**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования**
«Иркутский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

Посохина Алина Алексеевна

# РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СБОРА АНГИОПРОТЕКТОРНОГО И ЭКСТРАКТА СУХОГО НА ЕГО ОСНОВЕ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук
Мирович Вера Михайловна

Иркутск – 2021

*Оглавление*

ВВЕДЕНИЕ ..... 5

ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ ВЕНОТОНИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ И РАСТЕНИЙ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ СБОРА АНГИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) ..... 13

1.1. Анализ ассортимента препаратов, применяемых при заболеваниях вен на российском фармацевтическом рынке ..... 13

1.2. Современные методические подходы по разработке многокомпонентных растительных средств (лекарственных сборов) ..... 20

1.3. Ботанико-ресурсная характеристика компонентов, входящих в состав сбора ангиопротекторного ..... 24

1.4. Химический состав и стандартизация растительного сырья, входящего в состав сбора ангиопротокторного ..... 29

1.5. Фармакологическая характеристика растительного сырья, входящего в состав сбора ангиопротекторного ..... 35

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 ..... 38

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ..... 39

2.1. Объекты исследования ..... 39

2.2. Методики фармакогностического анализа ..... 39

2.3. Методики фитохимического анализа ..... 39

2.3.1. Качественные аналитические реакции ..... 39

2.3.2. Хроматографические методы ..... 40

2.3.3. Методы количественного определения БАВ ..... 45

2.4. Спектральные исследования ..... 50

2.5. Используемые стандартные образцы и реактивы ..... 50

2.6. Статистические методы анализа ..... 50

ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА СБОРА, ОБЛАДАЮЩЕГО АНГИОПРОТЕКТОРНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ..... 51

3.1. Теоретическое обоснование состава сбора ангиопротекторного ..... 51

3.2. Экспериментальное обоснование состава сбора ангиопротекторного . 56

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3 ..... 60

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СБОРА АНГИОПРОТЕКТОРНОГО ..... 61

4.1. Исследование химического состава сбора ангиопротекторного ..... 61
4.1.1. Исследование состава биологически активных веществ ..... 61
4.1.2. Исследование фенольных соединений методом МК-ВЭЖХ-УФ..... 65
4.1.3. Анализ минерального состава сбора ангиопротекторного..... 67
4.1.4. Исследование компонентного состава эфирного масла сбора ангиопротекторного ..... 69
4.1.5. Количественное содержание биологически активных веществ в сборе ангиопротекторном ..... 71
4.2. Разработка показателей для определения подлинности сбора ..... 74
4.2.1. Описание внешних признаков сбора ангиопротекторного ..... 74
4.2.2. Микроскопия сбора ангиопротекторного..... 75
4.2.3. Разработка методик качественных реакций и ТСХ сбора ангиопротекторного ..... 78
4.3. Разработка методик количественного анализа биологически активных веществ в сборе ангиопротекторном ..... 80
4.3.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе ангиопротекторном. ..... 80
4.3.2. Разработка и валидация методики количественного определения суммы фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном. ..... 88
4.4. Определение норм товароведческих показателей в сборе ангиопротекторном ..... 94
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4 ..... 97
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ВОЛОДУШКИ МНОГОЖИЛКОВОЙ ТРАВЫ (BUPLEURI MULTINERVIS HERBA) ..... 99
5.1. Микроскопические исследования сырья *Bupleuri multinervis herba* ... 100
5.2. Исследование флавоноидов и фенокарбоновых кислот сырья *Bupleuri multinervis herba* ..... 107
5.3. Материалы по разработке нормативной документации на сырье *Bupleuri multinervis herba* ..... 111
5.3.1. Разработка методики ТСХ-анализа для определения подлинности сырья..... 111
5.3.2. Разработка и валидация методики количественного анализа флавоноидов в сырье *Bupleuri multinervis herba*..... 113
5.3.3. Исследование минерального состава сырья *Bupleuri multinervis herba* ..... 122

5.3.4. Товароведческие показатели *Bupleuri multinervis herba* ..... 125
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5 ..... 127
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ЭКСТРАКТА СУХОГО НА ОСНОВЕ СБОРА АНГИОПРОТЕКТОРНОГО ..... 129
6.1. Разработка технологии получения экстракта сухого ..... 129
6.2. Исследование химического состава экстракта сухого на основе сбора ангиопротекторного ..... 134
6.2.1. Состав фенольных соединений экстракта сухого «Ангиофитон». .. 134
6.2.2. Исследование минерального состава экстракта сухого «Ангиофитон» ..... 135
6.2.3. Разработка показателей для ФСП «Экстракт сухой «Ангиофитон» 137
6.2.4. Нормирование показателей качества для экстракта сухого «Ангиофитон» ..... 143
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6 ..... 145
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ……..147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 170
ПРИЛОЖЕНИЕ 1……171
ПРИЛОЖЕНИЕ 2……182
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 ……...191
ПРИЛОЖЕНИЕ 4……197
ПРИЛОЖЕНИЕ 5……....200
ПРИЛОЖЕНИЕ 6……....206
ПРИЛОЖЕНИЕ 7 ……...212

# ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность**. Неблагоприятные экологические условия, малоподвижный образ жизни, стресс – это не полный перечень факторов, способствующих распространению венозных заболеваний. Масштабные исследования, проведенные по программе «Vein Consult», показали наличие венозных заболеваний у 83,6% пациентов, включенных в исследование [170]. В России варикозная болезнь в настоящее время занимает одно из ведущих мест среди сосудистых заболеваний и диагностируется более чем у 20% мужчин и 40% женщин [91].

Средствами базисной фармакотерапии служат флеботропные лекарственные препараты [97]. Для лечения данной группы заболеваний используется достаточно широкий спектр медикаментозных препаратов на основе природных соединений, а также полученных синтетическим, полусинтетическим путем. В профилактике и лечении венозных заболеваний используются также ангиопротекторные средства, они укрепляют сосудистые стенки, повышают их эластичность, восстанавливают проницаемость капилляров. Ангиопротекторным действием обладают биологически активные вещества растений (БАВ) – флавоноиды, антоцианы, фенолкарбоновые кислоты, сапонины.

Применение растительных средств в медицинской практике обусловлено тем, что они практически не токсичны, содержат комплекс биологически активных веществ, проявляют полифункциональные свойства и оказывают влияние на многие стадии патологического процесса [69]. На фармацевтическом рынке России многокомпонентные растительные препараты представлены в ограниченном количестве и составляют 4,8% от имеющегося ассортимента средств венотонизирующего действия. Зарегистрирован многокомпонентный препарат «Ангионорм», представляющий собой экстракт сухой из сырья растений *Aesculi hippocastani semina, Glycyrrhizae glabrae radices, Crataegi fructus, Rosae fructus* [76].

Сборы для лечения и профилактики венозных заболеваний на российском фармацевтическом рынке в настоящее время не включены в Государственный реестр лекарственных средств, поэтому разработка сбора ангиопротекторного действия и лекарственного средства на его основе является задачей актуальной.

Известны фармакопейные растения, обладающие капилляроукрепляющим, антиоксидантным действием и содержащие флавоноиды, антоцианы и фенолкарбоновые кислоты: *Bupleurum multinerve* DC, *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *Aronia melanocarpa* (Michx.). Венотонизирующее и капилляроукрепляющее действие проявляют сапонины *Aesculus hippocastanum* L., противовоспалительным и мочегонным действием обладают *Calendula officinalis* L. и *Fragaria vesca* L. Сырье данных растений может стать основой для разработки нового растительного средства.

Качество растительного сырья определяется нормативной документацией в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения». Качество сырья *Bupleuri multinervis herba* регламентируется ВФС-42-580-76 и не соответствует современным требованиям, что является основанием для разработки новой фармакопейной статьи.

**Степень разработанности темы исследования.**

Быковым В.А. с соавторами был предложен сбор «Касмин» для профилактики и лечения тромбоэмболий различной этиологии, сбор влияет на систему гемостаза, сердечно-сосудистую систему, липидный и углеводный обмен. В состав сбора входят *Aesculi hippocastani semina*, *Glycyrrhizae glabrae radices*, *Menthae piperitae folia* или *Melissae officinalis herbae*, *Crataegi fructus*, *Rosae fructus* [75]. В настоящее время сбор «Касмин» не входит в Государственный реестр лекарственных средств. Колхир В.К. и Воскобойникова И.В. предложили растительную композицию «Ангионорм» (№ государственной регистрации ЛС – 001137-050319), обладающую

антиагрегационным, капилляропротекторным, венотонизирующим действием [76].

Исследованию химического состава флавоноидов в надземных органах *Bupleurum multinerve* посвящены работы Минаевой В.Г. с соавторами в 1978 – 1991гг. [60-62], Михайловой С.И. [66]. Изучение фенилпропаноидов и флавоноидов в *Bupleurum multinerve* флоры Бурятии проводил Оленников Д.Н. с соавт. в 2013 году [160]. На сырье *Bupleuri multinervis herba* имеется ВФС-42-580-76, по которой подлинность сырья устанавливается методом бумажной хроматографии (время анализа 24 часа), количественное определение флавоноидов проводится хроматоспектрофотометрическим методом (время анализа более 24 часов).

**Целью** диссертационного исследования является разработка состава, стандартизация сбора ангиопротекторного действия и экстракта сухого на его основе.

**В задачи** диссертационной работы входило:

1. провести анализ ассортимента препаратов венотонизирующего действия на фармацевтическом российском рынке; дать фитохимическую и фармакологическую характеристику растениям, рекомендованным для включения в сбор ангиопротекторный;
2. теоретически и экспериментально обосновать компонентный состав сбора ангиопротекторного действия;
3. исследовать биологически активные вещества и элементный состав сбора ангиопротекторного, дать оценку их количественному содержанию;
4. установить макро- и микроскопические признаки, числовые показатели сбора; разработать и валидировать методики количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот;
5. исследовать состав фенольных соединений сырья *Bupleuri multinervis herba*, провести усовершенствование нормативной документации;

6. разработать технологию получения экстракта сухого «Ангиофитон» (на основе сбора ангиопротекторного), изучить его химический состав и провести стандартизацию;

7. разработать проекты ФС на сбор ангиопротекторный, ФС на сырье *Bupleuri multinervis herba,* ФСП на экстракт сухой «Ангиофитон».

**Научная новизна.** Теоретически обоснован и экспериментально подтвержден компонентный состав нового сбора ангиопротекторного (патент на изобретение № 2729784, зарегистрированный 12.08.2020). В составе сбора установлено содержание флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, тритерпеновых сапонинов, кумаринов, антоцианов, эфирного масла, полисахаридов, аминокислот, дубильных веществ. В сумме флавоноидов идентифицировано 10 соединений (рутин, изокверцитрин, нарциссин, изорамнетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин, изорамнентин, кемпферол, гиперозид, гисперидин, спиреозид), 4 фенолкарбоновые кислоты (3-*O*-кофеилхинная, 5-*O*-кофеилхинная, протокатеховая, кофейная), 2 антоциана (цианидин-3-*O*-глюкозид, цианидин-3-*O*-арабинозид). При этом преобладают рутин 3,35±0,06 мг/г, нарциссин 4,15±0,09 мг/г. В составе эфирного масла содержится 21 компонент. Доминирующие компоненты - салициловый альдегид (58,30%), метилсалицилат (16,17%). В составе тритерпеновых сапонинов идентифицированы календулозиды А и В, эсцин и в составе кумаринов – эскулетин, убеллиферон. Сбор содержит 8 макро-, 64 микро- и ультрамикроэлементов. Разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе ангиопротекторном в пересчете на рутин, суммы фенолкарбоновых кислот - в пересчете на 3-*O*-кофеилхинную кислоту.

Методом УВЖХ-ДМД-ИЭР-МС в *Bupleuri multinervis herba* идентифицировано 8 флавоноидов (производных кверцетина, кемпферола, изорамнетина) и 7 фенолкарбоновых кислот (производных хинной кислоты). Впервые установлено содержание флавоноидов кверцетин-3-*O*-глюкуронида, астрагалина и пяти фенолкарбоновых кислот 5-*O*-*n*-кумароилхинной, 5-*O*-ферулоилхинной, 3-*O*-ферулоилхинной, 3,5-ди-*O*-кофеилхинной, 4,5-ди-*O*-

кофеилхинной. В надземных органах *B. multinerve* исследован элементный состав, идентифицировано 72 элемента.

Дополнены анатомо-диагностические признаки сырья *Bupleuri multinervis herba* - наличие млечников во всех надземных органах. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин.

Разработан способ получения экстракта сухого «Ангиофитон» (на основе сбора ангиопротекторного) и установлены его показатели качества.

**Практическая значимость.** Разработаны новые растительные средства сбор ангиопротекторный и экстракт сухой на его основе.

В результате проведенных испытаний предложены и внедрены проекты фармакопейных статей на сбор ангиопротекторный - ФС «Сбор ангиопротекторный», траву володушки многожилковой - ФС «Володушки многожилковой трава - *Bupleuri multinervis herba*», ФСП на экстракт сухой «Ангиофитон».

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс в Иркутском государственном медицинском университете на дисциплинах фармакогнозия, фармацевтическая химия, основы фитотерапии, а также на курсах повышения квалификации провизоров в цикле «Контроль качества лекарственных средств».

Результаты исследования используются в работе контрольно-аналитической группы ООО «Иван-чай» (г. Ангарск): состав сбора ангиопротекторного, анатомо-диагностические признаки компонентов сбора ангиопротекторного, технология получения экстракта сухого «Ангиофитон», методики количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в экстракте «Ангиофитон» спектрофотометрическим методом.

**Методология и методы исследования.** При изучении перспективы внедрения сбора ангиопротекторного в практику проведен анализ ассортимента лекарственных средств, применяемых при венозных

заболеваниях; использованы методические подходы по разработке новых сборов с определенной фармакологической направленностью; проанализированы нормативная документация, сведения литературы, патенты на компоненты разрабатываемого сбора; дана оценка актуальности темы исследования, установлены цель и задачи диссертационной работы. В экспериментальной части работы применялись современные физико-химические методы: ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, МК-ВЭЖХ-УФ, ТСХ, методы титриметрии, спектрофотометрические методы.

**На защиту выносятся:**

- разработка компонентного состава сбора ангиопротекторного, исследования его химического состава, разработка товароведческих показателей, методик определения подлинности сбора, разработка и валидация методик количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот;

- материалы по исследованию фенольных соединений и совершенствованию нормативной документации на *Bupleuri multinervis herba,* установление анатомо-диагностических признаков, определение числовых показателей, разработка и валидация методики спектрофотометрического анализа суммы флавоноидов;

- способ получения, исследование химического состава, стандартизация экстракта сухого «Ангиофитон» (на основе сбора ангиопротекторного).

**Личное участие автора**. Автором проведен анализ лекарственных средств, применяемых для лечения и профилактики венозных заболеваний, определена перспективность разработки и внедрения в медицинскую практику новых растительных средств, в частности сбора ангиопротекторного действия. Запланированы и выполнены экспериментальные исследования по разработке состава сбора, изучению его химического состава, выполнены исследования по стандартизации сбора и

*Bupleuri multinervis herba*. Исследование фенольных соединений методом УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС и МК-ВЭЖХ-УФ проведены совместно с д.фарм.н. Оленниковым Д.Н. – ведущим научным сотрудником ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН. Автором подготовлены к публикации материалы диссертационного исследования, представлены доклады на конференциях, оформлены диссертационная работа и автореферат.

**Апробация полученных результатов**. Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на конференциях различного уровня. Международные конференции: «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Республика Казахстан, Шимкент, 2017). Всероссийские конференции: «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2017-2020), «Инновационные технологии в фармации» (Иркутск, 2018 - 2020), «Природные соединения и здоровье человека» (Иркутск, 2019, 2020).

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом основных научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава РФ по комплексной теме «Изучение перспективных лекарственных растений Восточной Сибири» (номер государственной регистрации 01.2.00304320).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по пунктам: 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 6 – «Изучение

химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 2 статьи – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, получен 1 патент РФ на изобретение.

# ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ ВЕНОТОНИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ И РАСТЕНИЙ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ СБОРА АНГИОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Анализ ассортимента препаратов, применяемых при заболеваниях вен на российском фармацевтическом рынке

В последнее время на фармацевтическом рынке страны значительно расширился спектр препаратов, применяемых для лечения и профилактики заболеваний вен. Основную долю лекарственных средств, предназначенных для лечения данной группы заболеваний, занимают препараты системного действия, зарегистрированные в виде таблеток, капсул, суспензий, драже, растворов. Кроме того, на сегодняшний день имеется немало средств, используемых для наружного применения, представленных в виде мазей и гелей [40].

Фармакологические свойства изучаемой группы препаратов направлены на улучшение микроциркуляции, обеспечение антитромбоцитарного и антиагрегационного эффектов, снятие воспалительных процессов, устранение отеков, регенерацию поврежденных тканей, укрепление стенок крупных сосудов и капилляров, повышение их тонуса [91]. Подавляющее большинство препаратов обеспечивает фармакологический эффект за счет входящих в состав основных биологически активных веществ – флавоноидов и сапонинов (табл. 1.1.1) [41, 93]. Лекарственные средства для лечения и профилактики заболеваний вен можно разделить на несколько групп: препараты растительного происхождения, представленные индивидуальными биологически активными соединениями и их комбинациями, препараты синтетического происхождения, полученные путем химических реакций и комбинированные препараты, произведенные путем синтеза биологически активных фракций и химических соединений [24] (табл. 1.1.1).

Таблица 1.1.1 - Ассортимент лекарственных средств для лечения заболеваний вен, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации

| № п/п | Название препарата | Состав | Основная группа БАВ, химический состав | Фармакологическое действие | Форма выпуска | Произво-дитель |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Препараты, содержащие флавоноиды*** | | | | | | |
| 1 | Ангиорус | Диосмин, гесперидин | флавоноиды | Ангиопротективное, венопртективное, венотонизирующее, противовоспалительное | Таблетки 500 г № 30, 60 | Россия |
| 2 | Антистакс | Экстракт красных листьев винограда | Флавоноиды - изокверцетин, кверцетина глюкуронид | Ангиопротекторное, противоотечное, защитное | Капсулы 180 мг № 20, 50, 100; гель, охлаждающий 125 мл, спрей для ног 75 мл, гель 125 мл | Россия |
| 3 | Вазокет | Диосмин | Флавоноиды | Ангиопротективное, венопртективное, венотонизирующее, противовоспалительное | Таблетки 600 мг № 30 | Швейцария |
| 4 | Венарус | Диосмин, гесперидин | флавоноиды | Ангиопротективное, венопртективное, венотонизирующее, противовоспалительное | Таблетки 500 мг и 1000 мг № 30, 60, 45 | Россия |
| 5 | Венолайф Дуо | Диосмин, гесперидин | флавоноиды | Венотонизирующее, ангиопротективное, противовоспалительное | Таблетки 500, 1000 мг № 30, 60 | Россия |
| 6 | Венорутон | рутинозид | Флавоноид- гликозид кверцетина | Флеботонизирующее, ангиопротективное | Капсулы 300 мг № 50; | Россия |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | гель 2% 40 г | |
| 7 | Детралекс | Диосмин, гесперидин | флавоноиды | Ангиопротективное, венопртективное, венотонизирующее, противовоспалительное | Таблетки 500 мг № 30, 60; 1000мг № 18, 30, 60, суспензия 1000мг № 30 | Франция |
| 8 | Троксевазин | Троксерутин | Флавоноид -гликозид кверцетина | Ангиопротективное, капилляропротекторное, противовоспалительное | Капсулы 300 мг № 50, 100; гель 2% 40 г. | Болгария |
| 9 | Троксерутин | Троксерутин | Флавоноид -гликозид кверцетина | Ангиопротективное, капилляропротекторное, противовоспалительное | Капсулы 300 мг № 50, 100; гель 2% 40 г | Россия |
| 10 | Флебавен | Диосмин, гесперидин | флавоноиды | венотонизирующее и ангиопротективное | Таблетки 500 мг № 32, 64, 96; 1000 мг № 32, 64 | Россия |
| 11 | Флебодиа 600 | Диосмин | флавоноиды | Ангиопротективное, венотонизирующее, противовоспалительное | Таблетки 600 мг № 30, 60 | Франция |
| 12 | Флебофа | Диосмин | флавоноиды | Ангиопротективное, венотонизирующее, противовоспалительное | таблетки 600 мг №30 | Россия |
| ***Препараты, содержащие сапонины*** | | | | | | |
| 13 | Венитан | Эсцин | Сапонин | Венотонизирующее, противоотечное, противовоспалительное | Гель 1% 50 г | Словения |
| 14 | Детрагель | Эсцин, гепарин натрия, Фосфолипиды | Сапонин, гликозоамингликан, | антикоагулянтное, противовоспалительное, венотонизирующее и антиагрегантное | Гель 40, 80 г | Франция |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 15 | Эскузан | Эсцин,<br>Экстракт семян каштана конского | Сапонины | Венотонизирующее, антиэксудативное | Раствор для приема внутрь 20 мл | Германия |
| ***Комбинированные препараты*** | | | | | | |
| 16 | АнгиоНорм | Экстракт сухой из плодов боярышника, корней солодки, семян каштана конского, плодов шиповника | Флавоноиды-авикулярин, сапонин-эсцин, поливитамины | Антиагрегационное, антитромбоцитарное, ангиопротективное, тонизирующее, противовоспалительное | Таблетки 100 мг № 100 | Россия |
| 17 | Аскорутин | Аскорбиновая кислота рутин | соединение ИЮПАК гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты, кверцетин-3-О-рутинозид, софорин | Капилляропротекторное Антиоксидантное | Таблетки № 50 | Россия |
| 18 | Гинкор | Троксерутин, гинко билоба экстракт | Флавоноиды- гликозид кверцетина | Капилляропротективное, венотонизирующее, улучшающее микроциркуляцию | Капсулы 300 мг №30.<br>Гель 3% 100г | Франция |
| 19 | Венолайф | Троксерутин, гепарин, декспантенол | Флавоноид, гликозоамингликан, производное пантотеновой кислоты | Ангиопроетективное, венотонизирующее, противовоспалительное, антиоксидантное | Гель 0,25%+5% +2% 40, 100 г | Россия |
| 20 | Индовазин | Индометацин, Троксерутин | Производное индолилуксусной кислоты, флавоноид | Противовоспалительное, обезболивающее, ангиопротективное | Гель 100г | Болгария |
| 21 | Троксевазин Нео | Троксерутин, гепарин, декспантенол | Флавоноид, гликозо-аминогикан, производное пантотеновой кислоты | Ангиопроетективное, венотонизирующее, противовоспалительное, антиоксидантное, противоотечное, фебринолитическое, регенерирующее | Гель 2% (1.7 мг+20 мг+50 мг/1 г: тубы) 40 г или 100 г | Исландия |

Препараты для лечения данной патологии представлены как российскими, так и зарубежными производителями и имеют разный ценовой сегмент.

Общее число препаратов российских и зарубежных, производных флавоноидов и эсцина, составляет 21 наименование. Доля лекарственных препаратов отечественного производства составляет 47%, а зарубежных – 53% (рис. 1.1.1)

Рисунок 1.1.1- Производители лекарственных препаратов и БАД венотонизирующего действия.

Наиболее значительные поставки препаратов данной категории приходятся на Францию и составляют 40%. Доля препаратов, произведенных в Болгарии, составляет 20%, Швейцария, Словения, Германия, Исландия импортируют в Россию по 10%. (рис. 1.1.2).

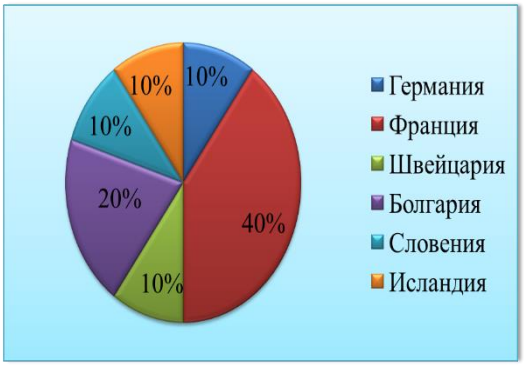



Рисунок 1.1.2 – Препараты зарубежных производителей.

Наиболее популярными лекарственными формами исследуемой категории препаратов являются таблетки (37%), гели (33%) и капсулы (18%). Значительно меньшая доля приходится на растворы для внутреннего применения, суспензии, спреи – по (4%) (рис. 1.1.3).

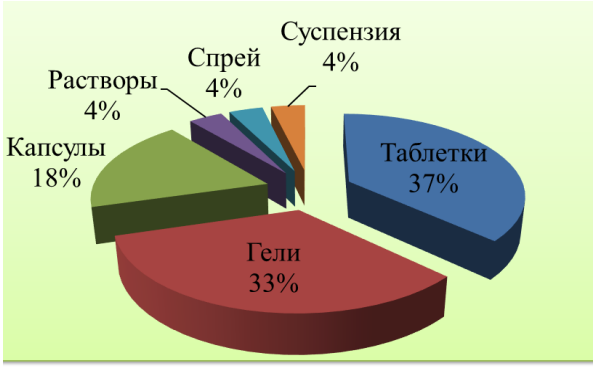



Рисунок 1.1.3 – Лекарственные формы, применяемые для лечения венозных заболеваний.

Значительная часть лекарственных средств, применяемых для лечения венозных заболеваний, приходится на препараты для внутреннего применения и составляет 69,5%, для наружного применения – 30,4%. Лекарственные средства, имеющие в своем составе такие биологически активные вещества, как флавоноиды, занимают широкую нишу, составляя 57% от общего объема лекарственных средств[31]. В меньшей степени представлены препараты, содержащие в своем составе сапонины, доля которых составляет всего 14%. Кроме того, на российском фармацевтическом рынке существуют и комбинированные лекарственные средства, составляющие 29 % от суммарного количества.

Основными компонентами, входящими в состав препаратов, для лечения заболеваний вен, являются биологически активные вещества – флавоноиды (диосмин, гесперидин, рутин) и сапонины (эсцин), которые оказывают ангиопротекторное, венотонизирующее, противовоспалительное, капилляроукрепляющее, антиоксидантное действие [31]. Комбинированные средства имеют в своем составе такие химические соединения, как гепарин натрия, обладающий антикоагулятным, противовоспалительным и противоотечным свойством, декспантенол, способствующий регенерации тканей, индометацин, способствующий противовоспалительному и обезболивающему действию [24,31].

Таким образом, на фармацевтическом рынке России представлен достаточно широкий ассортимент медикаментозных препаратов, для лечения и профилактики заболеваний вен, полученных синтетическим либо полусинтетическим путем. В настоящее время препаратов, содержащих биологически активные вещества растительного происхождения, ограниченное количество.

Быковым В.А. с соавторами разработан и предложен сбор «Касмин», в состав которого входят: каштана конского семяна –*Aesculus hippocastanum semena* (7-12%), солодки голой корни – *Glycyrrhizae glabrae radices* (12-17%), мяты перечной листья – *Menthae piperitae folia* или мелиссы лекарственной трава – *Melissae officinalis herbae* (20%), боярышника плоды – *Crataegi fructus* (20%), шиповника плоды – *Rosae fructus* (35%). Сбор обладает антитромботической, антиагрегационной, гиполипидемической активностью [75].

Дармограй В.Н. и Швальб П.Г. предложили растительную икомпозицию для профилактики и лечения сосудистых заболеваний. Состав сбора: каштана семена -*Aesculus hippocastanum semena* (1ч), шиповника плоды - *Rosae fructus* (1ч), синюхи голубой корневище с корнями – *Polemonii caerulei rhizomata cum radicibus* (1ч), смолевки татарской или поникающей трава – *Silene tatarica herba* (1ч). Сбору присвоено название «Цитросипол» [74].

В 2004 году Колхир В.К. и Воскобойникова И.В.предложили экстракт сухой из плодов боярышника - *Crataegi fructus*, корней солодки - *Glycyrrhizae glabrae radices*, семян каштана конского - *Aesculus hippocastanum semena*, плодов шиповника - *Rosae fructus,*который обладает антиагрегационным, капилляропротекторным, венотонизирующим действием [76].

Ассортимент лекарственных средств, в виде сборов, суммарных экстрактов выпускают в недостаточном количестве.

## 1.2. Современные методические подходы по разработке многокомпонентных растительных средств (лекарственных сборов)

Сборы лекарственные - это смеси двух и более видов лекарственного растительного сырья различных способов переработки, возможно с добавлением субстанций минерального, синтетического, растительного и животного происхождения [23].

Сырье исходных компонентов сбора, применяемое в составе сбора, должно соответствовать требованиям нормативной документации [23, 92, 103,111].

Многокомпонентные лекарственные средства (лекарственные сборы), в состав которых входит несколько растений, характеризуются более ярко выраженным многосторонним фармакологическим действием, чем средства из отдельных компонентов. Это объясняется проявлением выраженного результативного эффекта, благодаря чему происходит повышение активации регуляторных механизмов, что интегрирует их в направлении восстановления гомеостаза [53,101].

Фармакологическую активность лекарственные растения проявляют за счет не только основных биологических соединений, но и сопутствующих веществ, входящих в их химический состав. При очистке извлечений от сопутствующих соединений, отсутствуют сопрягающие ингредиенты и основные компоненты растений не достигают в полной мере точек приложения и не проявляют весь спектр фармакологического действия [73].

С этой точки зрения многокомпонентные лекарственные препараты (сборы) можно рассматривать, по мнению фармаколога С.М. Николаева, как фитофармакологические системы, модулирующие естественные, эволюционно сложившиеся механизмы восстановления здоровья [69].

Основные биологически активные вещества взаимодействуют с рецепторами, ферментами и т.д., принимая участие в базисных биохимических, биофизических процессах.

Куркиным В.А. в химическом составе растений выделяются основная группа биологически активных соединений и вторая группа биологически активных соединений, а также сопутствующие вещества [53]. Вторая группа природных биологически активных соединений и сопутствующие вещества реализуют свое действие на уровне регуляторных центров, сопрягая и интегрируя функции базисных процессов, физиологических реакций [55]. Они информируют регуляторные центры и обеспечивают координацию всех функций, направляя их в русло восстановления саморегуляции, гомеостаза.

Близкородственные по химической структуре биологически активные вещества способны взаимодействовать с одним или несколькими рецепторами. В результате происходит частичное или полное дублирование эффектов, что обеспечивает надежность фармакологического воздействия.

Подбор лекарственных растений в состав сбора осуществляется с учетом характера заболевания, особенностей его протекания, наличия сопутствующих патологических процессов, возникающих при данном заболевании [8, 53]. При этом необходимо знать основной и сопутствующий фармакологический эффект растения. В составе сбора должно быть 2-3 вида растительного сырья с одинаковым основным, но с разными сопутствующими действиями. Рекомендуется вводить в состав сбора 3-5 видов растений. Применение сборов имеет преимущества по сравнению с индивидуальным растительным сырьем, т.к. привыкание к многокомпонентным смесям развивается медленно и возможно моделирование необходимого основного фармакологического действия и сопутствующих эффектов [8, 74]. Поскольку в патологических и адаптивных реакциях участвуют практически все его системы, лечебные и регулирующие воздействия целесообразно основывать на общем (системном) действии на организм, а в качестве обязательного компонента терапии – использовать средства общеукрепляющего типа действия (тонизирующие, поливитаминные и т.п. растения) [73].

При разработке рецептуры сбора необходимо выбрать 2-3 растения, имеющие сходные основные биологически активные вещества, которые будут определять основное фармакологическое действие. Главный компонент (первое растение) применяется самостоятельно и предназначен для лечения конкретного заболевания. Биологически активные вещества второго или третьего растения, кроме того, подкрепляют, усиливают, или дополняют действие главного компонента. Вспомогательные растения придают дополнительные свойства сбору с учетом сопутствующих патологических процессов, свойственных данному заболеванию [44, 53, 69].

Этапы разработки лекарственных сборов

Первоначально определяется нозологическая форма заболевания, проводится анализ основных и сопутствующих симптомов заболевания. Далее анализируется ассортимент лекарственного растительного сырья, используемого в научной медицине, которое применяется при основных и сопутствующих симптомах заболевания. Выбирается растительное сырье, наиболее часто применяемое при данных условиях (рис. 1.2.1).

Следующим этапом является проверка официнальности лекарственных растений, наличие фармакопейных статей или наличие другой нормативной документации. Далее проводят изучение основных и сопутствующих биологически активных веществ выбранного лекарственного растительного сырья. Проводят отбор 2-3 базовых видов сырья со сходным химическим составом основных биологически активных веществ и действием (влияние на основные симптомы заболевания), но имеющие разный набор сопутствующих веществ, а также осуществляется выбор растительного сырья для влияния на сопутствующие симптомы.

Создание проекта прописи лекарственного сбора. Проведение анализа совместимости компонентов сбора химической и технологической.

Рисунок 1.2.1 - Этапы разработки сборов с заданной фармакологической активностью.

Определение оптимального соотношения компонентого состава сбора на основе экспериментальных исследований по содержанию биологически активных веществ, отвечающих за фармакологическую активность. Проведение исследований для подтверждения фармакологического действия разработанного сбора.

## 1.3. Ботанико-ресурсная характеристика компонентов, входящих в состав сбора ангиопротекторного

**Володушка многожилковая** - ***Bupleurum multinerve* DC.**, семейства сельдерейных - *Apiaceae* многолетнее травянистое растение высотой 10-100 см, с одним или несколькими стеблями. Они простые или ветвистые в верхней части. Прикорневые листья ланцетовидные или линейно-ланцетовидные 5-7 нервные, к основанию суженные в более или менее длинный черешок. Средние и верхние стеблевые листья сидячие, в нижней части яйцевидно-расширенные с сердцевидным, стеблеобъемлющим основанием. Цветки мелкие пятимерные с желтым венчиком собраны в многоцветковые соцветия зонтички. Зонтички крупные с 5-15 лучами, обертки состоят из 2-4 крупных, неравных между собой листочков с заостренной верхушкой. Плоды – вислоплодники овальные, длиной 3-4 см, сжатые с боков, с двумя бороздками, более или менее крылатыми ребрами. Цветет в июне-июле, плодоносит в августе [50, 162].

*B. multinerve* имеет дизъюнктивный ареал. Вид встречается на Алтае, в Красноярском крае, Иркутской области, Хакасии, Забайкалье, Туве, а также произрастает на Южном и Среднем Урале, в областях Воронежской, Курской и Белгородской, в Казахстане, Монголии [9, 80].

*B. multinerve* произрастает на открытых участках, опушках сосновых и лиственных лесов, на степных и высокогорных лугах. Промышленные массивы *B. multinerve* находятся на Алтае, в Хакасии и Туве. У растения наблюдаются пропуски в цветении, что является биологическим механизмом

адаптации к неблагоприятным условиям произрастания. На Алтае на площади 800 га урожайность *B. multinerve* составляла 341,7 кг/га, эксплуатационный запас 273, 4 тонны. Возможный объем заготовки равен 54,7 тонны [68, 157].

Промышленное возделывание *B. multinerve* возможно в лесостепной зоне на Алтае, Западной Сибири. При культивировании отмечается повышение продуктивности и увеличение содержания флавоноидов [9, 67, 68].

В медицинской практике используется володушки многожилковой трава – *Bupleuri multinerve herba* (рис. 1.3.1).

Рисунок 1.3.1 - Сырье *Bupleuri multinerve herba.*

**Конский каштан обыкновенный – *Aesculus hippocastanum* L.** семейства конскокаштановые – *Hippocastanaceae* дерево высотой до 30 м, листья супротивные длинночерешковые до 25 см в диаметре, 5-7 пальчато-сложные. Плод - крупная трехстворчатая коробочка, обычно шиповатая с одним крупным семенем. Семя размером до 4 см, блестящее, коричневое с сероватым пятном [28]. *Ae. hippocastanum* растет на Балканском полуострове, в России культивируется от южных районов Европейской части до Санкт-Петербурга.

В медицинской практике применяются конского каштана семена – *Aesculi hippocastani semina* (рис. 1.3.2). Ресурсы семян конского каштана превосходят потребности в медицине [28].

Рисунок 1.3.2 – Сырье *Aesculi hippocastani semina.*

**Лабазник вязолистный** – *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. семейства розоцветных – *Rosaceae* многолетнее травянистое растение высотой до 2-х метров. Листья прерывисто-пальчато-рассеченные очередные. Цветки мелкие, белые, душистые в метельчатом соцветии с ароматным запахом.

*F. ulmaria* распространен по всей территории Европейской части России, на Кавказе, в Западной и Восточной Сибири. Растение предпочитает увлажненные луга, болота, заболоченные берега рек и озер, растет в сырых лесах**,** на опушках и по вырубкам [27].

Сырьем являются лабазника вязолистного цветки – *Filipendulae ulmariae flores* (рис. 1.3.3).

Рисунок 1.3.3 – Сырье *Filipendulae ulmariae flores.*

**Арония черноплодная (рябина черноплодная) – *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot** семейства розоцветных – *Rosaceae* кустарник высотой 2,5 м, листья цельные, обратно-яйцевидные, с пильчатым краем. Цветки

пятимерные в соцветии щиток, плоды яблокообразные, черного цвета с сизоватым налетом.

Родина *A. melanocarpa* Северная Америка, в России культивируется в Европейской части России, на Алтае, Урале, Сахалине [59, 82].

Лекарственным растительным сырьем являются аронии черноплодной свежие плоды - *Aroniae melanocarpae recens fructus*, аронии черноплодной сухие плоды - *Aroniae melanocarpae sicco fructus* [23]. В качестве компонента сбора выбраны плоды аронии черноплодной сухие (рис. 1.3.4).

Рисунок 1.3.4. Сырье *Aroniae melanocarpae sicco fructus.*

**Земляника лесная – *Fragaria vesca* L**. семейства розоцветных – *Rosaceae* многолетнее травянистое растение до 20 см высотой, листья в прикорневой розетке, черешковые, тройчатосложные. Из пазух листьев развиваются ползучие побеги, укореняющиеся в узлах. Цветки с белым венчиком, в щитковидном соцветии. Плод многоорешек типа земляничины [25].

Произрастает *F. vesca* в лесной и лесостепной зоне Европейской части России, Западной и Восточной Сибири, на Кавказе, Казахстане [78].

Лекарственным сырьем являются земляники лесной листья - *Fragariae vescae folia* (рис. 1.3.5).

Рисунок 1.3.5 – Сырье *Fragariae vescae folia*.

**Календула лекарственная – *Calendula officinalis* L.** семейства астровых – *Asteraceae* однолетнее травянистое растения высотой до 90 см. Листья очередные обратно-ланцетные. Цветки в крупных корзинках до 5-8 см золотисто-желтые или оранжевые, краевые цветки ложноязычковые, в центре трубчатые. Плоды семянки разной формы и размеров, развиваются из краевых ложно-язычковых цветков, трубчатые цветки бесполые [10].

Дикорастущие формы *C. officinalis* неизвестны. Растение встречается только в культуре. Основные районы культуры Самарская область, Краснодарский край, Новосибирская область.

Лекарственным растительным сырьем являются календулы лекарственной цветки - *Calendulae officinalis flores* (рис. 1.3.6).

Рисунок 1.3.6 - Сырье *Calendulae officinalis flores*.

## 1.4. Химический состав и стандартизация растительного сырья, входящего в состав сбора ангиопротокторного

***B. multinerve***. В надземных органах растения, произрастающего в Западной Сибири и Бурятии, установлено содержание флавоноидов кверцетина, рутина, кемпферола, нарциссина, изокверцитрина, изорамнетина, изорамнетин-3-*O*-глюкозида [60-62, 66, 160]. Фенилпропаноиды и флавоноиды исследовались в надземных органах *B. multinerve* флоры Бурятии. В листьях установлено содержание 3-*O*-кофеилхинной кислоты 7,73 мг/г, 1,3-ди-*O*-кофеилглицерина 0,71 мг/г, рутина 34,14 мг/г, в стеблях содержалось 3-*O*-кофеилхинной кислоты 1,94 мг/г и изокверцетрина 1,11 мг/г [133, 160].

Тритерпеновых сапонинов было найдено 10%, каротиноидов 10-30 мг%, аскорбиновой кислоты 400 мг%, также в *B. multinerve* содержатся дубильные вещества, следы эфирного масла, плоды накапливают его до 0,8% [95, 133]. В составе эфирного масла надземных органов *B. multinerve* флоры Монголии идентифицированы (E)-β-оцимена (18,3%), гермакрена D (19,41%) [105, 122, 165].

***Ae. hippocastanum***. Семена содержат кумарины умбеллиферон, эскулетин, цихорин, эскулин, изоскополетин, скополетин, изоскополин; флавоноиды кверцетин, авикулярин, астрагалин, кверцитрин, юглан, изокверцитрин, кемпферол-3-*O*-α-L-арабинозид, кемпферол-3-*O*-α-L-рамнозид [46, 138]. С. Н. Комиссаренко после гидролиза суммы тритерпеновых сапонинов (эсцина) были получены агликоны олеананового ряда: эсцигенин, барринтогенол D, протоэсцигенин, барринтогенол [94].

В составе семян содержатся аминокислоты треанин, аланин, аргинин; незаменимые аминокислоты метионин, валин, лейцин, изолейцин, лизин [28].

Доминирующими сопутствующими веществами семян являются белки 8-10%, крахмал до 50%, жирное масло 6-8%, дубильные вещества [28].

***F. ulmaria.*** Цветки содержат флавоноиды гиперозид, авикулярин, кверцетин, изокверцитрин, спиреозид, миквелианин, никотифлорин,

кверцетин-3-*O*-гентиобиозид, кверцитрин, апигенин, кверцетин-4′-*O*-рутинозид (ульмариозид) [1]. В сумме флавоноидов преобладают спиреозид 49,36 мг/г изокверцитрин 3,79 мг/г, рутин 6,94 мг/г, кемпферол-4′-*O*-глюкозид 7,86 мг/г [159]. Из фенольных кислот в *F. ulmaria* идентифицированы *n*-гидрокибензойная, салициловая, сиреневая, *n*-кумаровая, коричная, галловая, *o*-анисовая, эллаговая, 3-*O*- и 5-*O*-галлоилхинная. Производные коричной кислоты – кофейная кислота, моно-, ди- и три-*O*-кофеилхинные кислоты. Из эллаготаннинов содержатся теллимаграндин $I_1$, $I_2$, II, ругозин $B_1$, $B_2$, D [52].

В составе эфирного масла цветков *F. ulmaria* содержатся салициловый альдегид (35,7%), 4-метоксибензальдегид, метилсалицилат (18,4%), бензилсалицилат (6,3%), линалоол (2,3%), цинеол и эукарвон [36].

Из тритерпеновых кислот идентифицированы урсоловая и олеаноловая кислоты, из аминокислот преобладают глутаминовая и аспарагиновая кислоты [81].

***A. melanocarpa***. Плоды содержат флавоноиды, аскорбиновую кислоту до 110 мг%, каротиноиды, витамины группы В ($B_1$, $B_2$), дубильные вещества, органические кислоты, сахара до 10% (сахароза, глюкоза, фруктоза), полисахариды, антоцианы, проантоцианидины [139, 141].

Преобладают в сумме антоцианов**:** цианидин-3-*O*-галактозид, цианидин-3-*O*-арабинозид, минорный цианидин-3-*O*-глюкозид., цианидин-3-*O*-ксилозид. В плодах из разных мест сбора на долю цианидин-3-*O*-галактозида приходится 63-72%, в три раза меньше содержалось цианидин-3-*O*-арабинозида от суммы антоцианов [6, 54].

Количественное содержание суммы антоцианов в сухих плодах составляет 4,85-17,37% [141].

В состав суммы флавоноидов входят гесперидин (7-*O*-рутинозид гесперетина), кверцетин, рутин, кверцитрин. Фенилпропаноиды представлены хлорогеновой и криптохлорогеновой кислотой [141].

***F. vesca.*** Листья содержат гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, дубильные вещества, кумарины [78]. Флавоноиды *F. vesca* представлены флавонолами, катехинами и лейкоантоцианами. В сумму флавоноидов входят агликоны кверцетин, апигенин, кемпферол; гликозиды рутин, гиперозид, изокверцетин, кемпферол-3-*O*-рутинозид, астрагалин, робинин. Количественное содержание флавоноидов в *F. vesca* 1,8–2,8% [47, 134]. Из группы флавана листья содержат производные катехина и эпикатехина (процианидины типа А и В), производные эллаговой кислоты (педункулагин и агримониин). Содержание дубильных веществ составляет от 7,3 до 11,1% [78]. В листьях установлено содержание кислот 3-*O*-кофеилхинной, 5-*O*-кофеилхинной, кофейной, галловой, хинной, салициловой; кумаринов - кумарина, умбеллиферона, скополетина [134].

Кроме этого, в листьях *F. vesca* содержатся урсоловая кислота, алкалоиды, эфирное масло (0,144%), арбутин. Содержание аскорбиновой кислоты составляет до 0,55%, каротина 4,0 мг%, α, β, γ, δ-токоферолов 3,8 мг% и фолиевой кислоты 115 мкг%. Содержание полисахаридов составляет от 4,5 до 7,5%, свободных аминокислот 14 мг%, связанных - 90 мг% [17].

***C. officinalis.*** Цветки содержат каротиноиды – α- и β-каротин, ликопин, лютеин, виолоксантин, флавоксантин. Сумма каротиноидов в краевых цветках достигает 3%. Флавоноиды производные кемпферола, кверцетина и изорамнетина: изокверцитрин, изорамнетин-3-*O*-глюкопиранозид, календофлазид, рутин, гиперозид, нарциссин, мангаслин, тифанеозид [18, 150, 156, 161]. Фенольные кислоты представлены бензойными кислотами - ванилиновой, сиреневой; коричными кислотами – феруловой, изоферуловой, кофейной, 3,4,5 – трикофеилхинной [108, 153].

В цветках *C. officinalis* содержатся также тритерпеновые сапонины календулозиды – гликозиды олеаноловой кислоты, производные лупеола – арнидиол, фарадиол [123]. Эфирного масла содержится до 0,12%, дубильных веществ до 6%, смолистых веществ 3%, слизи до 4% [147].

Стандартизация сырья компонентов сбора ангиопротекторного проводится в соответствии с нормативными документами (табл. 1.4.1).

При установлении подлинности сырья применяется ТСХ с использованием стандартных образцов, в отдельных случаях используются качественные реакции.

По содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин с применением спектрофотометрических методик проводят стандартизацию сырья *B. multinerve, F. vesca, C. officinalis*. В сырье *F. vesca* расчет содержания суммы флавоноидов проводится в пересчете на спиреозид. В плодах *A. melanocarpa* определяется содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-*O*-глюкозид. В семенах *Ae. hippocastanum* методом ВЭЖХ определяется содержание эсцина [29].

Изучение методик количественного определения, используемых в анализе исходных компонентов сбора ангиопротекторного, показало, что для анализа сырья *B. multinerve* по ВФС -42-580-76 используется хроматоспектрофотометрический метод. Данным методом на первом этапе осуществляется разделение суммы флавоноидов, методом бумажной хроматографии, с последующим элюированием 95% спиртом этиловым. Измерение оптической плотности проводят при 420 нм в варианте прямой спектофотометрии (раствор сравнения - спирт этиловый). Расчет процентного содержания суммы флавоноидов проводится по калибровочному графику, построенному по рутину. Методика количественного определения длительная и трудоемкая. Экстракция сырья осуществляется при комнатной температуре 24 ч, разделение флавоноидов проводят методом БХ также в течение 24 часов.

На основании этого следует, что необходимо проведение исследований по совершенствованию методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *B. multinerve.*

Таблица 1.4.1 - Методики определения подлинности и количественного содержания БАВ в компонентах сбора ангиопротекторного

| Компонент | НД | Подлинность | Количественное определение | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | показатель | метод | норма |
| Володушки многожилковой трава – *Bupleuri multinervis herba* | ВФС-42-580-76 | БХ | | хроматоспектро-фотометрический Система БХ: 85% уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (10:2:3) Суммы флавоноидов в пересчете на рутин | Не менее 2% |
| Конского каштана семена – *Aesculi. hippocastani semina* | ТУ 9377-075-04868244-2008 | ТСХ система: этилацетат-изопропанол-вода (40:40:3); СО эсцин | Содержание эсцина | ВЭЖХ | Не менее 4% |
| Лабазника вязолистного цветки – *Filipendulae ulmariae flores* | ВФС – 42-1717-87 | Качественная реакция на флавоноиды | Суммы флавоноидов в пересчете на спиреозид | Спектрофото-метрический | Не менее 2% |
| Аронии черноплодной сухие плоды - *Aroniae* | ФС.2.5.0003.15 | ТСХ Система: н-бутанол-уксусная к-та | Суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-*О*- | Спектрофото-метрический | Не менее 3% |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *melanocarpae sicco fructus* | | ледяная-вода (4:1:2) | глюкозид | | |
| Земляники лесной листья - *Fragariae vescae folia* | ФС.2.5.0016.15 | ТСХ<br>Система: этилацетат-муравьиная к-та-безводная – вода (70:15:15);<br>СО рутин | Суммы флавоноидов в пересчете на рутин.<br>Экстрактивных в-в, извлекаемых водой | Спектрофото-метрический<br><br>Гравиметрический | Не менее 1%<br><br>Не менее 25% |
| Календулы лекарственной цветки - *Calendulae officinalis flores* | ФС.2.5.0030.15 | ТСХ<br>1.Система: муравьиная к-та безводная-вода-этилацетат (10:10:80)<br>СО рутин, хлорогеновая к-та, кофейная к-та<br>2.Система: гексан-бензол (85:15);<br>СО β-каротин<br>Качественная реакция на тритерпеновые сапонины | Суммы флавоноидов в пересчете на рутин.<br>Экстрактивных веществ, извлекаемых, 70% спиртом этиловым.<br>Экстрактивных веществ, извлекаемых водой | Спектрофото-метрический<br><br>Гравиметрический<br><br>Гравиметрический | Не менее 1%<br><br>Не менее 35%<br><br>Не менее 35% |

## 1.5. Фармакологическая характеристика растительного сырья, входящего в состав сбора ангиопротекторного

***B. multinerve.*** Флавоноиды растений рода *Bupleurum* обладают Р-витаминной активностью [62, 63, 64]. Флавоноидный комплекс (кверцетин, 3-рутинозид изорамнетин, рутин, изокверцетин) укрепляет стенки капилляров, делает их эластичными, восстанавливает проницаемость [39, 83, 104, 113, 158]. На основе флавоноидов *B. multinerve* и *Bupleurum aureum* был предложен препарат «Буплерин» как капилляроукрепляющее средство при отеках, связанных с сосудистой недостаточностью, кровотечениях из носа, десен, при гипертонической болезни [20, 57, 63, 64, 70, 98]. Флавоноиды этого растения также проявляют гепатопротекторное действие [14, 15], обладают антигиалуронидазной активностью [56].

Исследования показали, что эфирное масло *B. multinerve* обладает антиоксидантной активностью и антимикробным действием [165].

***Ae. hippocastanum***. Комплекс тритерпеновых сапонинов, под названием эсцин, обладает венотонизирующим, ангиопротекторным и антитромботическим действием [31, 96].

Экспериментальные и клинические исследования показали уменьшение отеков, которые развиваются на фоне воспалительного процесса. При этом было показано, что противоотечный эффект находится в прямой зависимости от концентрации эсцина [45, 148]. Препарат эскузан повышал сократимость изолированных вен на 50% в течение 5 часов. Венотонизирующее действие связано с образованием простагландина $F_2$ [169].

***F. ulmaria.*** Экспериментальными исследованиями установлено, что извлечения из цветков *F. ulmaria* обладают противовоспалительным, ранозаживляющим, гепатозащитным, антикаогулянтным, противоязвенным, ноотропным, антиканцерогенным действием, а также флавоноиды *F. ulmaria* уменьшают проницаемость капилляров [13, 19, 33, 109, 115].

Сумма флавоноидов и другие фенольные соединения *F. ulmaria* проявляют антиоксидантное, противодиабетическое действие [12].

Гель с экстрактом *F. ulmaria* в эксперименте оказывал заметное капилляроукрепляющее действие, превосходящее гель троксевазин [30].

Выраженной антиоксидантной активностью обладают экстракты *F. ulmaria* на 70 и 95% этаноле [2], а наибольшую активность проявляет хлороформная фракция из экстракта на 70% этаноле. Высокая антиоксидантная активность хлороформной фракции 70% водно-этанольного экстракта *F. ulmaria* может быть обусловлена наличием в ней ароматических карбоновых кислот, фенольных и тритерпеновых соединений [116].

***A. melanocarpa.*** Плоды *A. melanocarpa* обладают поливитаминным, гипотензивным, капилляроукрепляющим, антимикробным действием [137].

Проведенными экспериментами была установлена высокая мембранстабилизирующая активность фитопрепаратов аронии черноплодной в низких разведениях. Высушенные плоды рябины черноплодной могут быть рекомендованы как новый перспективный источник для получения фитопрепаратов, обладающих адаптогенным, антиоксидантным действием [129, 132].

Полифенольные соединения *A. melanocarpa* снижают уровень глюкозы в крови в результате ингибирования α- глюкозидазы [107, 130, 143].

Исследования проантоцианидиновых фракций, процианидинов C1, B5 и B2 и антоцианинов показали иммуномодулирующую и противовоспалительную активность. Цианидин-3-глюкозид обладал более сильной активностью, чем другие антоцианы [144, 146].

***F. vesca.*** Водные извлечения из *F. vesca* в эксперименте показали сосудорасширяющее действие, которое носило дозозависимый характер, действие по эффективности не уступало водным извлечениям из цветков и листьев боярышника красного. Экстракт листьев *F. vesca* восстанавливает процесс гемопоэза. Содержание мелокариоцитов увеличивалось за счет

нейтрофильных гранулоцитов на 17-35%, в костном мозге увеличивалось количество эритроидных и лимфоидных клеток [4, 5].

В дозе 50 мг/кг сумма фенольных соединений *F. vesca* в 2 раза увеличивала диурез [99]. Работы С.Г. Аксиненко и С.С. Кравцовой показали, что листья *F. vesca* обладают выраженной противовоспалительной активностью [3]. Сумма фенольных соединений также оказывает влияние на центральную нервную систему. Установлено седативное действие, при этом не происходит расслабление мышц, что отличает *F. vesca* от других седативных средств и транквилизаторов [99]. Для листьев *F. vesca* установлено, также протиязвенное, регенерирующее, антистрессорное действие [131]. Настой листьев *F. vesca* применяют как мочегонное средство при мочекаменной и желчекаменной болезнях, при падагре, диабете и малокровии [99]. Водные извлечения обладают антиоксидантным, противовоспалительным действием [3, 26, 136].

***C. officinalis***. Экспериментально установлено антимикробное действие препаратов *C. officinalis* [71]. Настой и спиртовые извлечения цветков подавляют рост ряда микроорганизмов: *Escherichia coli, Candida albicans, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*. Наиболее широким спектром действия обладает настой цветков [128, 147].

Препараты *C. officinalis* проявляют противовоспалительную [168] и иммуномодулирующую, гастропротективную активность [149, 163], стимулируют процессы регенерации тканей, ускоряют и улучшают качество грануляции, способствуют более быстрой эпителизации, снижают кровяное давление, проявляют антиоксидантную активность [58, 125 - 127, 142,152].

Галеновые препараты оказывают спазмолитическое действие, снимают спазм сфинктеров желчевыводящих путей, усиливают секреторную функцию печени и поступление желчи в двенадцатиперстную кишку [140].

Исследования на крысах показали, что в дозе 50 мкл/кг настойка и экстракт жидкий цветков *C. officinalis* при однократном введении внутрижелудочно стимулируют диурез, а также экскрецию креатинина и

электролитов [32, 142, 156]. Экстракт, содержащий тритерпеноиды, обладал высокой противовоспалительной активностью [123, 164, 167].

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1.Для лечения и профилактики заболеваний, связанных с патологией вен и капилляров, широко используются препараты, полученные синтетическим или полусинтетическим путем, и их комбинации. Растительные препараты, содержащие комплексы биологически активные вещества, используются ограниченно. В связи с данным положением разработка препаратов на растительной основе является перспективным научным направлением.

2. Анализ ассортимента лекарственных средств данной группы показал, что значительная их доля приходится на зарубежного производителя. Основными импортерами препаратов в нашу страну являются Франция и Болгария.

3. Препараты, применяемые для лечения и профилактики заболеваний вен и капилляров, имеют различные лекарственные формы, однако сборы, обладающие капилляроукрепляющим, противовоспалительным, антиоксидантным действием, воздействующие на все системы организма и имеющие минимальные побочные действия, в настоящее время не входят в государственный реестр лекарственных средств.

4. Основными действующими компонентами, применяемыми для лечения и профилактики заболеваний вен и капилляров, входящими в большинство препаратов, являются флавоноиды, сапонины, витамины. При разработке состава сбора ангиопротекторного действия в него должно входить растительное сырье, содержащее эти группы биологически активных веществ.

5. Разработка сбора ангиопротекторного должна быть осуществлена по принципам разработки растительных лекарственных средств.

6. Анализ нормативной документации растительного сырья, входящего в сбор ангиопротекторный, показал, что на сырье *Bupleuri multinervis herba* нормативный документ (ВФС-42-580-76) не соответсвует требованиям, что является основанием для разработки новой фармакопейной статьи.

# ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 2.1. Объекты исследования

Объектом исследования являлся шестикомпонентный сбор, состоящий из сырья: *Bupleuri multinervis herba* – володушки многожилковой трава (ВФС - 42-580-76), *Aesculi hippocastani semina* - конского каштана семена (ТУ 9377-075-04868244-2008), *Filipendulae ulmariae flores* лабазника вязолистного цветки - (ВФС – 42-1717-87), *Aroniae melanocarpae sicco fructus* - аронии черноплодной сухие плоды (ФС.2.5.0003.15), *Fragariae vescae folia* - земляники лесной листья (ФС.2.5.0016.15), *Calendulae officinalis flores* - календулы лекарственной цветки (ФС.2.5.0030.15). Все компоненты сбора соответствовали требованиям нормативной документации.

Объектом исследования являлись также образцы сырья *Bupleuri multinervis herba*, собранные в разных районах Иркутской области в 2017-2020 гг в период массового цветения, сырье сушили в тени под навесом.

## 2.2. Методики фармакогностического анализа

Макро- и микроскопический анализ проводили по требованиям ГФ XIV издания. В работе применяли бинокулярный стереоскопический микроскоп МБС-12, микроскопы Микмед-2, марки «Levenhuk». Микрофотографии препаратов выполняли цифровой фотокамерой, фотографии обрабатывали на компьютере в программе Windows Adobe Photoshop 10,0.

При разработке числовых показателей сбора, *Bupleuri multinervis herba* влажность, зола общая, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, примеси, степень измельченности использовали соответствующие ОФС, изложенные в ГФ XIV [23].

## 2.3. Методики фитохимического анализа

### 2.3.1. Качественные аналитические реакции

Для обнаружения групп БАВ в исследуемых объектах применяли аналитические реакции. В водных извлечениях определяли содержание

сапонинов, дубильных веществ, полисахаридов, спиртовые извлечения тестировали на содержание флавоноидов, кумаринов [118].

### 2.3.2. Хроматографические методы

*Бумажная хроматография (БХ)*

Исследование качественного состава фенольного комплекса проводили в спиртовых извлечениях (1:50), экстракцию проводили 70% спиртом этиловым. После экстракции на кипящей водяной бане извлечение фильтровали, спирт удаляли и водный остаток обрабатывали хлороформом. Очищенное извлечение наносили на хроматографическую бумагу марки Санкт-Петербургской фабрики № 2 «М», разделение проводили двухмерной и одномерной хроматографией в системах н-бутанол-лед. уксусная кислота – вода (4:1:2) и 15% уксусная кислота. Для идентификации применяли спиртовые 0,05% растворы стандартных веществ: кемпферол, кверцетин, рутин, гиперозид, гисперидин, спиреозид, 3-*О*-кофеилхинная кислота, кофейная кислота, протокатеховая кислота.

Хроматограммы проявляли, парами аммиака, 1% спиртовым р-ром алюминия хлорида, просматривали до проявления и после обработки реактивами в видимом и УФ-свете (360 нм). Идентификация соединений проводилась по совпадению значений Rf и окраске пятен. Кроме того, использовались сведения литературы по хроматографическому поведению соединений [119].

*Тонкослойная хроматография (ТСХ)*

Для исследования состава тритерпеновых сапонинов извлечение из сбора ангиопротекторного и семян конского каштана получали 70% спиртом этиловым (1:10) при нагревании содержимого колбы на водяной бане. Получение извлечения из цветков календулы: 5 г сырья экстрагировали при нагревании 60 мл 70% спирта этилового, извлечение фильтровали и 25 мл фильтрата упаривали до объема 5 мл. Водный остаток охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтр с

осадком переносили в стакан и прибавляли 5 мл спирта этилового 96% и перемешивали. Раствор сливали в пробирку на 10 мл.

Для исследования состава агликонов тритерпеновых соединений сбора использовали раствор А (количественный анализ тритерпеновых сапонинов стр. 48). 15 мл раствора А концентрировали до объема 1 мл (исследуемый раствор).

Пробы наносили на хроматографическую пластинку Sorbfil ПТСХ - АФ-А-УФ, хроматограммы развивали в системе растворителей хлороформ-этанол-вода (26:14:3), и н-бутанол-лед. уксусная к-та-вода (4:1:2). Проявителем являлся 25% спиртовой раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты. Сапонины проявлялись в виде пятен серо-фиолетового цвета.

Присутствие аскорбиновой кислоты устанавливали в водных извлечениях в системе этилацетат-лед. $CH_3COOH$ (80:20), проявителем являлся 0,05% раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Пятно аскорбиновой кислоты наблюдается в виде бело-желтого пятна на розовом фоне.

Содержание в образцах сырья каротиноидов исследовали в гексановых извлечениях (1:10), которые получали при нагревании на водяной бане 15 минут. Далее извлечение выпаривали до сухого остатка, который растворяли в 1 мл хлороформа. Хроматографию проводили на пластинках Sorbfil ПТСХ - АФ-А-УФ в системе растворителей гексан-спирт этиловый (9:1). Каротиноиды наблюдали в виде пятен желтого и желто-оранжевого цвета [42, 118].

Исследование состава кумаринов проводили в извлечении из сбора ангиопротекторного 96% спиртом этиловым на пластинках Sorbfil ПТСХ - АФ-А-УФ. Система для разделения хлороформ-петролейный эфир, хроматограммы проявляли опрыскиванием диазотированной сульфаниловой кислотой и 10% раствором натрия гидроксида. Хроматограммы нагревали 5 минут в сушильном шкафу при температуре $105^0$С. Пятна кумаринов без проявления в УФ-свете (240 нм) имели голубую и желто-зеленую

флюоресценцию. После проявления в видимом свете имели красную и оранжевую окраску [51].

*Метод УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС и МК-ВЭЖХ-УФ.*

Приготовление извлечения:

1. Метод УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС. Для проведения анализа образец сырья измельчали до частиц размером 1 мм. Навеску сырья массой 0,0400 г экстрагировали 1 мл 70% спирта этилового в ультразвуковой ванне в течение 30 минут при температуре 50°С. Полученное извлечение центрифугировали 20 минут при скорости 6000 об/мин, а далее пропускали через мембранный фильтр (размер пор 0.45 мкм).

2. Метод МК-ВЭЖХ-УФ. В пробирку Эппендорфа помещали образец сырья, измельченного до частиц размером 1 мм массой 0,20000 г и прибавляли 2 мл 70% спирта этилового. В ультразвуковой ванне экстракцию вели в течение 30 минут, полученные извлечения центрифугировали при 3000 об/мин. Извлечение помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл. Экстракцию анализируемого образца повторяли еще раз при тех же условиях. Содержимое мерной колбы доводили до метки 70% спиртом этиловым (раствор А).

*Общие экспериментальные условия.* Изучение метаболома (флавоноидов и фенолкарбоновых кислот) проводили методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным и масс-спектрометрическим (ионизация электрораспылением) детектированием (УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС, URLC-DAD-ESI-MS/MS).

*УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС.* Исследования проводили на приборе «LCMS-8050» производства Shimadzu, USA, который оснащен диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами; применяли колонку GLC Mastro C18 (150×2,1 мм, диаметром 3 мкм, марки Shimadzu, Japan, Kyoto). Условия ВЭЖХ-анализа: инжектируемый объем – 1 мкл; подвижная фаза – элюенты: А – $H_2O$, элюент В – $CH_3CN$; программа градиента В: 0–10 мин 10–16%, 10–

28 мин 14–72%, 25–30 мин 73–100%, 30–35 мин 95–12%; температура колонки – 35°С; скорость потока – 230 мкл/мин; диапазон сканирования 200–600 нм спектров поглощения. Условия ИЭР-МС: режим ионизации – электрораспыление; температура линии десольватации – 245°С; температура интерфейса ИЭР – 300°С; температура нагревательного блока – 410°С; скорость газа-распылителя (азота) – 3 л/мин; скорость воздуха газа-нагревателя – 12 л/мин; давление газа (аргона), используемого для диссоциации, индуцируемой соударением – 270 кПа; скорость аргона – 0.35 мл/мин; напряжение на капилляре – 3 кВ; диапазон сканирования масс 100–1900 (m/z).

*МК-ВЭЖХ-УФ.* Количественный анализ осуществляли методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием на приборе Милихром А-02 «Эконова», Новосибирск Россия. Условия анализа: колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (1 × 60 мм × 5 мкм); элюент А – 0.2 М $LiClO_4$ в 2.5 мкМ $HClO_4$; элюент В MeCN; программа градиента 0.0-20.0 мин 5-100% В; температура колонки $35^0$С; скорость элюента 150 мкл/мин; УФ-детектор 326 нм, 360 нм.

*Стандартные образцы.* Готовили 0,01% растворы коммерческих образцов веществ сравнения производства Sigma-Aldrich (USA), Chem-Fages, Extrasynthese, Lione (France), Beijing (China).

*Статистический анализ.* Исследования проводили в 3-х параллельных определениях, результаты количественного анализа флавоноидов и фенолкарбоновых кислот представлены в виде среднего результата и ±стандартного отклонения, SD.

*Метод хромато-масс-спектрометрии*

*Исследование компонентного состава эфирного масла*

Из растительного сырья эфирное масло получали методом гидродистилляции по методу 1 ГФ XIV [23]. После дистилляции эфирное

масло отделяли от водной фазы и обрабатывали натрия сульфатом для обезвоживания.

Анализ компонентного состава эфирного масла проводился методом газожидкостной хроматографии с использованием квадроупольного хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS (Agilent Technology, USA). Условия анализа: кварцевая капиллярная колонка HP-5MS (30 м × 0,250 мм ×0,50 мкм); неподвижная фаза – 5%-ый фенил-метил-полисилоксан, подвижная фаза газ-носитель – гелий, скорость потока 1 мл/мин. Способ ионизации – электронный удар, энергия ионизации: 70 эВ, диапазон сканирования 30-650 а.е.м. Температура испарителя 280°С, источника ионов 172°С, детектора 150°С, линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром 280°С. Градиент температуры: начальная температура колонки - 55°С (+2 мин), затем 55-150 (20°С/мин), со 150 до 250°С (2°С/мин), при 250°С – (+30мин). В инжектор вводился 1% р-р эфирного масла в спирте метиловом, объем вводимой пробы – 2мкл, режим разделения потоков 5:1.

Идентификация выделенных компонентов проводилась путем сравнения линейных индексов удерживания и полных масс-спектров соединений с данными библиотеки «NIST 11» и коммерческими образцами [79].

*Исследование элементного состава*

Исследование элементного состава проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500 ce.

Для анализа образцы сырья (экстракта) готовили методом мокрого озоления $HNO_3$ и $H_2O_2$, для этого к образцу в количестве 0,030 мг добавляли 0,75 мл 72%-ной $HNO_3$ и помещали смесь на 30 мин в ультразвуковую термостатируемую ванну при температуре 80-100°С. Затем прибавляли 0,3 мл 30%-ной перекиси водорода и продолжали термостатирование 30 мин. Далее прибавляют воду, очищенную до 15 мл, и термостатируют 30 мин при

тех же условиях. Затем пробирки с содержимым выдерживают 12 ч при комнатной температуре. Рассчитанное количество $HNO_3$ в растворах составляло 2%, коэффициент разбавления (Кразб) = 500.

Анализируемые растворы центрифугировали в течение 10 мин (13400 об/мин). Далее надосадочную жидкость весовым способом в количестве 1,8 мл переносили в пробирки центрифужные. В качестве внутреннего стандарта в пробирки добавляли 40 мкл рабочего раствора индия, концентрация In в измеряемых растворах составляла 30 ppb. Так же готовились холостые пробы.

Пробы вводили в режиме самораспыления с помощью концентрического кварцевого распылителя, со скоростью подачи 400 мкл/мин.

Для калибровки масс-спектрометра использовали многоэлементные стандартные растворы ICP-MS-68A-B, ICP-MS-68A-A (HIGH-PURITY STANDARDS, Charleston, USA) и др.

Результаты статистически обрабатывали с рассчетом коэффициента вариации (RSD %).

### 2.3.3. Методы количественного определения БАВ

*Количественное определение аскорбиновой кислоты*

Содержание аскорбиновой кислоты определяли титриметрическим методом: навеска сырья 5,0000 г, экстрагент вода очищенная, титрант 0,001 М р-р 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия («Шиповника плоды – *Rosae fructus*» ФС.2.5.0106.18) [23].

*Количественное определение суммы органических кислот*

Количественное определение суммы органических кислот в пересчете на яблочную кислоту проводили титриметрическим методом: навеска сырья 5,0000 г, экстрагент - вода очищенная, титрант 0,1 М р-р натрия гидроксида,

индикатор – 1% спиртовой р-р фенолфталенина и 0,1% р-р метиленового синего («Рябины обыкновенной плоды – *Sorbi aucupariae fructus*» ФС. 2.5.0093.18) [23].

*Количественное определение каротиноидов*

Количественное определение суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин проводили спектрофотометрическим методом: навеска сырья 2,0000 г, экстрагент гексан, оптическую плотность измеряли при λ=450 нм, удельный показатель β-каротина в гексане 2592 (ФС.2.5.0106.18) [23].

*Количественное определение суммы полифенольных (окисляемых) соединений*

Содержание суммы полифенольных соединений определяли перманганатометрическим методом [110]. Для этого навеску сырья 2,000 г экстрагировали 50 мл 50% спирта этилового в течение 45 мин на водяной бане, извлечение охлаждали и фильтровали в мерную колбу на 250 мл. Экстракцию повторяли еще 2 раза. Объединенные извлечения в мерной колбе доводили до метки 50% спиртом этиловым. На титрование брали 10 мл извлечения, 25 мл индигокармина и помещали в колбу на 750 мл, далее прибавляли воду 500 мл. Титрование вели 0,02 М р-ром калия перманганатом до золотисто-желтого окрашивания.

Расчетная формула:

$$X\ (\%) = \frac{(V1-V2)\cdot 250\cdot 0{,}004157\cdot 100\cdot}{m\cdot 10}\cdot\frac{100}{(100-W)},$$

где $V_1$ – объем 0,02 М р-ра $KMnO_4$, пошедший на титровании исследуемого р-ра; $V_2$ - объем 0,02 М р-ра $KMnO_4$, пошедший на титрование в контрольном опыте; 0,004157 – титр танина; W – абсолютная влажность сырья, в %.

*Количественное определение дубильных веществ*

Содержание дубильных веществ в сборе ангиопротекторном определяли спектрофотометрическим методом, экстракцию сырья проводили водой очищенной, измерение оптической плотности проводили при 277 нм, расчет % содержания дубильных веществ вели в пересчете на танин. Сбор ангиопротекторный содержит фенолкарбоновые кислоты, которые

экстрагируются водой очищенной и в электронном спектре, также имеют поглощение в области максимума поглощения дубильных веществ. В связи с этим мы провели количественное определение дубильных веществ в водном извлечении, а также после осаждения дубильных веществ раствором желатина.

Навеску сырья 1,0000 г заливали 200 мл горячей воды очищенной и вели экстракцию при кипячении на плитке 30 минут, содержимое колбы охлаждали и фильтровали. Далее готовили разведение: 1 мл фильтрата переносили в мерную колбу объемом 50 мл и колбу доводили водой, очищенной до метки (анализируемый раствор). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при λ=277 нм. Параллельно проводили измерение оптической плотности стандартного образца танина, раствор сравнения вода очищенная [51].

Содержание дубильных веществ рассчитывали по формуле:

$$X\ (\%) = \frac{Dx \cdot 200 \cdot 50 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 100}{Do \cdot m_x \cdot 1 \cdot 200 \cdot 50} \cdot \frac{100}{(100-W)} = \frac{Dx \cdot mo \cdot 500}{Do \cdot mx} \cdot \frac{100}{(100-W)}$$

где $Dx$ – оптическая плотность испытуемого раствора; $m_x$ – масса испытуемого образца сырья; $Do$ – оптическая плотность раствора танина; $m_0$ – масса СО танина.

*Содержание дубильных веществ в сборе ангиопротекторном* после осаждения раствором желатины. К 100 мл полученного извлечения прибавляли 20 мл 5% раствора желатины, выдерживали 48 часов при температуре $5^0$С. Образовавшийся осадок отфильтровывали. Далее готовили разведение: 1 мл анализируемого раствора, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, колбу доводили до метки водой очищенной. Оптическую плотность измеряли при λ=277 нм. В расчетах % содержания дубильных веществ после осаждения раствором желатина использовали разность оптической плотности между первым и вторым испытанием.

*Примечание*. Приготовление р-ра СО танина: около 0,0200 г танина, высушенного при температуре 100-$105^0$С, помещают в мерную колбу на 200 мл, доводят до метки водой очищенной (р-р А), затем 5 мл р-ра А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки водой очищенной. Раствор используют свежеприготовленным.

*Количественное определение суммы фенолкарбоновых кислот*

Содержание фенолкарбоновых кислот определяли в сборе ангиопфротекторном и экстракте сухом «Ангиофитон» спектрофотометрическим методом. Для расчета процентного содержания применяли удельный показатель 3-*О*-кофеилхинной кислоты Ɛ= 504 [65].

*Количественное определение полисахаридов*

Для оценки содержания сбора ангиопротекторного на содержание полисахаридов применяли гравиметрический метод [23].

*Количественное определение суммы флавоноидов*

Количественное содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом. В качестве стандартного образца использовали рутин [78, 85].

Условия спектрофотометрического анализа суммы флавоноидов.

| Объект анализа | Навеска, г | Объем извлечения, мл | Объем аликвоты, мл | Объем разведения, мл | $AlCl_3$ | Время комплексообразования, мин | λ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Сбор ангиопротекторный | 1,0000 | 100 | 1 | 25 | 1%, 1 мл | 45 | 415 |
| *Bupleuri multinerve herba* | 1,0000 | 100 | 1 | 25 | 2% 1 мл | 45 | 412 |
| Экстракт сухой «Ангиофитон» | 0,1000 | 50 | 2 | 25 | 1% 2мл | 45 | 415 |

*Количественное определение сапонинов*

Количественное содержание сапонинов в сборе ангиопротекторном определяли спектрофотометрическим методом по методике, описанной в работе Петуховой С.А. [79].

*Методика.* 1,000 г измельченного сырья сбора (1 мм) экстрагировали 1 час 70%-ным спиртом этиловым в количестве 50 мл на водяной бане. После

удаления спирта к водному остатку прибавляли 15 мл хлороформа. Хлороформный слой отделяли в делительной воронке. К водному остатку добавляли 3 мл $H_2SO_4$ конц. и 12 мл $CH_3COOH$ лед. Гидролиз проводили 1 час при нагревании на кипящей водяной бане, поученный раствор охлаждали, затем для извлечения агликонов смесь обрабатывали хлороформом трехкратно по 10 мл. Объединенные хлороформные извлечения промывали водой, очищенной по 20 мл до pH промывных вод равным 7. Хлороформное извлечение фильтровали через фильтр бумажный, на котором находилось 2 г $Na_2SO_4$ безводного, в колбу мерную вместимостью 50 мл, фильтр промывали 10 мл хлороформа и объем доводили до 50 мл хлороформом (р-р А). Затем 0,4 мл раствора А помещали в мерную пробирку, хлороформ удаляли до сухого остатка и прибавляли конц. $H_2SO_4$ до объема 5 мл. Смесь выдерживали при температуре $70^0$С в течение 60 минут. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при λ=315 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм, раствором сравнения являлась конц. $H_2SO_4$.

Содержание тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту проводили по формуле:

$$X\ (\%) = \frac{D \cdot 50 \cdot 5}{\varepsilon \cdot m \cdot 0{,}4} \cdot \frac{100}{(100 - W)} = \frac{D \cdot 625}{311 \cdot m} \frac{100}{(100 - W)},$$

где $D$ –оптическая плотность; ε – удельный показатель поглощения олеаноловой кислоты; $m$ – масса сбора в, г; W – влажность сырья.

*Количественное определение аминокислот*

Содержание аминокислот в сборе ангиопротекторном определяли спектрофотометрическим методом [79].

Навеску сбора 1,0000 г (размер частиц сырья 2-3 мм) экстрагировали при кипячении с обратным холодильником 100 мл водой очищенной. Извлечение охлаждали и фильтровали, далее 20 мл извлечения переносили в мерную колбу на 100 мл и колбу доводили до метки водой очищенной (р-р А).

Далее 1 мл раствора А помещали в мерную колбу на 50 мл прибавляли

реактивы 1 мл 0,25% р-ра $Na_2CO_3$, 2 мл нингидрина спиртового р-ра и смесь нагревали 10 минут на водяной бане. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и доводили водой до метки. Параллельно в мерную колбу на 50 мл помещали 1 мл р-ра СО глутаминовой кислоты и далее поступали, как с исследуемым раствором. Оптическую плотность р-ров измеряли на спектрофотометре при λ=568 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 1см, р-р сравнения - вода очищенная.

Содержание аминокислот вычисляли по формуле:

$$X\ (\%) = \frac{Dx \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50 \cdot mo \cdot 1 \cdot 100}{mx \cdot 20 \cdot 1 \cdot Do \cdot 100 \cdot 50} \cdot \frac{100}{(100-W)} = \frac{Dx \cdot mo \cdot 500}{mx \cdot Do} \cdot \frac{100}{(100-W)},$$

где $D_x$ – оптическая плотность исследуемого р-ра; $D_o$ – оптическая плотность р-ра СО глутаминовой к-ты; $m$ – навеска в г сбора; $m_o$ – навеска в г СО глутаминовой к-ты.

Приготовление р-ра СО глутаминовой кислоты: около 0,0500 г глутаминовой кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл воды перемешивали и доводили раствор водой очищенной до метки.

## 2.4. Спектральные исследования

Спектральные исследования проводили на спектрофотометрах марок LEKI SS1207UV (Финляндия), СФ-2000 (Россия), СФ-46 (Россия).

## 2.5. Используемые стандартные образцы и реактивы

Применяемые в работе стандартные образцы производства Sigma-Aldrich (USA), Chem-Fages, Extrasynthese, Lione (France), Beijing (China); реактивы категории ЧДА.

## 2.6. Статистические методы анализа

Статистический анализ экспериментальных результатов проводили в по требованиям ГФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» [23].

# ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА СБОРА, ОБЛАДАЮЩЕГО АНГИОПРОТЕКТОРНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

## 3.1. Теоретическое обоснование состава сбора ангиопротекторного

Ангиопротекторы — это средства способные корректировать свойства крови, укреплять сосудистые стенки, повышать их эластичность, восстанавливать проницаемость, регенерировать ткани. Ангиопротекторные препараты обладают достаточно широким спектром действия и используются в ходе лечения большого числа болезней сосудов и вен.

Механизм действия ангиопротекторов заключается в подавлении медиаторов воспаления (серотонина, гистамина), в способности снижать активность производных гиалуроновой кислоты, нормализации проницаемости сосудистых стенок, улучшении микроциркуляции за счет улучшения состава крови.

Противовоспалительное действие свойственно таким БАВ как флавоноиды, сапонины, каротиноиды [55, 120, 151, 154].

Флавоноиды (рутин, кверцетин, гесперидин, катехины) являются соединениями, которые стабилизируют структурные компоненты венозной стенки и повышают ее тонус. При регулярном приеме нормализуют состояние стенок сосудов и капилляров, увеличивают их прочность и эластичность, т.е. проявляют Р-витаминную активность. Рутин имеет также свойство уменьшать внешнюю проницаемость сосудов, что поддерживает оптимальную микроциркуляцию крови. [24, 35, 120, 124].

Венотонизирующее действие сапонина эсцина позволяет восстановить работу клапанного аппарата сосудов [16]. Под влиянием разного рода провоцирующих факторов клапаны ослабевают и начинают пропускать кровь в обратном направлении. В результате в поверхностных венах скапливается избыточный объем крови, что приводит к постепенному растяжению их стенок [91, 135]. Эсцин проявляет также антиагрегатное действие, т.е. улучшает текучесть крови [16, 145, 166, 169].

Под давлением венозного рефлюкса (патологического сброса крови сверху-вниз) кровь застаивается в венах, стенки сосудов истончаются, и жидкость получает возможность проникать в соседние ткани. Возникают отеки, которые, в свою очередь, приводят к нарушению трофики. Растительные средства, обладающие мочегонным действием и тонизирующие стенки сосудов, способствуют снижению и устранению отеков [171].

Нарушение тока крови способствует накоплению в мелких кровеносных сосудах продуктов метаболизма, это вызывает сгущение крови и провоцирует появление свободных радикалов и медиаторов воспалительной реакции. При данной патологии необходимо применение средств, обладающих противовоспалительным и антиоксидантным действием [38, 53, 73].

Высокими антиоксидантными свойствами обладает аскорбиновая кислота. При сочетании аскорбиновой кислоты и флавоноидов (рутина, кверцетина) наблюдается явление синергизма - усиливается антиоксидантное, капилляроукрепляющее действие в сравнении с монопрепаратами этих веществ [24, 40, 53, 155].

Многокомпонентное растительное средство может сочетать в себе комплекс биологически активных веществ, которые будут обеспечивать многопрофильное воздействие [53, 73].

Для разработки компонентного состава сбора с ангиопротекторным действием был проведен анализ состава биологически активных веществ и фармакологическое действие ряда растительного сырья, применяемого в медицинской практике в качестве противовоспалительного, капилляроукрепляющего, венотонизирующего, мочегонного и антиоксидантного. Особое внимание уделено растениям, содержащим в качества БАВ флавоноиды, тритерпеновые соединения, витамины (табл. 3.1.1).

Таблица 3.1.1 - Характеристика компонентов растительного сбора ангиопротекторного (сведения литературы)

| Лекарственное растительное сырье | Фармакологическое действие | | Биологически активные вещества | |
|---|---|---|---|---|
| | Основное | Сопутствующее | Основные | Сопутствующие |
| *Bupleuri multinervis herba* | капилляроукрепляющее | противовоспалительное | Флавоноиды (рутин, кемпферол, изорамнетин-3-рутинозид) | Тритерпеновые сапонины, эфирные масла, дубильные вещества, фенольные кислоты |
| *Aesculi hippocastani semina* | Венотонизирующее, уменьшает проницаемость капилляров, антитромботическое | Противоотечное, противовоспалительное | Тритерпеновые сапонины (сумма соединений - эсцин), кумарины (эскулин, фраксин) | Флавоноиды (спиреозид, кверцетин, авикулярин), жирное масло, дубильные вещества, аминокислоты |
| *Filipendulae ulmariae flores* | Уменьшают проницаемость капилляров, антиоксидантное | Противовоспалительное, вяжущее, ранозаживляющее | Флавоноиды (кверцетин, кверцитрин, спиреозид), фенологликозиды (монотропинин, спиреин, изосалицин) | Тритерпеновые сапонины (урсоловая и олеаноловая кислоты), кумарины, фенольные кислоты), дубильные вещества, эфирное масло (салициловый альдегид, метилсалицилат, бензилсалицилат) |
| *Aroniae melanocarpae sicco* | Капилляроукрепляющее, поливитаминное, | Иммуномодулирующее, противовоспалительное, | Антоцианы (цианидин-3-*О*- | Органические кислоты, дубильные |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *fructus* | адаптогенное, антиоксидантное | | галактозид, цианидин-3-*O*-арабинозид), аскорбиновая кислота, флавоноиды (гесперидин, рутин, кверцетин) | вещества, фенольные кислоты (хлорогеновая, криптохлорогеновая) |
| *Fragariae vescae folia* | Мочегонное, сосудорасширяющее, антиоксидантное | Противовоспалительное, седативное | Флавоноиды (кверцетин, рутин), аскорбиновая кислота | Процианидины типа А и В, кумарины, тиритерпеновые соединения (урсоловая кислота), эфирное масло, полисахариды, фенольные кислоты |
| *Calendulae officinalis flores* | Противовоспалительное, антимикробное | Мочегонное, антиэкссудативное, иммуномодулирующее, гипотензивное | Каротиноиды, флавоноиды (рутин, нарциссин, тифанеозид, мангаслин) | Тритерпеновые сапонины (календулозиды), эфирное масло, дубильные вещества, смолистые вещества |

На основании проведенного анализа для сбора ангиопротекторного были выбраны 3 растения с одинаковыми основными БАВ и разными сопутствующими веществами [16, 96], а также одно растение содержит тритерпеновые сапонины (эсцин). Дополняют спектр фармакологического действия растения с антиоксидантным, противовоспалительным и мочегонным действием.

В результате нами предлагается растительная композиция ангиопротекторного действия, которая включает сырье растений володушки многожилковой, каштана конского, лабазника вязолистного, аронии черноплодной, земляники лесной, календулы лекарственной.

Химический состав травы *B. multinerve* определяет Р-витаминную активность и противовоспалительное действие, при этом повышается тонус вен, снижается застой крови, а также уменьшается ломкость капилляров, восстанавливается их проницаемость, улучшается микроциркуляция и лимфоотток [57, 70, 104, 158].

Основной состав БАВ и сопутствующие вещества плодов *Ae hippocastanum* обеспечивают повышение тонуса венозных сосудов, препятствуют образованию тромбов, обладают капилляропротекторным действием [30, 148].

Химический состав цветков *F. ulmaria* обусловливает противовоспалительное, антиоксидантное, капилляроукрепляющее, иммуностимулирующее, регенерирующее действие [13, 19, 33].

Аскорбиновая кислота, антоцианы, флавоноиды плодов *A. melanocarpa* оказывают антиоксидантное и капилляроукрепляющее действие. Аскорбиновая кислота участвует во многих видах окислительно-восстановительных реакций, обеспечивает нормальную проницаемость стенок капиллярных сосудов, повышает их эластичность и прочность, проявляет антиоксидантную активность [24,129, 132].

Химический состав листьев *F. vesca* обуславливает диуретическое, противовоспалительное, антиоксидантное действие [3, 99].

Биологически активные вещества цветков *C. officinalis* определяют противовоспалительное, антимикробное, мочегонное и антиоксидантное действие. Препараты календулы лекарственной снижают кровяное давление, уменьшают отеки, проявляют седативное действие [58, 121, 125, 168].

Выбранные компоненты сбора разрешены к применению в медицинской практике и имеют нормативную документацию на растительное сырье.

## 3.2. Экспериментальное обоснование состава сбора ангиопротекторного

Для установления оптимального соотношения компонентов сбора ангиопротекторного было проведено исследование 5 вариантов растительных композиций на содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, полифенольных соединений, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, аскорбиновой кислоты (3.2.1).

У пациентов с венозными заболеваниями наблюдается дисбаланс антиоксидантной системы, что требует регуляции окислительного стресса, поэтому нами учитывалось в составе растительных композиций не только содержание биологически активных веществ, но и антиоксидантная активность [73].

Обнаружение биологически активных веществ в растительных композициях проводили в спиртовых и водных извлечениях. В спиртовых извлечениях определяли присутствие флавоноидов (с 10% спиртовым раствором NaOH, 10% спиртовым раствором $AlCl_3$, проба Синода), кумаринов (лактонная проба, реакция азосочетания). Водные извлечения испытывали на содержание дубильных веществ (с 1% раствором желатина, 1 % раствором железа (III) аммония сульфата) [118].

С помощью метода тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil в растительных композициях определяли присутствие тритерпеновых соединений, каротиноидов, аскорбиновой кислоты [11, 119].

Таблица 3.2.1 - Растительные композиции с различным соотношением компонентов

| Компоненты | Содержание компонентов, % | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | F |
| *Bupleuri multinervis herba* | 20 | 30 | 20 | 20 | 30 |
| *Aesculi hippocastani semina* | 10 | 20 | 20 | 30 | 20 |
| *Filipendulae ulmariae flores* | 10 | 20 | 30 | 20 | 20 |
| *Aroniae melanocarpae sicco fructus* | 20 | 10 | 10 | 10 | 20 |
| *Fragariae vescae folia* | 20 | 10 | 10 | 10 | 5 |
| *Calendulae. officinalis flores* | 20 | 10 | 10 | 10 | 5 |
| Итого | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Количественное содержание флавоноидов фенолкарбоновых кислот определяли спектрофотометрическим методом. Содержание аскорбиновой кислоты, полифенольных соединений проводили титриметрическими методами, экстрактивных веществ - гравиметрическим методом (Методики изложены в главе «Характеристика объектов и методов исследования» на стр. 45).

Антиоксидантную активность извлечений изучали в опытах in vitro на сыворотке донорской крови. Для этого из растительных композиций получали извлечения 50% спиртом этиловым (2:50) при настаивании в течение 24 часов. Далее 1 мл деалкоголизированного извлечения смешивали с 2 мл сыворотки донорской крови. Индукцию перекисного окисления липидов вызывали прибавлением 0,1 мл 0,5 М раствора $CuSO_4$. В контрольном опыте вместо извлечения прибавляли 1 мл воды очищенной. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37°С в течение 24 часов в

термостате. Далее проводили определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) [7, 100].

Исследования проводили в 6 повторностях, результаты статистически обрабатывали.

Максимальное количество флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, полифенольных соединений, аскорбиновой кислоты и экстрактивных веществ содержится в извлечении из растительной композиции С (табл. 3.2.2) [38].

При исследовании извлечений из растительных композиций A, B, C, D, F в опытах in vitro на содержание ДК и МДА в сыворотке донорской крови человека нами установлено, что все композиции подавляют образование ДК в сравнении с контрольным образцом (вода очищенная) от 10,50 до 37,00% (табл. 3.2.3).

Таблица 3.2.2 - Количественное содержание в извлечениях из растительных композиций биологически активных веществ

| Растительная композиция | Содержание | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | СФЛ, мг% | СФКК, мг% | АК, мг% | ПФС, % | ЭВ, % |
| A | 37,04±2,10 | 32,4±1,20 | 8,93±0,24 | 0,44±0,02 | 1,25±0,04 |
| B | 47,01±1,50 | 30,8±1,30 | 8,91±0,26 | 0,49±0,01 | 1,27±0,05 |
| **C** | **55,90±2,40** | **38,4±1,20** | **8,94±0,25** | **0,52±0,02** | **1,34±0,07** |
| D | 40,66±1,30 | 18,8±0,60 | 5,85±0,15 | 0,40±0,01 | 1,33±0,03 |
| F | 46,12±2,80 | 12,0±±0,70 | 5,94±0,14 | 0,35±0,01 | 1,28±0,06 |

Примечание. СФЛ – сумма флавоноидов, СФКК – сумма фенолкарбоновых кислот, АК – аскорбиновая кислота, ПФС – полифенольные соединения, ЭВ – экстрактивные вещества

Таблица 3.2.3 -Антиоксидантная активность извлечений из растительных композиций

| Раститель-ная композиция | ДК | | МДА | |
|---|---|---|---|---|
| | Содержание в мкмоль/мл | Ингибирование, в % | Содержание в мкмоль/мл | Ингибирование, в % |
| A | 67,53±5,51 | 10,50 | 11,91±0,55 | 15,78 |
| B | 58,54±3,23 | 22,50 | 13,08±0,61 | 7,50 |
| **C** | **47,51±1,49** | **37,00** | **4,62±0,45** | **67,33** |
| D | 58,82±3,83 | 22,00 | 12,74±0,56 | 9,90 |
| F | 55,54±1,94 | 26,60 | 13,23±0,58 | 6,40 |
| Контроль (вода очищенная) | 75,5±3,11 | | 14,14±1,02 | |

Примечание. ДК- диеновые коньюгаты, МДА – малоновый диальдегид

Самое большое снижение уровня ДК установлено для растительной композиции С, которое составляет 37,00 %.

