.
62. Лебеда, А.Ф. Перспективы использования растений в борьбе с иммунодефицитами / А.Ф. Лебеда // В сборнике: Сборник научных трудов по итогам 4 Междунар. конф. по медицине, ботанике. – Киев. – 1997. – С. 3-9.
63. Левковский, С.Н. Мочекаменная болезнь: прогнозирование течения и метафилактика / С.Н. Левковский. – СПб.: Типография Береста, 2010. – 120 с.

64. Лесиовская, Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии: учебное пособие / Е.Е. Лесиовская, Л.В. Пастушенков. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 592 с.
65. Ловкова, М.Я. Почему растения лечат / М.Я. Ловкова, А.М. Рабинович, С.М. Пономарева, Г.Н. Бузук, С.М. Соколова. – М.: Наука, 1990. – 256 с.
66. Лубсандоржиева, П.Б. Хроматоспектрофотометрическое определение арбутина в листьях *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch / П.Б. Лубсандоржиева, Б.С. Жигжитов, Т.Д. Даргаева // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – Т. 34, № 5. – С. 38-40.
67. Люй, Годун. Некоторые результаты изучения полыни обыкновенной *Artemisia vulgaris* L. в РФ и КНР. Обзор / Годун Люй, Т.Л. Киселева // Сборник научных трудов I Российского фитотерапевтического съезда, г. Москва, 14-16 марта 2008 г. – М.: Изд-во ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2008. – С.275-276.
68. Люй, Годун. Разработка методик количественного определения суммы флавоноидов в сырье *Artemisia vulgaris* L. – полыни обыкновенной, применяемой в традиционной медицине России и Китая / Годун Люй, Т.Л. Киселёва, А.В. Чаузова, О.А. Горошко // Сборник научных трудов II Российского фитотерапевтического съезда, г. Москва, 22-23 октября 2010 г. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2010. – С 184-187.
69. Люй, Годун. Фармакогностическое изучение отдельных представителей рода *Artemisia* L.: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Люй Годун. – М., 2014 – 24 с.
70. Маевский, Н.Ф. Флора средней полосы европейской части России / Н.Ф. Маевский. – 10-е изд. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
71. Мазо, Е.Б. Почечная колика на догоспитальном этапе / Е.Б. Мазо, А.Л. Верткин, Е.Ю. Тихоновская // Справочник поликлинического врача. – 2008. – № 9. – С. 17-20.

72. Маркарян, А.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование разработки профилактических средств, рекомендуемых при заболеваниях мочеполовой системы, и их стандартизация: дис. ... д-ра фарм. наук: 15.00.02, 15.00.01 / Маркарян Артем Александрович. – М., 2005. – 358 с.

73. Махлаюк, В.П. Лекарственные растения в народной медицине / В.П. Махлаюк. – М.: Нива России, 1992. – С. 287-288.

74. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей / М.Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2012. – 1216 с.

75. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.; под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

76. Микроскопическая техника: руководство / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

77. Мирахмедов, Ч.М. Применение лекарственных растений и их препаратов для лечения некоторых заболеваний кожи / Ч.М. Мирахмедов, Л.В. Белова // Вестн. дерматологии и венерологии. – 1983. – №7. – С. 23-27.

78. Мирошников, В.М. Лекарственные растения и препараты растительного происхождения в урологии: Учебное пособие / В.М. Мирошников. – М.: Медпресс-информ, 2005. – 240 с.

79. Моисеев, Д.В. Определение арбутина в листьях брусники обыкновенной методом ВЭЖХ / Д.В. Моисеев // Вестник фармации. – 2011. – № 1. – С. 40-45.

80. Назаров, Т.Х. Современные аспекты этиологии и патогенеза мочекаменной болезни / Т.Х. Назаров, Н.С. Тагиров, А.Г. Васильев, С.А. Маджидов, М.А. Ахмедов // Педиатр. – 2014. – Т. V №3. – С. 101-109.

81. Николаев, С.М. О рациональном подходе к разработке многокомпонентных лекарственных препаратов / С.М. Николаев, Т.Д. Даргаева, Г.И. Российская и др. – Улан-Удэ, 1986. – 49 с.

82. Никонов, Г.К. Основы современной фитотерапии / Г.К. Никонов, Б.М. Мануйлов. – М.: Медицина, 2005. – 520 с.
83. Носаль, М.А. Лекарственные растения и способы их применения в народе / М.А. Носаль, И.М. Носаль. – М.: Профиздат, 1993. – С. 31-33.
84. Онегин, С.В. Разработка методики фотоэлектроколориметрического определения арбутина / С.В. Онегин; под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича // Сборник статей молодых ученых и специалистов. – Томск: СГМУ, 2003. – 268 с.
85. Отраслевой стандарт 91500.05.001-00 Стандарт качества лекарственных средств. Основные положения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.consultpharma.ru/index.php/documents/drugs/495-915000500100-1>.
86. ОФС 42-0011-03. Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье. Стронций-90, цезий-137. Отбор проб, анализ, оценка результатов.
87. Петров, Е.В. Теоретические предпосылки разработки рецептур многокомпонентных фитопрепаратов на основе опыта традиционной медицины / Е.В. Петров, Т.А. Асеева, Г.В. Чехирова // БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – №3(67). – С.222-224.
88. Попов, В.И., Лекарственные растения / В.И. Попов, Д.К. Шапиро, И.К. Данусевич – Мн.: Полымя, – 1990. – С. 167.
89. Пронченко, Г.Е. Путешествие в мир фармакогнозии / Г.Е. Пронченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176 с.
90. Пшукова, И.В. Определение содержания биологически активных веществ в растительном сырье лопуха большого флоры Северного Кавказа / И.В. Пшукова, В.А. Карпенко // Сб. науч. тр. Пятигор. гос. фармац. акад. Вып. 65. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск: Пятигор. ГФА, 2010. – С. 101-102.
91. Пытель, Ю.А. Уратный нефролитиаз / Ю.А. Пытель, И.И. Золотарев. – М.: Медицина, 1995. – 176 с.

92. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: Часть I – Семейства Lysorodiaceae – Ephedraceae, часть II – Дополнения к 1–7-му томам. Спб.: Мир и семья-95, 1996. – 571 с.

93. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 5. Семейство Asteraceae (Compositae). Часть 1. Роды *Achillea*-*Doronicum* / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – Спб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012. – 320 с.

94. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – Спб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 513 с.

95. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). – Спб.: Наука, 1993. – 352 с.

96. Решетникова, М.Д. Фармакогностическое изучение хвоща полевого: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Решетникова Мария Дмитриевна. – Уфа, 1993. – 17 с.

97. Российская энциклопедия биологически активных добавок к пище: учебное пособие / под общей ред. В.И. Петрова, А.А. Спасова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 1056 с.

98. Россоловский, А.Н. Мочекаменная болезнь: эволюция представлений / А.Н. Россоловский, О.Л. Березинец, Б.И. Блюмберг // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2014. – Т.4, №1. – С.84-86.

99. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2(R1) // Фармация. – 2008. – № 4. – С. 3-10.

100. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др. Разработчики: В.Л. Багирова, А.И. Гризодуб, Т.Х. Чибиляев и др. – М., 2007. – 48 с.

101. Рыдшок, Т.Д. Лекарственные растения в борьбе с сахарным диабетом / Т.Д. Рыднюк // Мед. помощь. – 1993. – №4. – С. 59-61.

102. Рычкова, Ю.В. Лечение крапивой и лопухом / Ю.В. Рычкова. – М.: РИПОЛ классик, – 2006. – С. 10.
103. Самылина, И. А. Лекарственные растительные сборы / И. А. Самылина, А. А. Сорокина, Н. В. Пятигорская // Фарматека. – 2010. – № 10. – С. 80-82.
104. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т. 2 – 384 с.
105. Самылина, И.А. Фармакогнозия: учебник / И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 976 с.
106. Самылина, И.А., Перспективы создания сухих экстрактов / И.А. Самылина, О.А. Блинова, Л.А. Кумышева, С.Д. Марченко, А.И. Иванов // Фармация. – 2006. – № 2. – С. 43-46.
107. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.
108. Синяков, А.Ф. Лекарственные растения / А.Ф. Синяков. – М: Эксмо, 2010. – 608 с.
109. Сладкова, О.В. Крапива, одуванчик, лопух. Лечение без лекарств / О.В. Сладкова. – М.: Мир книги, 2011. – 192 с.
110. Смылова, О.А. Идентификация полисахаридов и органических кислот в сборе, обладающем уrolитической активностью / О.А. Смылова, А.А. Маркарян // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы и перспективы развития медицины». – Омск: ИЦРОН, 2015. – № 2. – С. 126-127.
111. Смылова, О.А. Изучение стадии экстрагирования при получении сухого экстракта на основе сбора уrolитического / О.А. Смылова, А.А. Маркарян, О.В. Евдокимова, И.Ю. Глазкова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. – №5 (10). – С. 9-13.
112. Смылова, О.А. Исследования по идентификации и определению содержания арбутина в уrolитическом растительном сборе / О.А. Смылова, А.А. Маркарян // «Современная медицина: актуальные вопросы»: Сб. ст. по

материалам XLI междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск: СибАК, 2015. – №3 (39). – С. 84-91.

113. Смыслова, О.А. Качественная и количественная оценка содержания сахаров в комплексном растительном средстве для терапии и профилактики уrolитиаза / О.А. Смыслова, А.А. Маркарян // «Научная дискуссия: вопросы медицины»: Сб. ст. по материалам XXXVI междунар. заочной науч.-практ. конф. – М.: Международный центр науки и образования, 2015. – С. 83-89.

114. Смыслова, О.А. Количественное определение дубильных веществ перманганатометрическим методом в фитокомпозиции с уrolитической активностью / О.А. Смыслова, А.А. Маркарян // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях». – Казань: ИЦРОН, 2015. – № 2. – С. 141-143.

115. Смыслова, О.А. Количественное определение флавоноидов в комплексном растительном средстве с уrolитической активностью / О.А. Смыслова, А.А. Маркарян, О.В. Евдокимова, И.Ю. Глазкова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. – №3 (8). – С. 54-59.

116. Смыслова, О.А. Новое перспективное комплексное растительное средство для терапии и профилактики мочекаменной болезни / О.А. Смыслова, А.А. Маркарян, И.Ю. Глазкова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. – №1 (6). – С. 31-36.

117. Смыслова, О.А. Разработка и фитохимическое изучение растительной композиции для лечения и профилактики мочекаменной болезни / О.А. Смыслова, А.А. Маркарян, И.Ю. Глазкова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. – №1 (6). – С. 44-47.

118. Смыслова, О.А. Хроматографическое исследование фенольных соединений многокомпонентного растительного сбора для лечения и профилактики мочекаменной болезни / О.А. Смыслова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. – №1 (6). – С. 14-19.

119. Смыслова, О.А. Хроматографическое исследование эфирного масла сбора уrolитического / О.А. Смыслова // «Современная медицина: актуальные вопросы»: Сб. ст. по материалам ХLI междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск: СибАК, 2015. – №3 (39). – С. 91-96.
120. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям. (Фитотерапия) / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – 3 изд., стереотип. М.: Металлургия, 1989. – 512 с.
121. Соколов, С.Я. Фитотерапия и фитотерапевтика: руководство для врачей / С.Я. Соколов. – М.: Мед. информ. агентство, 2000. – 976 с.
122. Сумина, Е.Г. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение / Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков, Н.В. Тюрина – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2002. – 102 с.
123. Темирбулатов, Р.А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р.А. Темирбулатов, Е.И. Селезнев // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209-211.
124. Трапезникова, М.Ф. Комплексное лечение урологических заболеваний, сопровождающихся нарушением уродинамики верхних мочевых путей: учеб. пособие / М.Ф. Трапезникова, Н.В. Бычкова, С.Б. Уренков, К.В. Поздняков, Л.М. Колобова, А.А. Подойницын. – Москва: МОНИКИ, 2006. – 34 с.
125. Турова, А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. / А.Д. Турова, Э.Н. Сапожникова – М.: Медицина, 1982. – 288 с.
126. Узденов, М.А. Консервативная противорецидивная терапия больных мочекаменной болезнью / М.А. Узденов, Э.К. Яненко, И.Д. Гербекова // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6, №3. – С. 95-99.
127. Фармакогнозия. Лекарственное сырьё растительного и животного происхождения: учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 863 с.
128. Федосеева, Л.М. Анализ арбутина подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.),

произрастающего на Алтае / Л.М. Федосеева // Химия растительного сырья. – 2003. – № 1. – С. 73-77.

129. ФС 42-2094-83. Трава полыни обыкновенной высушенная.

130. Харкевич, Д.А. Фармакология: учебник / Д.А. Харкевич. – 10-е изд., испр., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

131. Чабан, Н.Г., Фитохимические основы создания препаратов для литолиза оксалатных конкрементов / Н.Г. Чабан, А.Е. Степанов, Л.М. Рапопорт, Д.Г. Цариченко, Д.О. Подволоцкий // Вестник МИТХТ. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 37-45.

132. Черепанова, Е.В. Метафилактика мочекаменной болезни в амбулаторных условиях / Е.В. Черепанова, Н.К. Дзеранов // Экспериментальная и клиническая урология. – 2010. – № 3. – С. 33-39.

133. Чибисов, С.М. Мочекаменная болезнь: ассортимент лекарственных средств / С.М. Чибисов, Т.С. Илларионова, Е.В. Харлицкая, Д.С. Скрылев, Д.Г. Стрелков // Фундаментальные исследования. – 2006. – №11. – С. 21-30.

134. Чукарина, Е.В. Определение арбутина и гидрохинона в листьях толокнянки, брусники и фитопрепаратах, приготовленных на их основе / Е.В. Чукарина, А.М. Власов, К.И. Эллер // Вопросы питания. – 2007. – Т. 76, № 3. – С.82-87.

135. Шахмачев, В.И. Лекарственные растения в урологии / В.И. Шахмачев. Чебоксары: Чуваш.кн.изд-во, 1995. – 208 с.

136. Шепелева, Н.В. Некоторые особенности изготовления готовых лекарственных средств из сухих экстрактов / Н.В. Шепелева, В.Ф. Охотникова // Сборник трудов Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений. «Химия, технология, медицина». – М.: ВИЛАР, 2000. – С. 168-170.

137. Шестаев, А.Ю. Метафилактика оксалатного уrolитиаза у больных с метаболическим синдромом / А.Ю. Шестаев, М.В. Паронников, В.В. Протощак и др. // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – № 3. – С. 53-56.

138. Шматков, Д.А. Определение инулина в корнях лопуха большого / Д.А. Шматков, К.В. Беляков, Д.М. Попов // Фармация. – 1998. – № 6. – С. 17-19.
139. Ali, E.A. The pharmacological importance of *Anethum graveolens*. A review / E.A. Ali // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. – 2014. – Vol. 6(4). – PP.11-13.
140. Alok, S. Pathophysiology of kidney, gallbladder and urinary stones treatment with herbal and allopathic medicine: A review / S. Alok, S.K.Jain, A. Verma, M. Kumar, M. Sabharwal // Asian Pac. J. Trop. Dis. – 2013. – Vol. 3, N 6. – PP. 496-504.
141. Ashok, P.K. Evaluation of analgesic and antiinflammatory activities of aerial parts of *Artemisia vulgaris* L. in experimental animal models / P.K. Ashok, K. Upadhyaya // J. Biolog. Act. Prod. Nature. – 2013. – Vol. 3 (1). – PP. 101-105.
142. Bagga, H.S. New insights into the pathogenesis of renal calculi / H.S. Bagga, T. Chi, J. Miller, M.L. Stoller // Urol Clin North Am. – 2013. – Vol. 40, N 1. – PP.1-12.
143. Baheti, D.G. Antiurolithiatic activity of a polyherbal formulation against calcium oxalate induced urolithiasis in rats / D.G. Baheti, S.S. Kadam // J. Adv. Pharm. Edu. Res. – 2013. – Vol. 3. – PP. 31-40.
144. Bora, K.S. The genus *Artemisia*: a comprehensive review / K.S. Bora, A. Sharma // Pharm Biol. – 2011. – Vol. 49(1). – PP. 101-109.
145. Brikowski, T.H. Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States / T.H. Brikowski, Y. Lotan, M.S. Pearle // Proc Natl Acad Sci USA. – 2008. – Vol. 105, N 28. – PP. 9841-9846.
146. Chang, I.H. Possible relationship between metabolic syndrome traits and nephrolithiasis: incidence for 15 years according to gender / I.H. Chang, K.D. Kim, Y.T. Moon et al. // Korean. J. Urol. – 2011. – Vol. 52, N 8. – PP. 548-553.
147. Cho, S.T. Correlation of metabolic syndrome with urinary stone composition / S.T. Cho, S.I. Jung, S.C. Myung, T.H. Kim // Int. J. Urol. – 2013. – Vol. 20, N 2. – PP. 208-213.
148. Daudon, M. Epidemiology of urolithiasis / M. Daudon, B. Knebelmann // Rev. Prat. – 2011. – Vol. 61, N 3. – PP.372-378.

149. Do Monte, F.H. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice / F.H. Do Monte, J.G. Jr. Santos, M. Russi et al. // *Pharmacol. Res.* – 2004. – Vol. 49 (3). – PP. 239-243.
150. European Pharmacopoeia. 6th edition. Strasbourg: EDQM, 2007.
151. European Pharmacopoeia. 6th edition. Supplement 6.2. Strasbourg: EDQM, 2007.
152. European Pharmacopoeia. 6th edition. Supplement 6.4. Strasbourg: EDQM, 2008.
153. European Pharmacopoeia. 7th edition. Strasbourg: EDQM, 2011.
154. European Pharmacopoeia. 7th edition. Supplement 7.2. Strasbourg: EDQM, 2011.
155. European Pharmacopoeia. 8th edition. Strasbourg: EDQM, 2013.
156. Fatemeh, K. Antiproliferative activity of aqueous extract from *Arctium lappa* L. root in human erythroleukemia cell line (k562) and lymphocyte cell / K. Fatemeh, P. Khosro, F.T. Ahmad // *Life Sci. J.* – 2013. – Vol. 10, № 6s. – PP. 656-661.
157. Ferracane, R. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves / R. Ferracane, G. Graziani, M. Gallo, V. Fogliano, A. Ritieni // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 51(2). – PP. 399-404.
158. Filgueiras, P.S. Metabolic syndrome and associated urolithiasis in adults enrolled in a community-based health program / P.S. Filgueiras, J.R. Almeida, H.C. Kang, M.L. Rosa, J.R. Lugon // *Fam. Pract.* – 2013. – Vol. 30, N 3. – PP. 276-281.
159. Gharib Naseri, M.K. Antispasmodic effect of *Anethum graveolens* fruit extract on rat ileum / M.K. Gharib Naseri, A. Heidari // *Int. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 3 (3). – PP. 260-264.
160. Gladchenko, M.P. The studying of diuretic activity of the extract of the herbs of the *berteroa incana* / M.P. Gladchenko, E.B. Artyushkova, I.L. Drozdova, T.I. Lupilina // *Dig. Scient. J.* – 2014. – Vol. 4. – URL: <http://www.science-education.ru/pdf/2014/4/215.pdf>.