Все тестируемые извлечения, полученные из растительных композиций, ингибируют образование МДА в сыворотке донорской крови (табл. 3.2.3). По отношению к воде очищенной (контрольный опыт) подавление образования МДА составляет от 6,40 до 67,33%. Растительная композиция С максимально снижает содержание в сыворотке крови МДА (67,33 %).

В растительной композиции С установлено содержание суммы полифенольных соединений – 11,80±0,45%, суммы флавоноидов в пересчете на рутин 3,28±0,05%, суммы фенолкарбоновых кислот 3,32±0,10%, аскорбиновой кислоты – 0,29±0,01%, экстрактивных веществ, извлекаемых водой очищенной – 33,01±0,4%, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом этиловым 40% – 43,60±0,8% [84].

Фармакологические исследования показали, что растительная композиция С обладает противовоспалительным, капилляроукрепляющим действием, а также подтверждена антиоксидантная активность (приложение 5) [34]. Новизна представленной разработки подтверждена Патентом РФ [77].

В результате проведенного комплекса испытаний экспериментально установлено, что вариант растительной композиции С имеет высокую антиоксидантную активность, содержит наибольшее количество флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, полифенольных соединений, аскорбиновой кислоты, экстрактивных веществ и может быть базовым для создания на её основе растительных средств ангиопротекторного действия.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. С использованием алгоритма разработки сборов теоретически обоснован состав шестикомпонентой композици с ангиопротекторным действием.

2. Средство с ангиопротекторной активностью на основе биологически активных веществ должно содержать флавоноиды, производные флавонола, флавана, тритерпеновые соединения, аскорбиновую кислоту.

3. С учетом химического состава основных и сопутствующих биологически активных веществ, а также фармакологических свойств растительного сырья теоретически обоснован состав растительной композиции ангиопротекторного действия.

4. Экспериментальными исследованиями определен оптимальный состав растительной композиции (сбор лекарственный).

5. Биолого-фармакологическими исследованиями подтверждено капилляроукрепляющее, противовоспалительное и антиоксидантное действие растительной композиции (сбора ангиопротекторного).

# ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СБОРА АНГИОПРОТЕКТОРНОГО

## 4.1. Исследование химического состава сбора ангиопротекторного

### 4.1.1. Исследование состава биологически активных веществ

Водные извлечения (1:10) исследовали на содержание сапонинов, дубильных веществ, полисахаридов.

Дубильные вещества. С 1% раствором желатины, 1% раствором хинина хлорида наблюдали осадки, прибавление железоаммонийных квасцов вызвало появление черно-синего окрашивания. Реакция дифференциации показала наличие гидролизуемых и конденсированных таннидов.

Полисахариды. Прибавление к извлечению 96% спирта этилового (1:3) вызвало появление хлопьевидного осадка.

Сапонины. При встряхивании извлечения образовывалась устойчивая пена, в щелочной среде столб пены более высокий и устойчивый, чем в кислой среде, что указывает на тритерпеновую структуру сапонинов. Реакция Лафона была положительной: при добавлении к извлечению серной кислоты концентрированной, спирта этилового и сернокислого железа появилось сине-зеленое окрашивание.

Для ТСХ анализа пробоподготовку сбора цветков календулы лекарственной и семян конского каштана провели по методике, указанной на стр. 40. При элюировании в системе хлороформ-этанол-вода (26:14:2) в извлечении *C. officinalis* обнаруживается 3 вещества календулозид А (Rf 0,29), календулозид В (Rf 0,09), олеаноловая кислота (Rf 0,85). Сумма сапонинов семян *Ae. hippocastanum* не разделилась. В системе БУВ (4:1:2) сапонины семян *Ae. hippocastanum* имеют Rf 0,14; 0,24; 0,36. Преобладающее пятно с Rf 0,14 эсцин. По результатам ТСХ-анализа в сборе ангиопротекторном содержатся календулозиды А, В, эсцин. В продуктах гидролиза сапонинов сбора содержится олеаноловая кислота (рис. 4.1.1).

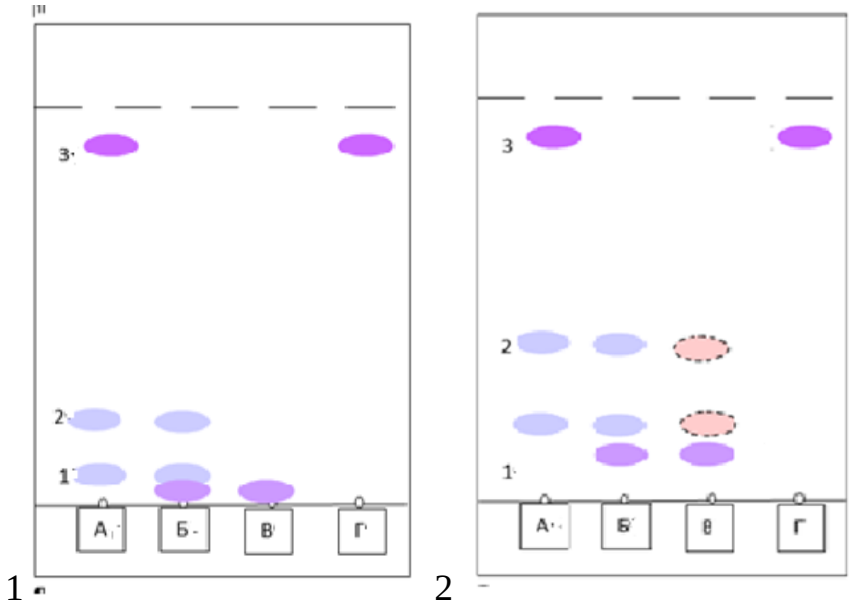



Рисунок 4.1.1 – Схема ТСХ тритерпеновых сапонинов. 1.Система хлороформ-этанол-вода (26:14:2); 2. БУВ (4:1:2). А - извлечение из цветков *C. officinalis*, Б - извлечение из сбора ангиопротекторного, В - извлечение из семян *Ae. hippocastanum*, Г - продукты кислотного гидролиза сбора ангиопротекторного (1 – календулозид В, 2 – календулозид А, 3 – олеоноловая кислота).

Аминокислоты. При добавлении к извлечению 0,2% спиртового раствора нингидрина при нагревании появилось синее окрашивание.

Спиртовые извлечения (1:10) исследовали на содержание флавоноидов, кумаринов, антоцианов.

Антоцианы. Спиртовое извлечение с содержанием 1% HCl конц. было окрашено в красный цвет, при добавлении 10% р-ра NaOH цвет извлечения становился оливковым, а добавление ацетата свинца основного вызывало образование сине-зеленого осадка.

Кумарины. Извлечение, полученное с 96% спиртом этиловым, дало положительные реакции: лактонная проба, реакция азосочетания с сульфаниловой кислотой диазотированной. Методом ТСХ при разделении в системе хлороформ-этанол (9:1) установлено содержание 4-х соединений, относящихся к кумаринам с Rf 0,32; 0,48; 0,54; 0,58. В сравнении со стандартными образцами идентифицированы кумарины – эскулетин (Rf 0,48), умбеллиферон (Rf 0,54).

Флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты. Извлечение (96% спирт этиловый) дало положительную реакцию Синода и реакцию по Брианту, что свидетельствует о присутствии флавоноидов в виде гликозидов и агликонов. При добавлении алюминия хлорида наблюдали желтое окрашивание, прибавление натрия гидроксида давало оливковое окрашивание, которое при нагревании реакционной смеси переходило в красное, что указывает на присутствие флавоноидов группы флавонолов.

Исследование состава флавоноидов провели методом БХ (табл. 4. 1.1, рис. 4.1.2). Для этого 5 г сбора экстрагировали 70% спиртом этиловым (1:10) в течение 30 мин на кипящей водяной бане. Спирт отгоняли, водный остаток очищали хлороформом. Очищенный водный остаток исследовали двумерной БХ. В сборе определили содержание не менее 14 соединений фенольного характера: 9 флавоноидов, 3 фенольных кислоты и 2 антоциана [65].

Таблица 4.1.1 – Значения Rf и окраска пятен фенольных соединений при двухмерной БХ извлечения сбора ангиопротекторного

| Номер пятна | Значения Rf в системах | | Окраска пятен | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | $NH_4OH$ | | $AlCl_3$ | |
| | А | Б | Вид. свет | УФ – свет (360 нм) | Вид. свет | УФ – свет (360 нм) | Вид. свет | УФ – свет (360 нм) |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1 | 0,69 | 0,05 | - | желт. | желт. | желто-зел. | желт. | желто-зел. фл. |
| 2 | 0,85 | 0,08 | - | - | - | желто-зел. | желт. | желто-зел. фл. |
| 3 | 0,88 | 0,29 | - | кор. | - | желт | - | желт. |
| 4 | 0,40 | 0,35 | - | кор. | желт. | желт. | желт. | желт. |
| 5 | 0,72 | 0,38 | - | - | - | желто-зел. | - | желто-зел. |
| 6 | 0,60 | 0,45 | - | кор. | - | желт. | желт. | желт. |
| 7 | 0,61 | 0,51 | - | кор. | желт. | желто-зел. | желт. | желт. |
| 8 | 0,58 | 0,80 | - | | - | | - | желт. |
| 9 | 0,48 | 0,18 | - | желто-зел. | желто-зел. | желто-зел. | - | желто-зел. |
| 10 | 0,63 | 0,74 | | голуб. | | зелено-голуб | - | зелено-голуб. |
| 11 | 0,69 | 0,47 | - | голуб. | - | желто-зел. фл. | - | желто-зел. |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | 0,86 | 0,64 | - | фиол | - | фиол. фл. | | фиол. фл. |
| 13 | 0,28 | 0,26 | красн.-кор. | красн. | зел. | кор. | красн-кор. | красн. |
| 14 | 0,32 | 0,51 | красн.-кор. | красн. | зел. | кор. | красн-кор. | красн. |

Примечание: система А - БУВ (4:1:2); система Б - 15% $CH_3$ COOH; вид. свет – видимый свет; желт. – желтый; желто-зел. – желто-зеленый; кор – коричневый; красн.- красный; желто-зел. фл. – желто-зеленая флюоресценция; красн.-кор. – красно-коричневы; голуб. – голубой; зелено-голуб. – зелено-голубой; зел. - зеленый.

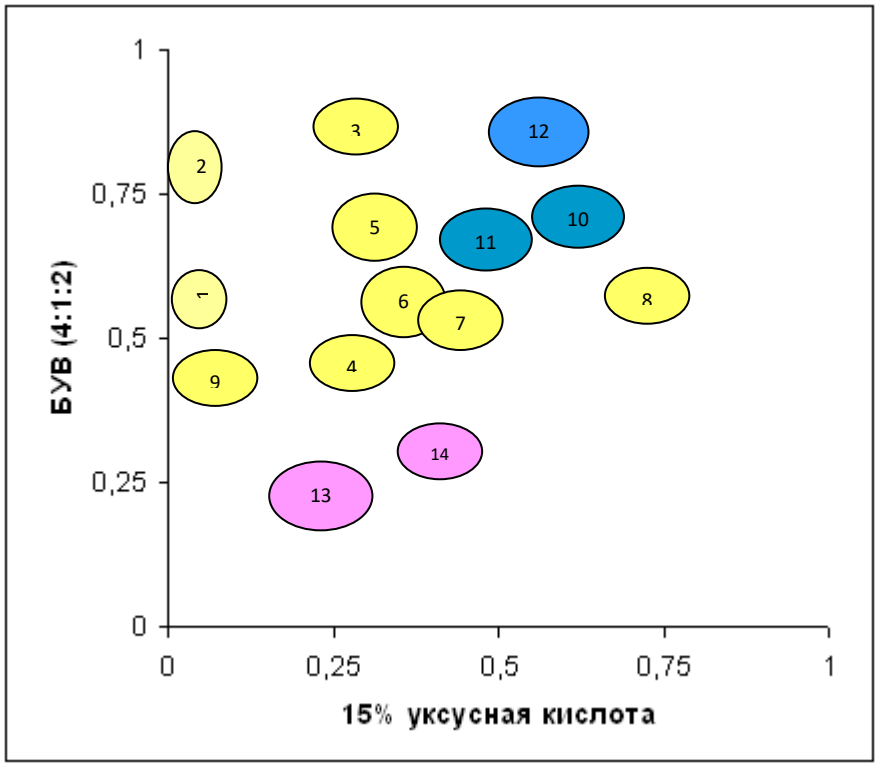



Рисунок 4.1.2 – Схема БХ спиртового извлечения сбора ангиопротекторного: флавоноиды 1-9, фенолкарбоновые кислоты 10-12, антоцианы 13-14.

В сравнении со стандартными образцами идентифицированы флавоноиды - кверцетин, кемпферол, гиперозид, рутин, нарциссин, изокверцитрин, гисперидин, спиреозид, антоцианы – цианидин-3-*О*-глюкозид, цианидин-3-*О*-арабинозид, фенолкарбоновые кислоты – 3-*О*-кофеилхинная кислота (хлорогеновая), кофейная и протокатеховая.

Аскорбиновая кислота. При исследовании водного извлечения сбора ангиопротекторного методом ТСХ в системе этилацетат - уксусная к-та ледяная (80:20) после проявления раствором 2,6 -

дихлорфенолиндофенолятом натрия на розовом фоне обнаруживалось пятно белого цвета, соответствующее по значению Rf и окраске СО аскорбиновой кислоты.

Каротиноиды. Методом ТСХ исследовали гексановое извлечение (1:10) сбора ангиопротекторного в системе гексан – спирт этиловый (9:1). На треке извлечения обнаруживалось 4 пятна желтого и желто-оранжевого цвета. Преобладающее пятно соответствовало СО β-каротина.

По результатам анализа в сборе ангиопротекторном установлено содержание дубильных веществ, полисахаридов, сапонинов, аминокислот, антоцианов, кумаринов, аскорбиновой кислоты, каротиноидов, флавоноидов и фенолкарбоновых кислот.

### 4.1.2. Исследование фенольных соединений методом МК-ВЭЖХ-УФ

Дополнительные сведения о составе фенольных соединений в сборе ангиопротекторном получены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для этого было получено извлечение из сбора 70% спиртом этиловым при экстракции в ультразвуковой ванне (стр. 42). В сравнении со стандартными образцами в сборе ангиопротекторном идентифицировано 6 флавоноидов и 1 фенолкарбоновая кислота (рис. 4.1.3).

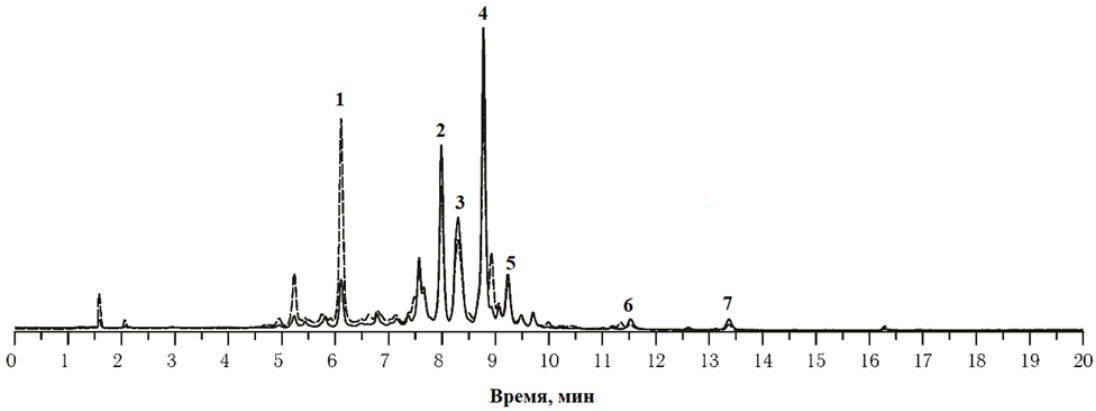



Рисунок 4.1.3 - Хроматограмма (МК-ВЭЖХ-УФ) спиртового извлечения сбора ангиопротекторного при 330 нм (пунктир) и 360 нм (сплошная). Числами указано положение соединений: 1 – 5-*О*-кофеилхинная кислота, 2 – – кверцетин-3-*О*-рутинозид, 3 – кверцетин-3-*О*-глюкозид, 4 – изорамнетин-3-*О*-рутинозид, 5 – изорамнетин-3-*О*-глюкозид, 6 – кверцетин, 7 – изорамнетин.

Среди флавоноидов содержатся агликоны - кверцетин и изорамнетин, гликозиды – кверцетин-3-*О*-рутинозид (рутин), кверцетин-3-*О*-глюкозид (изокверцитрин), изорамнетин-3-*О*-рутинозид (нарциссин), изорамнетин-3-*О*-глюкозид. Из фенолкарбоновых кислот идентифицирована 5-*О*-кофеилхинная кислота.

Методом МК-ВЭЖХ-УФ проведено количественное определение идентифицированных соединений (табл. 4.1.2).

Таблица 4.1.2 – Количественное содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном (метод МК-ВЭЖХ-УФ) от массы воздушно-сухого сырья

| № п/п | Соединение | Время удерживания, мин | Содержание в мг/г |
|---|---|---|---|
| 1 | 5-*О*-кофеилхинная кислота | 6,08 | 2,30±0,05 |
| 2 | Кверцетин-3-*О*-рутинозид (рутин) | 7,87 | 3,35±0,06 |
| 3 | Кверцетин-3-*О*-глюкозид (изокверцитрин) | 8,28 | 3,14±0,06 |
| 4 | Изорамнетин-3-*О*-рутинозид (нарциссин) | 8,77 | 4,15±0,09 |
| 5 | Изорамнетин-3-*О*-глюкозид | 9,15 | 0,78±0,02 |
| 6 | Кверцетин | 11,46 | 0,14±0,00 |
| 7 | Изорамнетин | 13,31 | 0,08±0,00 |
| | Содержание фенолкарбоновых кислот<br>Содержание суммы флавоноидов | | 2,30<br>11,64 |

Среди выделенных флавоноидов преобладают кверцетин-3-*О*-рутинозид (рутин), кверцетин-3-*О*-глюкозид (изокверцитрин), изорамнетин-3-*О*-рутинозид (нарциссин).

### 4.1.3. Анализ минерального состава сбора ангиопротекторного

Методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) провели изучение элементного состава сбора ангиопротекторного на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500 ce.

В составе сбора ангиопротекторного содержится 8 макроэлементов: K>Ca>Cl>Mg>P>S>Na>Fe.

Содержание кремния в сборе составляет 350 мг/кг (что соответствует 0,075% оксида кремния).

Микроэлементы:

- элементы с содержанием от 10 до 100 мг/кг Mn>B>Al>Ba>Sr>Zn>Rb;

- элементы с содержанием от 1 до 10 мг/кг Cu>Br>Ni>Mo;

- элементы с содержанием от 0,1 до 0,5 мг/кг Sc>Cr>Li>V>Co>Se.

Содержание ультрамикроэлементов:

- элементы с содержанием от 0,1 до 0,001 мг/кг Ce>La>Fs>Zn>Ga>Nd>W>Cs>J>Sn>Y>Sb>Fe>Pr>Sm>Hg>Th>Nb>Eu>Ag>Cd >Dy>Tl>Yb>Bi>U>Er;

- элементы с содержанием менее 0,001 мг/кг Pd>Ho>Rh>Hf>Pt>Re>Tb>Lu>Ta>Ir>Tm (табл. 4.1.3).

Таблица 4.1.3– Элементы сбора ангиопротекторного

| Элемент | Содержа-ние, мг/кг | Погреш-ность измерения, % | Элемент | Содержа-ние, мг/кг | Погреш-ность измерения, % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Макроэлементы | | | | | |
| Na (натрий) | 660 | 5 | K (калий) | 24000 | 14 |
| Mg (магний) | 3600 | 5 | Ca (кальций) | 10800 | 5 |
| P (фосфор) | 3400 | 5 | Cl (хлор) | 7200 | 5 |
| S (сера) | 3200 | 5 | Fe (железо) | 112 | 5 |
| Микро- и ультрамикроэлементы | | | | | |
| Li (литий) | 0,32 | 5 | Te (теллур) | 0,007 | >50 |
| Be (берилий) | 0,0024 | 25 | I (иод) | <0.02 | nd |
| B (бор) | 43 | 5 | Cs (цезий) | 0,021 | 8,1 |
| Al (алюминий) | 42 | 5 | Ba (барий) | 40 | 5 |
| Si (кремний) | 350 | 5 | La (лантан) | 0,037 | 6,4 |
| Sc (скандий) | 0,5 | 5 | Ce (церий) | 0,058 | 5,5 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ti (титан) | 3 | 5 | Pr (празеодим) | 0,006 | 11 |
| V (ванадий) | 0,177 | 5 | Nd (неодим) | 0,024 | 12 |
| Cr (хром) | 0,35 | 6,7 | Sm (самарий) | 0,006 | 20 |
| Mn (марганец) | 53 | 5 | Eu (самарий) | 0,0051 | 14 |
| Co (кобальт) | 0,137 | 5 | Gd (гадалиний) | 0,0041 | 19 |
| Ni (никель) | 7,1 | 5 | Tb (тербий) | 0,0005 | 24 |
| Cu (медь) | 8,6 | 5 | Dy (диспрозий) | 0,0034 | 20 |
| Zn (цинк) | 27 | 5 | Ho (гольмий) | 0,0008 | 20 |
| Ga (галлий) | 0,025 | 9,7 | Er (ербий) | 0,0011 | 26 |
| Ge (германий) | 0,0031 | 24 | Tm (тулий) | <0.0001 | nd |
| As (мышьяк) | 0,03 | 15 | Yb (иттербий) | 0,0017 | 22 |
| Se (селен) | 0,13 | 20 | Lu (лютеций) | 0,0004 | 26 |
| Br (бром) | 7,9 | 5 | Hf (гафний) | 0,0007 | 29 |
| Rb (рубидий) | 16,5 | 5 | Ta (тантал) | 0,00034 | 27 |
| Sr (стронций) | 28 | 5 | W (вольфрам) | 0,024 | 11 |
| Y (иттрий) | 0,018 | 7,8 | Re (рений) | <0.0005 | nd |
| Zr (цирконий) | 0,029 | 8,6 | Os (осмий) | <0.004 | nd |
| Nb (ниобий) | 0,0072 | 11 | Ir (иридий) | <0.0002 | nd |
| Mo (молибден) | 1,43 | 5 | Pt (платина) | <0.0007 | nd |
| Ru (рутений) | <0.0005 | nd | Au (золото) | 0,0022 | 22 |
| Rh (родий) | 0,0007 | 24 | Hg (ртуть) | <0.005 | nd |
| Pd (палладий) | <0.001 | nd | Tl (таллий) | 0,0026 | 17 |
| Ag (серебро) | 0,0048 | 16 | Pb (свинец) | 0,158 | 4,9 |
| Cd (кадмий) | 0,063 | 12 | Bi (висмут) | 0,0017 | 19 |
| Sn (олово) | 0,02 | 11 | Th (торий) | 0,0089 | 10 |
| Sb (сурьма) | 0,011 | 15 | U (уран) | 0,0018 | 17 |

По ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» анализируемый образец сбора ангиопротекторного соответствует требованиям (табл. 4.1.4).

Таблица 4.1.4 – Содержание тяжелых металлов и мышьяка в сборе ангиопротекторном

| Элемент | Найдено в сборе ангиопротекторном, мг/кг | Предельно допустимое содержание, мг/кг |
|---|---|---|
| Ртуть | 0,005 | 0,1 |
| Свинец | 0,158 | 6,0 |
| Кадмий | 0,063 | 1,0 |
| Мышьяк | 0,03 | 0,5 |

Элементы определяют постоянство состава клеток, регулируют процессы сокращения мышечной ткани, проведение нервных импульсов, состояние стенок сосудов. Наибольшее значение при этом имеют калий, кальций, натрий, железо, магний, цинк, фосфор, марганец [21].

Таким образом, лекарственный сбор ангиопротекторный содержит комплекс элементов, необходимых для нормального состояния стенки сосудов и капилляров организма человека [21, 117].

### 4.1.4. Исследование компонентного состава эфирного масла сбора ангиопротекторного

Анализ эфирного масла проводили методом хромато-масс-спектрометрии на приборе Agilent (6890N).

В ходе анализа было идентифицировано 7 углеводородов: 3-гексанон ($C_6H_{12}O$), 2-гексанон ($C_6H_{12}O$), 3-гексанол ($C_6H_{13}O$), 2-гексанол ($C_6H_{14}O$), 2-гексеналь ($C_6H_{10}O$), н-эйкозан ($C_{20}H_{42}$), н-гептадекан ($C_{17}H_{36}$) (табл. 4.1.5.).

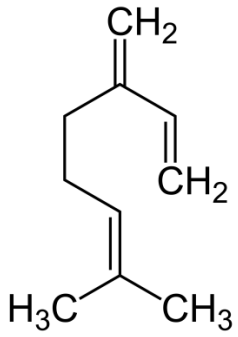
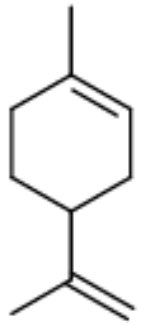
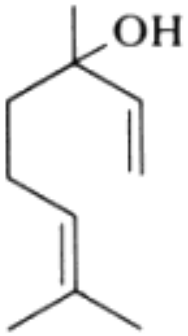
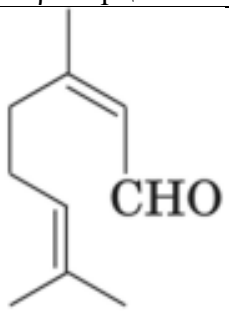
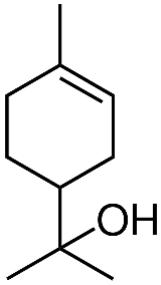
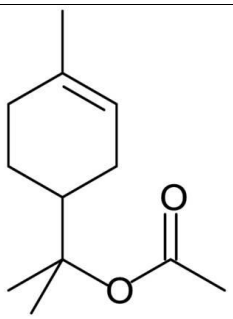
Таблица 4.1.5 – Результаты исследования эфирного масла сбора ангиопротекторного

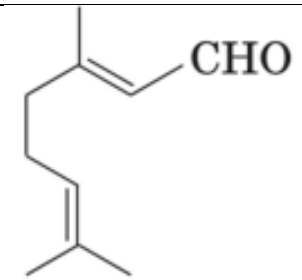
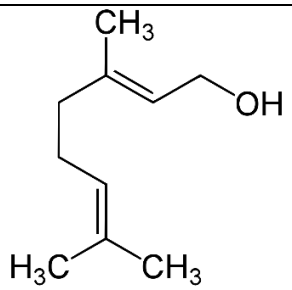
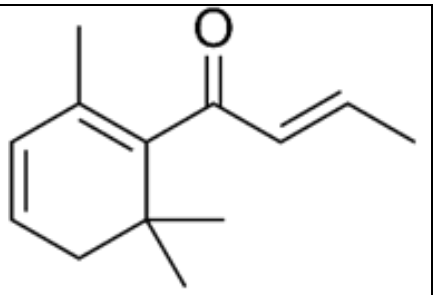
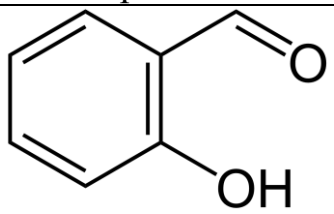
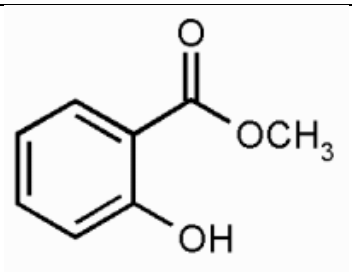
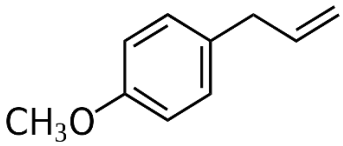
| Время удерживания, мин | Соединение | Содержание в сумме, % |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| 5,56 | 3-гексанон | 0,79 |
| 6,29 | 2- гексанон | 0,90 |
| 9,21 | β-мирцен | 0,06 |
| 9,90 | 3-гексанол | 0,72 |
| 10,84 | dl-лимонен | 0,18 |
| 10,92 | 2-гексанол | 0,65 |
| 11,24 | 2-гексеналь | 0,11 |
| 28,77 | линалоол | 1,26 |
| 35,90 | салициловый альдегид | 58,30 |
| 36,42 | нераль | 0,20 |
| 37,20 | α-терпинеол | 0,43 |
| 37,46 | α-терпинил ацетат | 0,74 |
| 39,22 | гераниаль | 0,28 |
| 40,92 | β-цитронеллол | 0,52 |
| 41,32 | метилсалицилат | 16,17 |
| 42,67 | цис-гераниол | 0,67 |

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| 43,95 | β-дамасценон | 0,48 |
| 45,16 | гераниол | 0,70 |
| 53,92 | анисовый альдегид | 0,21 |
| 60,63 | пеларгоновая кислота | 0,86 |
| 70,77 | н-эйкозан | 4,56 |
| 70,89 | н-гептадекан | 2,59 |
| 74,50 | лауриновая кислота | 1,17 |
| 82,88 | миристиновая кислота | 2,26 |
| 90,69 | пальмитиновая кислота | 5,09 |
| | Итого | 99,9 |

Из компонентов эфирного масла идентифицировано 12 соединений: β-мирцен, dl-лимонен, линалоол, нераль, α-терпинеол, *α*-терпинил ацетат, гераниаль, β-цитронеллол, цис-гераниол, β-дамасценон, гераниол, анисовый альдегид (табл. 4.1.6).

Таблица 4.1.6 – Структурные формулы идентифицированных соединений в сборе ангиопротекторном

| | | |
|---|---|---|
|   β-мирцен |  dl-лимонен |   линалоол |
|   нераль |   α-терпинеол |   α-терпинил ацетат |

| | | |
|---|---|---|
|   гераниаль |   гераниол |   β-дамасценон |
|   салициловый альдегид |   метилсалицилат |   анисовый альдегид |

Два соединения отнесены к простым фенольным соединениям – метилсалицилат, салициловый альдегид.

Из жирных кислот были идентифицированы пеларгоновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая кислоты.

Таким образом, в компонентный состав эфирного масла сбора входят углеводороды, монотерпеновые, фенольные соединения и жирные кислоты.

### 4.1.5. Количественное содержание биологически активных веществ в сборе ангиопротекторном

Количественное определение биологически активных веществ в сборе ангиопротекторном проводили по методикам, изложенным во второй главе. Анализ проводился в 6 независимых повторностях и обрабатывался с помощью методов математической статистики [23].

Количественное содержание суммы полифенольных соединений (окисляемых веществ) в извлечении, полученном с применением 50% спирта этилового содержалось 11,80±0,45% [90] (табл. 4.1.7). Количественное определение дубильных веществ проводили в водном извлечение спектрофотометрическим методом. Дубильных веществ в пересчете на танин в сборе ангиопротекторном содержалось 8,07±0,17%.

Таблица 4.1.7 – Результаты определения количественного содержания биологически активных веществ в сборе ангиопротекторном*

| Наименование БАВ, % | Метод анализа | Метрологическая характеристика |
|---|---|---|
| Сумма полифенольных соединений (окисляемые вещества) 11,80±0,45 | титриметрический | $S\overline{x}$=0,17321; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ =0,45; $\overline{E}$, % = 3,77 |
| Дубильные вещества в пересчете на танин 8,07±0,17 | СФМ | $S\overline{x}$=0,06464; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 0,17; $\overline{E}$, % =2,06 |
| Дубильные вещества в пересчете на танин (после осаждения р-ром желатины) 4,75±0,07 | СФМ | $S\overline{x}$= 0,08237; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 0,21; $\overline{E}$, % = 2,64 |
| Сумма флавоноидов в пересчете на рутин 3,28±0,05 | СФМ | $S\overline{x}$=0,01838; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 0,05; $\overline{E}$, % = 1,44 |
| Сумма фенолкарбоновых кислот в пересчете на 3-*О*-кофеилхинную кислоту 3,32±0,10 | СФМ | $S\overline{x}$=0,03992; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 0,10; $\overline{E}$, % = 3,09 |
| Эфирное масло 0,010±0,001 | Метод дистилляции | $S\overline{x}$=0,00054; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ =0,001; $\overline{E}$, % =9,09 |
| Сумма аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту 6,37±0,23 | СФМ | $S\overline{x}$=0,08861; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ =0,23; $\overline{E}$, % = 1,58 |
| Аскорбиновая кислота, мг% 298±9,73 | титриметрический | $S\overline{x}$= 3,78594; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ =9,73; $\overline{E}$, % = 3,27 |
| Каротиноиды, мг% 77,68±1,36 | СФМ | $S\overline{x}$= 0,53004; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 1,36; $\overline{E}$, % = 1,75 |
| Органические кислоты 1,89±0,05 | титриметрический | $S\overline{x}$= 0,01939; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 0,05; $\overline{E}$, % = 2,63 |
| Тритерпеновые сапонины 1,08±0,05 | СФМ | $S\overline{x}$= 0,04916; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 0,05; $\overline{E}$, % = 4,87 |
| Антоцианы 0,75±0,03% | СФМ | $S\overline{x}$= 0,01352; t(P, f) = 2,57; $\Delta\overline{x}$ = 0,03; $\overline{E}$, % = 4,62 |

* в абсолютно сухом сырье

Измерение оптической плотности осуществляли при длине волны 277 нм, расчет процентного содержания проводили в пересчете на танин. Водные извлечения, кроме дубильных веществ, содержат фенолкарбоновые кислоты, производные хинной кислоты, которые также поглощают в данной области. Для определения содержания в сборе ангиопротекторном только дубильных веществ использовали их осаждение в части извлечения 1% раствором желатина. Далее проводили измерение оптической плотности раствора после отделения осадка дубильных веществ. По разнице значений оптической плотности рассчитывали содержание дубильных веществ. Было найдено 4,75±0,07% дубильных веществ в пересчете на танин после осаждения раствором желатина.

Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин составляло 3,28±0,05%, суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на 3-*О*-кофеилхинную кислоту 3,32±0,10%.

В состав сбора ангиопротекторного входит растительное сырье, содержащее в химическом составе эфирное масло, поэтому мы провели количественное определение эфирного масла в сборе. Методом дистилляции в сборе ангиопротекторном определено содержание эфирного масла в небольшом количестве до 0,010±0,001%.

В водном извлечении из сбора ангиопротекторного содержание суммы свободных аминокислот определяли спектрофотометрическим методом. Расчет процентного содержания проводили в пересчете на глутаминовую кислоту, т.к. водное извлечение в присутствии нингидрина и натрия карбоната имеет максимум поглощения при 568 нм и совпадает с глутаминовой кислотой в присутствии этих реактивов. Содержание свободных аминокислот составило 6,37±0,23%.

Содержание аскорбиновой кислоты в сборе ангиопротекторном составляет 298±9,73 мг% (титриметрический метод – титрант 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия), каротиноидов - 77,68±1,36 мг% (спектрофотометрический метод), органических кислот в пересчете на

яблочную кислоту - 1,89±0,05%. Суммарное содержание сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту в сборе ангиопротекторном составляет 1,08±0,05%. Содержание суммы антоцианов в сборе ангиопротекторном составляет 0,75±0,03%.

Таким образом, предлагаемый сбор содержит значительное количество биологически активных веществ, оказывающих ангиопротекторное действие.

## 4.2. Разработка показателей для определения подлинности сбора

### 4.2.1. Описание внешних признаков сбора ангиопротекторного

Внешние признаки. Смесь кусочков листьев, стеблей, цветков, плодов с размером частиц до 7 мм. При рассмотрении сбора с использованием лупы (х10) или стереомикроскопа (х16) видны:

- кусочки листьев с гладкой поверхностью без волосков, кусочки стеблей круглых с ребристой поверхностью зеленого или грязно-зеленого цвета, листочки обвертки бледно-желтого цвета обратнояйцевидной формы размером 4-6 мм, плоды вислоплодники, распадающиеся на 2 мерикарпия размером 2-3 мм (*B. multinerve*);

- кусочки листьев и черешков, опушенных сероватыми волосками. На поверхности листа жилки желтоватого цвета, поверхность листьев зеленого или серовато-зеленого цвета (*F. vesca*);

- кусочки плодов часто сморщенные, черно-синего цвета с сизоватым оттенком, встречаются кусочки плода с волосками паутинистыми, семена обратно-яйцевидные, продольно-морщинистые размером до 3 мм, красновато-коричневые (*A. melanocarpa*);

- кусочки семян различной формы белого или желтоватого цвета с остатками темно-коричневой кожуры (*Ae. hippocastanum*);

- кусочки цветоножек, цветков, бутонов, недозрелых плодиков, лепестки цветков мелкие желто-белого цвета (*F. ulmaria*);

- кусочки цветоложа, обвертки корзинки опушенные, серовато-зеленого цвета, язычковые цветки на верхушке трехзубчатые, трубчатые цветки пятизубчатые, цвет язычковых и трубчатых цветков красновато-оранжевый, желтый, бледно-желтый (*C. officinalis*).

### 4.2.2. Микроскопия сбора ангиопротекторного

Для проведения анализа кусочки листьев, фрагменты цветков кипятили в 5% растворе натрия гидроксида в течение 3-5 минут, сырье промывали водой. Кусочки плодов *A. melanocarpa* и семян *Ae. hippocastanum* размачивали в воде в течение 2 часов, затем кипятили в воде в течение 3-5 минут, готовили давленные препараты.

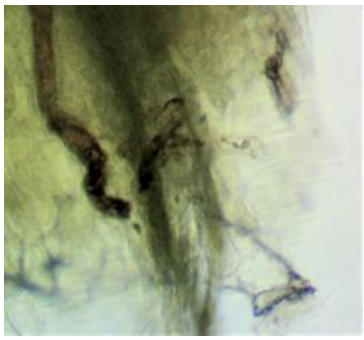
Анатомо-диагностические признаки сбора ангтопротекторного (рис. 4.2.1):

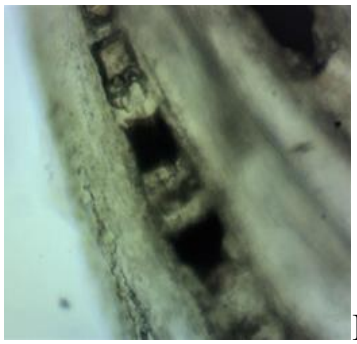
- видны фрагменты листьев стеблевых, прикорневых, прицветных и стеблей, клетки эпидермиса прямостенные или извилистые, устьица анизоцитного типа (окружены тремя клетками, одна из которых меньше по размеру), жилки сопровождаются млечниками с желтым или коричневым содержимым; элементы цветка, особенно чашелистики имеют широкие членистые млечники (*B. multinerve*);

- фрагменты листьев с длинными толстостенными одноклеточными волосками, у основания волоски суживаются и наклонены к поверхности листовой пластинки, волоски на 2-3 клеточной ножке с овальной железистой головкой, по жилкам располагаются кристаллы оксалата кальция ромбовидной формы и друзы (*F. vesca*);

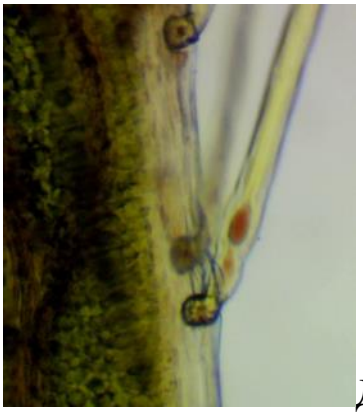
- фрагменты плода розово-фиолетового цвета, клетки эпидермиса полигональной формы, имеются одноклеточные тонкие извилистые волоски, в мезокарпии встречаются каменистые клетки с неравномерно утолщенными стенками, группы склереидов с пористыми стенками, в мякоти располагаются тяжи мелких призматических кристаллов и друз (*A. melanocarpa*) [48, 49, 114];

А

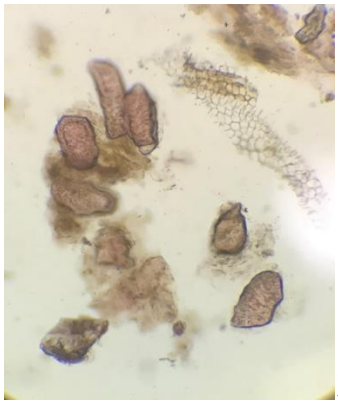

Б

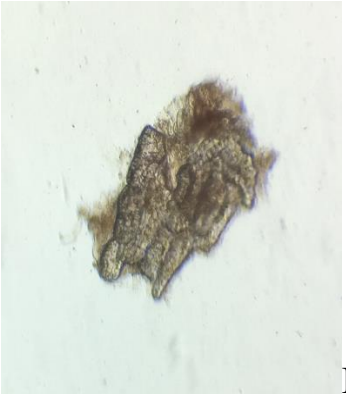

В

Г

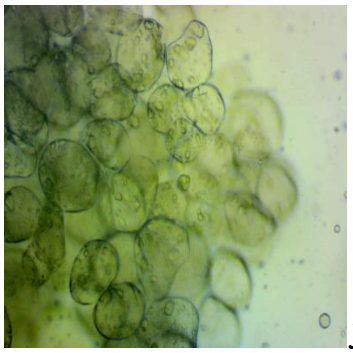

Д

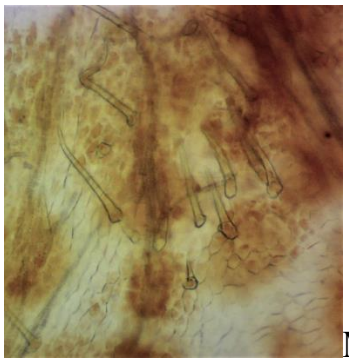
Ж

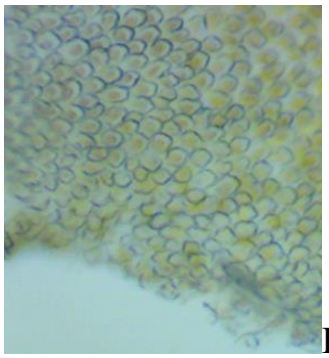

З

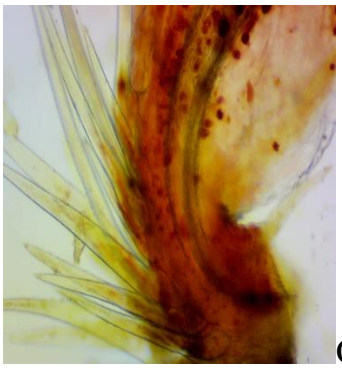
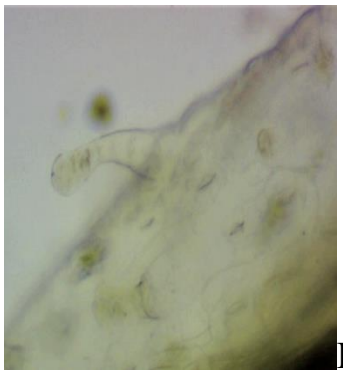

И

К


Л


М


Н


О

П

Р

Рисунок 4.2.1 - Микроскопия компонентов сбора ангиопротекторного. *B. multinerve*: А- эпидермис листа (х200), Б - жилка листа с млечником (х180), В- чашечка с млечником (х180); *F. vesca*: Г- простые и железистые волоски (х180), Д – основание простого волоска (х200), Ж – друзы и ромбовидные кристаллы (х200); *A. melanocarpa*: З – каменистые клетки мезокарпия плода, И – склереиды мезокарпия плода, К – мелкие друзы плода, образующие тяжи; *Ae. hippocastanum*: Л – паренхимные клетки с крахмалом семени; *F. ulmaria*: М- волоски чашечки (х180), Н – эпидермис лепестков (х200), О – основание завязи (х200); *C. officinalis*: П – железистый волосок язычкового цветка, Р – волосок трубчатого цветка.

- фрагменты семени из крупных изодиаметричных клеток, заполненных крахмальными зернами, окрашивающихся в синий цвет от раствора Люголя (*Ae. hippocastanum*);

- фрагменты цветков - чашечки со слабо извилистым эпидермисом и одноклеточными волосками, лепестки с сосочковидным эпидермисом, элементы завязей, покрытые пучком одноклеточных остроконечных волосков, тычиночные нити, зерна пыльцы мелкие шаровидные (*F. ulmaria*);

- элементы корзинок, язычковые и трубчатые цветки с простыми и железистыми одно- и двухрядными волосками, у железистых волосков головка 2-4-8 рядная, на листочках обвертки могут, кроме того, встречаться ветвистые волоски, элементы тычиночных нитей, пыльца округлая или четырехгранная шиповатая (*C. officinalis*).

Приготовление препарата порошка сбора ангиопротекторного. 1 г порошка кипятили в 5% растворе натрия гидроксида, после просветления порошок сбора промывали водой, декантируя каждую порцию.

Анатомо-диагностические признаки порошка сбора ангиопротекторного (рис. 4.2.2). Фрагменты листьев, стеблей, цветка с

млечниками, фрагменты листьев с длинными простыми волосками, каменистые клетки и склереиды, изодиаметричные клетки с крахмальными зернами, фрагменты чашелистиков и обвертки с одноклеточными, многоклеточными двухрядными и железистыми волосками, фрагменты завязей с одноклеточными волосками, тычиночные нити, пыльца шаровидная, четырехгранная шиповатая, фрагменты лепестков цветков с сосочковидным эпидермисом с простыми двухрядными, железистыми волосками или без них [89].

Рисунок 4.2.2 - Микроскопия сбора ангиопротекторного порошка: 1 – млечники *B. multinerve*; 2 - склереиды, 3 – каменистые клетки *A. melanocarpa*, 4 – фрагмент листа *F. vesca*, 5- клетки семени *Ae. hippocastanum*, 6 – элементы *C. officinalis*.

### 4.2.3. Разработка методик качественных реакций и ТСХ сбора ангиопротекторного

Для определения подлинности сбора ангиопротекторного предложены качественные реакции обнаружения основных групп БАВ, определяющих фармакологическую активность. Это аналитическая реакция обнаружения флавоноидов с алюминия хлоридом и тритерпеновых соединений с раствором ванилина в концентрированной серной кислоте (приложение 1).

Методика ТСХ-анализа.