161. Goth, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range / L. Goth // *Clin. Chimica Acta*. – 1991. – Vol. 196. – N2-3 – PP. 143-152.
162. Grases, F. Urolithiasis and phytotherapy / F. Grases, G. Melero, A. Costa-Bauza, R. Prieto, J.G. March // *Int. Urol. Nephrol.* – 1994. – Vol. 26 (5). – PP. 507-511.
163. Gründemann, C. Equisetum arvense (common horsetail) modulates the function of inflammatory immunocompetent cells / C. Gründemann, K. Lengen, B. Sauer, M. Garcia-Käufer, M. Zehl, R. Huber // *BMC Complement Altern. Med.* – 2014. – Vol. 14:283. – URL: <https://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/283>.
164. Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency / B. Havsteen // *Biochemical Pharmacology*. – 1983. – Vol. 32. – № 7. – PP. 1141-1148.
165. Jana, S. Anethum graveolens: An Indian traditional medicinal herb and spice / S. Jana, G.S. Shekhawat // *Pharmacogn Rev.* – 2010. – Vol. 4(8). – PP. 179-184.
166. Jyothi, M. Joy. Potent herbal wealth with litholytic activity: a review / M. Joy. Jyothi, S. Prathyusha, S. Mohanalakshmi et al. // *Int. J. of Innov. Drug Disc.* – 2012. – Vol. 2, № 2. – PP. 66-75.
167. Kaur, G.J. Antibacterial and phytochemical screening of Anethum graveolens, Foeniculum vulgare and Trachyspermum ammi / G.J. Kaur, D.S. Arora // *BMC Complement Altern Med.* – 2009. – Vol. 9, № 30. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2736926/>.
168. Kikugawa, K. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid / K. Kikugawa, T. Kojima, S. Yamaki, H. Kosugi // *Analyt. Biochem.* – 1992. – Vol. 202. – PP. 249-255.
169. Knan, A.U. Antispasmodic and bronchodilator activities of Artemisia vulgaris are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx / A.U. Knan, A.H. Gilani // *J. Ethnopharmacol.* – 2009. – Vol. 126 (3). – PP. 480-486.

170. Koppula, S. *Anethum graveolens* Linn (Umbelliferae) extract attenuates stress-induced urinary biochemical changes and improves cognition in scopolamine-induced amnesic rats / S. Koppula, D.K. Choi // *Trop. J. Pharm. Res.* – 2011. – Vol. 10 (1). – PP. 47-54.
171. Mahran, G.H. Investigation of diuretic drug plants. Phytochemical screening and pharmacological evaluation of *Anethum graveolens* L., *Apium graveolens* L., *Daucus carota* L. and *Eruca sativa* Mill / H.A. Kadry, Z.G. Isaac, C.K. Thabet, M.M. Al-Azizi, M.M. El-Olemy // *Phytother. Res.* – 1991. – Vol. 5. – PP. 169-172.
172. Myagmar, B.E. Antioxidant activity of medicinal herb *Rhodococcum vitis-idaea* on galactosamine-induced liver injury in rats / E. Shinno, T. Ichiba, Y. Aniya // *Phytomedicine.* – 2004. – Vol. 11 (5). – PP. 416-423.
173. Nagal, A. Herbal resources with antiurolithiatic effects: a review / A. Nagal, R.K. Singla // *Indo Gl. J. of Pharm. Scien.* – 2013. – Vol. 3(1). – PP. 6-14.
174. Naseri, M. The study of anti-inflammatory activity of oil-based dill (*Anethum graveolens* L.) extract used topically in formalin-induced inflammation male rat paw / M. Naseri, F. Mojab, M. Khodadoost et al. // *Iran. J. Pharm. Res.* – 2012. – Vol. 11(4). – PP. 1169-1174.
175. Porpiglia, F. Nifedipine versus tamsulosin for the management of lower ureteral stones / F. Porpiglia, G. Ghignone, C. Fiori et al. // *J. Urol.* – 2004. – Vol. 172. – PP. 568-571.
176. Predes, F.S. Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts / F.S. Predes, A.L. Ruiz, J.E. Carvalho et al. // *BMC Complement Altern Med.* – 2011. – Vol. 11, № 25. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3073957/>
177. Shyu, Y.S. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower / Y.S. Shyu, J.T. Lin, Y.T. Chang et al. // *Food Chemistry.* – 2009. – Vol. 115, № 2. – PP. 515-521.
178. Smyslova, O.A. Characteristics of the new comprehensive herbal medicine for the treatment and prevention of urolithiasis / O.A. Smyslova, A.A. Markaryan, O.V.Evdokimova, I.U. Glazkova, M.A. Yaroshenko // *Biol. Med.* – 2015. – Vol. 7, №

2. – URL: http://www.biolmedonline.com/Articles/Vol7_2_2015/BM-070-15-Characteristics-of-the-new-comprehensive-herbal-medicine-for-the-treatment-and-prevention-of-.pdf.

179. Smyslova, O.A. Chromatographic study of flavonoids multi-plant collection for treatment and prevention of urolithiasis / O.A. Smyslova, A.A. Markaryan // Proceedings of the 6th European Conference on Biology and Medical. «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH. – Vienna, 2015. – PP. 135-138.

180. Smyslova, O.A. Study of chemical composition of the new urolithic herbal tea / O.A. Smyslova, A.A. Markaryan, M.A. Yaroshenko // Biol. Med. – 2015. – Vol. 7, № 2. – URL: http://www.biolmedonline.com/Articles/Vol7_2_2015/BM-085-15_Study-of-chemical-composition-of-the-new-urolithic-herbal-tea.pdf.

181. Soygur, T. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and residual fragments after shockwave lithotripsy in caliceal calcium urolithiasis: A randomized controlled trial / T. Soygur, A. Akbay, S. Kupeli // J. Endourology. – 2002. – Vol. 16 (3). – PP. 149-152.

182. Taylor, E.N. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones / E.N. Taylor, M.J. Stampfer, G.C. Curhan // JAMA. – 2008. – Vol. 293, N 4. – PP. 455-462.

183. Temraz, A. Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris* / A. Temraz, W.H. El-Tantawy // Pac. J. Pharm. Sci. – 2008. – Vol. 21(4). – P. 321-326.

184. The United States Pharmacopeia / The Nacional Formular XXVII/19. – 2004. – PP. 2622-2625.

185. Trinchieri, A. Epidemiology of urolithiasis: an update / A. Trinchieri // ClinCases Miner Bone Metab. – 2008. – Vol. 5, N 2. – PP.101-106.

186. Tunon, H. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis / H. Tunon, C. Olavsdotter, L. Bohlin // J. Ethnopharmacol. – 1995. – Vol. 78 (2). – PP. 61-76.

187. Uslu, V.E. Optimization of extraction conditions for active components in *Equisetum arvense* extract / V.E. Uslu, I. Erdogan, O. Bayraktar, M. Ates // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2013. – Vol. 18 (2). – PP. 8115-8130.

188. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Recommended for Adoption at. Step 4 of the ICN Process on 6 November 1996 by the ICN Steering Committee.

189. Wojnicz, D. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli* / D. Wojnicz, A.Z. Kucharska, A. Sokol-Letowska et al. // *Urol Res*. – 2012. – Vol. 40 (6). – PP. 683-697.

190. Yarnell, E. Botanical medicines for the urinary tracts. / Yarnell E. // *World J. Urol*. – 2002. – Vol. 20(5). – PP. 285-293.

191. Yasui, T. Epidemiology of urolithiasis for improving clinical practice / T. Yasui, R. Ando, A. Okada et al. // *Hinyokika Kyo*. – 2012. – Vol. 58, N 12. – PP. 697-701.

192. Zou, Q. Development of an LC/MS/MS method in order to determine arctigenin in rat plasma: its application to a pharmacokinetic study / Q. Zou, Y. Gu, R. Lu et al. // *Biomed. Chromatogr*. – 2013. Vol. 27(9). – PP.1123-1128.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

“УТВЕРЖДАЮ”

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени
И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
кандидат фармацевтических наук,
доцент Т.М. Литвинова



«31» 05 2017 г.

А К Т

внедрения в учебный процесс
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
результатов диссертационного исследования
Смысловой Ольги Александровны
на тему «Исследования по разработке и стандартизации комплексного урологического
растительного средства»

Мы, нижеподписавшиеся, к.т.н., доцент, завуч кафедры Глазкова Т.Ю., д.ф.н., профессор Денисова М.Н., к.ф.н., доцент Ярошенко Н.П., удостоверяем факт внедрения результатов научной работы Смысловой Ольги Александровны в учебный процесс кафедры фармации Образовательного департамента Института фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Материалы исследования используются при чтении лекций и проведении семинаров со слушателями факультета повышения квалификации по специальности «Фармация», интернами по специальности «Управление и экономика фармации».

Завуч кафедры фармации,
к.ф.н., доцент

Т.Ю. Глазкова

д.ф.н., профессор

М.Н. Денисова

к.ф.н., доцент

Н.П. Ярошенко

Приложение 2.

Испытательная лаборатория Государственного бюджетного учреждения здравоохранения
«Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы»
111123, Россия, город Москва, ш. Энтузиастов, 64

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий Испытательной лабораторией
ГБУЗ «ЦЛО и КК ДЗ г. Москвы»
Г.Р. Айсина
05 06 2017 г.

АКТ

внедрения в научно-исследовательскую деятельность
испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента
здравоохранения г. Москвы»
результатов диссертационного исследования
Смысловой Ольги Александровны
на тему «Исследования по разработке и стандартизации комплексного урологического
растительного средства»

Мы, нижеподписавшиеся, члены комиссии в составе:

кандидат фарм. наук, проф. аналит. химии Комиссия В.И.
(звание, должность, Ф.И.О.)
кандидат фарм. наук, проф. аналит. химии Смирнов;
(звание, должность, Ф.И.О.)
кандидат фарм. наук, проф. аналит. химии Туров С.А.
(звание, должность, Ф.И.О.)