*Получение извлечения*. К 1,0 г сбора, измельченного до частиц размером 1мм, добавляют 10 мл 70% спирта этилового, экстракцию проводят на

кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения извлечение фильтруют.

*Раствор сравнения СО рутина 0,004%.* Навеску 0,04 г СО рутина растворяют в 10 мл 50% спирта этилового при нагревании. Полученный раствор охлаждают, срок годности 3 месяца.

*Раствор сравнения СО кверцетина 0,005%.* Навеску 0,05 г СО кверцетина растворяют в 10 мл 96% спирта этилового при нагревании. Полученный раствор охлаждают, срок годности 3 месяца.

*Методика ТСХ-анализа.* На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого извлечения в виде полосы 1 см и по 5 мкл растворов стандартных образцов рутина и кверцетина (рис. 4.2.3). Пластинку сушат на воздухе и помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей н-бутанол-уксусная кислота лед.-вода (4:1:2) (предварительное насыщение камеры 60 мин). Хроматографируют восходящим способом, когда растворитель пройдет 80% длины пластинки, ее вынимают и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

| **Верх ТСХ-хроматограммы** | |
|---|---|
| Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета (1)<br><br>Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета (2) | Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета<br>Зона желтого цвета<br>Зона желтого цвета<br>Зона красно-фиолетового цвета<br>Зона желтого цвета<br>Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета<br>Зона желтого цвета |
| **Раствор СО кверцетина (1) и рутина (2)** | **Испытуемое извлечение** |

Рисунок 4.2.3 – Схема ТСХ хроматограммы спиртового извлечения сбора ангтопротекторного после обработки 1% раствором $AlCl_3$ (в УФ-свете при 360 нм).

Хроматограмму просматривают в УФ свете (360 нм), зона СО рутина окрашена в желтый цвет, зона СО кверцетина желто-зеленого цвета. Хроматографическую пластинку обрабатывают 1% спиртовым раствором $AlCl_3$, высушивают и нагревают 5 минут в сушильном шкафу при 100-105$^0$С. Пластинку рассматривают в УФ свете (360 нм). Зоны СО рутина и СО кверцетина имеют желто-зеленую флюоресценцию. В зоне извлечения имеются пятна на уровне зоны СО рутина и СО кверцетина, между зонами стандартных образцов 2-3 пятна желтого цвета и 1 пятно красно-фиолетового цвета, ниже зоны СО рутина допускается 1-2 зоны желтого цвета.

## 4.3. Разработка методик количественного анализа биологически активных веществ в сборе ангиопротекторном

### 4.3.1. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе ангиопротекторном

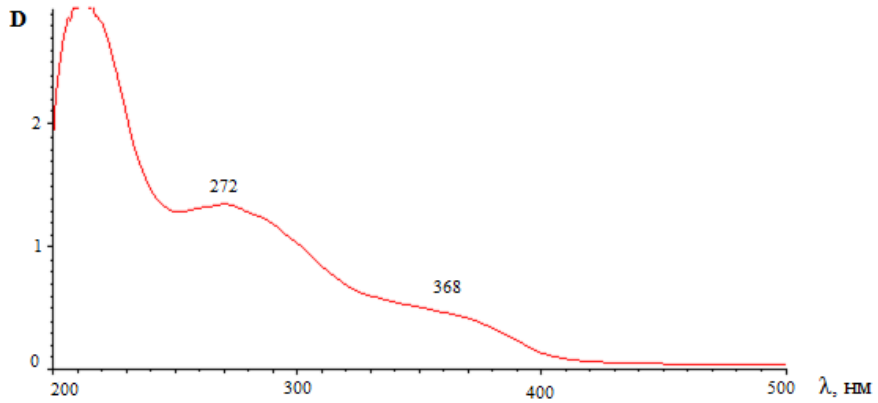
Стандартизацию сбора ангиопротекторного предлагается проводить по содержанию флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, т.к. данные соединения максимально вносят вклад в развитие фармакологического эффекта (капилляроукрепляющее, противовоспалительное, антиоксидантное действие) [96].

Для проведения количественного анализа содержания суммы флавоноидов в сборе ангиопротекторном выбран метод спектрофотометрии. В электронном спектре спиртового извлечения сбора ангиопротекторного имеются максимумы поглощения при 272 нм и 368 нм (рис. 4.3.1 А). Данные области перекрываются с сопутствующими БАВ – фенольными кислотами, дубильными веществами.

При добавлении к спиртовому извлечению сбора ангиопротекторного алюминия хлорида происходит смещение длинноволнового максимума до 415 нм, который близок к максимуму поглощения СО рутина с алюминия

хлоридом 412±3 нм (рис. 4.3.1 Б). В качестве стандартного образца выбран рутин.

А




Б

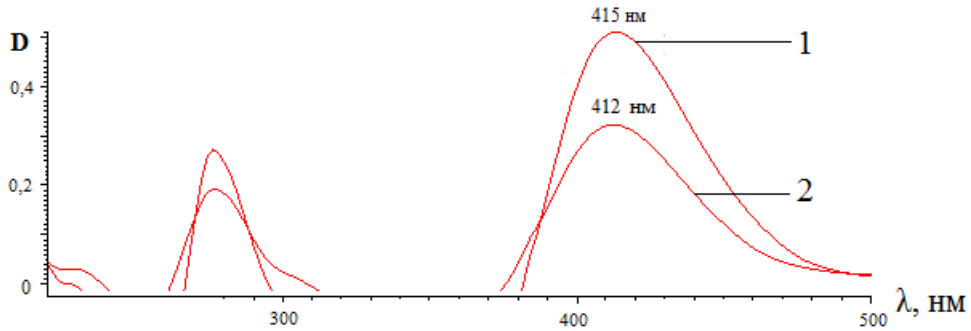



Рисунок 4.3.1 – А- электронный спектр спиртового извлечения сбора ангиопротекторного; Б - дифференциальные спектры в присутствии алюминия хлорида спиртового извлечения сбора ангиопротекторного (1) и СО рутина (2).

Для установления оптимальной концентрации спирта этилового, позволяющего максимально извлечь флавоноиды из сбора ангиопротекторного, проводили экстракцию сырья в течение 60 минут при температуре кипящей водяной бани. Из таблицы 4.3.1 видно, что наибольшее количество флавоноидов извлекается 40 и 50% спиртом этиловым. Для экстракции флавоноидов сбора ангиопротекторного достаточно применение 40% спирта этилового.

Оптимальный размер частиц сырья сбора 1-2 мм, максимальное количество флавоноидов извлекается при соотношении сырье - экстрагент 1:100 40% спиртом этиловым в течение 60 минут и полученные данные

соответствуют исчерпывающей экстракции (3 раза при соотношении сырье-экстрагент 1:50) (табл. 4.3.1).

Таблица 4.3.1 – Экстракция флавоноидов и фенолкарбоновых кислот из сбора ангиопротекторного

| Условия эксперимента | Содержание, % | |
|---|---|---|
| | СФСА | СФКСА |
| Экстрагент | | |
| Спирт этиловый 20% | 2,85±0,10 | 2,97±0,11 |
| -«- 30% | 3,25±0,11 | 3,00±0,10 |
| -«- 40% | **3,65±0,09** | **3,42±0,08** |
| -«- 50% | **3,66±0,08** | **3,41±0,07** |
| -«- 60% | 3,50±0,10 | 3,28±0,09 |
| -«- 70% | 3,15±0,11 | 3,15±0,05 |
| -«- 80% | 2,80±0,12 | 2,84±0,08 |
| -«- 90% | 2,12±0,11 | 1,80±0,05 |
| -«- 96% | 1,85±0,12 | 1,74±0,10 |
| Размер частиц сырья, мм | | |
| 5 | 1,84±0,11 | 1,50±0,10 |
| 3 | 3,45±0,12 | 2,95±0,12 |
| 2 | **3,69±0,11** | **3,40±0,11** |
| 1 | **3,70±0,10** | **3,39±0,09** |
| Соотношение сырье : экстрагент | | |
| 1:30 | 2,80±0,11 | 2,92±0,11 |
| 1:50 | 3,55±0,10 | 3,11±0,10 |
| 1:100 | **3,70±0,12** | **3,43±0,08** |
| Время экстракции в минутах (однократная экстракция) | | |
| 45 | 3,48±0,10 | 3,35±0,08 |
| 60 | **3,69±0,14** | **3,42±0,10** |
| 90 | **3,68±0,13** | **3,41±0,11** |
| Кратность экстракции | | |
| 2 раза 1:50 | 2,86±0,10 | 3,84±0,10 |
| 3 раза 1:50 | **3,68±0,11** | **3,41±0,12** |

Примечание: СФСА – сумма флавоноидов сбора ангиопротекторного, СФКСА – сумма фенолкарбоновых кислот сбора ангиопротекторного

Экспериментально установили, что оптимальное количество 1% алюминия хлорида, необходимое для образования комплекса с 1 мл аликвоты составляет 1 мл. Время стабилизации комплекса 45 минут.

*Методика количественного определения суммы флавоноидов.* Навеску сбора около 1,0000 г, измельченного до частиц размером 1-2 мм, помещают в колбу объемом 250 мл и прибавляют 100 мл 40% спирта этилового, далее колбу присоединяют к обратному холодильнику. Экстракцию проводят на кипящей водяной бане в течение 1 часа, извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, при этом отбрасывают первые 10 мл фильтрата.

В 2 мерные колбы объемом 25 мл помещают по 1 мл фильтрата. В первую колбу добавляют 1 мл 1% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Во вторую колбу (раствор сравнения) к 1 мл фильтрата добавляют 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Измерение оптической плотности проводят через 45 минут на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кюветах с толщиной слоя 10мм.

Приготовление раствора СО рутина. Испытуемый раствор: 1мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 1% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят колбу до метки 96% спиртом этиловым.

Раствор сравнения: 1 мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Оптическую плотность измеряют через 45 минут при длине волны 415 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по формуле:

$$X=\frac{D\cdot m_0\cdot V_1\cdot V_2\cdot V_3\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot V_4\cdot V_5\cdot V_6\cdot (100-W)}=\frac{D\cdot m_0\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot (100-W)},$$

где $V_1$- объем извлечения, 100 мл; $V_2$- объем разведения извлечения, 25 мл; $V_3$ – аликвота раствора СО рутина, 1мл; $V_4$ – аликвота извлечения, 1 мл; $V_5$ – объем разведения СО

рутина, 25 мл; $V_6$ – объем СО рутина, 50 мл; m – масса сырья в г; $m_0$ – масса рутина в г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

*Примечание.* Приготовление СО рутина. Около 0,0500 г рутина помещают в мерную колбу объемом 100 мл и добавляют 80 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до растворения и охлаждают. Далее раствор доводят до метки 96% спиртом этиловым.

Допускается в расчетах использование удельного показателя поглощения рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X=\frac{D\cdot 100\cdot 25\cdot 100}{E_{1см.}^{1\%}\cdot m\cdot 2\cdot (100-W)}$$

где D - оптическая плотность извлечения; $E_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина с $AlCl_3$ при λ=415 нм в 96% спирте этиловом, равный 248; $m$ – навеска сырья, г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

Статистический анализ результатов количественного определения суммы флавоноидов 9 опытов при достоверной вероятности 95 показал, что ошибка среднего результата составляет 3,15% (табл. 4.3.2).

Таблица 4.3.2 – Метрологические характеристики метода анализа флавоноидов в сборе ангиопротекторном

| f | $\bar{x}$ | S | S $\bar{x}$ | P,% | t(P,f) | $\Delta\bar{x}$ | $\bar{E}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 4,09 | 0,16732 | 0,05577 | 95 | 2,31 | 0,13 | ±3,15 |

Таблица 4.3.3 – Результаты испытаний извлечения сбора ангиопротекторного с добавками стандартного образца рутина

| Содержание СФСА в аликвоте извлечения, мкг | Количество СОР, добавленного, мкг | Рассчитанное количество СФСА+СОР мкг | Найдено СФСА+СОР, мкг | Ошибка | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | абс., мкг | отн., % |
| 408,78 | 20 | 428,78 | 435,92 | +7,14 | 1,67 |
| 408,78 | 20 | 428,78 | 416,80 | -11,98 | 2,79 |
| 408,78 | 20 | 428,78 | 415,34 | -13,44 | 3,13 |
| 408,78 | 50 | 458,78 | 448,81 | -9,97 | 2,17 |
| 408,78 | 50 | 458,78 | 464,55 | +5,77 | 1,26 |
| 408,78 | 50 | 458,78 | 445,50 | -13,28 | 2,89 |
| 408,78 | 75 | 483,78 | 490,82 | -7,04 | 1,46 |
| 408,78 | 75 | 458,78 | 494,70 | +10,92 | 2,25 |
| 408,78 | 75 | 458,78 | 498,30 | +14,52 | 3,00 |

Примечание: СФСА – сумма флавоноидов сбора ангиопротекторного, СОР-стандартный образец рутина

Опыты, проведенные с добавлением рутина, показывают отсутствие систематической ошибки, т.к. относительные ошибки результатов находятся в пределах ошибки методики (табл. 4.3.3).

Таблица 4.3.4 – Результаты проверки прецизионности (сходимость и воспроизводимость) методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе ангиопротекторном (истинное значение определяемой величины 4,088%)

| Результаты опыта | Метрологическая характеристика | Значение RSD (%) | Рассчитанный критерий Стьюдента |
|---|---|---|---|
| Сходимость | | | |
| 1 день<br>1. 3,98<br>2. 4,00<br>3. 3,95<br>4. 3,87<br>5. 4,08<br>6. 4,10 | $\overline{x}$ =3,9967<br>S =0,08501<br>S$\overline{x}$=0,03471;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,09;<br>$\overline{E}$, % =2,23 | 2,13 | 2,54 |
| 2 день<br>1. 4,05<br>2. 3,85<br>3. 3,98<br>4. 3,95<br>5. 4,10<br>6. 4,02 | $\overline{x}$ =3,9917<br>S =0,08704<br>S$\overline{x}$=0,03554;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,09;<br>$\overline{E}$, % =2,29 | 2,18 | 2,47 |
| Воспроизводимость | | | |
| 1 лаборатория<br>1. 3,96<br>2. 3,88<br>3. 4,15<br>4. 4,12<br>5. 3,80<br>6. 3,95 | $\overline{x}$ =3,9767<br>S =0,13574<br>S$\overline{x}$=0,05542;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,14;<br>$\overline{E}$, % = 3,58 | 3,41 | 2,01 |
| 2 лаборатория<br>1. 3,84<br>2. 3,99<br>3. 4,14<br>4. 3,97<br>5. 4,05<br>6. 3,85 | $\overline{x}$ =3,9733<br>S =0,11570<br>S$\overline{x}$=0,04723;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,12;<br>$\overline{E}$, % =3,06 | 2,90 | 2,12 |

При изучении прецизионности методики установлено, что значение RSD не превышает 3,41, а рассчитанный коэффициент Стьюдента меньше табличного, что указывает на соответствие критериям прецизионности (RSD ≤15%) (табл. 4.3.4).

Правильность методики доказана в опытах на модельных смесях с СО рутина (концентрации 75, 100, 125, 150 от нормируемого). Каждая концентрация анализировалась в трех повторностях. (табл. 4.3.5).

Таблица 4.3.5 – Результаты проверки правильности методики количественного определения СФСА

| № | Количество СОР в модельной смеси, мг | Экспериментальные данные | |
|---|---|---|---|
| | | Найденное значение СОР, мг | Процент восстановления, % |
| 1 | 22,50 | 22,54 | 100,17 |
| 2 | 22,50 | 21,37 | 94,78 |
| 3 | 22,50 | 21,80 | 96,89 |
| Среднее | | | 97,28 |
| 1 | 30,00 | 29,50 | 98,33 |
| 2 | 30,00 | 30,76 | 102,53 |
| 3 | 30,00 | 31,05 | 103,50 |
| Среднее | | | 101,45 |
| 1 | 37,50 | 37,90 | 101,65 |
| 2 | 37,50 | 36,78 | 98,08 |
| 3 | 37,50 | 37,65 | 100,40 |
| Среднее | | | 100,05 |
| 1 | 45,00 | 45,95 | 102,11 |
| 2 | 45,00 | 45,30 | 106,66 |
| 3 | 45,00 | 44,00 | 97,78 |
| Среднее | | | 102,18 |
| Средний процент восстановления для 4-х концентраций | | | 100,24 |

Примечание: СФСА - сумма флавоноидов сбора ангиопротекторного, СОР – стандартный образец рутина

В эксперименте средний процент восстановления составил 100,24%, что находится в допустимых пределах [22, 37].

Линейность методики исследовали со стандартным образцом рутина. Были приготовлены растворы с содержанием в исследуемом растворе от нормируемого 50, 75, 100, 125, 150 %.

Коэффициент корреляции составил 0,9998 (допускается |r|≥0,98); b=0,020647619; a=0,00192381.

Уравнение y=0,0207·x+0,0019 (табл. 4.3.6, рис. 4.3.2).

Таблица 4.3.6 – Значение оптической плотности разных концентраций стандартного образца рутина

| Содержание СОР от нормируемого, в % | Концентрация СОР (в измеряемом растворе), мкг/мл | Значение оптической плотности, D | Коэффициент корреляции | y=b•x+a | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | b | a |
| 50 | 6,0 | 0,128 | 0,9998 | 0,0207 | +0,0019 |
| 75 | 9,0 | 0,185 | | | |
| 100 | 12,0 | 0,248 | | | |
| 125 | 15,0 | 0,315 | | | |
| 150 | 18,0 | 0,372 | | | |
| 175 | 21,0 | 0,436 | | | |

Примечание: СОР – стандартный образец рутина

Аналитическая область методики находится в переделах концентрации рутина (в измеряемом объеме) 9,61 мкг/мл – 21 мкг/мл.

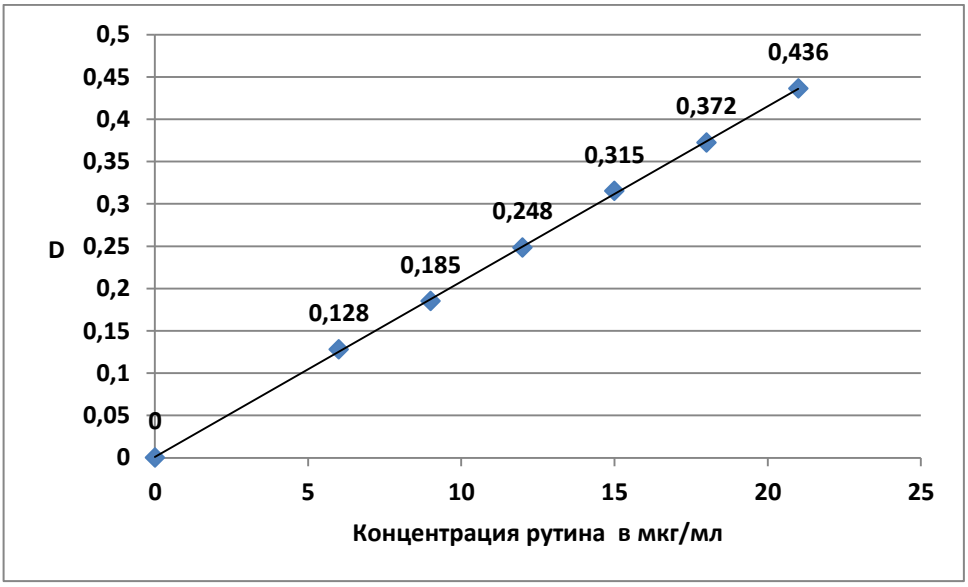



Рисунок 4.3.2 – График линейной зависимости оптической плотности рутина от его концентрации в измеряемом растворе.

При анализе 5 серий сбора ангиопротекторного содержание суммы флавоноидов было от 3,28% до 4,46% (табл. 4.3.7).

Таблица 4.3.7 - Количественное содержание суммы флавоноидов в 5 сериях сбора ангиопротекторного

| Серия | $\bar{x}$ | S | S $\bar{x}$ | P,% | t(P,f) | f | $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ | $\bar{E}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3,28 | 0,04502 | 0,01838 | 95 | 2,57 | 5 | 3,28±0,05 | 1,44 |
| 2 | 4,36 | 0,12660 | 0,05168 | 95 | 2,57 | 5 | 4,36±0,13 | 3,05 |
| 3 | 4,46 | 0,13014 | 0,05313 | 95 | 2,57 | 5 | 4,46±0,14 | 3,06 |
| 4 | 3,94 | 0,10985 | 0,04485 | 95 | 2,57 | 5 | 3,94±0,12 | 2,93 |
| 5 | 3,75 | 0,11113 | 0,04537 | 95 | 2,57 | 5 | 3,75±0,12 | 3,19 |

Рекомендуемая норма содержания суммы флавоноидов в сборе ангиопротекторном «не менее 3%».

Таким образом, предложена методика количественного определения в сборе ангиопротекторном суммы флавоноидов для включения в нормативный документ (проект ФС, приложение 1).

### 4.3.2. Разработка и валидация методики количественного определения суммы фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном

Изучение химического состава сбора ангиопротекторного показало содержание фенолкарбоновых кислот 3-*О*-кофеилхинной, 5-*О*-кофеилхинной, протокатеховой. Спиртовое извлечение сбора имеет максимум поглощения при 325 нм, который совпадает с максимумом поглощения 3-*О*-кофеилхинной кислоты, которая принята в качестве стандартного образца для расчета процентного содержания суммы фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном.

Концентрация спирта этилового влияет на выход фенолкарбоновых кислот. Максимальное их количество извлекается 40 и 50% спиртом этиловым (табл.4.3.1). Оптимальным размером частиц является степень мелкости сырья 1-2 мм, при однократной экстракции 1:100 в течение одного часа на водяной бане, при этом извлекается количество фенолкарбоновых кислот, равное исчерпывающей экстракции (табл. 4.3.1).

По результатам исследования предложена методика количественного анализа фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном.

*Методика.* Навеску сбора около 1,0000 г измельченного до частиц 1-2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, приливают 100 мл спирта этилового 40%. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают 1 час на кипящей водяной бане. Содержимое колбы охлаждают и фильтруют, получают раствор А (для анализа можно применить извлечение, получаемое при количественном определении суммы флавоноидов).

Далее 1 мл раствора А переносят в мерную колбу объемом 100 мл, которую доводят до метки 96% спиртом этиловым, получают раствор Б. Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при 325 нм. Толщина измеряемого слоя 10 мм, раствор сравнения 96% спирт этиловый.

Количество суммы фенолкарбоновых кислот в абсолютно сухом сыре в пересчёте на 3-*O*-кофеилхинную кислоту, в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X=\frac{D\cdot 100\cdot 100\cdot 100}{m\cdot 504\cdot 1\cdot (100-W)}=\frac{D\cdot 10000\cdot 100}{m\cdot 504\cdot (100-W)},$$

где $D$ – оптическая плотность испытуемого раствора; $m$ – масса сырья, г; 504 – удельный показатель поглощения 3-*O*-кофеилхинной кислоты в 96% спирте этиловом; $W$ – абсолютная влажность сбора, %.

На основании проведённых 9 независимых определений установлено, что ошибка методики составляет ±2,69% (табл. 4.3.8).

Таблица 4.3.8 – Метрологическая характеристика методики количественного анализа суммы фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном

| f | $\bar{x}$ | S | S $\bar{x}$ | P,% | t(P,f) | $\Delta\bar{x}$ | $\bar{E}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 3,47 | 0,12153 | 0,04051 | 95 | 2,31 | 0,09 | ±2,69 |

Правильность методики оценивали в опытах с добавками стандартного образца 3-*О*-кофеилхинной кислоты. В результате было установлено, что ошибка эксперимента не превышала ошибку методики (табл. 4.3.9).

Таблица 4.3.9 – Результаты опытов с добавками стандарта 3-*О*-кофеилхинной кислоты в сборе ангиопротекторном

| Содержание СФККв аликвоте, мкг | Добавлено СО 3-КХК, мкг | Ожидаемое количество СФКК, мкг | Полученное количество СФКК, мкг | Ошибка | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | абс., мкг | Е отн., %. |
| 86,7 | 20 | 106,7 | 109,0 | +2,3 | +2,16 |
| 86,7 | 20 | 106,7 | 104,5 | -2,2 | -2,06 |
| 86,7 | 20 | 106,7 | 104,8 | -1,9 | -1,78 |
| 86,7 | 30 | 116,7 | 118,5 | +1,54 | +1,54 |
| 86,7 | 30 | 116,7 | 119,2 | +2,14 | +2,14 |
| 86,7 | 30 | 116,7 | 115,5 | -1,03 | -1,03 |
| 86,7 | 50 | 136,7 | 140,2 | +3,5 | +2,56 |
| 86,7 | 50 | 136,7 | 138,5 | +1,8 | +1,32 |
| 86,7 | 50 | 136,7 | 133,4 | -3,3 | -2,41 |

Примечание. СФКК – сумма фенолкарбоновых кислот, 3-КХК - 3-*О*-кофеилхинная кислота

Далее провели валидацию предложенной методики количественного анализа суммы фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном. Исследования показали ее соответствие по критериям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность [22, 37].

Проверку правильности методики количественного анализа проводили на растворах с СО 3-*О*-кофеилхинной кислоты в концентрациях 75, 100, 125% от нормируемого содержания. Результаты анализа в таблице 4.3.10. Средний процент восстановления составил 101,3%, что находится в рекомендуемых пределах.

Критерием приемлемости прецизионности (сходимость и воспроизводимость) является величина относительного стандартного отклонения (RSD) не более 15% [22, 37].

При изучении прецизионности (сходимость и воспроизводимость) определяли на спектрофотометре LEKI в разные дни. Величина RSD не

превышала 2,11%, критерий Стьюдента рассчитанный не превышал табличное значение (t=2,57) (табл. 4.3.11).

Таблица 4.3.10 – Проверка правильности методики спектрофотометрического количественного определения фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном

| № | Количество СО 3-КХК в модельной смеси, мг | Экспериментальные данные | |
|---|---|---|---|
| | | Найденное значение 3-КХК, мг | Процент восстановления, % |
| 1 | 18,75 | 18,97 | 101,2 |
| 2 | 18,75 | 18,00 | 96,0 |
| 3 | 18,75 | 18,10 | 103,5 |
| Среднее | | | 100,2 |
| 1 | 25,00 | 25,54 | 102,2 |
| 2 | 25,00 | 26,18 | 104,2 |
| 3 | 25,00 | 27,30 | 109,2 |
| Среднее | | | 105,2 |
| 1 | 31,25 | 30,55 | 97,8 |
| 2 | 31,25 | 36,78 | 100,3 |
| 3 | 31,25 | 37,65 | 105,6 |
| Среднее | | | 101,0 |
| 1 | 37,50 | 35,80 | 95,5 |
| 2 | 37,50 | 36,74 | 98,0 |
| 3 | 37,50 | 38,50 | 102,7 |
| Среднее | | | 98,73 |
| Средний процент восстановления для 4-х концентраций | | | 101,3 |

Примечание: 3-КХК – 3- *О*-кофеилхинная кислота

Полученные результаты изучения критериев сходимости и воспроизводимости указывают на прецизионность методики (табл. 4.3.11).

Таблица 4.3.11 – Результаты проверки прецизионности (сходимость и воспроизводимость) методики количественного анализа суммы фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном (истинное значение определяемой величины 3,468%)

| Результаты опыта | Метрологическая характеристика | Значение RSD (%) | Рассчитанный критерий Стьюдента |
|---|---|---|---|
| Сходимость | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 день<br>1. 3,42<br>2. 3,55<br>3. 3,62<br>4. 3,45<br>5. 3,61<br>6. 3,48 | $\overline{x}$ =3,522<br>S =0,08424<br>S$\overline{x}$=0,03439;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,09;<br>$\overline{E}$, % =2,51 | 2,39 | 1,58 |

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
| 2 день<br>1. 3,57<br>2. 3,35<br>3. 3,42<br>4. 3,41<br>5. 3,40<br>6. 3,34 | $\overline{x}$ =3,415<br>S =0,08264<br>S$\overline{x}$=0,03374;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,09;<br>$\overline{E}$, % =2,54 | 2,42 | 1,56 |
| Воспроизводимость | | | |
| 1 лаборатория<br>1. 3,34<br>2. 3,42<br>3. 3,5<br>4. 3,48<br>5. 3,35<br>6. 3,30 | $\overline{x}$ =3,398<br>S =0,08110<br>S$\overline{x}$=0,03311;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,09;<br>$\overline{E}$, % = 2,50 | 2,39 | 2,11 |
| 2 лаборатория<br>1. 3,58<br>2. 3,40<br>3. 3,34<br>4. 3,45<br>5. 3,50<br>6. 3,42 | $\overline{x}$ =3,448<br>S =0,08353<br>S$\overline{x}$=0,03410;<br>t(P, f) = 2,57;<br>$\Delta\overline{x}$ = 0,09;<br>$\overline{E}$, % =2,54 | 2,42 | 0,58 |

Линейность методики изучали на шести уровнях концентраций стандарта 3-*О*-кофеилхинной кислоты 50, 75, 100, 125, 150, 175% от рекомендуемого по нормативной документации (не менее 2,5%) (табл. 4.3.12).

Таблица 4.3.12 – Значение оптической плотности 3-КХК от концентрации в растворе

| Содержание СО 3-КХК в % от рекомендуемого | Концентрация СО 3-КХК мкг/мл (в измеряемом растворе) | Значение оптической плотности, D | Коэффициент корреляции | y=b•x+a | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | b | a |
| 50 | 2,50 | 0,114 | 0,9985 | 0,0447 | 0,0045 |
| 75 | 3,76 | 0,171 | | | |
| 100 | 5,00 | 0,227 | | | |
| 125 | 6,26 | 0,284 | | | |
| 150 | 7,50 | 0,341 | | | |
| 175 | 8,76 | 0,400 | | | |

В соответствии с графиком коэффициент корреляции составил 0,9985 (допускается |r|≥0,98) [23], y=0,044702·x-0,004497 (рис. 4.3.3).

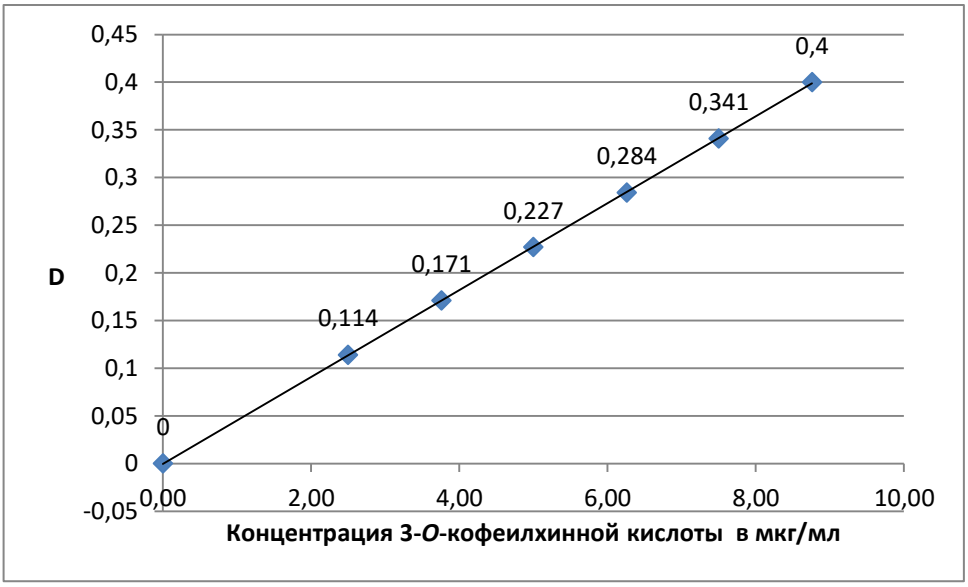



Рисунок 4.3.3 - Зависимость оптической плотности раствора от концентрации 3-*О*-кофеилхинной кислоты.

Линейность методики сохраняется в интервале оптической плотности 0,2-0,6 при концентрации 3-*О*-кофеилхинной кислоты от 4,37до 8,76 мкг/мл.

Электронный спектр извлечения из сбора ангиопротекторного совпадает со спектром СО 3-*О*-кофеилхинной кислоты, что подтверждает специфичность методики.

Предложенная методика количественного анализа суммы фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном валидна по параметрам: правильность, специфичность, прецизионность и линейность. Методика включена в проект ФС на сбор ангиопротекторный. Рекомендуемая норма содержания суммы фенолкарбоновых кислот не менее 2,5% (табл. 4.3.13).

Таблица 4.3.13 – Количественное содержание суммы фенолкарбоновых кислот в 5 сериях сбора ангиопротекторного

| Серия | $\bar{x}$ | S | S $\bar{x}$ | P,% | t(P,f) | f | $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ | $\bar{E}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3,52 | 0,08424 | 0,03439 | 95 | 2,57 | 5 | 3,52±0,09 | 2,51 |
| 2 | 3,67 | 0,06804 | 0,03043 | 95 | 2,57 | 5 | 3,67±0,08 | 2,31 |
| 3 | 3,32 | 0,05621 | 0,02295 | 95 | 2,57 | 5 | 3,32±0,06 | 1,78 |
| 4 | 3,00 | 0,06899 | 0,02817 | 95 | 2,57 | 5 | 3,00±0,07 | 2,41 |
| 5 | 3,32 | 0,08076 | 0,03296 | 95 | 2,57 | 5 | 3,32±0,08 | 2,55 |

## 4.4. Определение норм товароведческих показателей в сборе ангиопротекторном

Для проведения исследования были приготовлены 5 серий сбора массой каждая 250 г (средняя проба) в соответствии с ОФС.1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [23].

Содержание влаги в сборе колебалось от 7,34% до 8,94%, рекомендуем норму содержания «не более 11%». Золы общей в пробах содержалось от 8,98% до 10,15%; золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте от 2,80% до 3,37%.

Для включения в нормативный документ рекомендуются показатели: «золы общей не более 11%», «золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте не более 3,5%» (табл. 4.4.1) [88].

Таблица 4.4.1 – Результаты определения влаги и золы в сборе ангиопротекторном

| № серии сбора | Содержание, % | | |
|---|---|---|---|
| | Влага | Зола общая | Зола, нерастворимая в HCl |
| 1 | 7,34 | 9,25 | 3,25 |
| 2 | 7,50 | 9,10 | 3,10 |
| 3 | 8,35 | 8,98 | 2,94 |
| 4 | 8,50 | 10,15 | 3,37 |
| 5 | 8,94 | 9,96 | 2,80 |
| Среднее значение | 8,17±0,75 | 9,48±0,66 | 3,09±0,28 |
| Рекомендуемая норма содержания | Не более 10 | Не более 11 | Не более 3,5 |

Среднее значение органической примеси в сборе составило 0,87± 0,04% (рекомендуется не более 1,0%), минеральной примеси - 0,81±0,08% (рекомендуется не более 1,0%). Частиц размером более 7 мм составило 4,09±0,34% (рекомендуется не более 5,0%), частиц меньше размером 0,18 мм

- 4,04±0,19% (рекомендуется не более 5,0%). Частиц сбора, потерявших свою окраску, составляло 2,53±0,27% (рекомендуется не более 3,0%) (табл. 4.4.2).

Таблица 4.4.2 –Товароведческие показатели в 5 сериях сбора ангиопротекторного

| № серии | Примеси, % | | | Частицы, % | | Экстрактивные вещества, % | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Органическая | Минеральная | Частиц сбора, потерявших свою окраску | Не проходящие сквозь сито Ø 7 мм, % | проходящие сквозь сито Ø 0,18 мм, % | извлекаемые 40% этиловым спиртом | извлекаемые очищенной $H_2O$ |
| 1 | 0,83 | 0,79 | 2,55 | 3,80 | 4,20 | 42,35 | 22,35 |
| 2 | 0,88 | 0,82 | 2,60 | 3,90 | 4,15 | 36,82 | 21,44 |
| 3 | 0,91 | 0,71 | 2,30 | 4,15 | 3,85 | 40,53 | 22,75 |
| 4 | 0,88 | 0,88 | 2,84 | 4/50 | 3,90 | 37,12 | 23,79 |
| 5 | 0,84 | 0,84 | 2,35 | 4,10 | 4,10 | 38,55 | 24,73 |
| Среднее значение | 0,87± 0,04 | 0,81± 0,08 | 2,53± 0,27 | 4,09± 0,34 | 4,04± 0,19 | 39,07± 2,91 | 23,01± 1,59 |
| Рекомендуемая норма содержания | не >1 | не >1 | не >3 | не >5 | не >5 | не <35 | не <20 |

Экстрактивных веществ, извлекаемых 40% спиртом этиловым, было в среднем 39,07±2,91% (рекомендуемая норма не менее 35%), экстрактивных веществ, извлекаемых водой - 23,01±1,59% (рекомендуемая норма не менее 20%).

Для сбора в виде порошка введен показатель «Частицы, не проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм», не более 5%.

Определение сроков годности сбора ангиопротекторного проводили по требования ГФ XIV издания [23]. ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств». Для определения срока годности сбора ангиопротекторного 3 образца были заложены на хранение в бумажные пакеты при комнатной температуре в темном месте. При наблюдении в течение 2 лет показатели оставались стабильными (табл. 4.4.3).

Таблица 4.4.3 –Определение товароведческих показателей сбора ангиопротекторгого в процессе хранения (на примере одного образца)

| Дата анализа | БАВ, % | | Содержание влаги, % | Частиц сбора, потерявших свою окраску | Частицы, % | | Экстрактивные вещества, % | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | СФСА | СФКСА | | | не проходящие сквозь сито Ø 7 мм, % | проходящие сквозь сито Ø 0,18 мм, % | извлекаемые 40% этиловым спиртом | извлекаемые очищенной $H_2O$ |
| 10.01.2019 | 3,27 | 3,52 | 7,34 | 2,55 | 3,80 | 4,20 | 42,35 | 22,35 |
| 05.06.2019 | 3,28 | 3,53 | 7,33 | 2,56 | 3,90 | 4,15 | 36,82 | 21,44 |
| 12.12.2019 | 3,26 | 3,54 | 7,32 | 2,54 | 4,15 | 3,85 | 40,53 | 22,75 |
| 04.06.2020 | 3,27 | 3,51 | 7,31 | 2,55 | 4/50 | 3,90 | 37,12 | 23,79 |
| 02.12.2020 | 3,28 | 3,52 | 7,30 | 2,56 | 4,10 | 4,10 | 38,55 | 24,73 |
| норма | не < 3,0% | не < 2,5% | не > 10,0% | не > 3,0% | не >5,0% | не >5,0% | не <35% | не <20% |

Примечание: СФСА – сумма флавоноидов сбора ангиопротекторного, СФКСА – сумма фенолкарбоновых кислот сбора ангиопротекторного

Таблица 4.4.4. – Рекомендуемые числовые показатели для включения в проект ФС на сбор ангиопротекторный

| Показатель | Норма содержания | Показатель | Норма содержания |
|---|---|---|---|
| Влажность | Не более 10% | Золы нераство-римой в HCl | Не более 3,5% |
| Сумма флавоноидов, в пересчете на рутин | Не менее 3% | Частицы, не проходящие сквозь сито Ø 7 мм, % | Не более 5% |
| Сумма фенолкарбоновых кислот, в пересчете на 3-*О*-кофеилхинную кислоту | Не менее 2,5% | Частицы, проходящие сквозь сито Ø 0,18 мм, % | Не более 5% |
| Экстрактивных веществ, извлекаемых 40% спиртом этиловым | Не менее 35% | Частиц сбора, потерявших свою окраску | Не более 3% |
| Экстрактивных веществ, извлека-емых водой | Не менее 20% | Органическая примесь | Не более 1% |
| Золы общей | Не более 11% | Минеральная примесь | Не более 1% |
| Срок годности | 2 года | | |

Таким образом, по результатам анализа установили товароведческие показатели сбора ангиопротекторного: примеси (органическая, минеральная, частицы сырья, потерявшие окраску), степень измельченности сырья, экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом этиловым 40% не менее 35%, а извлекаемые водой не менее 20% [88].

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. В состав БАВ сбора ангиопротекторного входят флавоноиды, дубильные вещества, сапонины, аминокислоты, антоцианы, кумарины, органические кислоты, β-каротин, аскорбиновая кислота, фенолкарбоновые кислоты.

2. В состав фенольного комплекса входят флавоноиды (рутин, изокверцитрин, нарциссин, изорамнетин-3-*О*-глюкозид, кверцетин, изорамнентин, кемпферол, гиперозид, гисперидин, спиреозид), фенолкарбоновые кислоты (3-*О*-кофеилхинная, 5-*О*-кофеилхинная, протокатеховая, кофейная), антоцианы (цианидин-3-*О*-глюкозид, цианидин-3-*О*-арабинозид), кумарины эскулетин, умбеллиферон. В составе флавоноидов преобладают рутин 3,35±0,06 мг/г, нарциссин 4,15±0,09 мг/г.

3. Элементный состав представлен 8 макро- и 64 микро- и ультрамикроэлементами. Среди них содержатся элементы, регулирующие процессы сокращения мышечной ткани, проведение нервных импульсов, состояние стенок сосудов (кальций, натрий, железо, магний, цинк, фосфор, марганец). Анализируемые образцы сбора ангиопротекторного соответствовали нормам по содержанию мышьяка и тяжелых металлов.

4. В оставе эфирного масла идентифицировано 21 соединение: 7 углеводородов – 3-гексанон ($C_6H_{12}O$), 2-гексанон ($C_6H_{12}O$), 3-гексанол ($C_6H_{13}O$), 2-гексанол ($C_6H_{14}O$), 2-гексеналь ($C_6H_{10}O$), н-эйкозан ($C_{20}H_{42}$), н-гептадекан ($C_{17}H_{36}$); монотерпены – β- мирцен, dl-лимонен, линалоол, нераль, α-терпинеол, α-терпинил ацетат, гераниаль, β-цитронеллол, цис-гераниол, β-дамасценон, гераниол, анисовый альдегид. Два соединения отнесены к

простым фенольным соединениям – метилсалицилат, салициловый альдегид. Из жирных кислот были идентифицированы пеларгоновая кислота, лауриновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота.

5. Количественное содержание БАВ в сборе ангиопротекторном составило: суммы полифенольных соединений 11,4±0,57%, суммы флавоноидов 3,28±0,05%, суммы фенолкарбоновых кислот 3,32±0,10, дубильных веществ в пересчете на танин 4,75±0,07%, суммы аминокислот 6,37±0,23%, сапонинов – 1,08±0,05%, каротиноидов 77,68±1,36мг%, органических кислот 1,89±0,05%, аскорбиновой кислоты 298±9,73мг%, эфирного масла 0,01±0,001%, антоцианов 0,75±0,03%.

6. Разработаны показатели подлинности сбора ангиопротекторного: внешние признаки, анатомо-диагностические признаки – фрагменты листьев, стеблей, цветков с млечниками, фрагменты листьев и цветков с простыми и железистыми волосками, каменистые клетки и склереиды, изодиаметричные клетки с крахмальными зернами, тычиночные нити, пыльца шаровидная, четырехгранная шиповатая; качественные реакции обнаружения флавоноидов и тритерпеновых сапонинов, ТСХ флавоноидов и фенолкарбоновых кислот.

7. Обосновано проведение стандартизации сырья по содержанию флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. Проведена адаптация методик спектрофотометрического количественного анализа этих групп БАВ. Методики валидированы и соответствуют параметрам – правильность, специфичность, прецизионность.

8. Установлены товароведческие показатели и нормы их содержания в сборе ангиопротекторном при анализе 5 серий сбора. Норма содержания суммы флавоноидов не менее 3%, суммы фенолкарбоновых кислот не менее 2,5%, экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 20%, экстрактивных веществ, извлекаемых 40% спиртом этиловым, не менее 35%. Срок годности сбора 2 года.

# ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ВОЛОДУШКИ МНОГОЖИЛКОВОЙ ТРАВЫ (*BUPLEURI MULTINERVIS HERBA*)

Качество сырья *B. multinerve* регламентируется нормативным документом ВФС 42-580-76 «*Herba Bupleuri multinervis* – Трава володушки многожильчатой». Документ не соответствует современным требованиям к фармакопейным статьям. Требуется переработка данного нормативного документа. Во вводной части статьи указывается, что сырье предназначено для получения препарата буплерина (в настоящее время препарат не выпускается).

В разделе «Микроскопия» дается описание только для цельного сырья, а именно листа, при этом не указывается важный диагностический признак для растений рода *Bupleurum* - млечники с содержимым вдоль крупных жилок [79, 86, 87]. В разделе не приводятся микрофотографии или рисунки микроскопического строения.

В разделе «Качественные реакции» приводится методика бумажной хроматографии с применением системы уксусная кислота-85% муравьиная кислота-вода (10:2:3). Время разделения восходящим способом 24 часа, что достаточно длительно для определения подлинности сырья.

В раздел «Количественное определение» включен хроматоспектрофотометрический метод, предусматривающий экстракцию сырья 95% спиртом этиловым при настаивании в течение 24 часов с последующей исчерпывающей экстракцией этим же растворителем. Далее после концентрирования извлечения проводят количественно разделение флавоноидов методом бумажной хроматографии в системе: уксусная кислота-85% муравьиная кислота-вода (10:2:3) (время разделения 24 часа).

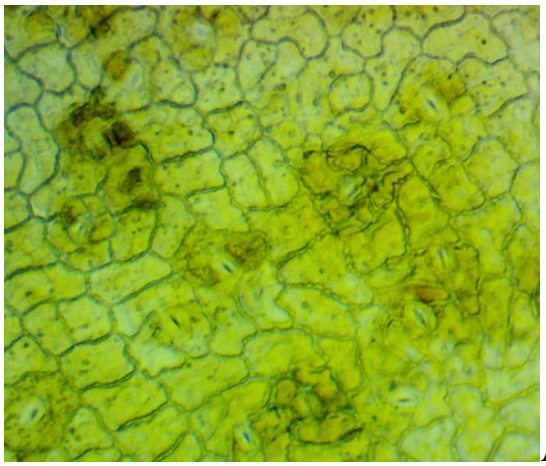
Хроматограмма после высушивания обрабатывается 10% спиртовым раствором алюминия хлоридом. Пятна флавоноидов вырезают и элюируют спиртом этиловым 95%, измеряют оптическую плотность при 420 нм. Расчет

процентного содержания проводят по калибровочному графику, построенному по рутину. Недостатки методики: длительность исполнения, измерение оптической плотности при 420 нм флавоноидов в комплексе с алюминия хлоридом.

Приведенные данные указывают на необходимость разработки нормативной документации – фармакопейной статьи, соответствующей современным требованиям по разделам: подлинность, испытания [92, 106].

## 5.1. Микроскопические исследования сырья *Bupleuri multinervis herba*
## Микроскопия листа

*Лист стеблевой.* При рассмотрении листа с верхней стороны видны клетки эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, местами стенки клеток прямостенные прямоугольные. Стенки клеток эпидермиса во многих местах имеют четковидные утолщения. Устьица погруженные и окружены тремя клетками, одна из которых значительно меньше по размеру (анизоцитный тип) (рис. 5.1.1 А).


А

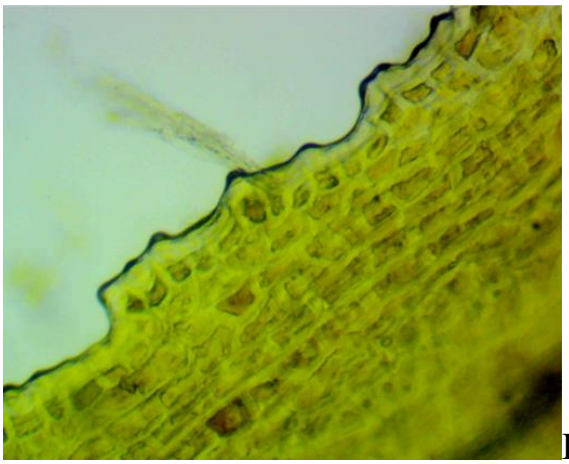
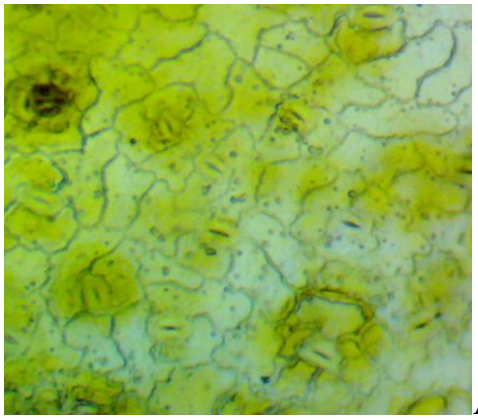

Б

Рисунок 5.1.1 – Эпидермис верхней стороны листа *B. multinerve* (х200):
А- устьица анизоцитного типа, Б- край листа (х200).

В центральной части листа эпидермальные клетки слабоизвилистые, ближе к периферии четырехугольные изодиаметричные, по краю листа клетки эпидермиса вытянутые прямостенные (рис. 5.1.1 Б). Клетки

эпидермиса покрыты складчатой кутикулой, которая по краю листа имеет гребенчатый вид.

На нижней стороне листа клетки эпидермиса меньше по размеру и более извилистые, устьица многочисленные анизоцитного типа (рис. 5.1.2 А).


А

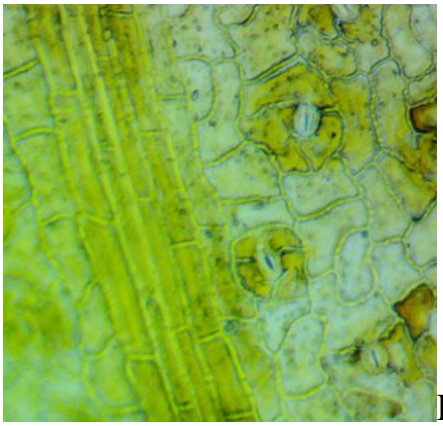
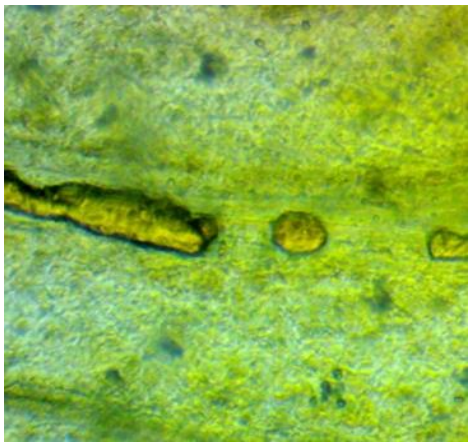

Б

Рисунок 5.1.2 -Эпидермис нижней стороны листа *B. multinerve*:
А-эпидермис с устьицами (х200), Б – прямостенный эпидермис над жилкой (х200).

Над крупными жилками клетки эпидермиса прямоугольной формы, вытянутые вдоль длинной оси листа (рис. 5.1.2 Б).

Жилки листа сопровождаются млечниками с маслянистым содержимым желтоватого или коричневого цвета (рис. 5.1.3).



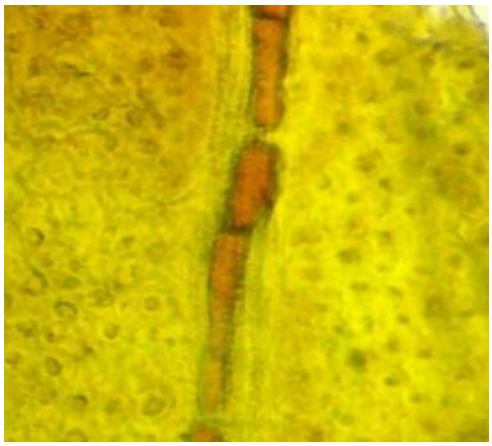


Рисунок 5.1.3 - Млечники листа *B. multinerve* (х200).

*Лист прикорневой.* Клетки эпидермиса прикорневых листьев слабо извилистостенные, часто с четковидными утолщениями, устьица анизоцитного типа, погруженные. Жилки сопровождаются млечниками (рис. 5.1.4 А, Б).

А

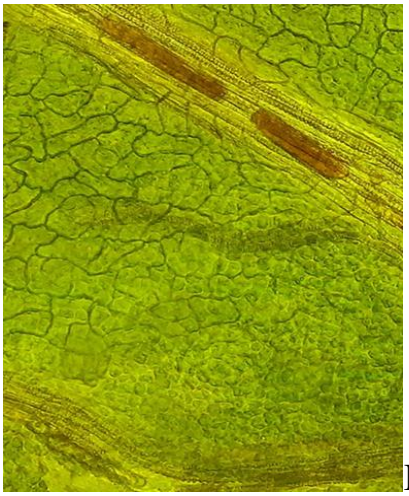
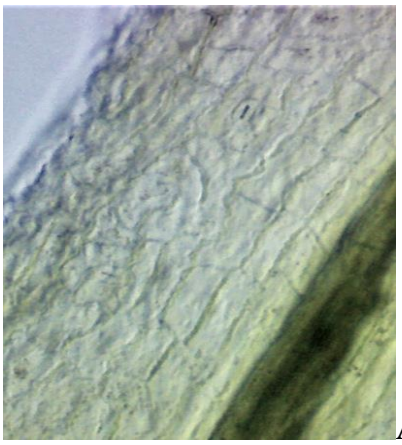
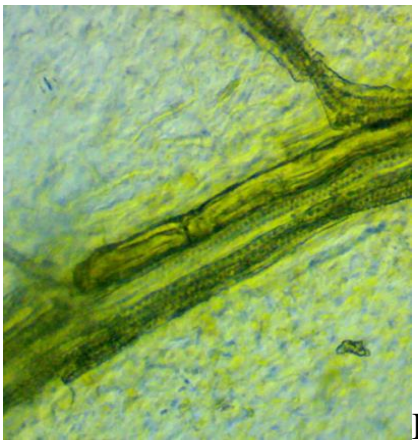

Б

Рисунок 5.1.4 – Прикорневые листья *B. multinerve*: А - эпидермис верхней стороны листа с устьицами (х200), Б- млечники (х150).

*Листочки обвертки соцветия.* Клетки эпидермиса обвертки со слабо-извилистыми стенками, устьица немногочисленные анизоцитного типа, над жилками клетки эпидермиса прямостенные, вытянутые, местами с четковидными утолщениями (рис. 5.1.5 А).


А


Б

В

Рисунок 5.1.5 – Листочек обвертки соцветия *B. multinerve*: А – эпидермис с устьицами (х200), Б – жилка с млечником (х200), В - жилка с сегментами млечника с бесцветным содержимым (х200).

По жилкам располагаются млечники с содержимым (рис. 4.1.5 Б). В начале жилок по периферии обвертки видны с бесцветным содержимым отдельные сегменты млечников (рис. 5.1.5 В).

*Цветок.* У лепестка цветка клетки эпидермиса слабоизвилистые, по краям с сосочковидными выростами (рис. 5.1.6 А).

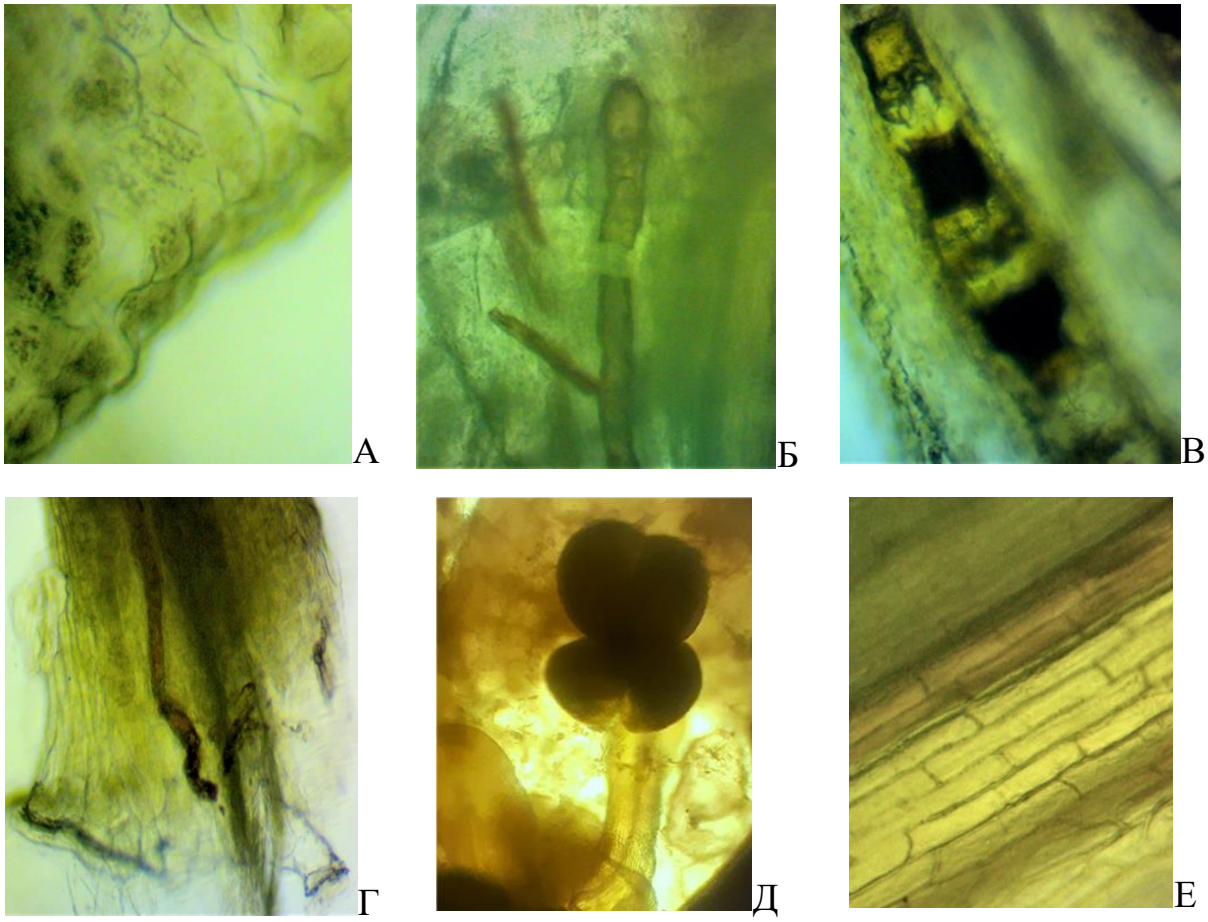



Рисунок 5.1.6 – Цветок *B. multinerve*: А - сосочковидный эпидермис лепестка (х180), Б - млечники у основания лепестка (х200), В – фрагмент чашелистика с млечником (х180), Г - основание тычинки с млечником по жилке (х180), Д – пыльник (х120), Е - эпидермис тычиночной нити (х250).

У основания лепестка жилки сопровождаются млечниками (рис. 5.1.6 Б). Чашелистики пронизаны широкими членистыми млечниками, содержимое которых окрашено в коричневый и желтый цвета (рис. 5.1.6 В). Пыльники у *B. multinerve* четырех гнездные, тычиночные нити пронизаны млечниками (рис. 5.1.6 Г, Д). Клетки эпидермиса тычиночной нити прямостенные, стенки с четковидными утолщениями (рис. 5.1.6 Е).

*Стебель.* Форма поперечного среза округлая с небольшой ребристостью. Сверху стебель покрыт эпидермисом. На поперечном срезе

видно подковообразное утолщение эпидермальных стенок. По ребрышкам кутикула над клетками эпидермиса утолщенная (рис. 5.1.7 А).

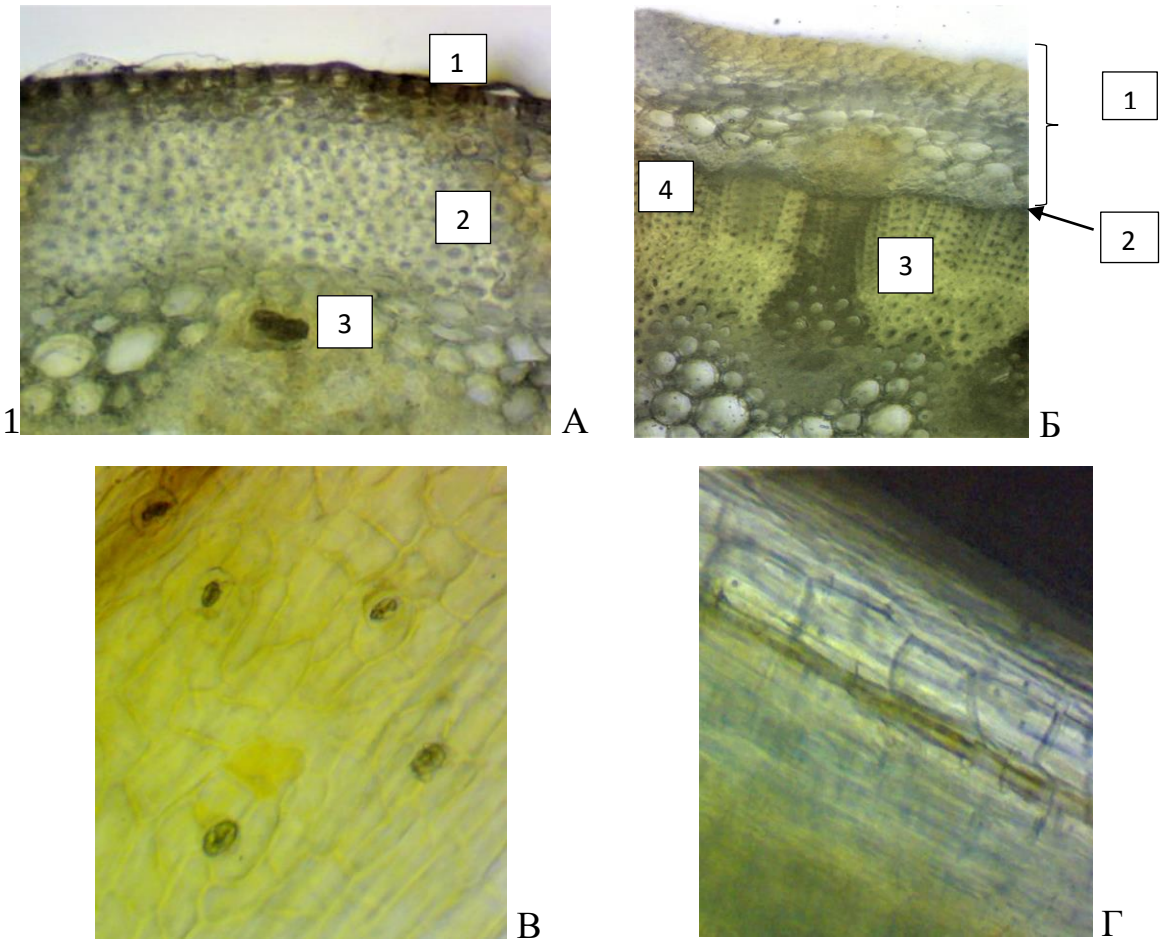



Рисунок 5.1.7 – Микроскопия стебля *B. multinerve:* А - кора стебля (х150) 1-пробка, 2-уголковая колленхима, 3 – млечник; Б - поперечный срез стебля (х100) 1- кора, 2-камбий, 3- проводящий пучок, 4- склеренхима; В – эпидермис стебля (х200); Г – млечник в продольном срезе (х150).

Клетки эпидермиса стебля слабоизвилистые с устьицами анизоцитного типа (рис. 5.1.7 В). Клетки коры крупные, пронизаны млечниками, в ребрах стебля многорядный слой уголковой колленхимы (рис. 5.1.7 А (2); 5.1.7 Г). Проводящие пучки располагаются в виде кольца, пучки имеют обкладку в виде склеренхимы, состоящей из толстостенных клеток механической ткани (рис. 5.1.7 Б). В центре стебля располагаются крупные клетки паренхимы.

*Корневище.* На поперечном срезе корневища видно, что оно покрыто многорядной пробкой коричневого цвета, под пробкой имеется 2-3 слоя клеток уголковой колленхимы.

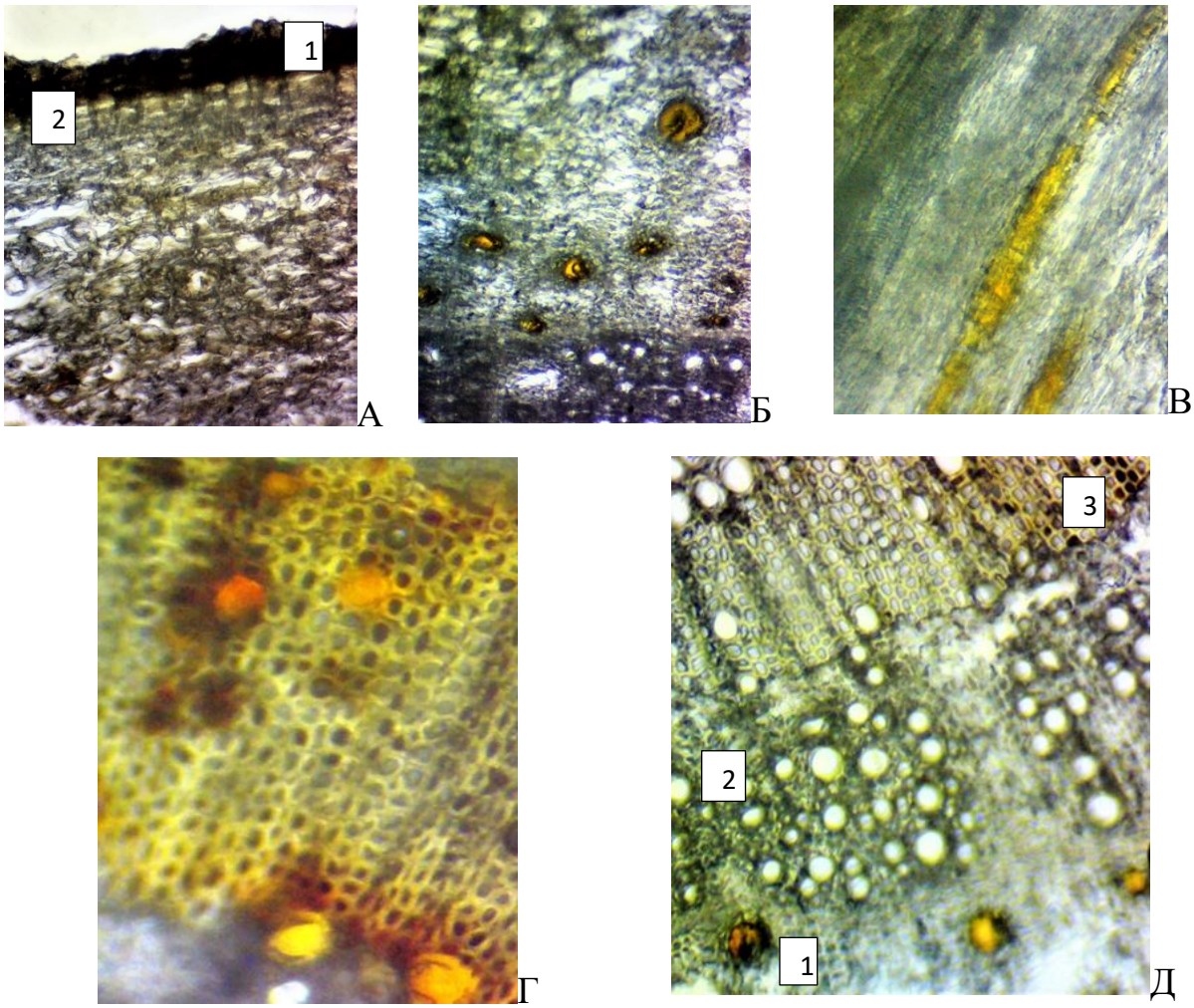



Рисунок 5.1.8 – Микроскопия корневища *B. multinerve:* А – фрагмент коры корневища 1- пробка, 2- клетки колленхимы (х150); Б- млечники в коре корневища (х200); В – млечники корневища в продольном срезе (х200); Г – млечники в древесине корневища (х200); Д – поперечный срез корневища 1- млечники, 2- сосуды, 3- механические волокна (х200).

Кора узкая, состоит из крупных клеток паренхимы, млечники широкие, расположены хаотично. Линия камбия четкая, сердцевинные лучи 5-6 рядные. Древесина состоит из крупных сосудов, трахеид и либриформа. Хорошо сформированы годичные кольца. В отдельные годы в древесине формируются млечники.

### Микроскопия порошка *Bupleuri multinervis herba*

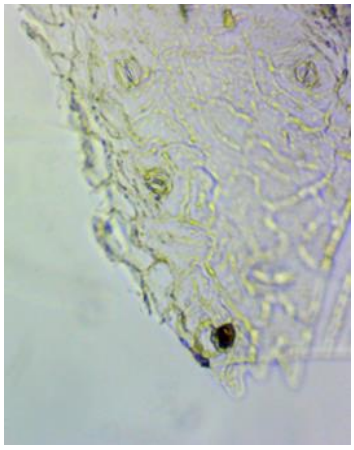
Проведен микроскопический анализ порошка травы *B. multinerve* с размером частиц сырья 2 мм.

Установлено, что диагностически значимыми признаками могут быть фрагменты листьев стеблевых и прикорневых, фрагменты листочков обвертки, элементы цветка и стебля.

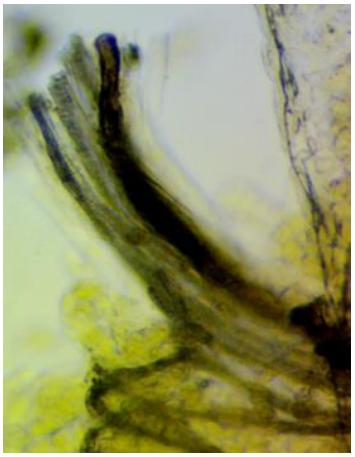
Фрагменты листьев, покрытые эпидермисом с извилистыми стенками (часто с четковидным утолщением стенок) и погруженными устьицами анизоцитного типа (устьица окружены тремя клетками, одна их которых меньше по размеру). На фрагментах края листа видны гребенчатые утолщения кутикулы. Фрагменты листовых пластинок пронизаны млечными трубками (рис. 5.1.9 А, Б, В).

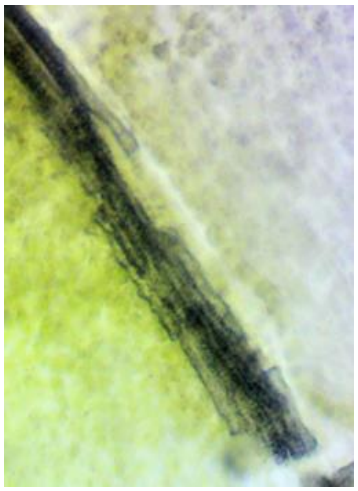
Фрагменты листочков обвертки пронизаны млечниками с бесцветным или коричневым маслянистым содержимым (рис. 5.1.9. Г, Д).

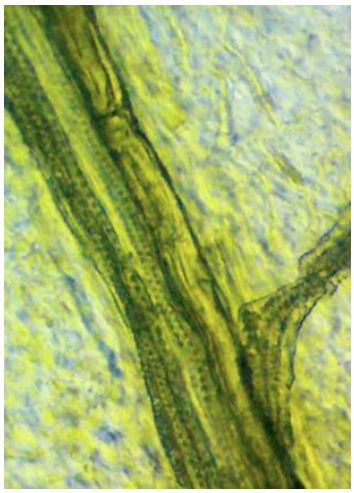
В препарате порошка часто встречаются фрагменты стебля с ярко выраженными членистыми млечниками Е) и элементы цветка, пронизанные млечниками с коричневым содержимым (рис. 5.1.9. Е, Ж).

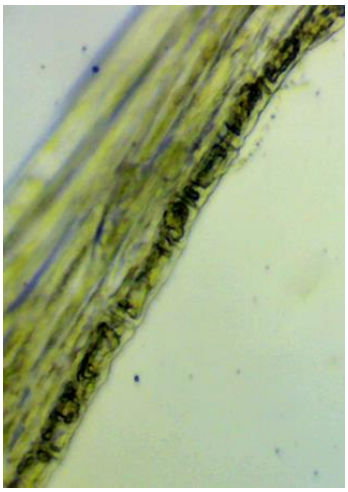

А

Б


В


Г


Д


Е

Ж

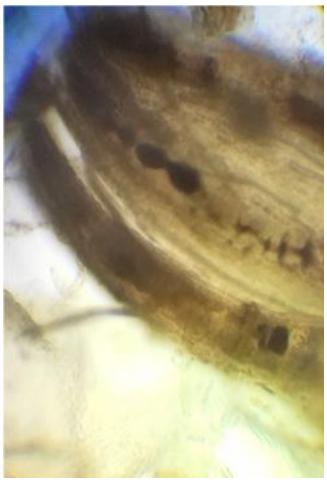

З

Рисунок 5.1.9 – Микроскопия порошка *B. multinerve:* А –эпидермис с устьицами листа (х200); Б - фрагмент края листа (х250); В – жилка листа с млечником (х200); Г (х200), Д (х250) – обвертка (жилки с млечниками); Е – млечник стебля (х220); Ж, З – фрагменты цветка, пронизанные млечниками (х150).

## 5.2. Исследование флавоноидов и фенокарбоновых кислот сырья *Bupleuri multinervis herba*

При исследовании методом УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС в надземных органах *B. multinerve* определено содержание 15 веществ, относящихся к фенольным соединениям. Идентификация соединений проводилась по временам удерживания, данным УФ-спектров, масс-спектров, полученных в режиме отрицательной ионизации.

По результатам ВЭЖХ-ДМД при сканировании в режиме 326 нм идентифицированы соединения 5-*O*-ферулоилхинная кислота (**4**), кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин) (**6**), кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин) (**7**), изорамнетин-3-*O*-рутинозид (нарциссин) (**9**) [112] (рис. 5.2.1, табл.5.2.1).

Метод ВЭЖХ-МС дает более полную информацию о составе метаболома надземных органов *B. multinerve.* В режиме полного ионного тока (TIC) идентифицированы соединения **4**, **6**, **9**, кверцетин (**14**), изорамнетин (**15**), в режиме основного пика (BPC) дополнительно идентифицировано соединение кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин) (**7**) (рис. 5.2.2 А, Б, табл. 5.2.1).

В режиме выделенных ионов (SIM) удалось идентифицировать, кроме ранее установленных, еще 7 соединений: 5-*O*-кофеилхинная кислота (**1**), 3-*O*-

кофеилхинная кислота (**2**), 5-*O*-*n*-кумароилхинная кислота (**3**), 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (**10**), изорамнетин-3-*O*-глюкозид (**11)**, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (**12**), кемпферол-3-*O*-глюкозид (астрагалин), кверцетин-3-*O*-глюкуронид (**13**) (рис. 5.2.2 В).

Выделенные хроматограммы для отдельных ионов (SIM) из хроматограммы спиртового извлечения надземных органов *B. multinerve*, приведенной на рисунке 2 В, масс-спектры соединений в режиме отрицательной ионизации, электронные спектры поглощения веществ приведены в приложении 4.

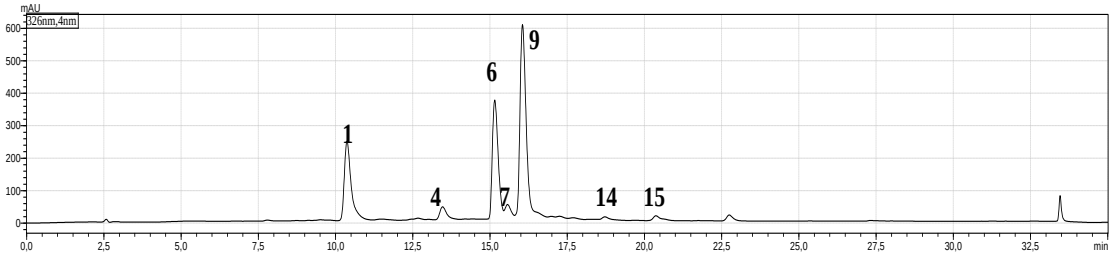



Рисунок 5.2.1 - Хроматограмма спиртового извлечения из надземных органов *B. multinerve* при λ 326 нм. (Метод ВЭЖХ-ДМД).

Из фенолкарбоновых кислот, производных хинной кислоты, в надземных органах *B. multinerve* идентифицировано 7 соединений. Эфиры хинной кислоты образованы с кофейной кислотой у соединений **1**, **2**, **10**, **12**, с феруловой кислотой у соединений **4**, **5** и кумаровой кислотой у соединения **3** [112].

Флавоноиды *B. multinerve* являются производными кверцетина, кемпферола и изорамнетина. В свободном состоянии, в виде агликонов, присутствуют кверцетин и изорамнетин.

Гликозидирование у флавоноидов происходит по 3 положению моносахаридами, глюкозой, глюкуроновой кислотой и дисахаридом рутинозой (состоящей из двух моносахаридов – глюкозы и рамнозы).

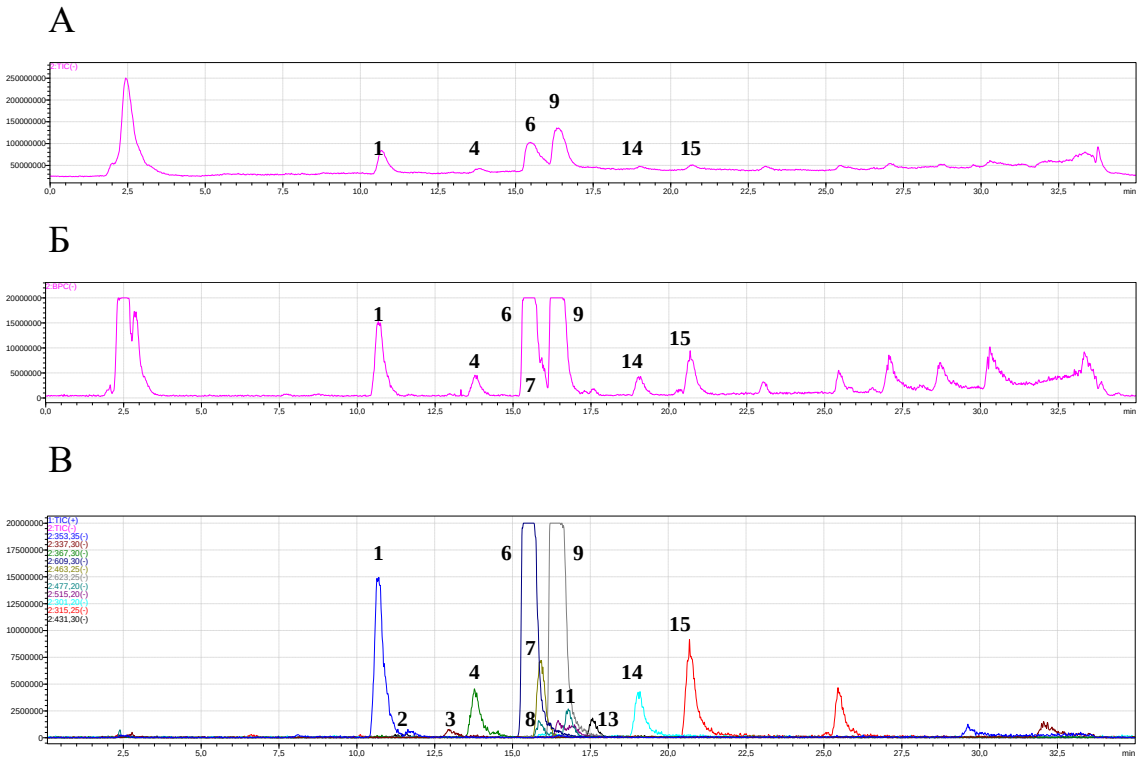



Рисунок 5.2.2 - Хроматограмма спиртового извлечения из *B. multinerve*: А – режим полного ионного тока (TIC), Б – режим основного пика (BPC), В – режим выделенных ионов (SIM), общий вид из одиннадцати хроматограмм. (Метод ВЭЖХ-МС).

Таблица 5.2.1 - Хроматографические и спектральные свойства соединений, содержащихся в надземных органах *B. multinerve*

| № соединения | t, мин | $[M–H]^-$ | $\lambda_{max}$, нм | Соединение |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **1** | 10,70 | 353 | 326 | 5-*O*-Кофеилхинная кислота |
| **2** | 11,69 | 353 | 326 | 3-*O*-Кофеилхинная кислота |
| **3** | 12,97 | 337 | 310 | 5-*O*-*n*-Кумароилхинная кислота |
| **4** | 13,80 | 367 | 327 | 5-*O*-Ферулоилхинная кислота |
| **5** | 14,42 | 367 | 327 | 3-*O*-Ферулоилхинная кислота |
| **6** | 15,51 | 609 | 255, 265, 354 | Кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин) |
| **7** | 15,91 | 463 | 254, 266, 353 | Кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин) |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| **8** | 15,98 | 477 | 254, 266, 352 | Кверцетин-3-*O*-глюкуронид |
| **9** | 16,42 | 623 | 254, 268, 353 | Изорамнетин-3-*O*-рутинозид (нарциссин) |
| **10** | 16,46 | 515 | 326 | 3,5-Ди-*O*-кофеилхинная кислота |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|
| **11** | 16,81 | 477 | 253, 267, 353 | Изорамнетин-3-*O*-глюкозид |
| **12** | 16,93 | 515 | 326 | 4,5-Ди-*O*-кофеилхинная кислота |
| **13** | 17,55 | 431 | 253, 350 | Кемпферол-3-*O*-глюкозид (астрагалин) |
| **14** | 19,06 | 301 | 255, 268, 355 | Кверцетин |
| **15** | 20,70 | 315 | 254, 267, 352 | Изорамнетин |

В сумму флавоноидов *B. multinerve* входят гликозиды кверцетина – кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин), кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин), кверцетин-3-*O*-глюкуронид, гликозиды изорамнетина – изорамнетин-3-*O*-рутинозид (нарциссин), изорамнетин-3-*O*-глюкозид, гликозид кемпферола – астрагалин.

Впервые установлено содержание в надземных органах *B. multinerve* флавоноидов **8**, **13**, фенолкарбоновых кислот **3**, **4**, **5**, **10**, **12** (табл. 5.2.1).

Методом МК-ВЭЖХ-УФ определили количественное содержание преобладающих флавоноидов и фенолкарбоновых кислот.

Суммарное содержание фенолкарбоновых кислот составляет 8,18 мг/г, в сумме преобладает 5-*O*-кофеилхинная кислота, на неё приходится 6,60±0,12 мг/г (табл. 5.2.2).

Суммарное содержание преобладающих флавоноидов составляет 44,33 мг/г. В сумме флавоноидов преобладают рутин (19,53±0,39 мг/г) и нарциссин (20,74±0,41 мг/г) (табл. 5.2.2).

Таким образом, в траве *B. multinerve* идентифицировано 8 флавоноидов и 5 фенолкарбоновых кислот. Из них внервые установлено содержание кверцетин-3-*O*-глюкуронида и астрагалина и 5 фенолкарбоновых кислот.

Таблица 5.2.2 - Количественное содержание фенолкарбоновых кислот и флавоноидов в надземных органах *B. multinerve*, мг/ г*± SD

| Соединение | t, мин | Содержание в мг/г |
|---|---|---|
| Фенолкарбоновые кислоты | | |
| 5-*O*-Кофеилхинная кислота | 6,08 | 6,60±0,12 |
| 3,5-Ди-*O*-кофеилхинная кислота | 7,43 | 1,58±0,03 |
| Суммарное содержание фенолкарбоновых кислот | | 8,18 |
| Флавоноиды | | |
| Кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин) | 7,87 | 19,53±0,39 |
| Кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин) | 8,28 | 2,24±0,04 |
| Изорамнетин-3-*O*-рутинозид (нарциссин) | 8,77 | 20,74±0,41 |
| Изорамнетин-3-*O*-глюкозид | 9,15 | 0,86±0,02 |
| Кверцетин | 11,46 | 0,43±0,01 |
| Изорамнетин | 13,31 | 0,53±0,01 |
| Суммарное содержание флавоноидов | | 44,33 |

* от массы воздушно-сухого сырья

## 5.3. Материалы по разработке нормативной документации на сырье *Bupleuri multinervis herba*

### 5.3.1. Разработка методики ТСХ-анализа для определения подлинности сырья

Для определения подлинности сырья предложена качественная реакция проба Синода (приложение 2).

Экспериментально подобраны условия определения подлинности сырья *B. multinerve* методом ТСХ (рис. 5.3.1).

*Получение извлечения*. К 1,0 г сырья, измельченного до частиц размером 1мм, добавляют 10 мл 50% спирта этилового, экстракцию проводят

на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют.

| **Верх ТСХ-хроматограммы** | |
|---|---|
| Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета | Зона желтого цвета<br>Зона желтого цвета<br>Зона желтого цвета<br>Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета<br>Зона желтого цвета |
| **Раствор СО рутина** | **Испытуемое извлечение** |

Рисунок 5.3.1 – Схема ТСХ хроматограммы извлечения из сырья *Bupleuri multinervis herba* после обработки 1% раствором $AlCl_3$.

*Раствор сравнения СО рутина 0,004%.* Навеску 0,04 г СО рутина растворяют в 10 мл 50% спирта этилового при нагревании. Полученный раствор охлаждают, срок годности 3 месяца.

*Методика ТСХ-анализа.* На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого извлечения в виде полосы 1 см и 5 мкл стандартного образца раствора рутина. Пластинку сушат на воздухе и помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей н-бутанол-уксусная кислота лед.-вода (4:1:2) (предварительное насыщение камеры 60 мин) (рис. 5.3.1). Хроматографируют восходящим способом, когда растворитель пройдет 80% длины пластинки ее вынимают и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Хроматографическую пластинку обрабатывают 1% спиртовым раствором $AlCl_3$, высушивают и нагревают 5 минут в сушильном шкафу при 100-105$^0$С. Пластинку рассматривают в УФ свете (360 нм). В зоне рутина отмечается пятно с желто-зеленой флюоресценцией, в зоне извлечения основное пятно на уровне зоны рутина и выше 2-3 пятна желтого цвета и одно пятно ниже зоны рутина (рис. 5.3.1).

### 5.3.2. Разработка и валидация методики количественного анализа флавоноидов в сырье *Bupleuri multinervis herba*

Для количественного определения суммы флавоноидов в сырье *B. multinerve* для включения в новый нормативный документ предлагается метод дифференциальной спектрофотометрии.

Для этого проведено изучение электронного спектра спиртового извлечения из сырья *B. multinerve,* а также установлены оптимальные условия экстракции флавоноидов.

Спиртовое извлечение *B. multinerve* имеет в электронном спектре основные максимумы поглощения при 350 нм и 264 нм. При добавлении алюминия хлорида происходит смещение максимума поглощения длинноволновой части спектра до 408 нм (рис. 5.3.2 А).

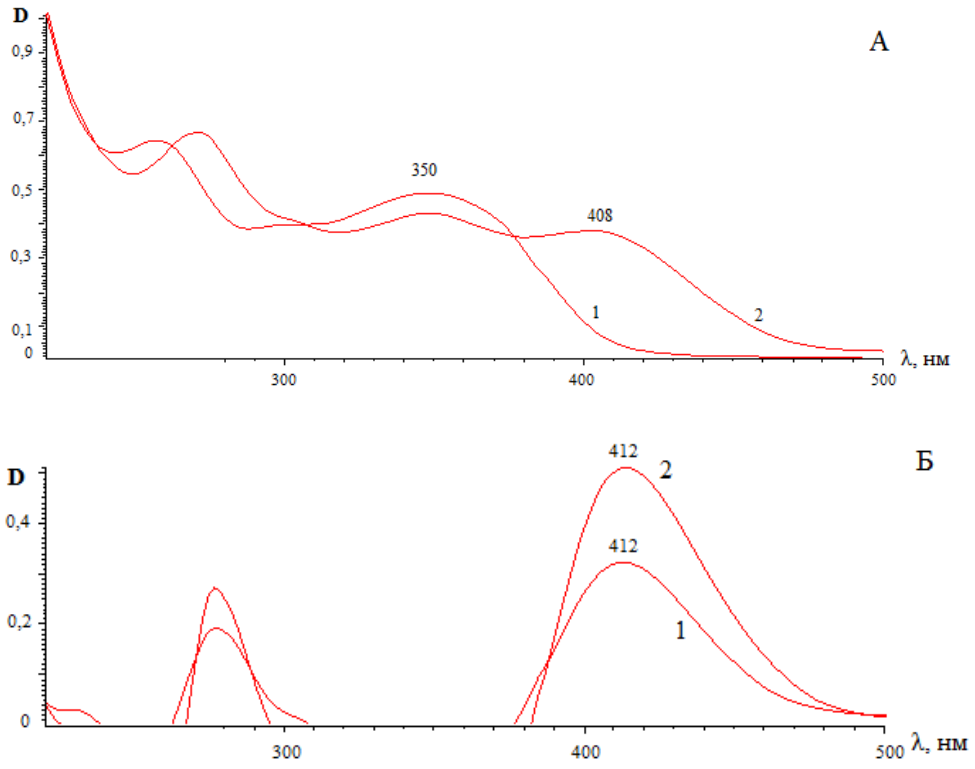



Рисунок 5.3.2 – А – электронные спектры спиртового извлечения *B. multinerve* (1) и + $AlCl_3$ (2); Б - дифференциальные спектры с $AlCl_3$ спиртового извлечения *B. multinerve* (1) и рутина (2).

В дифференциальном спектре спиртового извлечения в присутствии алюминия хлорида максимум поглощения длинноволновой части смещается до 412 нм. Дифференциальный спектр извлечения *B. multinerve* совпадает с

дифференциальным спектром стандартного образца рутина, который выбран нами в качестве стандартного образца (рис. 5.3.2 Б).

Экспериментальные данные показали, что оптимальным экстрагентом является 40%  60% спирт этиловый. Для полноты экстракции достаточно использование 40% спирта этилового (табл. 5.3.1).

Таблица 5.3.1 – Содержание суммы флавоноидов в зависимости от условий экстракции сырья *B. multinerve*

| Условия эксперимента | Содержание флавоноидов, % |
|---|---|
| 1 | 2 |
| Экстрагент | |
| Спирт этиловый 20% | 2,25±0,05 |
| -«- 30% | 3,23±0,08 |
| -«- 40% | **3,37±0,09** |
| -«- 50% | **3,36±0,05** |
| -«- 60% | **3,37±0,03** |
| -«- 70% | 3,10±0,05 |
| -«- 80% | 2,84±0,03 |
| -«- 90% | 1,53±0,01 |
| -«- 96% | 1,24±0,01 |
| Размер частиц сырья, мм | |
| 5 | 1,34±0,03 |
| 3 | 2,88±0,04 |
| 2 | **3,37±0,05** |
| 1 | **3,38±0,08** |
| 0,5 | 3,25±0,05 |
| Соотношение сырье:экстрагент | |
| 1:25 | 1,77±0,02 |
| 1:30 | 1,92±0,02 |
| 1:50 | 2,74±0,06 |
| 1:100 | **3,38±0,05** |
| 1:150 | **3,36±0,09** |
| 1 | 2 |
| Время экстракции в минутах (однократная экстракция) | |
| 45 | 2,64±0,03 |
| 60 | **3,35±0,06** |
| 90 | **3,36±0,05** |
| Кратность экстракции | |
| 2 раза 1:50 | 3,25±0,08 |
| 3 раза 1:50 | **3,35±0,06** |

Степень измельченности сырья влияет на процесс экстракции БАВ, максимальное количество флавоноидов извлекается при размере частиц 1-2

мм. При размере частиц сырья 0,5 мм нарушается целостность большинства клеток растения, при этом увеличивается выход сопутствующих веществ, что влияет на результаты анализа.

Показано, что применение однократной экстракции в течение 60 минут на кипящей водяной бане соответствует исчерпывающей экстракции (табл. 5.3.1). Оптимальное количество 2% алюминия хлорида, необходимое для образования комплекса 1 мл (рис. 5.3.3).

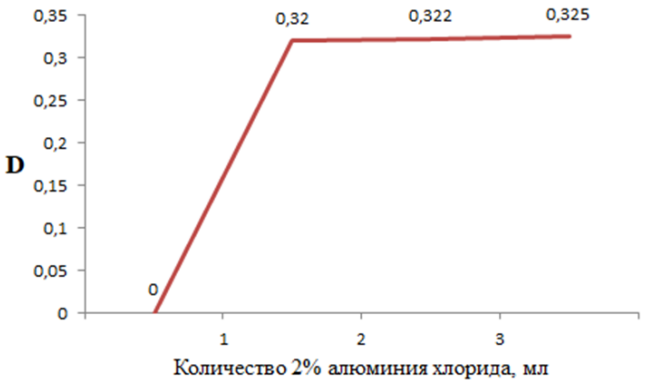



Рисунок 5.3.3 – Зависимость оптической плотности комплекса флавоноидов *B. multinerve* с $AlCl_3$ от его количества.