удостоверяем, что полученные диссертантом результаты исследований по
разработке и валидации аналитической методики определения содержания суммы
флавоноидов для стандартизации нового лекарственного растительного средства
внедрены в практику работы испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного
обеспечения Департамента здравоохранения г. Москвы».

Материалы исследования используются для контроля качества
многокомпонентных средств растительного происхождения.

кандидат фарм. наук, проф. аналит. химии Комиссия В.И.
(звание, должность, Ф.И.О.)
кандидат фарм. наук, проф. аналит. химии Смирнов;
(звание, должность, Ф.И.О.)
кандидат фарм. наук, проф. аналит. химии Туров С.А.
(звание, должность, Ф.И.О.)

Приложение 3.

Испытательная лаборатория Государственного бюджетного учреждения здравоохранения
«Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы»
111123, Россия, город Москва, ш. Энтузиастов, 64

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий Испытательной лабораторией
ГБУЗ «ЦЛО и КК ДЗ г. Москвы»
Г.Р. Айсина
06 2017 г.



АКТ
внедрения в научно-исследовательскую деятельность
испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента
здравоохранения г. Москвы»
результатов диссертационного исследования
Смысловой Ольги Александровны
на тему «Исследования по разработке и стандартизации комплексного урологического
растительного средства»

Мы, нижеподписавшиеся, члены комиссии в составе:

кандидат фарм. наук, профессор-аналитик Коминин А.Н.
(звание, должность, Ф.И.О.)
профессор-аналитик
(звание, должность, Ф.И.О.)
профессор-аналитик
(звание, должность, Ф.И.О.)

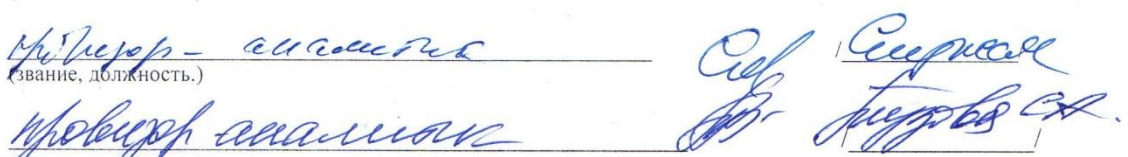


удостоверяем, что полученные диссертантом результаты исследований по
разработке и стандартизации нового лекарственного растительного средства - экстракта
сухого внедрены в практику работы испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр
лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения г. Москвы».

Материалы исследования используются в технологическом процессе получения
сухих экстрактов из растительного сырья.

кандидат фарм. наук, профессор-аналитик Юноя Коминин
(звание, должность, Ф.И.О.)

профессор-аналитик
(звание, должность, Ф.И.О.)
профессор-аналитик
(звание, должность, Ф.И.О.)



Приложение 4.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ
проект

Сбор «Фитоурол»

ФС 42-

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сбор «Фитоурол», состоящий из: собранных до начала цветения или после созревания плодов, высушенных и измельчённых листьев многолетнего вечнозеленого дикорастущего кустарничка брусники обыкновенной - *Vaccinium vitis - idaea* L., сем. вересковых - *Ericaceae* (ГФ XI изд., вып. 2, ст. 27); собранных в течение лета, высушенных и измельчённых надземных вегетативных побегов многолетнего травянистого дикорастущего растения хвоща полевого – *Equisetum arvense* L., сем. хвощевых – *Equisetaceae* (ФС.2.5.0045.15); собранной в фазу цветения, высушенной и измельчённой травы многолетнего растения полыни обыкновенной – *Artemisia vulgaris* L., сем. астровых – *Asteraceae* (ФС 42-2094-83); собранных осенью или ранней весной, тщательно очищенных от земли, высушенных и измельчённых корней дикорастущих двулетних травянистых растений лопуха большого – *Arctium lappa* L., лопуха паутинистого (войлочного) – *Arctium tomentosum* Mill., лопуха малого – *Arctium minus* (Mill.) Bernh., сем. астровых – *Asteraceae* (ФС.2.5.0025.15); собранных зрелыми и высушенных цельными плодов (мерикарпиев) культивируемого однолетнего травянистого растения укропа пахучего (огородного) – *Anethum graveolens* L., сем. сельдерейных – *Apiaceae* (ФС.2.5.0043.15); смешанные и применяемые в качестве лекарственного средства.

Состав.

Листьев брусники (*Folia Vaccinii vitis-idaeae*) – 30 г;

Травы хвоща полевого (*Herba Equiseti arvensis*) – 30 г;

Плодов укропа огородного (*Fructus Anethi graveolentis*) – 15 г;

Лопуха корней (*Arctii radices*) – 15 г;

Травы полыни обыкновенной (*Herba Artemisiae vulgaris*) – 10 г.

ИСПЫТАНИЯ**Внешние признаки.**

Смесь неоднородных кусочков растительного сырья: измельчённых листьев, стеблей, соцветий, корней и цельных плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет желтовато-коричневато-зелёный со светло-зелёными и тёмно-коричневыми вкраплениями.

При просмотре сбора под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны:

- кусочки листьев различной формы кожистых, голых, с одной стороны зеленых, а с другой стороны светло-зеленых с тёмно-коричневыми точками (желёзки) (*брусники листья*);

- кусочки стеблей и ветвей ребристых, продолговатых жестких, членистых, частично с узлами и влагалищами серовато – зеленого цвета, иногда расщеплёнными со светлой желтоватой сердцевинкой (*хвоща полевого трава*);

- кусочки корней в поперечном и продольном сечении с остатками коричневой и серовато-коричневой пробки, серовато – белого, иногда желтоватого цвета на изломе (*лопуха корни*);

- кусочки листьев различной формы: тонких, с одной стороны голых и зелёных, а с другой стороны сильно опушённых тонкими белыми волосками (серебристых); кусочки зелёных стеблей в поперечном и продольном сечении с белой губчатой сердцевинкой; а также целые и частично измельчённые корзинки светло-зелёные с опушёнными листочками обвёртки (*полыни обыкновенной трава*);

- цельные и частично измельчённые полуплодики длиной до 5 мм, шириной до 3 мм, широкоэллиптические, с одной стороны (спинка) - слабовыпуклые с тремя нитевидными и с двумя боковыми плоскими крыловидными рёбрами, а с другой стороны плоские; зеленовато-коричневые с желтоватыми рёбрами. Реже встречаются не распавшиеся вислоплодники (*укрона огородного плоды*).

Запах слабый своеобразный. Вкус горьковатый слегка пряный.

Микроскопические признаки.

При рассмотрении микропрепаратов под микроскопом видны (рис. 1):

- фрагменты кусочков листа с поверхности с клетками эпидермиса с более или менее извилистыми стенками, что соответствует нижнему и верхнему эпидермису листа брусники. Устьица парацитного типа, мелкие, с двумя околоустьичными клетками, расположенными параллельно устьичной щели. На эпидермисе встречаются желёзки с коричневым содержимым, состоящие из многоклеточной ножки, постепенно переходящей в овальную многоклеточную головку. В мезофилле встречаются редкие одиночные призматические кристаллы оксалата кальция (*брусники листья*);

- фрагменты кусочков листа с поверхности, с одной стороны они сильно опушённые (нижняя сторона), с другой почти голые (верхняя сторона). Клетки эпидермиса с тонкими извилистыми стенками – плохо различимы. Устьица, аномоцитного типа, видны на нижней стороне – они овальные с хорошо заметной устьичной щелью.

Волоски трёх типов: Т-образные - на 2-3-х клеточной ножке и с 2-х конечной длинной тонкой клеткой, прикреплённой к ножке в средней части и часто перекрученной с другими, волосками; волоски многоклеточные (бичевидные) – на короткой 2-4-х клеточной ножке с длинной тонкой клеткой и волоски короткие из 2-3х коротких клеток с небольшой головкой. На нижней стороне волосков много, на верхней редко встречаются Т-образные и короткие волоски.

Встречаются редкие желёзки - овальные, разделённые перегородкой на две части.

Цветки пятизубчатые, содержат пять продолговатых пыльников, сидят на цветоножке, окружённым листочками обвёртки; листочки обвёртки продолговатые с плёчатым прозрачным краем и центральной частью зелёного цвета; опушены снаружи волосками такими же, как и листья; желёзок много (*попыни обыкновенной трава*);

- фрагменты кусочков стеблей, ветвей и редуцированных листьев с клетками эпидермиса на ребрах сильно удлинённые (вытянутые по оси роста) с утолщёнными прямыми или слегка извилистыми, пористыми стенками. Клетки в бороздках короче, их длинные стенки извилистые (угловато и округло зубчатые), пористые. Выросты гребней рёбер имеют форму наклонных острых перегородочных зубцов.

Устьица расположены в основании ребер, обычно в два – три ряда (реже в четыре и один ряд) и сопровождают бороздку. Они слегка погруженные, с характерной лучистой складчатостью кутикулы.

У редуцированных листьев (зубцов влагалищ) с наружной стороны над жилкой расположен ряд парных устьиц, иногда с внутренней стороны на верхушке над жилкой имеется крупное устьице (гидатода) (*хвоица полевого трава*);

- фрагменты сетчатой пробки, состоящей из тонкостенных клеток с коричневыми стенками. Клетки паренхимы с содержимым и без. Сосуды и трахеиды (*лопуха корни*).