Стабилизация комплекса наблюдается через 45 минут, которая сохраняется до 60 минут (рис. 5.3.4).

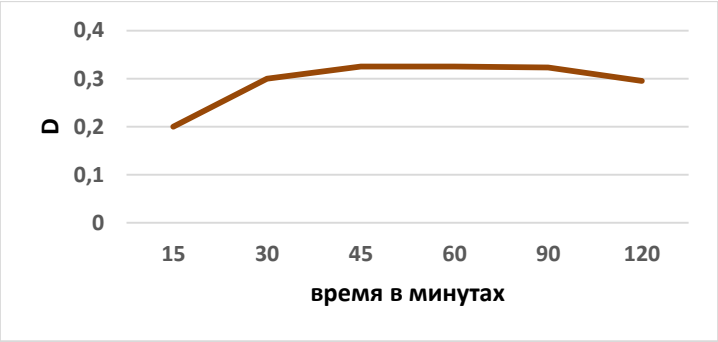



Рисунок 5.3.4 – Зависимость оптической плотности комплекса флавоноидов *B. multinerve* с $AlCl_3$ от времени.

Полученные результаты использованы для разработки методики количественного определения флавоноидов в сырье *B. multinerve*.

*Методика количественного определения суммы флавоноидов.* Навеску сырья около 1,0000 г, измельченного до частиц размером 1-2 мм, помещают в колбу объемом 250 мл и прибавляют 100 мл 40% спирта этилового и колбу присоединяют к обратному холодильнику. Экстракцию проводят на кипящей водяной бане в течение 1 часа, извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, при этом отбрасывают первые 10 мл фильтрата.

В 2 мерные колбы объемом 25 мл помещают по 2 мл фильтрата. В первую колбу добавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Во вторую колбу (раствор сравнения) к 2 мл фильтрата добавляют 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Измерение оптической плотности проводят через 45 минут на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кюветах с толщиной слоя 10мм.

Приготовление раствора СО рутина. Испытуемый раствор: 1мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят колбу до метки 96% спиртом этиловым. Раствор сравнения: 1 мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Оптическую плотность измеряют через 45 минут при длине волны 412 нм.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по формуле:

$$X=\frac{D\cdot m_0\cdot V_1\cdot V_2\cdot V_3\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot V_4\cdot V_5\cdot V_6\cdot(100-W)}=\frac{D\cdot m_0\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot(100-W)},$$

где $V_1$- объем извлечения, 100 мл; $V_2$- объем разведения извлечения, 25 мл; $V_3$ – аликвота раствора СО рутина, 1мл; $V_4$ – аликвота извлечения, 2 мл; $V_5$ – объем разведения СО рутина, 25 мл; $V_6$ – объем СО рутина, 50 мл; m – масса сырья в г; $m_0$ – масса рутина в г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

*Примечание.* Приготовление СО рутина. Около 0,0500 г рутина помещают в мерную колбу объемом 100 мл и добавляют 80 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до растворения и охлаждают. Далее раствор доводят до метки 96% спиртом этиловым.

Допускается в расчетах использование удельного показателя поглощения рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X=\frac{D\cdot 100\cdot 25\cdot 100}{E_{1см}^{1\%}\cdot m\cdot 2\cdot (100-W)},$$

где D - оптическая плотность извлечения; $E_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина с $AlCl_3$ при λ=412 нм в 96% спирте этиловом, равный 257,7 [78]; *m* – навеска сырья, г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

Статистический анализ результатов количественного определения суммы флавоноидов 9 опытов при достоверной вероятности 95 показал, что ошибка среднего результата составляет 3,20% (табл. 5.3.2).

Таблица 5.3.2 – Метрологические характеристики метода анализа флавоноидов в сырье *Bupleuri multinervis herba*

| f | $\bar{x}$ | S | S $\bar{x}$ | P,% | t(P,f) | Δ $\bar{x}$ | $\bar{E}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 3,39 | 0,14111 | 0,04704 | 95 | 2,31 | 0,11 | ±3,20 |

Опыты с добавками СО рутина в 3-х концентрациях показали, что относительная ошибка опытов находится в пределах относительной ошибки методики, что указывает на отсутствие систематической ошибки предлагаемой методики (табл. 5.3.3).

Таблица 5.3.3 – Результаты опыта с добавками к аликвоте извлечения из *Bupleuri multinervis herba* СО рутина

| Содержание СФВМ в аликвоте, мкг | Количество СОР, добавлено к аликвоте, мкг | Рассчитанное количество СФВМ+СОР, мкг | Найдено СФВМ+СОР, мкг | Ошибка | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | абс. в мкг | отн. в % |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 339,11 | 20 | 359,11 | 362,70 | +3,59 | 1,00 |
| 339,11 | 20 | 359,11 | 348,12 | -10,99 | 3,06 |
| 339,11 | 20 | 359,11 | 364,85 | +5,74 | 1,60 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 339,11 | 40 | 379,11 | 384,10 | +4,99 | 1,32 |
| 339,11 | 40 | 379,11 | 386,15 | +7,04 | 1,86 |
| 339,11 | 40 | 379,11 | 375,28 | -3,83 | 1,01 |
| 339,11 | 80 | 419,11 | 425,80 | +6,69 | 1,60 |
| 339,11 | 80 | 419,11 | 402,44 | -12,67 | 3,02 |
| 339,11 | 80 | 419,11 | 402,15 | +6,96 | 1,66 |

Примечание: СФВМ- сумма флавоноидов володушки многожилковой, СОР – стандартный образец рутина

Валидация методики количественного определения флавоноидов проведена по показателям - линейность, правильность, прецизионность, специфичность [22, 37].

Исследование линейности методики проводили с использованием СО рутина в концентрациях в измеряемом растворе от нормируемого значения (не менее 2%) в количестве 100%, а также 50, 75% и 125, 150, 175% (табл. 5.3.4).

Аналитическая область методики находится в переделах концентрации рутина (в измеряемом объеме) 8,67 мкг/мл – 26,08 мкг/мл.

Линейность методики подтверждается графиком зависимости оптической плотности от концентрации рутина (рис. 5.3.5). Коэффициент корреляции составляет 0,999883 (допускается $|r| \geq 0,98$) [23], график описывается уравнением $y=0,0230 \cdot x+0,0002$.

Таблица 5.3.4 – Значение оптической плотности разных концентраций стандартного образца рутина

| Содержание СОР от нормируемого, в % | Концентрация СОР (в измеряемом растворе), мкг/мл | Значение оптической плотности, D | Коэффициент корреляции | y=b•x+a | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | b | a |
| 50 | 8,0 | 0,180 | 0,999883 | 0,0230 | +0,0002 |
| 75 | 12,0 | 0,278 | | | |
| 100 | 16,0 | 0,372 | | | |
| 125 | 20,0 | 0,462 | | | |
| 150 | 24,0 | 0,556 | | | |
| 175 | 28,0 | 0,640 | | | |

Примечание: СОР – стандартный образец рутина

Для проверки правильности предлагаемой методики готовили модельные смеси с СО рутина, которые содержали 100% рутина к нормируемому количеству суммы флавоноидов в сырье *Bupleuri multinervis herba* (2%), а также с содержанием 75, 125 и 150% (табл. 5.3.5).

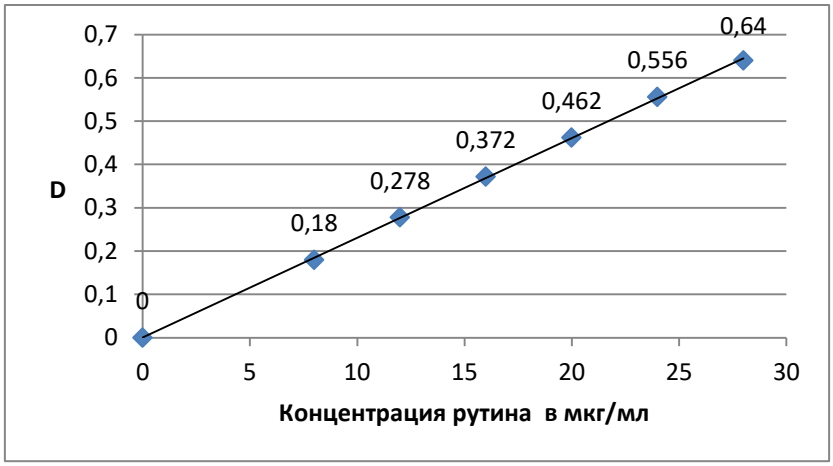



Рисунок 5.3.5 – График линейной зависимости оптической плотности рутина от его концентрации в измеряемом растворе.

Таблица 5.3.5 – Результаты проверки правильности методики количественного определения СФВМ

| № | Количество СО Р в модельной смеси, мг | Экспериментальные данные | |
|---|---|---|---|
| | | Найденное значение СОР, мг | Процент восстановления, % |
| 1 | 15,0 | 15,35 | 102,3 |
| 2 | 15,0 | 14,86 | 99,07 |
| 3 | 15,0 | 14,84 | 98,93 |
| Среднее | | | 100,10 |
| 1 | 20,00 | 20,78 | 103,90 |
| 2 | 20,00 | 19,65 | 98,25 |
| 3 | 20,00 | 20,54 | 102,7 |
| Среднее | | | 101,60 |
| 1 | 25,00 | 25,96 | 103,90 |
| 2 | 25,00 | 24,81 | 99,24 |
| 3 | 25,00 | 24,65 | 98,60 |
| Среднее | | | 100,58 |
| 1 | 30,00 | 31,05 | 103,50 |
| 2 | 30,00 | 31,36 | 104,20 |
| 3 | 30,00 | 99,47 | 99,47 |
| Среднее | | | 103,50 |
| Средний процент восстановления для 4-х концентраций в трех повторностях | | | 102,39 |

Примечание: СФВМ - сумма флавоноидов володушки многожилковой, СОР – стандартный образец рутина

В эксперименте средний процент восстановления составил 102,39%, что находится в допустимых пределах [22]. При изучении критерия прецизионности методики определяли сходимость и воспроизводимость. Анализировалась величина RSD – относительное стандартное отклонение и

рассчитывался критерий Стьюдента, определяемый экспериментально. Значение RSD должно быть не более 15% [37].

В эксперименте RSD в первый день составляло 2,32%, во второй день 2,02%. Рассчитанный критерий Стьюдента был меньше табличного значения. Следовательно, методика удовлетворяет требованиям «сходимость». Результаты анализов, проведенных в 2-х лабораториях, показали соответствие методики по критерию «воспроизводимость» (табл. 5.3.6 и табл. 5.3.7). Изучение дифференциального электронного спектра спиртового извлечения *Bupleuri multinervis herba* в сравнении с СО рутина показало их идентичность, что указывает на специфичность предлагаемой методики количественного анализа суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом (рис. 5.3.6).

Таблица 5.3.6 – Результаты проверки прецизионности (сходимость) методики количественного анализа СФВМ

| Дата испытания | Истинное значение определяемой величины 3,39% | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Образец № | Результаты анализа | Стандартное отклонение S | RSD, % | Критерий Стьюдента | |
| | | | | | экс. | таб. |
| 1-ый день | 1 | 3,20 | 0,07849 | 2,32 | 1,87 | 2,57 |
| | 2 | 3,27 | | | | |
| | 3 | 3,38 | | | | |
| | 4 | 3,40 | | | | |
| | 5 | 3,35 | | | | |
| | 6 | 3,38 | | | | |
| Среднее | | 3,33 | | | | |
| 2-ой день | 1 | 3,32 | 0,06911 | 2,02 | 1,06 | 2,57 |
| | 2 | 3,41 | | | | |
| | 3 | 3,45 | | | | |
| | 4 | 3,37 | | | | |
| | 5 | 3,44 | | | | |
| | 6 | 3,52 | | | | |
| Среднее | | 3,42 | | | | |

Примечание: СФВМ – сумма флавоноидов володушки многожилковой

Таблица 5.3.7 – Результаты проверки прецизионности (воспроизводимость) методики количественного анализа суммы флавоноидов в *Bupleuri multinervis herba*

| Лаборатория | Истинное значение определяемой величины 3,39% | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Образец № | Результаты анализа | Стандартное отклонение S | RSD % | Критерий Стьюдента | |
| | | | | | экс. | таб. |
| 1 | 1 | 3,45 | 0,06693 | 1,99 | 0,73 | 2,57 |
| | 2 | 3,43 | | | | |
| | 3 | 3,28 | | | | |
| | 4 | 3,40 | | | | |
| | 5 | 3,32 | | | | |
| | 6 | 3,34 | | | | |
| Среднее | | 3,37 | | | | |
| 2 | 1 | 3,28 | 0,09432 | 2,76 | 0,78 | 2,57 |
| | 2 | 3,46 | | | | |
| | 3 | 3,56 | | | | |
| | 4 | 3,41 | | | | |
| | 5 | 3,36 | | | | |
| | 6 | 3,40 | | | | |
| Среднее | | 3,41 | | | | |

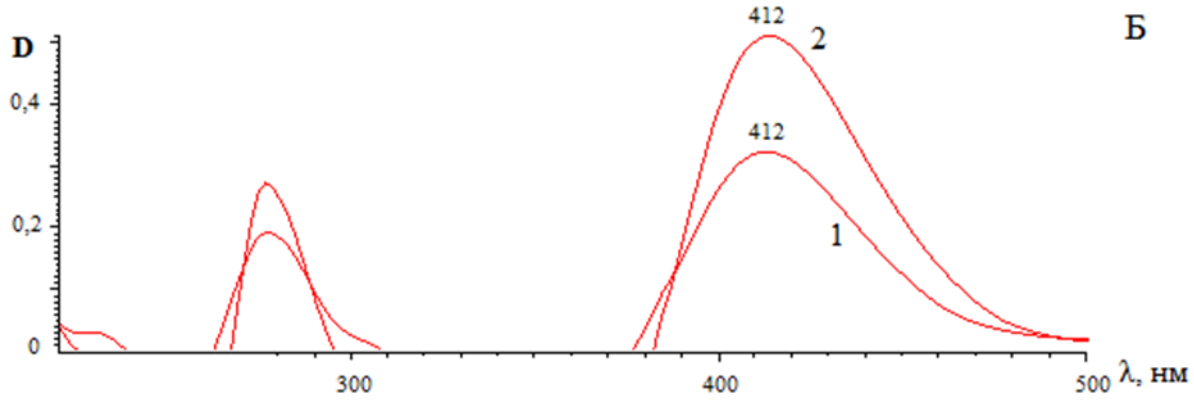



Рисунок 5.3.6 – Дифференциальные спектры при добавлении 2% раствора алюминия хлорида: 1 – спиртовое извлечение *Bupleuri multinervis herba* 2 – СО рутина.

Разработанной методикой проанализировано 5 партий сырья *B. multinerve,* содержание суммы флавоноидов составляло от 2,65±0,08% до 3,66±0,08% (табл. 5.3.8) [85]. Предложена норма содержания суммы флавоноидов «не менее 2%».

Таблица 5.3.8 – Результаты количественного определения суммы флавоноидов в сырье *Bupleuri multinervis herba*

| Номер партии сырья | Место сбора | Местообитание | Содержание СФВМ в % |
|---|---|---|---|
| 1 | Иркутская область, окр., Качугский р-он, с. Верхоленск | Разнотравный луг | 3,39±0,11 |
| 2 | Иркутская область, Усть-Ордынский Бурятский округ, окр. с. Баяндай | Остепненный луг | 2,65±0,09 |
| 3 | Иркутская область, Усольский р-он, окр. с. Мишелевка | Опушка леса | 3,45±0,09 |
| 4 | Республика Хакасия, окр. с. Чапаево | Разнотравно-осоковая степь | 3,55±0,10 |
| 5 | Иркутская область, окр. г. Свирска | Разнотравно-вострецовый луг | 3,66±0,08 |

Примечание: СФВМ- сумма флавоноидов володушки многожилковой

Методика количественного анализа суммы флавоноидов включена в новую редакцию ФС «Володушки многожилковой трава – *Bupleuri multinervis herba*» (приложение 2).

### 5.3.3. Исследование минерального состава сырья *Bupleuri multinervis herba*

В нормативном документе на сырье *B. multinerve* ВФС 42-580-76 нормируется содержание только золы общей не более 8,0%. Для видов сырья, применяемых в медицинской практике в качестве водных извлечений, рекомендуется определение показателя «золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте» [106].

Проведено исследование содержания золы общей и золы, не растворимой в хлористоводородной кислоте в образцах сырья из разных мест

сбора по методикам ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая»; ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» [23].

Содержание золы общей было в пределах 7,85-9,24%, золы, не растворимой в хлористоводородной кислоте 2,46-2,88% (табл. 5.3.9).

Таблица 5.3.9 – Содержание золы общей и золы, не растворимой в хлористоводородной кислоте и влаги в *Bupleuri multinervis herba*

| Номер партии сырья | Содержание, % | | |
|---|---|---|---|
| | Влажность | Зола общая | Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте |
| 1 | 6,54±0,50 | 8,22±0,52 | 2,54±0,20 |
| 2 | 5,88±0,44 | 9,04±0,50 | 2,88±0,15 |
| 3 | 7,48±0,48 | 8,15±0,45 | 2,36±0,20 |
| 4 | 6,55±0,51 | 9,24±0,55 | 2,75±0,25 |
| 5 | 5,79±0,38 | 7,85±0,50 | 2,46±0,12 |
| Среднее значение | 6,45 | 8,50 | 2,60 |
| Норма содержания | Не более 14% | Не более 10% | Не более 3% |

Проведенный анализ показал, что показатель «Зола общая» должен быть увеличен до «не более 10%». Рекомендуемый показатель «Золы, не растворимой в хлористоводородной кислоте» не «более 3%».

Далее было проведено изучение качественного состава минеральных веществ в траве *B. multinerve* методом хромато-масс-спектрометрии.

В составе сырья *B. multinerve* содержится 8 макроэлемнтов: K>Ca>Cl>P>S>Mg>Fe>Na.

Содержание кремния в сборе составляет 240 мг/кг (что соответствует 0,051% оксида кремния).

Микроэлементы:

элементы с содержанием от 10 до 100 мг/кг Mn>Ba>B>Al>Zn>Sr;

элементы с содержанием от 1 до 10 мг/кг Br>Cu>Ni>Mo;

элементы с содержанием от 0,1 до 0,5 мг/кг Ti>Cr>V>Co>Se.

Кроме того, в сырье *B. multinerve* содержатся 49 ультрамикроэлементов (табл. 5.3.10).

Таблица 5.3.10– Элементы сырья *Bupleuri multinervis herba*

| Элемент | Содержание, мг/кг | Погрешность измерения, % | Элемент | Содержание, мг/кг | Погрешность измерения, % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Макроэлементы | | | | | |
| Na (натрий) | 32 | 5 | K (калий) | 30000 | 20 |
| Mg (магний) | 3100 | 5 | Ca (кальций) | 15600 | 5 |
| P (фосфор) | 3400 | 5 | Cl (хлор) | 8000 | 5 |
| S (сера) | 3200 | 5 | Fe (железо) | 92 | 5 |
| Микро- и ультрамикроэлементы | | | | | |
| Li (литий) | 0,055 | 5,4 | Te (теллур) | 0,007 | >50 |
| Be (берилий) | 0,005 | 20 | I (иод) | <0.02 | nd |
| B (бор) | 37 | 5 | Cs (цезий) | 0,045 | 13 |
| Al (алюминий) | 30 | 5 | Ba (барий) | 38 | 5 |
| Si (кремний) | 240 | 5 | La (лантан) | 0,079 | 5 |
| Sc (скандий) | 0,52 | 5 | Ce (церий) | 0,065 | 5,3 |
| Ti (титан) | 0,98 | 5,9 | Pr (празеодим) | 0,009 | 9,4 |
| V (ванадий) | 0,147 | 5 | Nd (неодим) | 0,033 | 11 |
| Cr (хром) | 0,36 | 6,6 | Sm (самарий) | 0,007 | 19 |
| Mn (марганец) | 87 | 5 | Eu (самарий) | 0,0054 | 14 |
| Co (кобальт) | 0,121 | 5 | Gd (гадалиний) | 0,007 | 16 |
| Ni (никель) | 3 | 5 | Tb (тербий) | 0,0016 | 16 |
| Cu (медь) | 7 | 5 | Dy (диспрозий) | 0,006 | 16 |
| Zn (цинк) | 28 | 5 | Ho (гольмий) | 0,0018 | 16 |
| Ga (галлий) | 0,023 | 10 | Er (ербий) | 0,0036 | 18 |
| Ge (германий) | 0,0039 | 23 | Tm (тулий) | 0,0011 | 18 |
| As (мышьяк) | 0,049 | 13 | Yb (иттербий) | 0,0028 | 19 |
| Se (селен) | 0,11 | 21 | Lu (лютеций) | 0,0011 | 18 |
| Br (бром) | 9,9 | 5 | Hf (гафний) | 0,0019 | 21 |
| Rb (рубидий) | <0.0005 | 5 | Ta (тантал) | 0,0007 | 21 |
| Sr (стронций) | 18,2 | 5 | W (вольфрам) | 0,06 | 7,9 |
| Y (иттрий) | 0,035 | 6,3 | Re (рений) | 0,0009 | 24 |
| Zr (цирконий) | 0,054 | 7 | Os (осмий) | <0,004 | nd |
| Nb (ниобий) | 0,0032 | 15 | Ir (иридий) | <0,0002 | nd |
| Mo (молибден) | 1,82 | 5 | Pt (платина) | <0,007 | nd |
| Ru (рутений) | <0.0005 | nd | Au (золото) | 0,0053 | 17 |
| Rh (родий) | 0,0037 | 14 | Hg (ртуть) | 0,005 | 30 |
| Pd (палладий) | <0.001 | nd | Tl (таллий) | 0,0069 | 12 |
| Ag (серебро) | 0,0045 | 17 | Pb (свинец) | 0,158 | 4,9 |
| Cd (кадмий) | 0,038 | 14 | Bi (висмут) | 0,006 | 12 |
| Sn (олово) | 0,021 | 11 | Th (торий) | 0,0075 | 11 |
| Sb (сурьма) | 0,014 | 14 | U (уран) | 0,0063 | 11 |

По содержанию тяжелых металлов и мышьяка (ОФС.1.5.3.0009.15) трава *B. multinerve* соответствует требованиям (табл. 5.3.11) [23].

Таблица 5.3.11 – Содержание тяжелых металлов и мышьяка в сырье *Bupleuri multinervis herba*

| Элемент | Найдено, мг/кг | Предельно допустимое содержание, мг/кг |
|---|---|---|
| Ртуть | 0,005 | 0,1 |
| Свинец | 0,158 | 6,0 |
| Кадмий | 0,038 | 1,0 |
| Мышьяк | 0,049 | 0,5 |

### 5.3.4. Товароведческие показатели *Bupleuri multinervis herba*

На основании проведенных исследований дополнены и уточнены разделы фармакопейной статьи внешние признаки, микроскопия. В раздел «Определение основных групп БАВ» включена качественная реакция определения флавоноидов и метод ТСХ (табл. 5.3.12). Для количественного анализа предложен метод дифференциальной спектрофотометрии, который позволил сократить время определения содержания суммы флавоноидов. Изменена норма содержания золы общей (не более 10%).

Раздел испытания дополнен показателем содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой; золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте; показателями измельченности сырья; посторонних примесей (сырья, изменившее окраску - потемневшее, почерневшее). Включены испытания на тяжелые металлы и мышьяк, радионуклиды, остаточные количества пестицидов, микробиологическую чистоту.

Таблица 5.3.12 – Сравнительная характеристика показателей качества в нормативных документах ВФС 42-580-76 и проекте ФС на сырье *Bupleuri multinervis herba*

| Показатели | Требования ВФС 42-580-76 | Требования по проекту ФС |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Внешние признаки | Дается описание цельного сырья | **Раздел дополнен описанием измельченного и порошкованного сырья** |

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| Микроскопия | Описание цельного сырья только для листьев. | **Уточнены анатомо-диагностические признаки листа (наличие млечников вдоль жилок), добавлено описание микроскопии стебля, обвертки и цветка. Представлены микрофотографии.** |
| Качественные реакции | Метод БХ. *Первая система* лед.уксусная к-та-85% муравьиная к-та-вода (10:2:3). Разделения восходящим способом 24 часа.<br>*Втора система* лед. уксусная кислота- конц. HCl-вода (15:3:82).<br>*Проявитель* 10% $AlCl_3$, просматривают в УФ-свете. Идентификация по значению Rf, стандартные образцы свидетелей не применяются.<br>Время анализа до 48 часов. | **Реакция определения флавоноидов – проба Синода.**<br>**ТСХ.**<br>***Подвижная фаза*: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).**<br>***Проявление:* пластинку опрыскивают 1% $AlCl_3$ пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 360 нм. Применяется СО рутина.**<br>**Время анализа 60 минут.** |
| Количественное определение | Хроматоспектрофотометри-ческий. Время разделения суммы флавоноидов методом БХ в течение 24 ч.<br>Индивидуальные полосы флавоноидов обрабатывают спиртовым раствором алюминия хлорида и вырезают, далее объединяют и элюируют. Аналитическая длина волны 420 нм.<br>Общее время анализа более 48 часов.<br>Норма содержания суммы флавоноидов не менее 2%. | **Определяется содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом дифференциальной спектрофотометрией с применением алюминия хлорида. Аналитическая длина волны 412 нм.**<br>**Время анализа 2,5 ч.**<br>Норма содержания суммы флавоноидов не менее 2%. |
| Экстрактивных веществ, извлекаемых водой | Не определяется | **Не менее 20%** |
| Влажность | Не более 14 % | Не более 14% |
| Зола общая | Не более 8% | **Не более 10%** |
| Зола, нерастворимая в хлористоводород-ной кислоте | Не определяется | **Не более 3%** |
| Измельченность сырья. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. | Не определяется | **Не более 5%** |

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм; | Не определяется | **Не более 5%** |
| частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. | Не определяется | **Не более 5%** |
| *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм | Не определяется | **Не более 5%** |
| частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,18 мм | Не определяется | **Не более 5%** |
| Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное, измельченное сырье* | Не определяется | **Не более 7%** |
| Органическая примесь. *Цельное, измельченное* | Не более 1% | Не более 1% |
| Минеральная примесь. *Цельное, измельченное, порошок* | Не более 1% | Не более 1% |

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Анатомо-диагностическими признаками цельного и измельченного сырья *Bupleuri multinervis herba* являются: в поверхностных препаратах листьев клетки эпидермиса слабо извилистые с устьицами анизоцитного типа, жилки сопровождаются млечниками с желто-коричневым содержимым, части цветка – чашечка, основание венчика, тычиночные нити пронизаны млечниками; стебли в поперечном срезе округлые, проводящие пучки многочисленные коллатеральные расположены в виде кольца. В микроскопии порошка диагностическое значение имеют фрагменты эпидермиса с устьицами анизоцитного типа, фрагменты листа, стебля, цветка с млечниками.

2. В надземных органах *B. multinerve* идентифицировано 15 фенольных соединений, из них 8 флавоноидов и 7 фенолкарбоновых кислот. Впервые установлено содержание 2 флавоноидов (кверцетин-3-*O*-глюкуронид, астрагалин) и 5 фенолкарбоновых кислот (5-*O*-*n*-

кумароилхинная кислота, 5-*O*-ферулоилхинная кислота, 3-*O*-ферулоилхинная кислота, 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота).

3. Флавоноиды *B. multinerve* являются производными кверцетина, изорамнетина и кемпферола; фенолкарбоновые кислоты представлены эфирами хинной кислоты и производными коричных кислот (кофейной, феруловой, кумаровой).

4. Преобладающими фенольными соединениями в надземных органах *B. multinerve* являются флавоноиды рутин (19,73 мг/г) и нарциссин (20,74 мг/г), фенолкарбоновая кислота 5-*O*-кофеилхинная (6,60 мг/г).

5. Для определения подлинности сырья *Bupleuri multinervis herba* предложена методика ТСХ: система для разделения н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2), проявитель 1% спиртовой раствор алюминия хлорида, детекция в видимом и УФ сете (360 нм).

6. Для количественного анализа предложена методика спектрофотометрического анализа суммы флавоноидов: определены оптимальные условия экстракции сырья, реакции комплексообразования с алюминия хлоридом; обосновано использование в качестве стандартного образца рутина, аналитической длины волны 412 нм. Валидационные исследования предлагаемой методики количественного анализа показали ее соответствие по критериям правильность, линейность, прецизинность. По результатам анализа 5 партий сырья *Bupleuri multinervis herba* рекомендована норма содержания суммы флавоноидов в сырье «не менее 2%».

7. Минеральные вещества растения представлены 8 макро- и 64 микро- и ультрамикроэлементами. По содержанию мышьяка и тяжелых металлов образцы сырья соответствовали требованиям ГФ XIV издания.

8. Предложены показатели для включения в проект ФС на траву *B. multinerve*: золы общей «не более 10%», золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте «не более 3%», содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой «не менее 20%», а также показатели для измельченного сырья и порошка.

# ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ЭКСТРАКТА СУХОГО НА ОСНОВЕ СБОРА АНГИОПРОТЕКТОРНОГО

## 6.1. Разработка технологии получения экстракта сухого

Экстракты сухие - это сыпучие порошковые массы, с влажностью не более 5%. Экстракты сухие характеризуются меньшим количеством балластных веществ, высоким содержанием БАВ, они технологичны, из них возможно изготовление капсул, таблеток, мазей и другие лекарственные формы [102].

В ходе обоснования оптимальных условий экстракции БАВ из сбора ангиопротекторного провели исследования по выбору экстрагента, установлению размера частиц сырья сбора, соотношения сырья и экстрагента, а также температуры экстрагента. Для получения извлечения нами выбран метод мацерации в динамических условиях.

Из таблицы 6.1.1 видно, что максимальное количество БАВ, а именно, экстрактивных веществ, флавоноидов извлекается 40-60% спиртом этиловым при размере частиц сырья 2-3 мм, при соотношении сырье-экстрагент 1:16. Оптимальной температурой экстракции является $60^0$С. Перемешивание экстракционной смеси приводит к увеличению выхода БАВ.

Далее экспериментально устанавливали оптимальное время контакта фаз по трем ступеням экстракции. Для этого было проведено три серии опытов с разной продолжительностью контактов фаз на ступенях I, II, III (табл. 6.1.2). В ходе эксперимента проводился расчет эффективности экстракции по экстрактивным веществам, флавоноидам и фенолкарбоновым кислотам.

Максимальное количество БАВ (экстрактивные вещества, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты) извлекается при условиях опытов II и III. В опыте II количество флавоноидов экстрагируется больше на 1,01%, экстрактивных веществ на 1,4% больше в сравнении с опытом III, а в опыте III извлекается больше фенолкарбоновых кислот на 1,77%.

Таблица 6.1.1 – Результаты исследования по оптимизации экстракции БАВ из сбора ангиопротекторного

| Параметр | Содержание, %* | | |
|---|---|---|---|
| | Экстрактивные вещества | Сумма флавоноидов | Сумма фенолкарбоновых кислот |
| Тип экстрагента (размер частиц сырья 1 мм, сырье-экстрагент 1:10) | | | |
| $H_2O$ | 38,03 | 1,25 | 1,16 |
| $C_2H_5OH$ 10% | 40,26 | 1,52 | 1,55 |
| -«- 20% | 37,17 | 1,72 | 1,85 |
| -«- 30% | 36,02 | 1,87 | 2,10 |
| -«- 40% | **36,06** | **2,12** | **2,34** |
| -«- 50% | **35,96** | **2,10** | **2,33** |
| -«- 60% | **36,00** | **2,12** | **2,36** |
| -«- 70% | 29,54 | 1,98 | **2,35** |
| -«- 80% | 24,13 | 1,95 | 2,28 |
| -«- 90% | 13,80 | 1,90 | 2,15 |
| -«- 95% | 10,12 | 1,48 | 2,06 |
| | | 1,48 | |
| Размер частиц сырья, мм (спирт 40%, сырье-экстрагент 1:10) | | | |
| 1 | **36,06** | **2,12** | **2,33** |
| 2 | **36,10** | **2,11** | **2,34** |
| 3 | 34,12 | 2,05 | 1,98 |
| 5 | 25,42 | 1,74 | 1,56 |
| Сырье:экстрагент (размер частиц $\geq 2 \leq 3$ мм) | | | |
| 1:8 | Экстрагент не сливается | | |
| 1:10 | 36,06 | 2,10 | 2,34 |
| 1:12 | 36,15 | 2,12 | 2,34 |
| 1:14 | 36,88 | 2,24 | 2,36 |
| 1:16 | **37,54** | **2,33** | **2,60** |
| 1:18 | **37,51** | **2,34** | **2,62** |
| Температура, $^0$C (размер частиц $\geq 2 \leq 3$ мм, сырье-экстрагент 1:16), перемешивание | | | |
| | | | |
| 30 | 38,25 | 2,34 | 2,63 |
| 40 | 37,45 | 2,40 | 2,68 |
| 50 | 37,86 | 2,44 | 2,75 |
| 60 | **38,32** | **2,65** | **2,83** |
| 70 | **38,30** | **2,66** | **2,82** |
| 80 | **38,32** | **2,65** | **2,83** |

*Приведены средние значения трех определений

Учитывая, что эффективность экстракции в опытах II и III отличается незначительно, условия опыта II можно принять за основу, как более экономичный за счет меньшего времени экстрагирования на 0,5 часа.

Экспериментальные данные по изучению эффективности экстракции БАВ на примере опыта II (табл. 6.1.3).

Таблица 6.1.2 – Результаты определения эффективности извлечения экстрактивных веществ, флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в зависимости от времени контакта фаз

| № опыта | Продолжительность контакта фаз | Эффективность экстракции, % | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Флавоноиды | Фенолкарбоновые кислоты | Экстрактивные вещества |
| 1 | I – 60 мин<br>II – 60 мин<br>III – 30 мин | 69,73 | 77,00 | 90,50 |
| 2 | I – 90 мин<br>II – 60 мин<br>III – 30 мин | **79,95** | **80,36** | **95,38** |
| 3 | I – 120 мин<br>II – 60 мин<br>III – 30 мин | **78,94** | **82,13** | **94,00** |

Таблица 6.1.3 – Экспериментальные данные извлечения БАВ и экстрактивных веществ по ступеням экстракции

| Содержание в сборе, % | Влажность сырья, % | Ступень экстракции | Содержание в г на ступени экстракции | Эффективность экстракции, % |
|---|---|---|---|---|
| Сумма флавоноидов | | | | |
| 3,97 | 5,68 | 1<br>2<br>3<br>В сумме | 0,1166<br>0,0245<br>0,0083<br>0,1494 | 79,95 |
| Сумма фенолкарбоновых кислот | | | | |
| 3,46 | 5,68 | 1<br>2<br>3<br>В сумме | 0,0944<br>0,0253<br>0,0074<br>0,1271 | 80,36 |
| Экстрактивные вещества | | | | |
| 42,3 | 5,68 | 1<br>2<br>3<br>В сумме | 1,6148<br>0,1813<br>0,0631<br>1,8592 | 95,38 |

Выход экстрактивных веществ (суммы флавоноидов, суммы фенолкарбоновых кислот) по отношению к сырью абсолютно сухому (Y,%) рассчитывали по формуле:

$$Y = \frac{X \cdot 100}{m},$$

где $X$ – масса в граммах экстрактивных веществ (флавоноидов, фенолкарбоновых кислот) по всем ступеням, $m$ – масса в граммах абсолютно сухого сырья.

Эффективность экстракции (S, %) рассчитывали по формуле:

$$S = \frac{Y \cdot 100}{E}, \text{ где}$$

$Y$ - выход экстрактивных веществ (флавоноидов, фенолкарбоновых кислот) к абсолютно сухому сырью, %; $E$ – содержание экстрактивных веществ (флавоноидов, фенолкарбоновых кислот) в сырье, %.

На основании проведенных исследований составлено описание технологического процесса.

**Подготовка исходных материалов.** Стадия включает в себя три технологические операции.

1) Подготовка сырья сбора. Дополнительное измельчение и отбор фракции с нужным размером частиц по результатам просеивания через сита с диаметром 3 мм и 2 мм.

Получают 100 г сырья (сбора) с размером частиц $\geq 2 \leq 3$ мм.

2) Получение 40% этилового спирта.

Для приготовления 3500 мл 40% этилового спирта берут 1243 мл 96% этилового спирта и 2257 мл воды очищенной.

**Технологический процесс получения экстракта сухого.** Эта стадия состоит из шести технологических операций.

1) Экстракция сырья (получение извлечения).

Экстракцию сырья проводят методом мацерации в динамических условиях с трехкратным контактом фаз, при температуре экстракционной смеси 60ºС.

<u>I контакт фаз</u>. 100 г измельченного сырья заливают 40%-ным спиртом этиловым в объеме 1600 мл. Экстракцию осуществляют при температуре 60°С, смесь непрерывно перемешивается. Время экстракции 1час 30 минут. По истечении этого времени полученное извлечение сливают и переносят в сборник для извлечения (1160 мл). Отмеривают объем 40% спирта этилового, равный слитому в количестве 1160 мл, которым заливают сырье в экстракторе.

II контакт фаз. Экстракцию продолжают в течение 1 часа, температура экстракции – 60°С, перемешивание – постоянно. По истечении времени экстракции извлечение сливают (объем слитого извлечение 740 мл) и переносят его в сборник для извлечения. Затем отмеривают 740 мл 40% спирта этилового и заливают сырье в экстрактор.

III контакт фаз. Экстракция проводится в тех же условиях в течение 0,5 часа. По истечении времени экстракции извлечение сливают в объеме 760 мл и переносят в сборник для извлечения.

2) Объединенные извлечения (1160 мл + 740 мл + 760 мл) в количестве 2660 мл для очистки от сопутствующих веществ выдерживают при температуре +6°С в течение трех суток.

3) Для отделения веществ, выпавших в осадок, объединенное извлечение фильтруют с использованием друк-фильтра.

4) Упаривание извлечения осуществляют при температуре 60°С на роторном испарителе.

Спирт отгоняют при давлении 9,81 Па, сгущенная вытяжка составляет ¼ от первоначального объема (около 660 мл).

5) Сепарирование.

6) Сушка извлечения.

Высушивание проводят при 60°С в течение 8 часов. Влажность экстракта сухого не должна быть более 5%.

При наработке 3-х серий экстракта сухого (в каждой серии брали по 100 г сбора) получили: выход в 1-ой серии 32 г, во второй серии 31,8 г, в третьей серии 31,6 г, т.е. в среднем выход готового продукта составляет 31,8±0,5 г.

Таким образом, выход экстракта сухого в процентах из сбора ангиопротекторного составляет 31,8%.

Экстракту сухому на основе шестикомпонентного сбора ангиопротекторного дали условное название «Ангиофитон».

## 6.2. Исследование химического состава экстракта сухого на основе сбора ангиопротекторного

### 6.2.1. Состав фенольных соединений экстракта сухого «Ангиофитон»

В составе БАВ экстракта сухого «Ангиофитон» качественными аналитическими реакциями и хроматографическими методами установлено содержание флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, антоцианов, сапонинов, кумаринов, полисахаридов.

Детальное исследование провели БАВ, определяющих основную фармакологическую активность «Ангиофитона», это фенольные соединения (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты) (рис. 6.2.1., табл. 6.2.1).

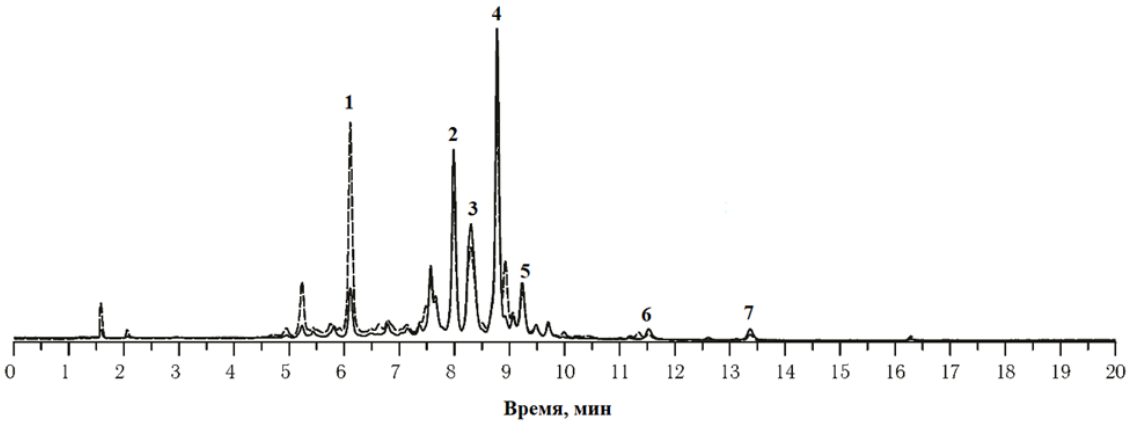



Рисунок 6.2.1 – Хроматограмма экстракта сухого «Ангиофитон» (МК-ВЭЖХ-УФ) при 330 нм (пунктир) и 360 нм (сплошная): 1 – 5-*О*-кофеилхинная кислота, 2 – кверцетин-3-*О*-рутинозид, 3 – кверцетин-3-*О*-глюкозид, 4 – изорамнетин-3-*О*-рутинозид, 5 – изорамнетин-3-*О*-глюкозид, 6 – кверцетин, 7 – изорамнетин.

В экстракте сухом «Ангиофитон» идентифицировано методом МК-ВЭЖХ-УФ 6 флавоноидов и 5-*О*-кофеилхинная кислота. Сравнительный анализ состава фенольных соединений экстракта сухого «Ангиофитон» и сбора ангиопротекторного показал идентичность качественного состава. В составе экстракта сухого отмечается увеличение количественного состава фенольных компонентов в 2-3 раза (табл. 4.1.2, табл. 6.2.1.).

Таблица 6.2.1 – Флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты экстракта сухого «Ангиофитон» (метод МК-ВЭЖХ -УФ)

| № п/п | Соединение | Время удерживания, мин | Содержание в мг/г |
|---|---|---|---|
| 1 | 5-*О*-кофеилхинная кислота | 6,08 | 5,63±0,11 |
| 2 | кверцетин-3-*О*-рутинозид (рутин) | 7,87 | 7,31±0,14 |
| 3 | кверцетин-3-*О*-глюкозид (изокверцитрин) | 8,28 | 9,70±0,19 |
| 4 | изорамнетин-3-*О*-рутинозид (нарциссин) | 8,77 | 9,51±0,18 |
| 5 | изорамнетин-3-*О*-глюкозид | 9,15 | 2,45±0,05 |
| 6 | кверцетин | 11,46 | 0,45±0,01 |
| 7 | изорамнетин | 13,31 | 0,25±0,00 |
| | Содержание суммы: фенолкарбоновых кислот флавоноидов | | 5,63<br>29,67 |

### 6.2.2. Исследование минерального состава экстракта сухого «Ангиофитон»

Исследования по изучению минерального состава экстракта сухого «Ангиофитон» проводили хромато-масс-спектрометрическим методом. Методика изложена на стр. 43. В исследуемом объекте содержалось 72 элемента (табл. 6.2.2).

Таблица 6.2.2 – Содержание макро-, микро- и ультрамикроэлементов в экстракте сухом «Ангиофитон»

| Элемент | Погреш-ность измере-ния, % | Содержание, мг/кг | Элемент | Погреш-ность измере-ния, % | Содержание, мкг/кг |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Макроэлементы | | | | | |
| Натрий (Na) | 5 | 2900,00 | Сера (S) | 5 | 3,9,00 |
| Магний (Mg) | 5 | 5300,00 | Хлор (Cl) | 5 | 17,00 |
| Фосфор (P) | 5 | 4200,00 | Кремний (Si) | 5 | 290,00 |
| Алюминий (Al) | 5 | 12,00 | Кальций (Ca) | 5 | 3400,00 |
| Калий (K) | 5 | 55000,00 | | | |
| Микро- и ультрамикроэлементы | | | | | |
| Берилий (Be) | 23 | 0,0032 | Цезий (Cs) | 6,6 | 0,039 |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|
| Барий (Ba) | 8,5 | 3,20 | Бор (B) | 5 | 56,00 |
| Церий (Ce) | 6,9 | 0,03 | Хром (Cr) | 5 | 2,300 |
| Скандий (Sc) | 5 | 0,69 | Лантан (La) | 8,5 | 0,015 |
| Литий (Li) | 5 | 0,46 | Титан (Ti) | 6,9 | 0,63 |
| Ванадий (V) | 5 | 0,166 | Празеодим (Pr) | 14 | 0,003 |
| Неодим (Nd) | 16 | 0,010 | Йод (I) | 5 | 3,10 |
| Марганец (Mn) | 5 | 2,10 | Самарий (Sm) | 26 | |
| Гадолиний (Gd) | 24 | 0,002 | Железо (Fe) | 5 | 154,00 |
| Никель (Ni) | 5 | 11,70 | Европий (Eu) | 21 | 0,0016 |
| Кобальт (Co) | 5 | 0,24 | Диспрозий (Dy) | 24 | 0,002 |
| Цинк (Zn) | 5 | 37,00 | Тербий (Tb) | 1,4 | 0,0014 |
| Медь (Cu) | 5 | 11,10 | Эрбий (Er) | 22 | 0,0017 |
| Мышьяк (As) | 11 | 0,078 | Гольмий (Ho) | 17 | 0,0013 |
| Галлий (Ga) | 11 | 0,017 | Лютеций (Lu) | 18 | 0,0011 |
| Германий (Ge) | 9,1 | 0,062 | Тулий (Tm) | 17 | 0,0012 |
| Рубидий (Rb) | 15 | 37,00 | Иттербий (Yb) | 18 | 0,0034 |
| Селен (Se) | 18 | 0,180 | Вольфрам (W) | 18 | 0,018 |
| Бром (Br) | 5 | 28,00 | Гафний (Hf) | 19 | 0,0024 |
| Ниобий (Nb) | 16 | 0,0025 | Тантал (Ta) | 19 | 0,0015 |
| Стронций (Sr) | 6,4 | 6,50 | Иридий (Ir) | <0,2 | <0,0002 |
| Иттрий (Y) | 6,9 | 0,026 | Рений (Re) | 1,3 | 0,0013 |
| Цирконий (Zr) | 6,4 | 0,071 | Осмий (Os) | <4 | <0,004 |
| Родий (Rh) | 3,3 | 0,003 | Свинец (Pb) | 23 | 2,00 |
| Молибден (Mo) | 5,9 | 0,190 | Платина (Pt) | 24 | 0,0028 |
| Рутений (Ru) | nd | <0,0005 | Золото (Au) | 3 | 0,003 |
| Палладий (Pd) | 23 | 0,0033 | Торий (Th) | 13 | 0,0043 |
| Серебро (Ag) | 7,1 | 0,058 | Талий (Tl) | 6,4 | 0,0064 |
| Сурьма (Sb) | 6 | 0,117 | Теллур (Te) | 8 | 0,008 |
| Кадмий (Cd) | 24 | 0,0021 | Висмут (Bi) | 5 | 1,18 |
| Олово (Sn) | 4,8 | 0,25 | Уран (U) | 8,7 | 0,013 |
| Ртуть (Hg) | 9 | 0,009 | | | |

Лекарственные растительные средства по ГФ XIV издания нормируются по содержанию тяжелых металлов и мышьяка. Содержание свинца должно быть не >6 мг/кг (найдено в экстракте сухом «Ангиофитон» 2 мг/кг), мышьяка не >0,5 мг/кг (установлено содержание 0,078 мг/кг), кадмия не >1 мг/кг (установлено содержание 0,002 мг/кг), ртути не >0,1 мг/кг (установлено содержание 0,009 мг/кг) [23].

Экстракт сухой «Ангиофитон» по содержанию минеральных веществ полностью соответствует сбору ангиопротекторному, отличается большим

содержанием эссенциальных элементов (селен, цинк, марганец, йод, медь, молибден, кобальт, хром), необходимых организму для нормального функционирования [21].

### 6.2.3. Разработка показателей для ФСП «Экстракт сухой «Ангиофитон» Аналитические реакции для определения подлинности

0,1 г экстракта сухого растворяют в 25 мл спирта этилового 40% и нагревают на водяной бане 10 мин, далее фильтруют. С полученным раствором проводят реакции:

- к 5 мл р-ра экстракта добавляют 2 мл 2% $AlCl_3$, появляется желтое окрашивание (флавоноиды);

- к 3 мл р-ра экстракта прибавляют 2 мл воды очищенной, далее по стенке пробирки приливают 1 мл раствора смеси ванилина в серной кислоте, на границе слоев должно наблюдаться кольцо красновато-коричневого цвета (тритерпеновые сапонины).

Тонкослойная хроматография.

Предлагается использовать 0,001% растворы стандартных веществ – рутина и кверцетина, на хроматографическую пластинку наносят их по 50 мкл.

*Методика.* 0,05 г экстракта сухого «Ангиофитон» растворяют в 5 мл 40% спирта этилового, нагревают на водяной бане, раствор фильтруют, исследуемый раствор 10 мкл наносят на пластинку в виде полосы в 1см. Далее поступают, как описано в методике на стр. 78.

Зоны стандартных образцов имеют желто-зеленую флюоресценцию. На хроматограмме экстракта сухого Ангиофитон имеются зоны, соответствующие стандартным веществам, а также между зонами стандартов располагаются 2-3 зоны желтого цвета и одна зона красного цвета, ниже СО рутина располагается одна или две зоны (рис. 2.2.1).

| Верх ТСХ-хроматограммы | |
|---|---|
| Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета (1)<br><br>Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета (2) | Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета<br>Зона желтого цвета<br>Зона желтого цвета<br>Зона красно-фиолетового цвета<br>Зона желтого цвета<br>Флюоресцирующая зона желто-зеленого цвета<br>Зона желтого цвета |
| **Раствор СО кверцетина (1) и рутина (2)** | **Испытуемое извлечение** |

Рисунок 2.2.1 – Схема ТСХ хроматограммы экстракта сухого «Ангиофитон» после проявления 1% раствором $AlCl_3$ (в УФ-свете, λ=360 нм).

Капилляроукрепляющее, противовоспалительное, антиоксидантное действие предложенного средства обусловлено фенольными соединениями. В связи с этим стандартизацию экстракта сухого «Ангиофитон» предлагается проводить по содержанию флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. Для этого применили адаптированные методики, используемые для анализа сбора ангиопротекторного, при этом соблюдается принцип сквозной стандартизации «сырье» - «лекарственное средство».

Максимум поглощения в дифференциальном спектре спиртового раствора экстракта сухого Ангиофитон находится при λ=415 нм, что совпадает с рутином и спиртовым извлечением сбора ангиопротекторного. Далее мы провели адаптацию методик количественного анализа, предложенных для стандартизации сбора ангиопротекторного.

*Методика количественного анализа суммы флавоноидов в экстракте сухом «Ангиофитон».* Навеску около 0,1000 г растворяют при нагревании в 50 мл спирта этилового 40%, р-р фильтруют, получают раствор А. Далее 2 мл раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 1% спиртового раствора $AlCl_3$, 0,1 мл 30% уксусной кислоты и доводят до метки

96% спиртом (получают раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре (λ=415 нм) в кюветах толщиной 10мм. Раствор сравнения содержит 2 мл раствора А, 0,1 мл 30% уксусной кислоты и доведен до метки 96% спиртом.

Приготовление стандартного р-ра рутина. 1 мл 0,05% раствора рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 1% р-ра $AlCl_3$, 0,1 мл 30% р-ра $CH_3COOH$ и до метки доводят 96% спиртом этиловым. Раствор сравнения: 1 мл 0,05% р-ра рутина, 0,1 мл 30% р-ра $CH_3COOH$ помещают в мерную колбу на 25 мл и раствор доводят 96% спиртом этиловым до метки, оптическую плотность измеряют при 415 нм.

Процентное содержание флавоноидов в пересчете на СО рутина и абсолютно сухой экстракт вычисляют по формуле:

$$X=\frac{D\cdot m_0\cdot 25\cdot 50\cdot 1\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot 100\cdot 2\cdot 25\cdot (100-W)}=\frac{D\cdot 25\cdot\cdot m_0 100}{m\cdot D_0\cdot (100-W)},$$

где D – значение оптической плотности раствора экстракта сухого; $D_0$ – оптическая плотность раствора рутина; m – масса экстракта сухого в г; $m_0$ – масса рутина в г; W – абсолютная влажность экстракта в процентах.

Допускается проведение расчета % содержания суммы флавоноидов по удельному показателю поглощения рутина при λ=415 нм в 96% спирте этиловом:

$$X=\frac{D\cdot 50\cdot 25\cdot 100}{E_{1см}^{1\%}\cdot m\cdot 2\cdot (100-W)},$$

где $D$ – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора; $m$ – навеска экстракта сухого; $E_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина в комплексе с $AlCl_3$ при α=415 нм, равный 248; г; W – абсолютная влажность экстракта в процентах.

Приготовление 0,05% раствора СО рутина (стр. 84).

Относительная ошибка методики определения суммы флавоноидов в экстракте сухом «Ангиофитон» составила ±2,16% (табл. 6.2.1).

Таблица 6.2.1 – Метрологическая характеристика методики количественного анализа суммы флавоноидов в экстракте сухом «Ангиофитон»

| $\bar{x}$ | f | S | P,% | S $\bar{x}$ | Δ $\bar{x}$ | t(P,f) | $\bar{E}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7,6300 | 8 | 0,21448 | 95 | 0,07149 | 0,16 | 2,31 | ±2,16 |

Правильность предложенной методики нами доказана в опытах с добавками СО рутина. Относительная ошибка в эксперименте с добавками не превышала относительную ошибку методики (табл. 6.2.2).

Таблица 6.2.2 – Результаты анализа с добавками СО рутина в экстракте сухом «Ангиофитон»

| СФЭ в аликвоте, мкг | Добавлено СОР, мкг | Ожидаемое содержание СФЭ, мкг | Полученное содержание СФЭ, мкг | Ошибка, % | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | абс., мкг | отн., % |
| 305,20 | 75,00 | 380,20 | 387,27 | +7,07 | 1,86 |
| 305,20 | 75,00 | 380,20 | 307,43 | -7,98 | 2,10 |
| 305,20 | 75,00 | 380,20 | 311,21 | +6,69 | 1,76 |
| 305,20 | 150,00 | 455,20 | 464,30 | +9,10 | 2,00 |
| 305,20 | 150,00 | 455,20 | 462,26 | +7,06 | 1,55 |
| 305,20 | 150,00 | 455,20 | 446,64 | -8,56 | 1,88 |
| 305,20 | 225,00 | 530,20 | 541,23 | +11,03 | 2,08 |
| 305,20 | 225,00 | 530,20 | 519,91 | -10,29 | 1,94 |
| 305,20 | 225,00 | 530,20 | 520,39 | -9,81 | 1,85 |

Примечание: СФЭ – сумма флавоноидов экстракта сухого СОР – стандартный образец рутина

Адаптированная методика количественного анализа суммы флавоноидов в экстракте сухом «Ангиофитон» соответствует критериям валидности (табл. 6.2.3) [22, 37].

Таблица 6.2.3 – Результаты валидации спектрофотометрического количественного анализа суммы флавоноидов в экстракте сухом «Ангиофитон»

| Результаты анализа | Критерии приемлемости |
|---|---|
| Правильность | |
| 1. 98,17%<br>2. $E_{от}$ опытов с добавками в пределах ошибки методики | 1. Восстановление в процентах 100 ± 5%<br>2. $E_{от}$ опытов с добавками должна быть в пределах ошибки методики |
| Сходимость | |
| Значение RSD% (1); критерий Стьюдента (2)<br>Первый день: 1) 1,31%; 2) 1,98 (меньше 2,57)<br>Второй день: 1) 1,89; 2) 0,20 (<2,57) | 1. RSD должно быть <15%<br>2. Критерий Стьюдента <табличного |
| Воспроизводимость межлабораторная | |
| Лаборатория «А»: 1) 1,65; 2) 0,52 (<2,57)<br>Лаборатория «Б»: 1) 1,70 2) 0,37 (<2,57) | 1. RSD должно быть <15%<br>2. Критерий Стьюдента <табличного |
| Специфичность | |
| Определено совпадение дифференциальных УФ-спектров раствора экстракта сухого и СО рутина | Совпадение спектров поглощения |
| Линейность и диапазон | |
| Уравнение линейности $y=0,0692 \cdot x – 0,0003$<br>Коэффициент корреляции 0,9996<br>Аналитическая область методики 2,89-11,57 мкг/мл | Коэффициент корреляции ≥ 0,99 |

Второй предложенный показатель для стандартизации экстракта сухого «Ангиофитон» это сумма фенолкарбоновых кислот. Максимум поглощения в электронном спектре экстракта сухого «Ангиофитон» имеется при 325 нм, что совпадает с 3-*О*-кофеилхинной кислотой, которая выбрана в качестве стандарта.

*Методика количественного анализа суммы фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом «Ангиофитон».* Используют раствор А методики количественного анализа флавоноидов. Далее 2 мл раствора экстракта сухого переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, колбу доводят до метки 96% спиртом этиловым (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при λ=325 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 1см. В качестве раствора сравнения используют 96% спирт этиловый.

Процентное содержание фенолкарбоновых кислот в пересчёте на 3-*О*-кофеилхинной кислоту и абсолютно сухой экстракт рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 504 \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого р-ра экстракта; m – масса экстракта сухого, г; W – абсолютная влажность экстракта сухого, %; 504 – удельный показатель поглощения 3-*О*-кофеилхинной кислоты при λ=325 нм.

Метрологическая характеристика показала ошибку методики ±2,19%. (табл. 6.2.4)

Таблица 6.2.4 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом «Ангиофитон»

| $\bar{x}$ | S x | f | S $\bar{x}$ | t(P,f) | Δ $\bar{x}$ | P, % | $\bar{E}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 8,56667 | 0,24454 | 8 | 0,08151 | 2,36 | 0,19 | 95 | 2,19 |

Правильность методики была доказана в опытах с добавками (ошибка испытаний не превышала ошибку методики) (6.2.4, 6.2.5).

Таблица 6.2.5 – Результаты опытов с добавками 3-*О*-кофеилхинной кислоты к экстракту сухому «Ангиофитон»

| Содержание СФКК в аликвоте, мкг | Добавлено СО 3-КХК кислоты, мкг | Рассчитано СФКК, мкг | Найдено СФКК, мкг | Ошибка | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | абс., мкг | отн., % |
| 342,67 | 50 | 392,67 | 384,38 | -8,29 | 2,11 |
| 342,67 | 50 | 392,67 | 400,29 | +7,62 | 1,94 |
| 342,67 | 50 | 392,67 | 257,56 | +7,77 | 1,98 |
| 342,67 | 100 | 442,67 | 436,03 | -6,64 | 1,50 |
| 342,67 | 100 | 442,67 | 447,98 | +5,31 | 1,20 |
| 342,67 | 100 | 442,67 | 433,37 | -9,30 | 2,10 |
| 342,67 | 150 | 492,67 | 502,52 | +9,85 | 2,00 |
| 342,67 | 150 | 492,67 | 482,52 | -10,15 | 2,06 |
| 342,67 | 150 | 492,67 | 498,28 | +5,01 | 1,14 |

Приложение: СФКК – сумма фенолкарбоновых кислот, 3-КХК – 3-*О*-кофеилхинная кислота.

Таблица 6.2.6 – Результаты валидации методики количественного анализа суммы фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом «Ангиофитон»

| Результаты анализа | Критерии приемлемости |
|---|---|
| Правильность | |
| 1. 101,50%<br>2. $E_{от}$ опытов с добавками в пределах ошибки методики | 1. Восстановление в процентах 100 ± 5%<br>2. $E_{от}$ опытов с добавками должна быть в пределах ошибки методики |
| Сходимость | |
| Значение RSD% (1); критерий Стьюдента (2)<br>Первый день: 1) 2,01 %; 2) 0,66 (меньше 2,57)<br>Второй день: 1) 1,84; 2) 0,30 (<2,57) | 1. RSD должно быть <15%<br>2. Критерий Стьюдента <табличного |
| Воспроизводимость межлабораторная | |
| Лаборатория «А»: 1) 2,68; 2) 0,46 (<2,57)<br>Лаборатория «Б»: 1) 1,84 2) 0,30 (<2,57) | 1. RSD должно быть <15%<br>2. Критерий Стьюдента <табличного |
| Специфичность | |
| Определено совпадение дифференциальных УФ-спектров раствора экстракта сухого и СО 3-О-кофеилхинной кислоты | Совпадение спектров поглощения |
| Линейность и диапазон | |
| Уравнение линейности $y=0{,}0469 \cdot x - 0{,}00216$<br>Коэффициент корреляции 0,9984<br>Аналитическая область методики 4,30-17,10 мкг/мл | Коэффициент корреляции ≥ 0,99 |

Адаптированная методика соответствует параметрам валидации (табл. 6.2.6) [22].

Методики количественного анализа флавоноидов и фенолкарбоновых кислот включены в проект ФСП «Экстракт сухой «Ангиофитон».

### 6.2.4. Нормирование показателей качества для экстракта сухого «Ангиофитон»

Для установления норм содержания БАВ - суммы флавоноидов, суммы фенолкарбоновых кислот, как определяющих основную фармакологическую активность разработанного средства, влажности, сроков годности нами было произведено 5 серий экстракта сухого «Ангиофитон».

Исследования по разработке показателей проводились в соответствии с требованиями с ОФС 1.4.1.0021.15 «Экстракты» по ГФ XIV [23].

Влажность экстрактов сухих составляла 4,45-4,90%, содержание тяжелых металлов соответствовало требованиям ГФ XIV (6.2.7) [23].

В экстракте сухом «Ангиофитон» содержалось суммы флавоноидов 6,44±0,12% -7,85±0,24%, фенолкарбоновых кислот 7,05±0,19% - 8,62±0,25%. Нами рекомендованы нормы содержания суммы флавоноидов не менее 6%, суммы фенолкарбоновых кислот не менее 6,5% (6.2.8). Ипытания на тяжелые металлы проводились по методикам ОФС.1.4.0021.15 «Экстракты».

Таблица 6.2.7 – Результаты испытаний экстракта сухого «Ангиофитон»

| Номер серии экстракта | Содержание влаги, в % | | Тяжелые металлы | |
|---|---|---|---|---|
| | Требования по ГФ XIV | Установлено | Требования по ГФ XIV | Установлено |
| 1 | Не >5 | 4,75 | Не >0,01% | Все серии соответс-твовали требованиям |
| 2 | | 4,90 | | |
| 3 | | 4,58 | | |
| 4 | | 4,60 | | |
| 5 | | 4,45 | | |

Срок годности экстракта сухого «Ангиофитон» определяли методом ускоренного старения ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» [23].

Таблица 6.2.8 –Анализ экстракта сухого «Ангиофитон» по содержанию флавоноидов, фенолкарбоновых кислот

| Номер серии экстракта | Содержание, % | |
|---|---|---|
| | Флавоноидов | Фенолкарбоновых кислот |
| 1 | 7,85±0,24 | 8,62±0,25 |
| 2 | 6,89±0,20 | 7,80±0,22 |
| 3 | 7,01±0,19 | 7,05±0,19 |
| 4 | 7,55±0,10 | 8,23±0,20 |
| 5 | 6,44±0,12 | 7,85±0,18 |

Установлен первоначальный срок годности экстракта сухого «Ангиофитон» 2 года (табл.6.2.9).

Таблица 6.2.9 – Определение стабильности экстракта сухого «Ангиофитон»

| Периодичность анализа | Внешние признаки | Сумма флавоноидов, % | Влажность, % | Сумма фенолкарбоновых кислот, % |
|---|---|---|---|---|
| Исходный анализ | Соотв. НД | 7,55 | 4,60 | 8,23 |
| Через 3 мес. | Соотв. НД | 7,53 | 4,60 | 8,18 |
| Через 6 мес. | Соотв. НД | 7,54 | 4,61 | 8,20 |
| Через 9 мес. | Соотв. НД | 7,58 | 4,65 | 8,22 |
| Через 12 мес. | Соотв. НД | 7,53 | 4,64 | 8,19 |
| Через 18 мес. | Соотв. НД | 7,51 | 4,65 | 8,20 |
| Через 24 мес. | Соотв. НД | 7,52 | 4,70 | 8,21 |

По результатам исследования нами предложены показатели качества экстракта сухого «Ангиофитон», которые включены в проект ФСП «Экстракт сухой «Ангиофитон» (табл. 6.2.10).

Таблица 6.2.10 – Спецификация экстракта сухого «Ангиофитон»

| ПОКАЗАТЕЛЬ | МЕТОД АНАЛИЗА | НОРМА СОДЕРЖАНИЯ |
|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Внешние признаки | Визуальный | Мелкокристаллический порошок светло-коричневого, коричневого цвета, вкус горьковатый, запах слабый. |
| Подлинность | 1.Аналитическая реакция обнаружения флавоноидов (с 1% р-ром $AlCl_3$)<br>2.Аналитическая реакция обнаружения тритерпеновых сапонинов (ванилин с $H_2SO_4$)<br>3. ТСХ (флавоноидов) | Желтое окрашивание<br><br>красно-коричневое окрашивание<br>рутин, кверцетин |

| 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|
| Влажность | гравиметрический | Не более 5% |
| Тяжелые металлы | ОФС.1.2.2.2.0012.15 | Не более 0,01% |
| Суммы флавоноидов; суммы фенолкарбоновых кислот | Спектрофотометрический<br>Спектрофотометрический | Не менее 6,0%<br>Не менее 6,5,0% |
| Срок годности | ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» | 2 года |

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. Предложен способ получения экстракта сухого «Ангиофитон» на основе сбора ангиопротекторного. Условия получения экстракта сухого: экстрагент 40% спирт этиловый, размер частиц сырья >2<3 мм, соотношение сырья и экстрагента 1:16; метод экстракции метод 3-х ступенчатой мацерации в динамических условиях при 60°С. Выход экстракта сухого составил 31,8%.

2. В составе экстракта содержатся флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества, антоцианы, сапонины, кумарины, полисахариды. Идентифицированы методом МК-ВЭЖХ-УФ: 5-*О*-кофеилхинная кислота, 1,3-ди-*О*-кофеилхинная кислота, кверцетин-3-*О*-рутинозид, кверцетин-3-*О*-глюкозид, изорамнетин-3-*О*-рутинозид, изорамнетин-3-*О*-глюкозид, кверцетин, изорамнетин. Экстракт сухой содержит элементы, регулирующие состояние сосудистых стенок (кальций, натрий, железо, магний, цинк, фосфор, марганец).

3. Для включения в проект ВФС «Экстракт сухой «Ангиофитон» адаптированы методики количественного анализа флавоноидов (относительная ошибка методики ±2,16%) и фенолкарбоновых кислот (относительная ошибка методики ±2,19%). Предложенные методики удовлетворяют критериям валидации.

4. Установлены нормы содержания в экстракте сухом «Ангиофитон» суммы флавоноидов в пересчете на рутин «не менее 6,0%», суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на 3-*O*-кофеилхинной кислоту «не менее 6,5%».

5. Экспериментально установлен первичный срок годности экстракта сухого «Ангиофитон» 2 года.

# ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Препараты, используемые для лечения и профилактики заболеваний вен, выпускаются в различных лекарственных формах, содержат вещества природного, синтетического и полусинтетического происхождения, из них около 50% - средства импортного производства; многокомпонентные растительные препараты представлены в ограниченном количестве и составляют 4,8%.

2. На основании существующих подходов при разработке сборов, данных по содержанию биологически активных веществ и результатов фармакологических исследований предложен рациональный состав сбора ангиопротекторного.

3. В составе БАВ сбора ангиопротекторного содержатся флавоноиды (рутин, изокверцитрин, нарциссин, изорамнетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин, изорамнентин, кемпферол, гиперозид, гисперидин, спиреозид), дубильные вещества, сапонины (календулозиды А и В, эсцин), аминокислоты, антоцианы (цианидин-3-*O*-глюкозид, цианидин-3-*O*-арабинозид), кумарины, органические кислоты, β-каротин, аскорбиновая кислота, фенолкарбоновые кислоты; в составе эфирного масла идентифицирован 21 компонент (преобладают метилсалицилат, салициловый альдегид); минеральный состав представлен 72 элементами, включая кальций, натрий, железо, магний, цинк, фосфор, марганец.

4. Установлены макро- и микроскопические диагностические признаки, позволяющие идентифицировать все компоненты сбора, а также предложены качественные реакции обнаружения флавоноидов, тритерпеновых сапонинов и ТСХ флавоноидов; стандартизацию сбора ангиопротекторного предложено проводить спектрофотометрическим методом по сумме флавоноидов (не менее 3%) и сумме фенолкарбоновых кислот (не менее 2,5%).

5. В состав фенольных соединений сырья *Bupleuri multinervis herba* входят 8 флавоноидов и 7 фенолкарбоновых кислот; впервые установлено

содержание 2 флавоноидов (кверцетин-3-*О*-глюкуронид, астрагалин) и 5 фенолкарбоновых кислот (5-*О*-*п*-кумароилхинная кислота, 5-*О*-ферулоилхинная кислота, 3-*О*-ферулоилхинная кислота, 3,5-ди-*О*-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-*О*-кофеилхинная кислота); для стандартизации сырья установлены его анатомо-диагностические признаки, предложен спектрофотометрический метод количественного определения флавоноидов с использованием СО рутина; раздел испытания дополнен определением показателей: золы общей «не более 10%»; золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, «не более 3%»; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, «не менее 20%».

6. Разработана и предложена технология получения экстракта сухого «Ангиофитон», разработаны показатели оценки его подлинности (качественные реакции, ТСХ), предложены и валидированы методики спектрофотометрического количественного определения суммы флавоноидов (не менее 6%) и фенолкарбоновых кислот (не менее 6,5%).

7. Разработаны и предложены проекты ФС на сбор ангиопротекторный, ФС на сырье *Bupleuri multinervis herba*, ФСП на экстракт сухой «Ангиофитон».

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Авдеева, Е.Ю. Динамика содержания флавоноидов и фенолокислот в надземной части *Filipendula ulmaria* (*Rosaceae*) / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, И.В. Шилова // Растительные ресурсы. – 2009. – Т. 45, №. 1. – С. 107-112.
2. Авдеева, Е.Ю. Компонентный состав фракции *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. с высокой антиоксидантной активностью / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, И.В. Шилова // Химия растительного сырья. – 2008. – № 3. – С. 115-118.
3. Аксиненко, С. Г. Противовоспалительная активность экстракта надземной части земляники лесной / С. Г. Аксиненко, С.С. Кравцова // Проблемы современной науки – 2012. – Вып. 5. – С. 123-129.
4. Аксиненко, С.Г. Влияние земляники лесной экстракта на течение острой тканевой гипоксии / С.Г. Аксиненко, Д.А. Щетинина, А.В. Шелудченко // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции / под ред. М.В. Гаврилина. – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 296-297.
5. Аксиненко, С.Г. Цитопротективные эффекты настойки надземной части *Fragaria vesca* L. в условиях интоксикации циклофосфаном / С.Г. Аксиненко, Д.А. Климентова, В.Г. Пашинский // Растительные ресурсы. - 2003. – Вып. 4. – С. 130−134.
6. Андреева, В.Ю. Определение содержания антоцианов в плодах аронии черноплодной / В.Ю. Андреева, А.С. Ангаскиева, Н.В. Исайкина // Здоровье и образование в XXI веке. – 2012. – № 2. – URL: https://cyberleninka.ru/article/n/opredelenie-soderzhaniya-antotsianov-v-plodah-aronii-chernoplodnoy. (дата обращения: 02.04.2020).
7. Антиоксидантная активность видов флоры Алтая / А.Л. Шаварда [и др.] // Растительные ресурсы. – 1998. – Т. 34, вып. 2. – С. 1-8.

8. Антиоксидантные свойства нового растительного сбора / В. В. Лампатов [и др.] // Психофармакология и биологическая наркология. – 2009. – Т. 7, № 4. – С. 1761-1762.
9. Асташенков, А.Ю. Состояние ценопопуляций *Bupleurum multinerve* DC. в различных условиях Хакасии и Алтая / А.Ю. Асташенков, В. А. Черемушкина // Растительный мир Азиатской России. – 2009. – Т. 1, № 1. - С. 94-99.
10. Афанасьева, П.В. Актуальные аспекты комплексного использования календулы лекарственной / П.В. Афанасьева // Аспирантский вестник Поволжья. – 2014. – № 5-6. – С. 152-154.
11. Бандюкова, В.А. Применение цветных реакций для обнаружения флавоноидов путем хроматографии на бумаге / В.А. Бандюкова // Растительные ресурсы. – 1965. – Т. 1, вып. 4. – С. 591-596.
12. Барнаулов, О.Д. Противодиабетические свойства настоя цветков лабазника вязолистного / О.Д. Барнаулов, М.Л. Поспелова // Психофармакология и биологическая наркология. – 2005. – Т. 5, № 4. – С. 1113-1120.
13. Барнаулов, О.Д. Противоязвенное действие отвара из цветков лабазника вязолистного / О.Д Барнаулов, П.П. Денисенко // Фармакология и токсикология. - 1980. – № 6. – С. 700-704.
14. Баширова, Р.М. Применение растений рода володушка *Bupleurum* в гепатологии / Р.М. Баширова, Р.С. Мингазов, А.М. Мингажаева // Практическая фитотерапия. – 2003. – №. 3. – С. 4-6.
15. Биофлаваноидные препараты володушки - корректоры нарушений антитоксической функции печени / А.И. Венгеровский [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Академии медицинских наук СССР. – 1991. – Т. 11, №. 2. – С. 49-51.
16. Богачев, В.Ю. Эскузан: фармакология, фармакокинетика и терапевтические характеристики. / В.Ю. Богачев, Б.В. Болдин, О.В.

Дженина // Стационарозамещающие технологии: Амбулаторная хирургия. – 2019 – № 1-2. – С. 19-25.

17. Бубенчикова, В.Н. Фенольные соединения и полисахариды листьев *Fragaria vesca* L / В.Н. Бубенчикова, И.Л. Дроздова // Растительные ресурсы. – 2003. – № 4 (39). – С. 94–98.
18. ВЭЖХ-анализ нарциссина в цветках календулы лекарственной /А.В. Куркина [и др.] // Фармация. – 2016. – Т. 65, №. 4. – С. 30-34.
19. Гепатозащитные свойства фракций экстракта лабазника вязолистного при экспериментальном токсическом гепатите / И. В. Шилова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 7. – С. 54-57.
20. Глущенко, А. В. Количественное определение флавоноидов и суммы полифенолов в надземной части володушки золотистой / А.И. Глущенко, В.А. Георгиянц, Н.Ю. Бевз // Актуальные проблемы медицины. – 2014. –- №11 (182) – С. 172-176.
21. Горбачев, В. В. Витамины. Макро- и микроэлементы / В.В. Горбачев, В.Н. Горбачева. – М.: Медицинская книга, 2011. – 432 с.
22. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. –URL: http://docs.cntd.ru/document/1200029975
23. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 4 томах / ред. С.В. Емшанова, О.Г. Потанина, Е.В. Буданова, В.В. Чистяков. – XIV изд. – Москва, 2018. – URL: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения 10.09.2020)
24. Государственный реестр лекарственных средств. – URL: http://grls.rosminzdrav.ru (дата обращения 16.09.2020).
25. Гриневич, В.С. Земляники лесной листья: компонентный состав и фармакологические свойства. Обзор литературы / В. С. Гриневич, Н.В. Корожан // Вестник фармации. 2018. – № 1 (79). – С. 87-94.

26. Дроздова, И.Л. Антиоксидантная активность полифенольных комплексов *Viola odorata* L. и *Fragaria vesca* L. [Текст] / И.Л. Дроздова, Р.А. Бубенчиков // Растительные ресурсы. – 2004. – Вып. 2. – С. 92 - 97.
27. Дубашинская Н.В. Лабазник вязолистный: химический состав и фармакологическая активность / Н.В. Дубашинская, А.А. Юркевич. // Вестник фармации. – 2017. – №. 4. – С. 55-58.
28. Жарова, О.Г. К вопросу о целесообразности использования препаратов каштана конского в медицинской практике (обзор) / О.Г. Жарова // Аспирантский вестник Поволжья. –- 2004. – № 1. – С. 20-22.
29. Жарова, О.Г. Стандартизация конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) семян и экстракта сухого на их основе: автореф. дисс. … канд. фарм. наук / О. Г. Жарова. – Москва, 2009. - 27 с.
30. Жилина, И.В. Гель, содержащий фитокомпоненты венотонизирующего действия из цветков лабазника вязолистного и софоры японской / И.В. Жилина, Э. Ф. Степанова // Научная жизнь. – 2011. – № 1. – С. 18-21.
31. Запорожская, Л.И. Ассортимент лекарственных препаратов для лечения и профилактики варикозной болезни нижних конечностей / Л.И Запорожская, Н.Н. Чеснокова // Ремедиум Приволжье. - 2016. - № 3 – С. 143.
32. Изучение диуретической активности препаратов на основе цветков календулы лекарственной / В. А. Куркин [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 51-57.
33. Изучение капилляроукрепляющего действия геля с экстрактом лабазника вязолистного / И. В. Жилина [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. - 2010. –- №22 (93). – С. 29-31.
34. Изучение противовоспалительной активности растительной композиции «Ангиофитон» / В.М. Мирович, А.В. Цыренжапов, А.А. Посохина, С.А. Петухова // Инновационные технологии в фармации: сборник научных трудов. – Иркутск: ИГМУ , 2020. – Выпуск 7. – С. 151-154.

35. Исследование содержания и состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот растений рода *Bupleurum* L., культивированных в Беларуси / Н.М. Бирюкова [и др.] // Вестник фармации. – 2011. – № 4(54). – С. 23-30.

36. Исследование эфирного масла из надземной части *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim / М.Ю. Круглова [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2011. – №. 5. – С. 13.

37. Йоахим, Э. Валидация методик в фармацевтическом анализе / Э. Йоахим, Д. Миллер // Примеры наилучших фармацевтических практик: пер. с англ. – М.: Группа компаний ВИАЛЕК, 2013. – 512с.

38. К разработке компонентного состава растительной композиции ангиопротекторного действия / В.М. Мирович, А.А. Посохина, С.А. Петухова, А.В. Цыренжапов // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – № 2. – С. 179-184.

39. Канунникова, Ю.С. Идентификация биологически активных веществ травы володушки золотистой (*Herba Bupleuri aurei*) / Ю.С. Канунникова, М.А. Джавахян // Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар, 2011. – С. 178.

40. Каралкин, А.В. Патогенез и диагностика хронической венозной недостаточности. Современный взгляд на проблемы: лекция / А.В. Каралкин, А.В. Альбицкий, А.Н. Кузнецов // Терапевтический архив. — 2004. – № 10. – С. 63-68.

41. Кириенко, А.И. Консервативное лечение тромбофлебита поверхностных вен нижних конечностей / А.И Кириенко, В.М. Кошкин // Терапевтический архив. – 1995. – Т. 67, № 4. – С. 53–55.

42. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981. – Т. 2. – 527 с.

43. Киселева, Т.Л. Конский каштан обыкновенный / Т.Л. Киселева // Медицинская помощь. – 1995. – № 1. – С. 54–57.

44. Киселева, Т.Л. Синергические аспекты современной фитофармакотерапии / Т.Л. Кисилева, М.А. Дронова // Новости медицины и фармации (Украина). – 2012. – № 7(409). – С. 24-27.
45. Камова, Н. Н. Разработка состава и технологические исследования гелей венотонизирующего действия с фитокомпозицией каштана конского, арники горной, ореха черного: автореф. дис. … канд. фарм. наук / Н.Н. Камова. – Пятигорск, 2006. – С. 24.
46. Комиссаренко, С.Н. Биологически активные вещества *Aesculus hippocastanum* L. и создание препаратов на их основе / С.Н. Комиссаренко // ФАРМАКОМ. – 2001. – № 4. – С. 4-12.
47. Коноплева, М.М. Количественное определение суммы фенольных соединений в листьях земляники лесной / М.М. Коноплева // Вестник фармации. – 2008. – № 3. – С. 34.
48. Костенко, Е.С. Микроскопические диагностические признаки порошка плодов аронии черноплодной / Е.С. Костенко, Н.Г. Иванкина, А.А. Посохина // Материалы 86-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины». – Иркутск, 2019. –- С. 435-436.
49. Костенко, Е.С. Фармакогностическая характеристика порошка сырья «Аронии черноплодной плоды» / Е.С. Костенко, А.А. Посохина, Н.Г. Иванкина // Сборник трудов Всероссийской студенческой научно-практической конференции с международным участием «Байкальские чтения». – Иркутск, 2019. – С. 70-71.
50. Котухов, Ю.А. Фитоценотические и биологические особенности володушки многожильчатой (*Bupleurum multinerve DC.*) и володушки золотистой (*Bupleurum longifolium L. subsp. aureum (Fisch. Ex offm.) Soo*) на южном Алтае / Ю.А. Котухов, А.Н. Данилова, О.А. Ануфриева //Журнал зарегистрирован в Министерстве культуры, информации и

спорта РК. Свидетельство о постановке на учет СМИ № 5888-ж от 11.04. 2005. – С. 86.

51. Кривошеев, И.М. Фармакогностическое исследование спиреи иволистной (*Spiraea salicifolia* L.), произрастающей в Восточной Сибири: автореф. дисс. … канд. фарм. наук / И.М. Кривошеев. – Иркутск, 2014. – 21 с.
52. Круглова, М.Ю. Анализ фенольного комплекса двух видов лабазника / М. Ю. Круглова, Д. С. Круглов, Н. С. Фурса //Фармация. – 2012. – № 7. – С. 21-23.
53. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
54. Куркин, В.А. Стандартизация плодов аронии черноплодной / В.А. Куркин, А.В. Егорова // Фармация. – 2012. – № 7. – С. 10-13.
55. Куркин, В.А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений / В.А. Куркин, А.В. Куркина, Е.В. Авдеева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11-9. – С. 1897-1901. – URL: http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=33478. (дата обращения: 04.04.2020).
56. Лапик, А.С. Об антигиалуронидазной активности препаратов флавоновых веществ из володушки многожильчатой и щавеля обыкновенного / А.С. Лапик // Растительные ресурсы Сибири, Урала и Дальнего Востока. – Новосибирск: Наука, 1965. – С. 103-105.
57. Лившиц, Н.С. Противовоспалительные и противоожоговые свойства водорастворимого Р-витаминного препарата для инъекций из володушки многожильчатой (*Bupleurum multinerve*) / Н.С. Лившиц, Фетисов А.А. // Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1989, – С. 310-312.

58. Лубсандоржиева, П.Н.Б. Антиоксидантная активность экстрактов *Calendula officinalis* L / П.Н.Б Лубсандоржиева // Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 123-126.
59. Метод экстракции и очистки антоцианов из плодов аронии черноплодной / Л.А. Дейнека [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – №10 (129). – URL: https://cyberleninka.ru/article/n/metod-ekstraktsii-i-ochistki-antotsianov-iz-plodov-aronii-chernoplodnoy. (дата обращения: 02.04.2020).
60. Минаева, В.Г. Лекарственные растения Сибири / В.Г. Минаева. – Новосибирск: Наука, 1991. – 427 с.
61. Минаева, В.Г. Сравнительное изучение флавоноидного состава некоторых сибирских видов володушки / В.Г. Минаева, Т.А. Волхонская, А.Г. Валуцкая // Растительные ресурсы. – 1985. – Т. 21, № 2. – С. 233-235.
62. Минаева, В.Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование / В.Г. Минаева. – Новосибирск: Наука, 1978. – 255 с.
63. Мирович, В.М. Фармакогностическая характеристика володушки золотистой, культивируемой в Иркутской области / В.М. Мирович А.А. Посохина // Инновационные технологии в фармации: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти доцента Пешковой В.А. – Иркутск: ИГМУ, 2018. – С. 181-184.
64. Мирович, В.М. Фитохимическое исследование надземных органов володушки золотистой, культивируемой в условиях Восточной Сибири / В.М. Мирович, А.А. Посохина, И.В. Карсунова // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сборник материалов 6-й международной научно-практической телеконференции. – Белгород, 2016. – С.110.
65. Мирович, В.М. Флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты растительного сбора ангиопротекторного действия / В.М. Мирович, А.А. Посохина,

С.А. Петухова // Инновационные технологии в фармации: сборник научных трудов. – Иркутск: ИГМУ, 2019. – Вып. 6. – С. 296-299.

66. Михайлова, С.И. Динамика накопления флавоноидов в володушке многожильчатой в различных участках ареала / С.И. Михайлова, И.Е. Лобанова // Физиолого-биохимические аспекты изучения лекарственных растений: материалы Международного совещания. – Новосибирск, 1998. – С. 41.
67. Михайлова, С.И. Морфология и анатомия *Bupleurum multinerve* (*Apiaceae*) на Алтае / С.И. Михайлова // Ботанический журнал. – 1989. – Т. 74, № 10. – С. 1455-1461.
68. Некратов, Н.Ф. Запасы сырья *Bupleurum multinerve* dc. на Алтае и экспресс-метод их определения / Н.Ф. Некратов, С.И. Михайлова, Н.А. Некратова // Растительные ресурсы. – 1989. – Т. 25, №. 2. – С. 196-201.
69. Николаев, С.М. Фитофармакотерапия и фитофармакопрофилактика заболеваний / С.М. Николаев. – Улан-Удэ: Издательство Бурятского госуниверситета, 2012. – 286 с.
70. Новые фармакологические свойства препарата буплерина из надземной части *Bupleurum multinerve* DC. / А.С. Саратиков и [др.] // Растительные ресурсы. – 1990. – Т. 26, № 1. – С. 88–90.
71. Определение антимикробной активности извлечений цветков календулы лекарственной / П. В. Афанасьева [и др.] // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4, № 2. – С. 60-70.
72. Пастушенков, Л.В. Растения антигипоксанты (фитотерапия) / Л.В. Пастушенков, Е.Е. Лесиовская. – Санкт-Петербург: Химико-фармацевтический институт, 1991. – 96 с.
73. Пашинский, В.Г. Теория фитотерапии / В.Г. Пашинский. – Томск: Печатная мануфактура, 2014. – 331 с.
74. Патент № 2088254 С 1. Российская Федерация. Лекарственный сбор для лечения и профилактики сосудистых заболеваний / В.Н. Драмограй, П.Г. Швальб. – № 94037907/14; заявл. 04.10.1994; опубл. 27.08.1997.

75. Патент № 2104024 С 1. Российская Федерация. Сбор «Касмин» для профилактики и лечения тромбозов / В.А. Быков [и др.]. – № 96113069/14; заявл. 02.07.1996; опубл. 10.02.1998.
76. Патент № 2241483 С 1. Российская Федерация. Композиция «Ангионорм», обладающая антиагрегационным, капилляропротекторным, венотонизирующим действием / В.К. Колхир, И.В. Воскобойникова. № 2003117111/15; заявл. 10.06.2003; опубл. 10.12.2004.
77. Патент № 2729784. Российская Федерация. Растительный сбор, обладающий антиоксидантным, противовоспалительным и капилляроукрепляющим действием / В.М. Мирович, А.А. Посохина, С.А. Петухова, А.В Цыренжапов. - № 2020100538; заявл. 09.01.2020; опубл. 12.08.2020.
78. Петухова, О. В. Фармакогностическое изучение листьев земляники лесной и садовой региона Урала: автореф. дис. ... канд. фарм. наук / О. В. Петухова – Пермь: ПГФА, 2003. – 24 с.
79. Петухова, С.А. Фармакогностическое исследование володушки козелецелистной (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.) травы и разработка на ее основе экстракта сухого: автореф. дисс. … канд. фарм. наук / С.А. Петухова. – Улан-Удэ, 2018. – С. 22.
80. Пешкова, Г. А. Флорогенетический анализ степной флоры гор Южной Сибири / Г.А. Пешкова. – Новосибирск: Наука, 2001. – 192 с.
81. Полисахаридный и аминокислотный состав наиболее распространенных видов лабазника / М.Ю. Круглова [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2011. – № 5. – С. 14.
82. Посохина, А.А. Антоцианы плодов аронии черноплодной, культивируемой в Прибайкалье / А.А. Посохина, Е.С Костенко, Н.Г Иванкина // Природные соединения и здоровье человека: материалы всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Иркутск, 2019. – С. 57.

83. Посохина, А.А. Изучение флавоноидов надземных органов володушки золотистой, культивируемой в Прибайкалье, методом ВЭЖХ / А.А. Посохина, С.А. Петухова // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 85-ой Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения профессора А.И. Никитина – Иркутск, 2018. – С. 291-292.
84. Посохина, А.А. К разработке растительного сбора ангиопротекторного действия / А.А. Посохина // Природные соединения и здоровье человека: материалы Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Иркутск: ИГМУ, 2019. – Вып. 1. – С. 55.
85. Посохина, А.А. Количественное определение суммы флавоноидов в траве володушки многожильчатой / А.А. Посохина, В.О Макарова // Природные соединения и здоровье человека: материалы Всероссийской научно-практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием. – Иркутск: ИГМУ, 2019. – Вып. 1. – С. 56.
86. Посохина, А.А. Микроскопическое исследование надземных органов володушки золотистой, культивируемой в условиях Прибайкалья / А.А. Посохина, С.А. Петухова, В.М. Мирович // Ohtyctik Казахтсан Memлекettik фармацевтика Академиясы хабарши. – Т. 4, № 4(81). – 2017. - С. 106-109.
87. Посохина, А.А. Накопление полифенольных соединений в надземных органах володушки золотистой, культивируемой в Прибайкалье / А.А. Посохина, И.В. Карсунова // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 84-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Иркутск: ИНЦХТ, 2017. – С.287-288.
88. Посохина, А.А. Определение норм товароведческих показателей в сборе ангиопротекторном / А.А. Посохина // Природные соединения и здоровье

человека: материалы научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Иркутск, 2020. – С. 123-127.

89. Посохина, А.А. Разработка показателей подлинности растительного сбора ангиопротекторного / А.А. Посохина // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 87-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Иркутск: ИНЦХТ, 2020. – С. 77.
90. Посохина, А.А. Содержание фенольных соединений в растительном сборе «Ангиофит» / А.А. Посохина // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 86-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, посвященной 100-летию ИГМУ. – Иркутск: ИНЦХТ, 2019. - С. 628-629.
91. Покровский, А. В. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей-современные проблемы диагностики, классификации, лечения / А.В. Покровский, С.В. Сапелкин //Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. – Т. 9. – №. 1. – С. 53-60.
92. Потанина, О.Г. Совершенствование требований к разработке общих фармакопейных методов анализа лекарственного растительного сырья / О.Г. Потанина, И.А. Самылина // Фармация. – 2011. – №. 3. – С. 46-47.
93. Разработка состава фитогеля венотонизирующего действия / Е. В. Иванова [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2015. – №. 1 (53). – С. 114-116.
94. Разработка технологии получения сухого экстракта семян конского каштана обыкновенного *Aescuhis hippocastanum* и его стандартизация / О.Г. Жарова [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. -– 2008. - № 7. – С. 605-609.
95. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность / ответственный

редактор А.Л. Буданцев. – СПб., М.: Товарищество научных изданий ИМК, 2010. – Т.3: Семейство Fabaceae – Apiaceae. – 601 с.

96. Разработка состава и технологии получения геля на основе арники облиственной и каштана конского сухих экстрактов/ О.А. Семкина [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – М., 2014. – № 6. – С. 62-63.

97. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению хронических заболеваний вен / Стойко Ю.М. [и др.] // Флебология. – 2018. - № 3. – С. 148-238.

98. Сагарадзе, В.А. Разработка методики количественного суммы флавоноидов в траве володушки золотистой / В.А. Сагарадзе // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2016. – № 2(12). – С.35-39.

99. Садикова, В.К. Диуретическая и нейротропная активность суммы фенольных соединений листьев земляники лесной / В. К. Садикова, М. М. Коноплева // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 66-й науч. сессии сотрудников университета, 27-28 января 2011 г. - Витебск: ВГМУ, 2011. - С. 41-42.