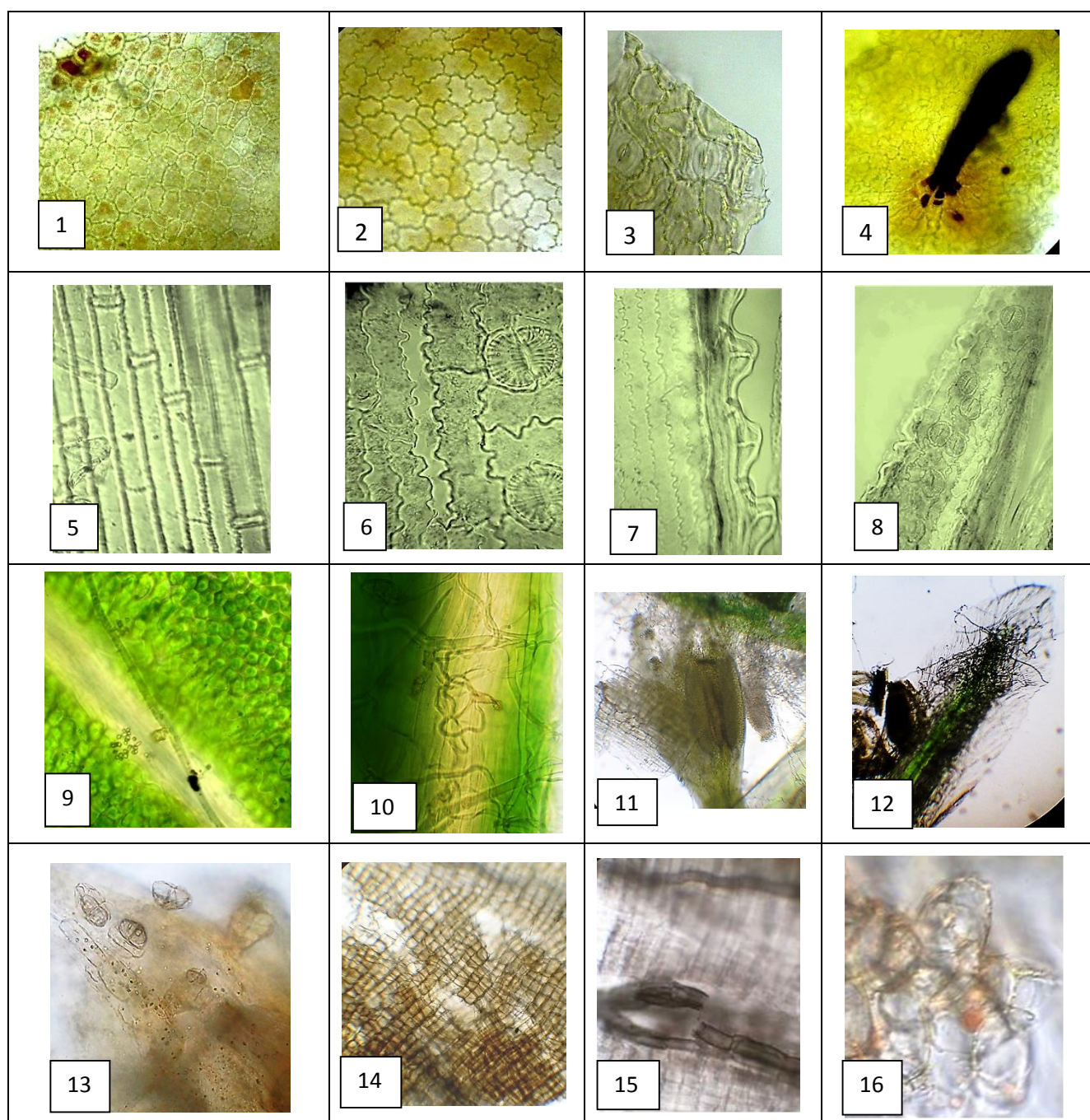


Рис. 1 –

Брусники листья: 1 – верхний эпидермис (280×); 2 – нижний эпидермис (280×); 3 – нижний эпидермис с устьицами парацитного типа (400×); 4 – нижний эпидермис с желёзкой (63×).

Хвоща полевого трава: 5 – эпидермис ребер стеблей и ветвей (280×); 6 – эпидермис бороздок стеблей и ветвей, устьица (280×); 7 – выросты гребней ребер стеблей (100×); 8 – фрагмент зубчика (редуцированный лист) (100×).

Полыни обыкновенной трава: 9 – верхний эпидермис (280×), Т-образный волосок на жилке; 10 – нижний эпидермис (280×), Т-образный волосок; 11 – цветок с пыльниками (56×); 12 – листочек обвёртки (56×); 13 – желёзки на покрове бутона (280×).

Лопуха корни (давленный препарат):

14 – пробка (56×); 15 – сосудистые тяжи (63×); 16 – капли жирного масла в паренхиме (Судан III) (280×).

Хроматография.

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) лютеолин-7-гликозида. Около 0,05 г СО лютеолин-7-гликозида растворяют в мерной колбе (объемом 100 мл) в 50 мл смеси растворителей: этилацетат-метанол (95:5) и полученный раствор доводят до метки тем же растворителем, перемешивали.

Раствор СО арбутина. Около 25 мг СО арбутина растворяют в мерной колбе (объемом 100 мл) в 10 мл метанола, перемешивают.

Раствор СО гидрохинона. Около 25 мг СО гидрохинона растворяют в мерной колбе (объемом 100 мл) в 10 мл метанола, перемешивают.

Раствор СО галловой кислоты. Около 25 мг СО галловой кислоты растворяют в мерной колбе (объемом 100 мл) в 10 мл метанола, перемешивают.

Раствор СО фруктозы. Около 0,05 г СО фруктозы растворяют в мерной колбе (объемом 100 мл) в 5 мл воды и доводят до метки 50% этанолом, перемешивают.

а) Аналитическую пробу сбора измельчают до величины частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряют точную навеску сбора массой 1,0 г, помещают в колбу (объемом 100 мл), добавляют 10 мл 70% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане с момента закипания в течение 1 ч. Охлаждают при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения проводят фильтрование через фильтровальную бумагу (испытуемый раствор). Испытуемый раствор упаривают на водяной бане и остаток растворяют в 2 мл смеси этилацетат-метанол (95:5).

На линию старта хроматографической пластины «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 20×20 см наносят точкой 20 мкл испытуемого раствора и рядом 20 мкл раствора СО лютеолин-7-гликозида. Предварительно камеру для восходящей тонкослойной хроматографии насыщают смесью растворителей

изопропанол-муравьиная кислота-вода (2:5:5), затем размещают пластину «Kieselgel 60 F₂₅₄» с нанесенными пробами. Окончание элюирования фиксируют визуально по финишной линии, когда растворитель пройдет 80-90% от линии старта. Далее пластину вынимают из камеры, высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу до полного улетучивания растворителей. Затем обрабатывают 2% раствором алюминия хлорида (III) в 95% этаноле и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 5 минут и просматривают в УФ-свете.

На хроматограмме СО лютеолин-7-гликозида должна обнаружиться желтая зона адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаружиться зона адсорбции, окрашенная в желтый цвет, на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО лютеолин-7-гликозида. Допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (флавоноиды).

б) Аналитическую пробу сбора измельчают до величины частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряют точную навеску сбора массой 2,5 г, помещают в колбу (объемом 50 мл), добавляют 25 мл смеси метанол-вода (1:1). Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане с момента закипания в течении 10 мин. Для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводят фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 100 мл. Полученный объем вытяжки доводят до метки тем же растворителем (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластины «Kieselgel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 15×20 см наносят 20 мкл испытуемого раствора и 10 мкл растворов СО: арбутина, гидрохинона, галловой кислоты. Предварительно камеру для восходящей тонкослойной хроматографии насыщают смесью растворителей муравьиная кислота-вода-этилацетат (6:6:88), затем размещают пластину

«Kieselgel 60 F₂₅₄» с нанесенными пробами. Окончание элюирования фиксируют визуально по финишной линии, когда растворитель прошел 80-90% от линии старта. Далее пластину вынимают из камеры, помещают в сушильный шкаф и растворитель удаляют при температуре 100-105°C. Хроматограмму вначале обрабатывают 1% раствором дихлорхинонахлоримида в метаноле и затем 2% раствором натрия карбоната безводным.

После детектирования хроматограммы наблюдают появление 2-х зон голубого цвета (арбутин), (гидрохинон) и зоны коричневого цвета (галловая кислота).

На хроматограмме СО арбутина должна обнаружиться голубая зона адсорбции; СО гидрохинона – голубая; СО галловой кислоты – коричневая.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаружиться 2 зоны адсорбции, окрашенные в голубой цвет, на уровне зон адсорбции на хроматограмме растворов СО арбутина и гидрохинона и зона адсорбции, окрашенная в коричневый цвет на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО галловой кислоты. Допускается обнаружение дополнительных голубых и коричневых зон адсорбции.

в) Аналитическую пробу сбора измельчают до величины частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Далее отмеряют точную навеску сбора массой 1,0 г, помещают в колбу (объемом 200 мл), добавляют 70 мл 50% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане с момента закипания в течении 1 ч. Охлаждают при комнатной температуре в естественных условиях. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводят фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу вместимостью 50 мл. Полученный объем раствора доводят до метки соответствующим растворителем – 50% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластины «TLC Silicagel 60 F₂₅₄» размером 15×20 см наносят точкой 20 мкл испытуемого раствора и рядом 20 мкл раствора СО фруктозы. Предварительно камеру для восходящей тонкослойной хроматографии насыщают смесью растворителей пиридин-этилацетат-вода (20:60:40), затем размещают пластину «TLC Silicagel 60 F₂₅₄» с нанесенными пробамии. Окончание элюирования фиксируют визуально по финишной линии, когда растворитель пройдет 80-90% от линии старта. Далее пластину вынимают из камеры, высушивают на воздухе и обрабатывают проявляющим реагентом: тимол-серная кислота конц.-спирт этиловый 95% (0,5:5:95), выдерживают 10 мин в сушильном шкафу при 100-105°C.

На хроматограмме СО фруктозы должна обнаружиться красно-фиолетовая зона адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаружиться зона адсорбции, окрашенная в красно-фиолетовый цвет, на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО фруктозы. Допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (сахара).

Арбутин. Не менее 1,3%.

Сумма флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид. Не менее 0,4%.

Сумма полисахаридов в пересчете на фруктозу. Не менее 1,7%.

Экстрактивные вещества, извлекаемые водой. Не менее 21%.

Влажность. Не более 12%.

Зола общая. Не более 14%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Не более 5%.

Измельченность. Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5%.

Посторонние примеси

Органическая примесь. Не более 1,5%.

Минеральная примесь. Не более 1%.

Однородность массы для недозированного сбора. В соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

1. Определение содержания арбутина.

Аналитическую пробу сбора измельчают до величины частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу объемом 100 мл, добавляют 50 мл воды очищенной и далее проводят определение содержания арбутина согласно методике ГФ XI изд., вып. 2, ст. 27.

2. Определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид.

Приготовление раствора.

Раствор СО лютеолин-7-гликозида: точную навеску СО лютеолин-7-гликозида (массой 0,03 г) помещают в мерную колбу (объемом 100 мл), растворяют в 50 мл 70% этанола и доводят тем же растворителем до метки – 70% этиловым спиртом, перемешивают.

Аналитическую пробу сбора измельчают до величины частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сбора помещают в колбу со шлифом объемом 200 мл, добавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу с навеской в спиртоводной смеси соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане с момента закипания в течение 1 ч. После охлаждения для отделения частиц сырья от полученной вытяжки проводят фильтрование через фильтровальную бумагу в мерную колбу (объемом 100 мл). Экстракцию повторяют с 50 мл 70% этилового спирта в течение 1 ч. После охлаждения спиртоводной вытяжки фильтруют в ту же мерную колбу, полученный объем доводят до метки соответствующим растворителем – 70% этиловым спиртом (раствор А).

В мерную колбу (объемом 25 мл) отмеряют 1,0 мл раствора А, добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III) и полученный объем доводят до метки 70% этиловым спиртом.

Раствор сравнения: в мерную колбу (объемом 25 мл) отмеряют 1 мл раствора А, добавляют 0,1 мл разведенной уксусной кислоты и доводят до метки 95% этиловым спиртом (раствор должен быть свежеприготовленным).

Оптическую плотность полученных растворов измеряют на саморегистрирующем спектрофотометре через 40 минут при длине волны 402 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО лютеолин-7-гликозида (при длине волны 402 ± 5 нм): 1,0 мл СО лютеолин-7-гликозида отмеряют в колбу (объемом 25 мл), добавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида (III), полученный объем доводят до метки 70% этиловым спиртом. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1,0 мл СО лютеолин-7-гликозида, 0,1 мл разведенной уксусной кислоты и 95% этиловый спирт до 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в анализируемом сборе в пересчете на лютеолин-7-гликозид и абсолютно сухое сырьё в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D^* \times 100 \times 25 \times M \times 1 \times 100 \times 100}{D \times M^* \times 100 \times 1 \times 25 \times (100 - W)}$$

где

D* – оптическая плотность испытуемого раствора;

D – оптическая плотность СО лютеолин-7-гликозида;

M* – масса навески анализируемого сбора, г;

M – масса СО лютеолин-7-гликозида, г;

W – потеря массы при высушивании изучаемого сбора, %.

3. Определение содержания суммы полисахаридов в пересчете на фруктозу.

Аналитическую пробу сбора измельчают до величины частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу объёмом 100 мл, добавляют 50 мл воды очищенной и далее проводят определение содержания полисахаридов в пересчете на фруктозу согласно ГФ РФ XIII изд., ФС.2.5.0025.15 «Лопуха корни».

4. Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой.

Аналитическую пробу сбора измельчают до величины частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200 мл, добавляют 50 мл воды очищенной и далее проводят определение содержания экстрактивных веществ согласно ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» метод 1 (экстрагент – вода очищенная).

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Маркировка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Срок годности. 3 года.

Приложение 5.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных
и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР)
Лаборатория микробиологических исследований
(лицензия от 27.05.2013 г. № 77.01.13.001.Л.000012.05.13)

117216, Москва, ул. Грина, 7. Тел. (495) 388-55-09, (495) 388-85-18 e-mail: vilarnii@mail.ru

Протокол № 41-17

испытания на микробиологическую чистоту

Образец получен от I МГМУ им. И.М. Сеченова (аспирант Смыслова О.А.)

Наименование образца: сбор из лекарственных растений урологического действия со сроком хранения 2 года 6 месяцев

Дата поступления образца на анализ: 17.04.2017

Дата проведения анализа: 17.04.17 – 24.04.17

№	Испытания на микробиологическую чистоту Категория 4 А	Рекомендуемые требования (нормы)	Результат испытаний
1	Общее число аэробных микроорганизмов в 1 г	не более 10^7 КОЕ	$2,5 \cdot 10^5$
2	Общее число дрожжевых и плесневых грибов в 1 г	не более 10^5 КОЕ	$3,5 \cdot 10^3$
3	<i>Escherichia coli</i> в 1 г	не более 10^2 КОЕ	отсутствие

Заключение: сбор из лекарственных растений урологического действия со сроком хранения 2 года 6 месяцев **соответствует** требованиям ГФ XIII, том 1, раздел 1.2.4.2. «Микробиологическая чистота» (ОФС.1.2.4.0002.15).

Категория 4 А.

Руководитель Центра химии
и фармацевтической технологии
ФГБНУ ВИЛАР, канд. фарм. наук

Зав. лабораторией микробиологических
исследований ФГБНУ ВИЛАР

Микробиолог лаборатории
микробиологических
исследований ФГБНУ ВИЛАР
24.04.2017 г.



Сайбель О.Л.

Фатеева Т.В.

Дыдыкина А.А.

Приложение 6.

ПРОТОКОЛ

исследования микробной обсемененности сбора из лекарственных растений урологического действия

В лаборатории микробиологических исследований ФГБНУ ВИЛАР проведено изучение микробной обсемененности сбора из лекарственных растений урологического действия, переданного Смысловой Ольгой Александровной – аспирантом кафедры фармации Института фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), (тема диссертации: «Исследования по разработке и стандартизации комплексного урологического растительного средства»).

Испытание на микробиологическую чистоту включает количественное определение жизнеспособных бактерий (ОЧБ) и общего числа грибов (ОЧГ) в 1 г (мл), а также патогенных и условно патогенных микроорганизмов (бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (в том числе *Escherichia coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella*). Испытания проводили чашечным методом с использованием питательных сред, предназначенных для контроля всех видов нестерильных лекарственных средств, а также сырья и готового продукта из него. Исследования проведены в соответствии с требованиями XII Государственной Фармакопеи Российской Федерации, часть I, раздел 32 «Микробиологическая чистота» (ОФС 42-0067-07), категория 4А и XIII Государственной Фармакопеи Российской Федерации, том 1, раздел 1.2.4.2. «Микробиологическая чистота» (ОФС.1.2.4.0002.15) категория 4А.

Исследование микробной обсемененности образцов сбора из лекарственных растений урологического действия

Проведено исследование микробной обсемененности образцов сбора из лекарственных растений следующего состава:

- Брусники листья (*Vaccinii vitis-idaeeae folia*) – 30%;
- Хвоща полевого трава (*Equiseti arvensis herba*) – 30%;
- Лопуха корни (*Arctii radices*) – 15%;
- Укропа огородного плоды (*Anethi graveolentis fructus*) – 15%;
- Полыни обыкновенной трава (*Artemisiae vulgaris herba*) – 10%.

Исследован образец сбора из лекарственных растений, изготовленный 24.10.2014г., и со сроками хранения 6 месяцев, 1 год, 1 год 6 месяцев, 2 года, 2 года 6 месяцев при комнатной температуре в защищенном от света месте (протоколы №: 35-14, 206-15, 51-15, 226-16, 71a-16, 41-17) (см. таблицу 1).

Таблица 1

Микробная обсемененность образцов сбора из лекарственных растений урологического действия

№	Испытания на микробиологическую чистоту Категория 4А	Рекомендуемые требования (нормы)	Результат испытаний
1	Общее число аэробных микроорганизмов в 1 г	не более 10^7 КОЕ	$2,5 \cdot 10^5$
2	Общее число дрожжевых и плесневых грибов в 1 г	не более 10^5 КОЕ	$3,5 \cdot 10^3$
3	<i>Escherichia coli</i> в 1 г	не более 10^2 КОЕ	отсутствие

Заключение. Изученные образцы сбора из лекарственных растений урологического действия **соответствуют** требованиям XII Государственной Фармакопеи Российской Федерации часть 1, раздел 32

«Микробиологическая чистота» (ОФС 42-0067-07), **категория 4А** (протоколы № 35-14, 20б-15, 51-15) и XIII Государственной Фармакопеи Российской Федерации, том I, раздел 1.2.4.2. «Микробиологическая чистота» (ОФС.1.2.4.0002.15) **категория 4А** (протоколы № 22б-16, 71а-16, 41-17).

Руководитель Центра химии
и фармацевтической технологии
ФГБНУ ВИЛАР, канд. фарм. наук

Зав. лабораторией микробиологических исследований ФГБНУ ВИЛАР

Сайбель О.Л.

Фатеева Т.В.



Приложение 7.

Федеральное агентство научных организаций

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУКУДК 615.02ОТЧЕТ
ПО ДОКЛИНИЧЕСКИМ ИСПЫТАНИЯМ УРОЛОГИЧЕСКОГО
СРЕДСТВА

Улан-Удэ, 2016

Введение. Показатель преваленса (распространенности) уролитиаза в странах Западной Европы составляет примерно 5-9%, в Канаде –12%, в США – 7-15%, а странах Восточного полушария – около 1-5%. Эпидемиологические исследования, проводимые в ряде индустриально развитых стран, указывают на сохранение тенденции к росту частоты выявления МКБ среди населения. Так, число впервые выявленных случаев МКБ на 100000 населения за последние десятилетия возросло в США с 58,7 (1950-1954 гг.) до 85,1 (2000 г.), – в Японии с 43,7 (1965 г.) до 134 (2005 г.) в России с 123,3 (2002 г.) до 178 (2013 г.) (Голованов С.А. и др., 2014). В настоящий момент препаратов, оказывающих уролитолитическое действие недостаточно. Поиск новых средств, ограничивающих развитие мочекаменной болезни, является актуальным.

Материалы и методы исследований. Эксперименты проведены в осенне-зимний период на белых крысах линии Wistar обоего пола массой 180-200 г. Содержание животных соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», и Правилами, принятыми «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST №123» от 18.03.1986 (Страсбург, 1986). Протокол исследования согласован с этической комиссией ИОЭБ СО РАН (протокол №6 от 25.10.2016). Эвтаназию животных осуществляли методом мгновенной декапитации под легким эфирным наркозом.

Объектом исследования служил сбор, состоящий из; листьев *Vaccinii Vitis-idaeae* L. 3 части, травы *Equiseti arvensis* L. 3 части, корней *Arctii Radices* L. 1,5 части, плодов *Anethi graviolensis* L. 1,5 части, травы *Artemisiae vulgaris* L. 1 часть. Мочекаменную болезнь воспроизводили по методу Higgens H.G. (1965) внутрижелудочным введением витамина Д₂ в дозе 12000 ЕД/кг массы 1 раз в сутки в течение 20 дней (контроль). Животным опытных

групп одновременно с введением витамина Д₂ интрагастрально вводили отвар комплексного растительного средства в объеме 10 мл/кг (изучаемый сбор). Введение испытуемого средства проводили один раз в сутки с начала эксперимента и на протяжении 20 дней. Животные второй опытной группы в качестве препарата сравнения получали «Урологический сбор» (АО «Красногорсклексредства») в объеме 10 мл/кг. Отвар испытуемого средства и препарата сравнения, готовили по требованиям ГФ (Х1). Крысам контрольной группы вводили эквивалентное количество дистиллированной воды по аналогичной схеме.

С целью оценки функционального состояния почек у животных определяли: диурез по общепринятому методу без нагрузки и с 2,5% водной нагрузкой (Руководство...2012); концентрацию катионов натрия, калия и кальция в моче – методом пламенной фотометрии на приборе «Flapho – 4» (Германия); фосфора - по Хаями Тадаси (Асатиани, 1965). Депурационную функцию почек оценивали по содержанию мочевины и креатинина в сыворотке крови и моче – унифицированными методами с использованием наборов реактивов Био-Ла-Тест «Лаксма» (Чехия); содержание белка в моче – реакцией с сульфосалициловой кислотой (Меньшиков и соавт., 1987); оценку скорости клубочковой фильтрации – по клиренсу эндогенного креатинина; pH мочи определяли на универсальном иономере ЭВ – 74 (Россия) с использованием приспособления для малых объемов. Сбор мочи для определения минутного диуреза осуществляли в течение 3 часов в обменных клетках, представляющих собой металлические цилиндры с перфорированным дном и воронкой, предназначенной для стока собираемой мочи. Мочевой осадок готовили из свежей порции мочи путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, оставшийся осадок помещали на предметное стекло и рассматривали под микроскопом в 100 окнах при увеличении (x 20) (Рябов, 2000). Концентрацию малонового диальдегида определяли спектрофотометрически при $\lambda = 532$ нм и 580 нм по степени образования

окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой в сыворотке крови (Темирбулатов, Селезнев, 1981) и в гомогенате почек (Kikugava et al, 1992). Активность каталазы сыворотки крови определяли спектрофотометрическим методом (Goth L, 1991). Полученные в ходе экспериментов данные статистически обработаны общепринятыми методами для малой выборки с определением средней величины (M) и средней ошибки (m). Значимость различий исследований оценивали с применением параметрического t -критерия Стьюдента. Различия средних величин контроля и опытов считали существенными при вероятности 95% ($P \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение.

Влияние изучаемого сбора на диуретическую и салуретическую функцию почек intactных крыс определяли при однократном интрагастральном введении испытуемых средств в объеме 10 мл/кг с 2,5% водной нагрузкой. Сбор мочи осуществляли в течение 3 часов после их введения фитосредств по общепринятой методике. В полученной моче определяли концентрацию катионов Na^+ , K^+ . Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние изучаемого сбора на скорость диуреза и содержание Na^+ , K^+ в моче белых крыс.

Группы животных	Показатели		
	Диурез, мл/100 г/ч	K^+ в моче, мМ/л	Na^+ в моче, мМ/л
Контрольная (n-8)	$1,17 \pm 0,033$	$63,9 \pm 3,83$	$43,5 \pm 2,61$
Изучаемый сбор (n-8)	$2,24 \pm 0,021^*$	$76,7 \pm 1,28^*$	$86,9 \pm 4,34^*$
Урологический сбор (n-8)	$1,6 \pm 0,014^*$	$74,2 \pm 5,11$	$69,5 \pm 2,17^*$

Примечание: * - здесь и далее, различия значимы в группах контроль-опыт при $P \leq 0,05$; n- количество животных.

Как следует из данных, приведенных в таблице 1, однократное введение испытуемого комплексного растительного средства оказывало выраженное мочегонное действие, повышая водовыделительную функцию

почек на 91 % по сравнению с данными у животных контрольной группы. При этом диуретическое действие значительно превышало таковое у препарата сравнения – урологического сбора. При этом, однократное введение белым крысам комплексного растительного средства оказывало существенное влияние на экскрецию ионов натрия, увеличивая их концентрацию в моче в 2 раза по сравнению с данными у животных контрольной группы. Фармакологическая активность референтного препарата уступала действию такового у испытуемого комплексного растительного средства. Полученные результаты свидетельствуют о высокой диуретической активности изучаемого сбора.

При определении влияния изучаемого сбора на образование уролитов в мочевых путях крыс установлено, что введение сублетальных доз витамина Д₂ сопровождается развитием воспалительной реакции в почках животных, о чем свидетельствует лейкоцитурия и эпителийурия, а также появление кристаллов солей фосфорной кислоты в осадке мочи. Установлено, что курсовое введение испытуемого средства крысам в указанном объеме ограничивает воспалительный процесс в почках. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние изучаемого сбора на состав осадка мочи белых крыс при экспериментальном уролитиазе, индуцированном введением витамина Д₂ (20 сутки)

Показатели	Группы животных			
	Интактная	Контрольная	Изучаемый сбор	Урологический сбор
Лейкоциты, ед в п/зр	3,5±0,24	20,8±1,5	6,4±0,52*	10,5±0,24*
Эпителий, ед в п/зр	2,3±0,12	17,5±1,34	5,5±0,26*	8,4±0,52*
Соли (фосфаты)	-	++++	++	+++

Примечание: + - означает выраженность наличия в осадке солей фосфорной кислоты.

Установлено, что на 20 сутки у контрольных животных повышается степень лейкоцит- и эпителийурии, а содержание фосфатов в моче увеличивается, в то время как курсовое введение животным изучаемого сбора в указанном объеме уменьшает количество лейкоцитов и эпителия в среднем в 3 раза по сравнению данными животных контрольной группы, а количество фосфатов снижает практически в 2 раза. Препарат сравнения оказывал однонаправленное менее выраженное влияние.

В таблице 3 приведены результаты исследования влияния комплексного растительного изучаемого средства на показатели функционального состояния почек животных при экспериментальном уролитиазе, индуцированного введением витамина D_2 .

Таблица 3. Влияние изучаемого сбора на показатели функциональной активности почек крыс при экспериментальном уролитиазе (20 сутки).

Показатели	Группы животных			
	Интактная (n – 8)	Контрольная (n – 8)	Изучаемый сбор (n – 8)	Урологический сбор (n – 8)
Диурез, мл/100 г/ч	1,2±0,03	0,8±0,04	1,3±0,08*	1,1±0,06*
Na ⁺ в моче, мм/л	65,2±1,74	34,8±1,86	62,8±3,14*	53,8±3,11*
K ⁺ в моче, мм/л	53,7±2,15	46,1±1,09	57,7±2,16*	51,3±2,19
СКФ, мкл/мин	96,2±4,65	72,4±3,92	89,2±4,68*	76,5±4,23
Белок в моче, г/л	0,93±0,012	2,06±0,13	1,04±0,09*	1,25±0,14*
pH мочи, усл.ед.	6,7±0,25	8,8±0,56	5,9±0,46*	6,3±0,49

Как следует из данных, приведенных в таблице 3, внутрижелудочное введение сублетальных доз витамина D_2 сопровождается нарушением функционального состояния почек. На 20 сутки диурез у крыс контрольной группы был снижен на 34%, а у животных, получавших отвар изучаемого сбора и референтный препарат, был на уровне показателей интактной

группы. Концентрация ионов натрия и калия также находилась на уровне показателей интактной группы животных. При этом СКФ у крыс контрольной группы снижена на 25%, а у животных опытной группы незначительно отличается от данных интактных животных. К этому сроку наблюдения отмечается повышение концентрации ионов водорода в моче животных опытной группы, pH мочи отклоняется в сторону закисления. При этом эффективность препарата сравнения уступает действию испытуемого средства.

В таблице 4 приведены результаты исследования влияния изучаемого сбора на показатели фосфорно-кальциевого обмена при экспериментальном уролитиазе у белых крыс.

Таблица 4. Влияние изучаемого сбора на концентрацию кальция и фосфора в сыворотке крови и в моче белых крыс на фоне экспериментального уролитиаза, индуцированного введением витамина Д₂ (20 сутки)

Показатели	Группы животных			
	Интактная (n – 8)	Контрольная я (n – 8)	Изучаемый. сбор (n – 8)	Урологич. сбор (n – 8)
Кальций в сыворотке крови, мкмоль/мл	2,2±0,01	3,3±0,18	2,4±0,09*	2,2±0,16*
Кальций в моче, мкмоль/мл	2,5±0,18	3,0±0,20	2,5±0,09	2,4±0,21
Фосфор в сыворотке крови, мкмоль/мл	0,8±0,06	6,2±0,43	2,1±0,15*	2,5±0,09*
Фосфор в моче, мкмоль/мл	1,5±0,01	8,3±0,86	4,5±0,32*	8,7±0,67

Как следует из данных, приведенных в таблице 4, введение витамина Д₂ сопровождается нарушениями фосфорно-кальциевого обмена, на что указывает выраженное повышение концентрации фосфора как в сыворотке крови, так и моче животных контрольной группы; при чем в моче этот показатель превышал в 5,5 раз аналогичные данные у интактных животных. Установлено, что курсовое введение крысам комплексного растительного средства способствовало снижению уровня кальция в сыворотке крови на

27,3%, фосфора в крови и в моче в 3 и 1,8 раза соответственно, по сравнению с данными у животных контрольной группы.

Данные, приведенные в таблице 5, свидетельствуют, что введение животным витамина Д₂ сопровождается индукцией процесса свободно-радикального окисления липидов и снижением антиоксидантного статуса организма, о чем свидетельствует повышение концентрации МДА в сыворотке и в гомогенате почек, и снижение активности каталазы в сыворотке крови у крыс контрольной группы. У животных, получавших отвар изучаемого сбора, наблюдали снижение МДА в сыворотке крови и гомогенате почек на 16 и 25% соответственно, а также повышение активности каталазы на 15%. Референтный препарат уступал по этим показателям испытываемому средству.

Таблица 5. Влияние изучаемого сбора на содержание МДА в сыворотке крови и гомогенате почек и активность каталазы сыворотки крови при экспериментальном уролитиазе, индуцированном введением витамина Д₂ (20 сутки)

Показатели	Группы животных			
	Интактная (n – 8)	Контрольная (n – 8)	Изучаемый сбор (n – 8)	Урологич. сбор (n – 8)
МДА в сывор. мкмоль/л	0,42±0,025	0,56±0,026	0,47±0,009*	0,51±0,027
МДА в почках, нмоль/г ткани	3,14±0,284	4,17±0,257	3,55±0,186*	4,09±0,264
Каталаза, kU/L	54,0±2,45	44,2±3,94	52,1±2,15*	48,7±3,15

При исследовании секционного материала установлено, что видимых уролитов (лупа) во всех группах не установлено. На рисунках 1-3 приведены снимки микроскопии осадков мочи.

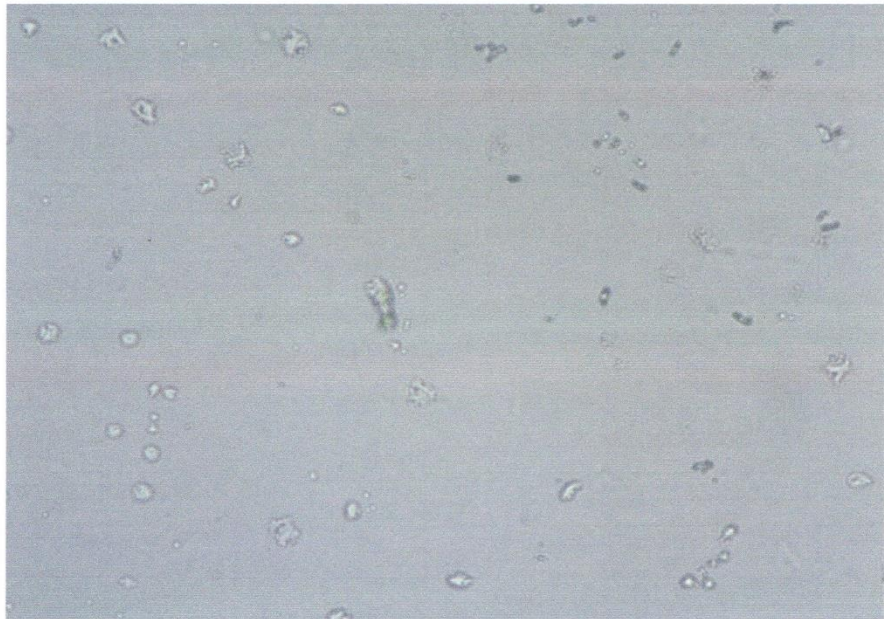


Рис.1 Микроскопия осадка мочи крысы интактной группы. Увеличение 1x20
Отсутствие уролитов

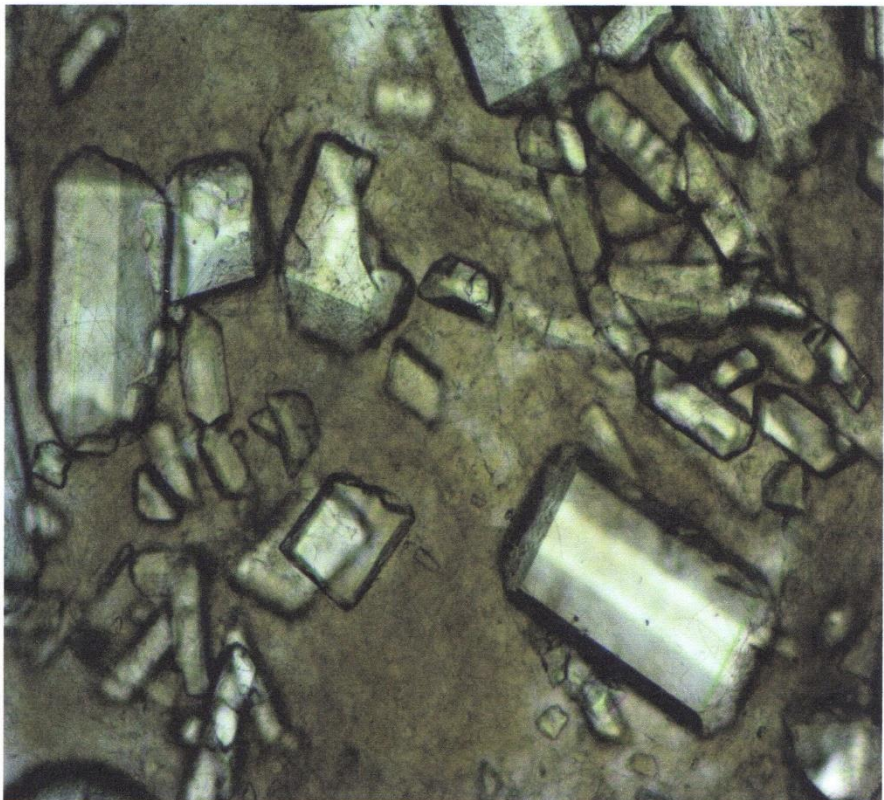


Рис.2 Микроскопия осадка мочи крысы группы контроля. Увел. 1x40. В поле зрения наблюдаются кристаллы, в основном, трипельфосфаты (фосфорнокислый кальций)



Рис. 3 Микроскопия осадка мочи крысы опытной группы. Оксалаты кальция.

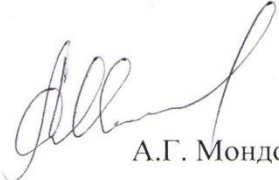
Таким образом изучаемый сбор оказывает выраженное уrolитолитическое влияние при экспериментальном уролитиазе у лабораторных животных, вызванного интрагастральным введением сублетальных доз витамина Д₂. По-видимому, указанный эффект обусловлен способностью сбора подкислять мочу, ускорять диурез, оказывать антиоксидантное действие, препятствуя тем самым разрушению клеточных и субклеточных мембранных структур, а также ограничивает образование уролитов.

Библиография:

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии.- М.,-1965.- 543 с.
2. Голованов С.А., Сивков А.В., Анохин А.В., Дрожжева В.В. Тенденции распространенности метаболических типов мочекаменной болезни в Московском регионе. Сравнительный анализ за период с 2010 по 2013

- гг //Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. - №4. – С. 54-58.
3. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике (справочник). – М., 1987. – 368 с.
 4. Микроскопическая техника: руководство/Под ред. Д.С.Саркисова и Ю.Л. Перова. – М., 1996. – 544 с.
 5. Рябов С.И. Нефрология: Руководство для врачей – СПб., 2000. – 672 с.
 6. Темирбулатов Р.А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р.А. Темирбулатов, Е.И. Селезнев // Лаб. дело. – 1981. - № 4. – С. 209-211.
 7. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // Clinica Chimica Acta, 1991, Vol. 196, N2-3 – P. 143-152.
 8. Kikugawa K., Kojima T., Yamaki S., Kosugi H. Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid // Analyt. Biochem. – 1992. – Vol.202. – P. 249-255.

Зав. лабораторией экспериментальной
фармакологии Отдела биологически
активных веществ Института общей
и экспериментальной биологии СО РАН
д.м.н.


А.Г. Мондодоев

Н.с. лаборатории безопасности
биологически активных веществ
к.б.н.


А.А. Торопова

Аспирант


Ю.А. Батуева