100. Самбаров, А.Л. Фармакогностическое исследование очанки гребенчатой (Euphrasia pectinate Ten), произрастающей в Восточной Сибири: автореф. дисс. … канд. фарм. наук / А.Л. Самбаров. – Иркутск, 2015. – 20 с.

101. Самылина, И.А. Лекарственные растительные сборы / И.А. Самылина, А.А. Сорокина, Н.В. Пятигорская // Фарматека. – 2010. – № 10. – С. 80-82.

102. Самылина, И.А. Перспективы создания сухих экстрактов / И.А. Самылина, О.А. Блинова, А.А. Марченко // Фармация. – 2006. – № 2. – С. 43-46.

103. Современные подходы к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств растительного происхождения в России и за

рубежом / Е.И. Саканян [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. - № 1. – С. 35-39.

104. Соболевская, Л.А. Володушки Западной Сибири как источник биофлавоноидов / Л.А. Соболевская, Т.А. Волхонская, В.Г. Минаева // Полезные растения природной флоры Сибири. – Новосибирск, 1967. – С. 92–99.

105. Соболевская, Л.А. Эфирномасличные растения сем. зонтичных во флоре Западной Сибири / Л.А. Соболевская, Е.В. Тюрина, И.Н. Гуськова // Растительные ресурсы. – 1973. – Т. 9, № 1. – С. 68–72.

106. Современные требования к стандартизации грудных сборов, их компонентов и лекарственных средств на их основе / А.А. Скибина [и др.] // Традиционная медицина. – 2019. – № 1 (56). – С. 30-39.

107. Сравнительный анализ мембранстабилизирующего действия препаратов плодов рябины черноплодной / Е.Е. Логвинова [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. – № 4. – С. 126-129.

108. Турова, А.Д. Лекарственные растения СССР и Вьетнама / А.Д. Турова, Э.Н. Сапожникова, Л. Вьен Дыок. – М.: Медицина, 1987. – 464 с.

109. Фармакологические свойства галеновых препаратов цветков *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / О.Д. Барнаулов [и др.] // Растительные ресурсы. – 1979. – Т. 15, Вып. 3. – С. 399-407.

110. Федосеева Г.М. Способ определения полифенольных соединений: авторское свидетельство 1215708 СССР / Федосеева Г.М. – заявлен 07.08.1981; опубликован 03.07.1986.

111. Фитотерапия: методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации / А.А. Карпеев [и др.]. – М.: Изд-во НПЦ ТМГ МЗ РФ, 2000. – 28 с.

112. Флавоноиды и фенилпропаноиды надземных органов володушки многожилковой (*Bupleurum multinerve* DC.) флоры Прибайкалья / С.А.

Петухова, В.М. Мирович, Д.Н. Оленников, А.А. Посохина // Химия растительного сырья. – 2020. – № 4. – С. 121-128.

113. Флавоноиды представителей рода Bupleurum L. южных районов Центральной Сибири / С.А. Петухова [и др.] // Ohtyctik казахтсан memлекettik фармацевтика академиясы хабарши. – 2016. –Т. 23, № 4 (77). – С. 96-97.

114. Химический состав и анатомо-диагностические признаки плодов аронии черноплодной (*Aroniae melanocarpae* (Michx.) Elliott.), культивируемой в Прибайкалье / В.М. Мирович, А.А. Посохина, Е.С. Костенко, Н.Г. Иванкина // Инновационные технологии в фармации: сборник научных трудов. – Иркутск, 2019. – С. 274-277.

115. Химический состав и биологическая активность фракции экстракта лабазника вязолистного / И.В Шилова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, № 4. – С. 7-11.

116. Химический состав и первичная оценка фармакологических свойств препаратов из цветков *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim / О. Д. Барнаулов [и др.] // Растительные ресурсы. -— 1977. – Т. 13, Вып. 4. - С. 661–669.

117. Химические элементы и аминокислоты в жизни растений, животных и человека / под ред. П.А. Власюк. – Киев, 1079. – С. 47-48.

118. Химический состав лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов / Е.А. Ладыгина, Л.Н. Сафронич. – М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.

119. Хроматография на бумаге / под ред. И.М. Хайса и К. Мацека. – М., 1962. – 851 с.

120. Цыденбаев, П.Б. Биологические эффекты флавоноидов / П.Б. ЦыденбаевЮ Б.С. Хышитуев, С.М. Николаев // Бюллетень ВСНЦ РАМН. – 2006. – № 6 (52). – С. 229-233.

121. Ahmad, H. Antiglycation and antioxidation properties of Juglans regia and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and

slowing down ageing / Ahmad H., I. Khan, A. Wahid // Journal of Traditional Chinese Medicine. – 2012. – Vol. 32, N 3. – P. 411-414.

122. Altantsetseg, S. Comparative study of essential oil constituents of *Bupleurum species* from Mongolia / S. Altantsetseg, S. Shatar, N.Javzmaa // Mongolian Journal of Chemistry. - 2012. - Vol. 13. - Pp. 28-30. DOI: 10.5564/mjc.v13i0.156.

123. An investigation of CO2 extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.) / L. Petrović [et al.] // Journal of the Serbian Chemical Society. – 2007. – Vol. 72, N 4. – P. 407-413.

124. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin / Perez-Vizcaino Francisco [et al.] // Pharmacological Reports. – 2009. – Vol. 61. – P. 67–75.

125. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers / M.Ukiya [et al.] // Journal of natural products. – 2006. – Vol. 69, N 12. – P. 1692-1696.

126. Antimicrobial activity of aqueous, acetone and methanol extracts of *Calendula officinalis* L. (Marigold) flower / P. Chandurkar [et al.] // International Journal of Pure & Applied Bioscience. – 2015. -– Vol. 3, N 2. – P. 386-388.

127. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens / E.Efstratios [et al.] // Complementary Therapies in Clinical Practice. – 2012. – Vol. 18. – - P. 173-176.

128. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.) / K. Zitterl-Eglseer [et al.] // Journal of ethnopharmacology. – 1997. – Vol. 57, N 2. – P. 139-144.

129. Antioxidant activity of *Aronia melanocarpa* fruit juice in vitro / S.Valcheva-Kuzmanova [et al.] // Acta alimentaria. – 2007. – T. 36, N 4. – C. 425-428.

130. Bermúdez-Soto M.J. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion / M.J

Bermúdez-Soto, F.A. Tomás-Barberán., M.T. García-Conesa // Food chemistry. – 2007. – Vol. 102, N 3. – P. 865-874.

131. Bioactivity of *Fragaria vesca* leaves through inflammation, proteasome and autophagy modulation / J. Liberal [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 158. – P. 113–122.

132. Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: in vitro and in vivo evidences and possible mechanisms of action: a review / P. N. Denev [et al.] // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2012. – Vol. 11, N 5. – P. 471-489.

133. Carbonnier J. A comparative phytochemical investigation of the genus *Bupleurum* L. (*Umbelliferae*) / J. A. Carbonnier, A. M. Cauwet-Marc // Taxon. – 1981. – Vol. 30, N 3. – Pp. 617-627. DOI: 10.2307/1219944.

134. Chlorogenic acid, rutin and hyperoside content in *Fragaria vesca*, *F. viridis* and *F. moschata* in Lithuania / E. Bagdonaite [et al.] // Natural Product Research. – 2012. – Vol. 27 (2). – P. 181-184.

135. Clinical, ultrasonographic and histological findings in varicose vein surgery / Moacir de Mello Porciunculla [et al.] // REV ASSOC MED BRAS. – 2018 - N 64(8). – P.729-735.

136. Das, S. Comparative study of anti-inflammatory activities of whole plant and fruit extracts of *Fragaria vesca* in experimental animal models / S. Das, L. Kanodia // Journal of Natural Pharmaceuticals. – 2011. – Vol. 2 (1). – P. 20–23.

137. Effects of *Aronia melanocarpa* constituents on biofilm formation of Escherichia coli and Bacillus cereus / M.Bräunlich [et al.] // Molecules. – 2013. – Vol. 18, N 12. – P. 14989-14999.

138. Ehlers, V.B. Chemical investigation of the New England horse chestnut, *Aesculus hippocastanum* / V.B Ehlers, G.A. Hill. // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1951. – Vol. 28, N 2. – P. 45-46.

139. Extracts, anthocyanins and procyanidins from Aronia melanocarpa as radical scavengers and enzyme inhibitors / M. Bräunlich. [et al.] // Nutrients. – 2013. – Vol. 5, N 3. – P. 663-678.

140. Farahpour M.R. Antioxidant activity, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Pot marigold hydroalcoholic extract on experimental animals / M. R. Farahpour // Inter. J. Pharm. Tech. Res. – 2014. – Vol. 1. – C. 974-4304.

141. Flavonoids from black chokeberries, Aronia melanocarpa / R.Slimestad [et al.] // Journal of Food Composition and Analysis. – 2005. – Vol. 18, N 1. – P. 61-68.

142. Ghaima K.K. Antibiofilm, antibacterial and antioxidant activities of water extract of *Calendula officinalis* flowers / K.K. Ghaima, S.F. Rasheed, E.F. Ahmed // International Journal of Biological & Pharmaceutical Research. - 2013. - Vol. 4, N 7. - P. 465–470.

143. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats / Valcheva-Kuzmanova S. [et al.] // Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology. – 2007. – Vol. 29, N 2. – P. 101-106.

144. Immunomodulating activity of *Aronia melanocarpa* polyphenols / G. T.T Ho. [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2014. – Vol. 15, N 7. – P. 11626-11636.

145. Impact of chronic venous disease on quality of life: Results of vein alarm study /E.B. Daciana [et al.] // EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE. – 2019. -Vol. 17. – P.1091-1096.

146. In vitro hypoglycemic, antioxidant and antineurodegenerative activity of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) leaves / G. Zdunić [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2020. – Vol. 148. – P. 112328.

147. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia / G. Rigane [et al.] // International Food Research Journal. – 2013. – Vol. 20, N 6. – P. 3001.

148. Investigation of *Aesculus hippocastanum* L tincture on the content of trace elements and pro-antioxidant status of organism in rats with adjuvant arthritis / A. Vasiliauskas [et al.] // Trace Elements & Electrolytes. – 2011. – Vol. 28, N 4. – P. 199-207.

149. Investigation of *Calendula officinalis* whole plant as a gastroprotective and antioxidant in peptic ulcer / A. K. Yadav [et al.] // Br J. Med Health Res. – 2016. – Vol. 3, N 7. – P. 67-76.

150. Isorhamnetin and quercetin derivatives as anti-acetylcholinesterase principles of marigold (*Calendula officinalis*) flowers and preparations/ Olennikov D. N. [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2017. – Vol. 18, N 8. – P. 1685.

151. Junji, T. P Vegetable flavonoids and cardiovascular disease / T. P. Junji, K.P. Yoshichika., M. Kaeko // Asia Pac J. Clin Nutr. - 2008. – Vol. 17. – P.291-293.

152. Kalvatchev, Z. Anti-HIV activity of extracts from Calendula officinalis flowers / Z. Kalvatchev, R. Walder, D. Garzaro // Biomedicine & pharmacotherapy. – 1997. – Vol. 51, N 4. – P. 176-180.

153. Kashchenko, N. I. Spectrophotometric analysis of phenolic compounds medicinal calendulas (*Calendula officinalis* L.). Revision study of existing methods / N. I. Kashchenko, D. N. Olennikov // Butlerov Communications. – 2014. – Vol. 37, N 1. – P. 146-155.

154. Kozłowska, A. Flavonoids - food sources and health benefits / A. Kozłowska, D. Szostak-Węgierek // Rocz Panstw Zakl Hig. – 2014. – Vol. 65(2). – P.79-85.

155. Min-Hsiung, Pan. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids / Pan Min-Hsiung, Laia Ching-Shu, Ho Chi-Tang // The Royal Society of Chemistry.2ood Funct. – 2010. – N 1. - P.15–31.

156. Muley, B.P. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (*Asteraceae*): a review / B. P. Muley, S.S.

Khadabadi, N.B. Banarase. // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2009. –Vol. 8, N 5. – P. 455-465.

157. Nekratova, N. A., Resources of medicinal plants in the Kuznetsky Alatau / N. A. Nekratova, M. N. Shurupova // International journal of environmental studies. – 2014. – Vol. 71, N 5. – Pp. 656-666. DOI: 10.1080/00207233.2014.944790.

158. New pharmacological properties of *Bupleurum* from the aerial part of *Bupleurum multinerve* DC / A. S. Saratikov [et al.] // Rastitel'nye Resursy. – 1990. – Vol. 26, N 1. – P. 88-90.

159. Olennikov, D.N. New quercetin glucoside and other phenolic compounds from *Filipendula* genus. / D.N. Olennikov, M.Y. Kruglova// Chem. Nat. – 2013. – Vol. 49. - P. 524-529.

160. Olennikov, D. N. Flavonoids and phenylpropanoids from several species of *Bupleurum growing* in Buryatia / D. N Olennikov, V. V. Partilkhaev // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – Vol. 48, N6. – Pp. 1078-1082. DOI: 10.1007/s10600-013-0471-x.

161. Olennikov, D. N. New esculetin glycoside from *Calendula officinalis* (*Asteraceae*) and its bioactivity / D. N. Olennikov, N. I. Kashchenko, C. A Vennos // Farmacia. – 2017. – Vol. 65, N 5. – P. 698-702.

162. Pimenov, M. G. Proposal to conserve the name *Bupleurum multinerve* against *B. striatum* (*Umbelliferae*) / M. G. Pimenov. // Taxon. – 2017. - Vol. 66, N5. – Pp. 1230-1231. DOI: 10.12705/665.26.

163. Preethi, K.C. Wound healing activity of flower extract of *Calendula offlcinalis* / K.C., Preethi R.Kuttan // Journal of basic and clinical physiology and pharmacology. – 2009. – Vol. 20, N1. – P. 73-80.

164. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*) / M. Hamburger [et al.] // Fitoterapia. – 2003. – Vol. 74, N 4. – P. 328-338.

165. Study on essential oil composition and antimicrobial, antioxidant activities of *Bupleurum multinerve* L. / J. I. Irekhbayar [et al.] // Planta Medica. – 2009. – Vol. 75, N 9. – P. PJ109.

166. The risk of recurrent venous thromboembolism afterdis continuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients / P. Prandoni [et al.] // Haematologica. – 2007. – Vol. 92. – P.199-205.

167. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers / M. Hamburger [et al.] // Planta medica. – 1994. – Vol. 60, N 6. – P. 516-520.

168. Topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis extracts* / R. Della Loggia [et al.] // Planta Médica. – 1990. – Vol. 56, N 6. – P. 658-658.

169. Total phenolic content and antioxidant activity of ethanolic extracts of *Aesculus hippocastanum* L / S Otajagić. [et al.] // Glas hem tehnol Bosne Hereg. – 2012. – Vol. 38. – P. 35-38.

170. VCP Coordinators. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program / Rabe E. [et al.] // Int. Angiol. – 2012. – N 1(2). P. 105-115.

171. Young Jin Youn, Chronic venous insufciency and varicose veins of the lower extremities / Jin Youn Young, Lee Juyong // Korean J Intern Med. – 2019. – Vol. 34. - P. 269-283.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

БХ – бумажная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ – Государственная фармакопея

МК-ВЭЖХ-УФ – микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

РФ – Российская федерация

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с диодноматричным и масс-спектрометрическим детектированием

ФС – фармакопейная статья

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ЭГКГ – эпигаллокатехингаллат

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**УТВЕРЖДАЮ**
**Руководитель Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России**
**_____ Ф.И.О.**
**"___" _____ _____ г.**

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**(ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет»)**

---

**Сбор ангиопротекторный** **ФСП. 2.5.0000.21**
**Вводится впервые**

---

Срок введения установлен

с «___» _____г.

до «___» _____г.

Состав сбора (г):
Володушки многожилковой трава (*Bupleuri multinervis herba*) – 20,0
Каштана конского семена (*Aesculi hippocastani semina*) – 20,0
Лобазника вязолистного цветки (*Filipendulae ulmariae flores*) – 30,0
Аронии черноплодной плоды сухие (*Aroniae melanocarpae sicco fructus)* – 10,0
Земляники лесной листья (*Fragariae vescae folia*) – 10,0
Календулы лекарственной цветки (*Calendulae officinalis flores*) – 10,0

Настоящая фармакопейная статья распространяется на сбор ангиопротекторный, полученный из нескольких компонентов растительного сырья, обладающий противовоспалительным, антиоксидантным, капилляроукрепляющим действием.

ПОДЛИННОСТЬ

***Внешние признаки.*** *Измельченное сырье.* Внешние признаки. Смесь кусочков листьев, стеблей, цветков, плодов с размером частиц размером до 7 мм. При рассмотрении сбора ангиопротекторного с использованием лупы (х10) или стереомикроскопа (х16) видны:

- кусочки листьев с гладкой поверхностью без волосков, кусочки круглых стеблей с ребристой поверхностью зеленого или грязно-зеленого цвета, листочки - обвертки обратнояйцевидной формы бледно-желтого цвета размером 4-6 мм, плоды вислоплодники, распадающиеся на 2 мерикарпия размером 2-3 мм. Данные признаки характерны для травы володушки многожилковой (*B. multinerve*);

- кусочки листьев и черешков, опушенных сероватыми волосками. Поверхность листа имеет жилки желтоватого цвета, поверхность листьев зеленого или серовато-зеленого цвета, что соответствует листьям земляники лесной (*F. vesca*);

- кусочки плодов часто сморщенные, черно-синего цвета с сизоватым оттенком, встречаются кусочки плода с волосками паутинистыми, семена обратно-яйцевидные, продольно-морщинистые размером до 3 мм, красновато-коричневые. Указанные признаки соответствуют плодам аронии черноплодной (*A. melanocarpa*);

- кусочки семян различной формы белого или желтоватого цвета с остатками темно-коричневой кожуры, которые являются отличительной особенностью каштана конского (*Ae. hippocastanum*);

- кусочки цветоножек, цветков, бутонов, недозрелых плодиков, лепестки цветков мелкие желто-белого цвета, указывающие на наличие в сборе цветков лобазника вязолистного (*F. ulmaria*);

- кусочки цветоложа, обвертки корзинки опушенные, серовато-зеленого цвета, язычковые цветки на верхушке трехзубчатые, трубчатые цветки - пятизубчатые, цвет язычковых и трубчатых цветков красновато-

оранжевый, желтый, бледно-желтый. Описание характерно для цветков календулы лекарственной (*C. officinalis*).

***Микроскопические признаки.*** *Измельченное сырье* (рис.1). При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты листьев стеблевых, прикорневых, прицветных и стеблей, клетки эпидермиса прямостенные или извилистые, устьица анизоцитного типа (окружены тремя клетками, одна из которых меньше по размеру), жилки сопровождаются млечниками с желтым или коричневым содержимым; элементы цветка, особенно чашелистики имеют широкие членистые млечники (*B. multinerve*);

фрагменты листьев с длинными толстостенными одноклеточными волосками, у основания волоски суживаются и наклонены к поверхности листовой пластинки, волоски на 2-3 клеточной ножке с овальной железистой головкой, по жилкам располагаются кристаллы оксалата кальция ромбовидной формы и друзы (*F. vesca*);

- фрагменты плода розово-фиолетового цвета, клетки эпидермиса полигональной формы, имеются одноклеточные тонкие извилистые волоски, в мезокарпии встречаются каменистые клетки с неравномерно утолщенными стенками, склереиды расположены группами с пористыми стенками, в мякоти которых имеются тяжи мелких призматических кристаллов и друз (*A. melanocarpa*)

- фрагменты семени представлены крупными изодиаметричными клетками, заполненных крахмальными зернами, образующее синее окрашивание от раствора Люголя (*Ae. hippocastanum*);

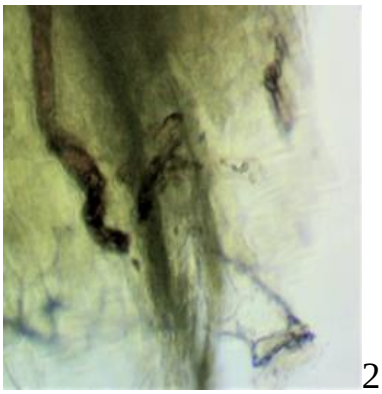
- фрагменты цветков - чашечки со слабо извилистым эпидермисом и одноклеточными волосками, лепестки с сосочковидным эпидермисом, элементы завязей, покрытые пучком одноклеточных остроконечных волосков, тычиночные нити, зерна пыльцы имеют мелкую шаровидную форму (*F. ulmaria*);

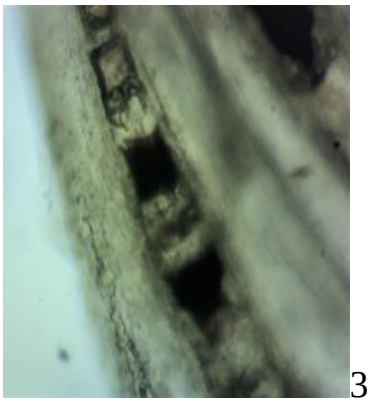
- элементы корзинок, язычковые и трубчатые цветки с простыми и железистыми одно- и двухрядными волосками, у железистых волосков

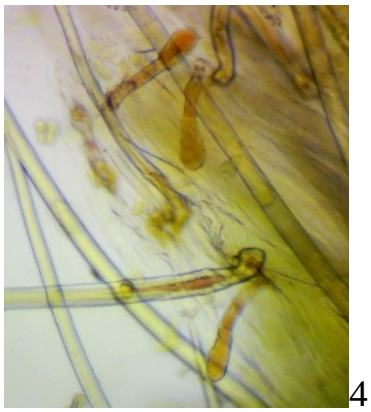
головка 2-4-8 рядная, на листочках обвертки могут, кроме того, встречаться ветвистые волоски, элементы тычиночных нитей, пыльца округлая или четырехгранная шиповатая (*C. officinalis*).

*Порошок.* При рассмотрении микропрепаратов видны фрагменты листьев, стеблей, цветка с млечниками, фрагменты листьев с длинными простыми волосками, каменистые клетки и склереиды, изодиаметричные клетки с крахмальными зернами, фрагменты чашелистиков и обвертки с одноклеточными, многоклеточными двухрядными и железистыми волосками, фрагменты завязей с одноклеточными волосками, тычиночные нити, пыльца шаровидная, четырехгранная шиповатая, фрагменты лепестков цветков с сосочковидным эпидермисом с простыми двухрядными, железистыми волосками или без них (рис.2).

1


2


3


4

5

6

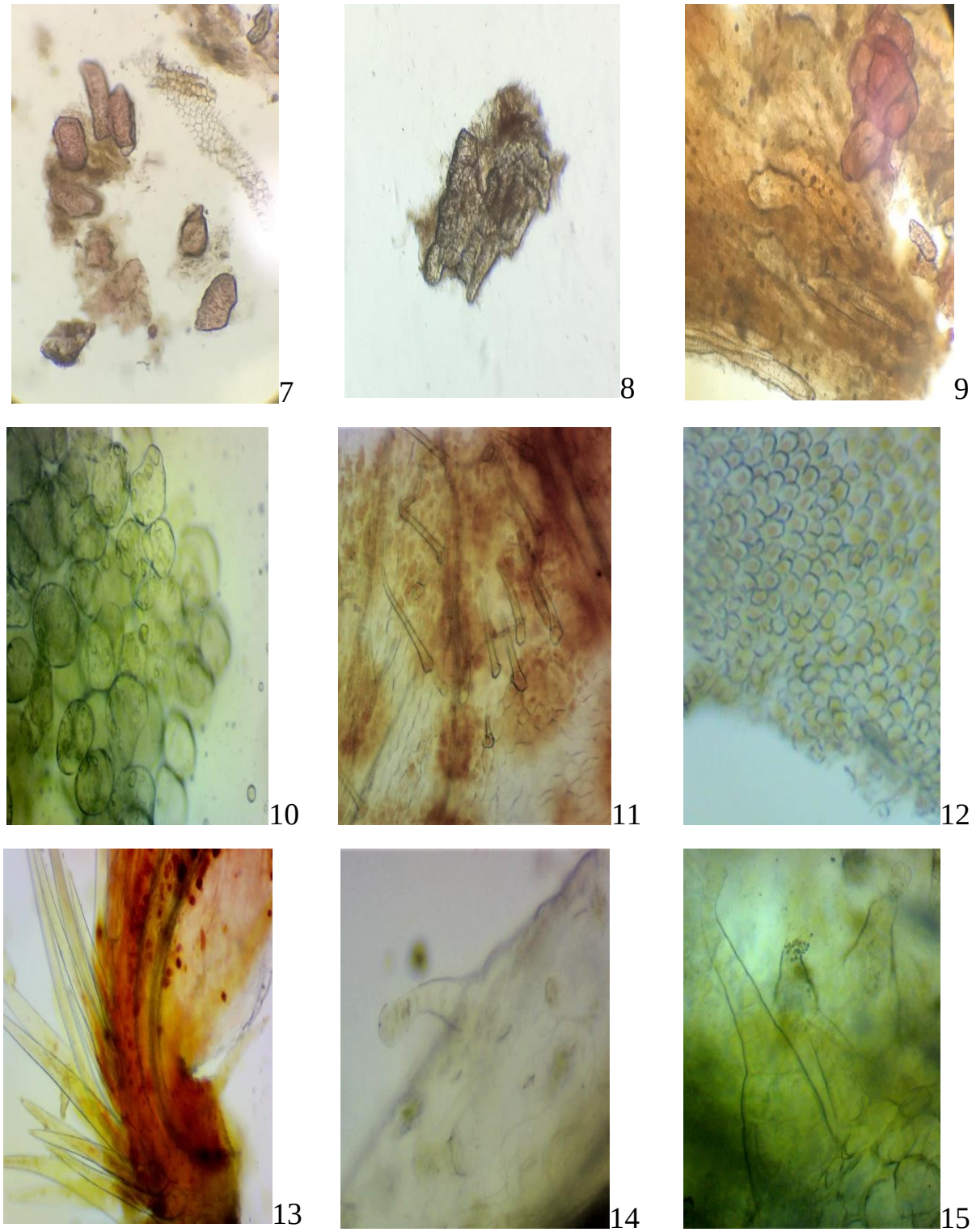



Рисунок 1 – Микроскопия измельченного сырья сбора ангиопротекторного *B. multinerve*: 1- эпидермис листа (х200), 2- жилка листа с млечником (х180), 3 - чашечка с млечником (х180); *F. vesca*: 4 - простые и железистые волоски (х180), 5 – основание простого волоска (х200), 6 – друзы и ромбовидные кристаллы (х200); *A. melanocarpa*: 7 – каменистые клетки мезокарпия плода, 8 – склереиды мезокарпия плода, 9 – мелкие друзы плода, образующие тяжи; *Ae. hippocastanum*: 10. – паренхимные клетки с крахмалом семени; *F. ulmaria*: 11 - волоски чашечки (х180), 12 – эпидермис лепестков (х200), 13 – основание завязи (х200); *C. officinalis*: 14 – железистый волосок язычкового цветка, 15 – волосок трубчатого цветка.

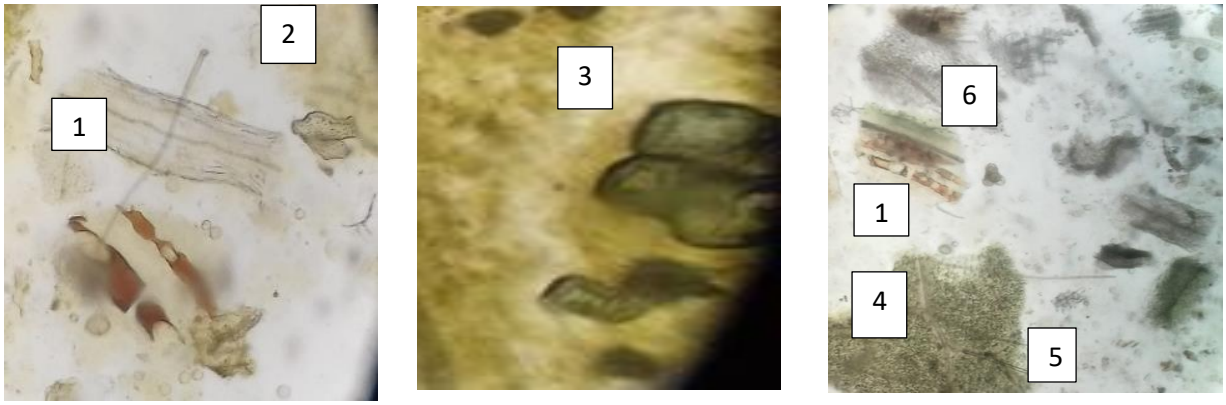



Рисунок 2 - Микроскопия сбора ангиопротекторного порошка:

1 – млечники *B. multinerve*; 2 - склереиды, 3 – каменистые клетки *A. melanocarpa*, 4 – фрагмент листа *F. vesca*, 5- клетки семени *Ae. hippocastanum*, 6 – элементы *C. officinalis*.

**Определение основных групп биологически активных веществ**

*Качественные реакции.*

*Получение извлечения*. Около 1 г сбора, измельченного до размера частиц 2 мм, помещают в колбу на 50 мл, прибавляют 30 мл 70% спирта этилового, нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут, охлаждают, фильтруют, проводят следующие реакции:

- 15 мл полученного извлечения помещают в фарфоровую чашку и упаривают до объема 3 мл. К 3 мл раствора прибавляют 1 мл 1% спиртового раствора $AlCl_3$.Постепенно наблюдается появление желтого окрашивания (флавоноиды).

- 1 мл полученного извлечения помещают в пробирку, осторожно по стенкам прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты 1 мл ванилина в растворе серной кислоты, перемешивают, затем прибавляют 1 мл воды для разбавления, наблюдают появление малиново-красного окрашивания (тритерпеновые соединения).

***Тонкослойная хроматография***

*Приготовление растворов.*

*Получение извлечения*. К 1,0 г сбора, измельченного до частиц размером 1 мм прибавляют 10 мл 70% спирта этилового, экстракцию проводят на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения извлечение фильтруют.

*Раствор сравнения СО рутина 0,004%*. Навеску 0,04 г СО рутина растворяют в 10 мл 50% спирта этилового при нагревании. Полученный раствор охлаждают, срок годности 3 месяца.

*Раствор сравнения СО кверцетина 0,005%*. Навеску 0,05 г СО кверцетина растворяют в 10 мл 96% спирта этилового при нагревании. Полученный раствор охлаждают, срок годности 3 месяца.

*Пластинка:* ТСХ: пластинка со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10х10 см (Sorbfil).

*Подвижная фаза:* н-бутанол – уксусная кислота ледяная– вода (4:1:2).

*Наносимый объем пробы:* по 10 мкл в виде полос.

*Фронт подвижной фазы:* не менее 8 см от линии старта.

*Высушивание:* при температуре от 100 до 105°С.

*Проявление:* пластинку опрыскивают 1% спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают 2-3 минуты при 100°–105°С. Через 15 мин пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

Около 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц 2 мм, экстрагируют 20мл 70% спирта этилового в конической колбе, объемом 50 мл, нагревают на водяной бане в течение 20 мин. Затем полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр и концентрируют в выпарительной чашке при нагревании на водяной бане до 2 мл.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого извлечения в виде полосы 1 см и по 5 мкл растворов стандартных образцов рутина и кверцетина. Пластинку сушат на воздухе и помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную системой растворителей н-бутанол-уксусная кислота лед.-вода (4:1:2) в течение 60 минут. Проводят хроматографирование восходящим

способом, как только растворитель пройдет 80% длины пластинки ее вынимают и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

Хроматограмму просматривают в УФ свете (360 нм), зона СО рутина окрашена в желтый цвет, зона СО кверцетина желто-зеленого цвета. Хроматографическую пластинку обрабатывают 1% спиртовым раствором $AlCl_3$, высушивают и нагревают 5 минут в сушильном шкафу при 100-105$^0$С. Пластинку рассматривают в УФ свете (360 нм). Зоны СО рутина и СО кверцетина имеют желто-зеленую флюоресценцию. В зоне извлечения имеются пятна на уровне зоны СО рутина и СО кверцетина, между зонами стандартных образцов 2-3 пятна желтого цвета и 1 пятно красно-фиолетового цвета, ниже зоны СО рутина допускается 1-2 зоны желтого цвета.

## ИСПЫТАНИЯ

***Влажность.*** *Измельченное сырье, порошок* – не более 10%.

**Зола общая.** *Измельченное сырье, порошок* – не более 11%.

**Золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте 10%.** *Измельченное сырье, порошок* – не более 3,5%.

**Измельченность сырья.** *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм – не более 5%, частиц. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм – не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм - не более 5%.

**Посторонние примеси**

***Частиц сырья, утративших окраску (побуревшие, почерневшие, выцветшие).*** *Измельченное сырье* – не более 3%.

***Органическая примесь.*** *Измельченное сырье* – не более 1%.

***Минеральная примесь.*** *Измельченное сырье, порошок*– не более 1%.

***Тяжелые металлы.*** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

***Радионуклиды.*** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов 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.** *Измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 3%, суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете 3-*О*-кофеилхинную кислоту – не менее 2,5%, экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 20%, экстрактивных веществ, извлекаемых 40% спиртом этиловым – не менее 35%.

***Сумма флавоноидов.***

*Приготовление растворов.*

*Раствор СО рутина*. Испытуемый раствор: 1мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 1% спиртового раствора алюминия хлорида 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят колбу до метки 96% спиртом этиловым.

*Раствор сравнения*. 1 мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Оптическую плотность измеряют через 45 минут при длине волны 415 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Навеску сбора около 1,0000 г, измельченного до частиц размером 1-2 мм, помещают в колбу объемом 250 мл и прибавляют 100 мл 40% спирта этилового, далее колбу присоединяют к обратному холодильнику. Экстракцию проводят на кипящей водяной бане в течение 1 часа, извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, при этом отбрасывают первые 10 мл фильтрата.

В 2 мерные колбы объемом 25 мл помещают по 1 мл фильтрата. В первую колбу добавляют 1 мл 1% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Во вторую колбу (раствор сравнения) к 1 мл фильтрата добавляют, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Измерение оптической плотности проводят через 45 минут на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по формуле:

$$X=\frac{D\cdot m_0\cdot V_1\cdot V_2\cdot V_3\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot V_4\cdot V_5\cdot V_6\cdot(100-W)}=\frac{D\cdot m_0\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot(100-W)},$$

где $V_1$- объем извлечения, 100 мл; $V_2$- объем разведения извлечения, 25 мл; $V_3$ – аликвота раствора СО рутина, 1мл; $V_4$ – аликвота извлечения, 1 мл; $V_5$ – объем разведения СО рутина, 25 мл; $V_6$ – объем СО рутина, 50 мл; m – масса сырья в г; $m_0$ – масса рутина в г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

Допускается в расчетах использование удельного показателя поглощения рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X=\frac{D\cdot 100\cdot 25\cdot 100}{E_{1см}^{1\%}\cdot m\cdot 2\cdot(100-W)}$$

где D - оптическая плотность извлечения; $E_{1см}^{1\%}$ удельный показатель поглощения рутина с $AlCl_3$ при λ=415 нм в 96% спирте этиловом, равный 248; $m$ – навеска сырья, г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

***Примечания***

*Приготовление СО рутина*. Около 0,0500 г рутина помещают в мерную колбу объемом 100 мл и добавляют 80 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до растворения и охлаждают. Далее раствор доводят до метки 96% спиртом этиловым.

*Приготовление 1% спиртового раствора алюминия хлорида.* 1 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл 95% этилового спирта доводят до требуемого объема раствора тем же растворителем, перемешивают.

***Сумма фенолкарбоновых кислот.***

Навеску сбора около 1,0000 г, измельченного до частиц 1-2 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, приливают 100 мл спирта этилового 40%. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают 1 час на кипящей водяной бане. Содержимое колбы охлаждают и фильтруют, получают раствор А (для анализа можно применить извлечение, получаемое при количественном определении суммы флавоноидов).

Далее 1 мл раствора А переносят в мерную колбу объемом 100 мл, которую доводят до метки 96% спиртом этиловым, получают раствор Б. Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при 325 нм. Толщина измеряемого слоя 10 мм, раствор сравнения 96% спирт этиловый.

Количество суммы фенолкарбоновых кислот в абсолютно сухом сырье в пересчёте на 3-*O*-кофеилхинную кислоту, в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X=\frac{D\cdot 100\cdot 100\cdot 100}{m\cdot 504\cdot 1\cdot (100-W)}=\frac{D\cdot 10000\cdot 100}{m\cdot 504\cdot (100-W)}$$

где $D$ – оптическая плотность испытуемого раствора; $m$ – масса сырья, г; 504 – удельный показатель поглощения 3-*O*-кофеилхинной кислоты в 96% спирте этиловом; $W$ – абсолютная влажность сбора, %.

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Хранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**УТВЕРЖДАЮ**
**Руководитель Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России**
**_____ Ф.И.О.**
**"___" _____ _____ г.**

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**
**(Проект)**

**Володушки многожилковой трава** **ФС. 2.5.0000.21**
***Bupleuri mutinerve herba*** **Вводится впервые**
**взамен ВФС 42-580-76**

Срок введения установлен

с «___» _____г.

до «___» _____г.

Собранная в фазу цветения и высушенная надземная часть многолетнего травянистого растения володушки многожилковой – *Bupleurum mutinerve DC*. сем. зонтичных – *Apiaceae.*

ПОДЛИННОСТЬ

***Внешние признаки.*** *Цельное сырье.* Облиственные стебли с бутонами, цветками и плодами, частично осыпавшимися. Стеблей несколько или одиночный, они прямые, простые или ветвистые в верхней части. Прикорневые и нижние стеблевые листья ланцетовидные или линейно – ланцетовидные 5-7 нервные, суженные к основанию в длинный черешок. Средние и верхние стеблевые листья сидячие, в нижней части яйцевидно-расширенные с сердцевидным, стеблеобъемлющим основанием. Цветки мелкие пятимерные с желтым венчиком собраны в многоцветковые соцветия

зонтички, они крупные с 5-15 лучами. Обертки состоят из 2-4 крупных, неравных между собой листочков с заостренной верхушкой. Плоды – вислоплодники овальные, длиной 3-4 см, сжатые с боков, с двумя бороздками, более или менее крылатыми ребрами. Цвет стеблей и листьев серовато-зеленый, венчиков – желтый. Запах слабый своеобразный.

*Измельченное сырье.* Кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки стебля цилиндрической формы с волокнистыми остатками черешков. Поверхность стебля – серовато-зеленая; кусочки листьев – светло-зеленые или серовато-зеленые, голые, с параллельными жилками; цветки или их части: зубцы чашечки малозаметные, лепестки венчика мелкие желтого цвета.

Цвет измельченного сырья светло-зеленый. Запах слабый своеобразный. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

*Порошок.* Кусочки стеблей, листьев и соцветий, фрагменты цветков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1-2 мм.

При рассмотрении порошка под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки серовато-зеленого стебля, светло зеленые частицы листьев и чашечки, фрагменты желтого венчика.

Цвет порошка от серовато-зеленого до светло-зеленого с многочисленными желтыми вкраплениями. Запах слабый своеобразный. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

**Микроскопические признаки.** *Цельное, измельченное сырье* (рис.1). При рассмотрении препаратов листа с верхней стороны видны клетки эпидермиса со слабо извилистыми стенками, местами они прямостенные прямоугольные. Стенки клеток эпидермиса имеют четковидные утолщения. Устьица погруженные и окружены тремя клетками, одна из которых значительно меньше по размеру (анизоцитный тип). Слабо извилистые эпидермальные клетки характерны для центральной части листа, а, ближе к

периферии имеют четырехугольную изодиаметричную форму; по краю листа клетки эпидермиса вытянутые, прямостенные. Для клеток эпидермиса характерна складчатая кутикула, которая по краю листа имеет гребенчатый вид. Наименьший размер имеют клетки эпидермиса на нижней стороне листа, они более извилистые, устьица многочисленные также анизоцитного типа. Над крупными жилками располагаются клетки эпидермиса прямоугольной формы, вытянутые вдоль длинной оси листа. Жилки листа заполнены млечниками желтоватого или коричневого цвета с маслянистым содержимым. Обвертка соцветия представлена клетками эпидермиса со слабо извилистыми стенками, устьица немногочисленные анизоцитного типа, над жилками клетки эпидермиса прямостенные, вытянутые, местами с четковидными утолщениями. Вдоль жилок расположены млечники с содержимым. Для лепестка цветка характерны слабо извилистые клетки эпидермиса, по краям которых расположены сосочковидные выросты. Жилки лепестка у основания сопровождаются млечниками. Чашелистики содержат широкие членистые млечники, с коричневым и желтым содержимым. Пыльники у володушки многожилковой четырех гнездные, тычиночные нити пронизаны млечниками, эпидермальные клетки которых прямостенные, четковидно утолщенные. Стебель имеет округлую форму с небольшой ребристостью, сверху покрыт эпидермисом, с подковообразно утолщенными стенками. Клетки эпидермиса стебля слабо извилистые с устьицами анизоцитного типа. Клетки коры крупные, пронизаны млечниками, в ребрах стебля многорядный слой уголковой колленхимы. Проводящие пучки располагаются в виде кольца, между ними располагается механическая обкладка пучков в виде склеренхимы, состоящей из толстостенных клеток механической ткани. В центре стебля располагаются крупные клетки паренхимы. Корневище покрыто многорядной пробкой коричневого цвета, под которым имеется 2-3 слоя клеток уголковой колленхимы. Кора узкая состоит из крупных клеток паренхимы, млечники широкие расположены хаотично. Линия камбия четкая, сердцевинные лучи 5-6 рядные. Древесина

состоит из крупных сосудов, трахеид и либриформа. Хорошо сформированы годичные кольца. В отдельные годы в древесине формируются млечники.

*Порошок.* При исследовании микропрепаратов должны быть видны фрагменты листьев стеблевых и прикорневых, фрагменты листочков обвертки, элементы цветка и стебля. Фрагменты листьев, покрытые эпидермисом с извилистыми стенками и погруженными устьицами анизоцитного типа. На фрагментах края листа должны быть видны гребенчатые утолщения кутикулы. Фрагменты листовых пластинок часто пронизаны млечными трубками Фрагменты листочков обвертки пронизаны млечниками с бесцветным или коричневым маслянистым содержимым. Наиболее часто встречаются фрагменты стебля с ярко выраженными членистыми млечниками и элементы цветка, пронизанные млечниками с коричневым содержимым (рис.2).

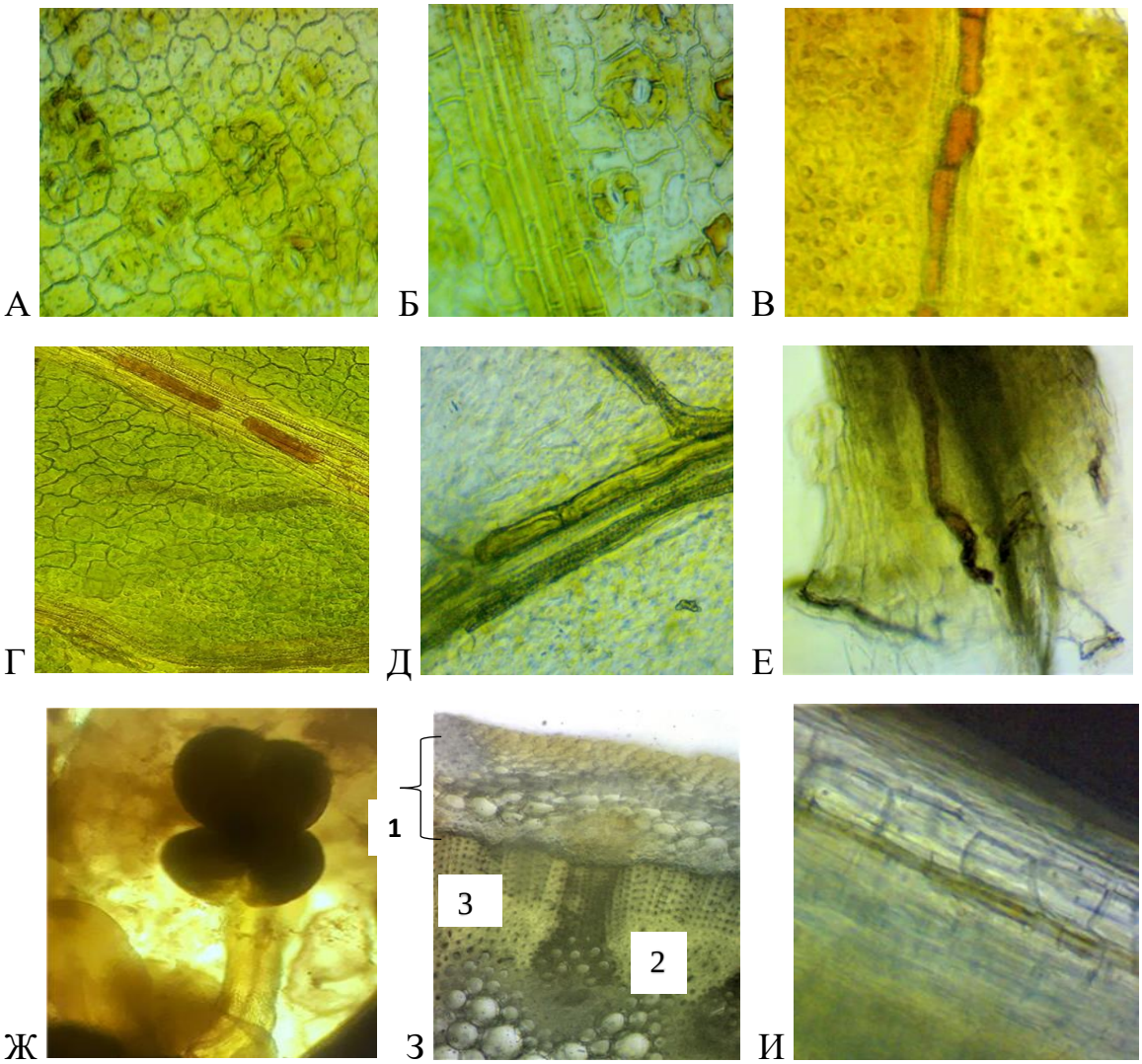


Рисунок 1 – Микроскопия володушки многожилковой травы:

А – эпидермис листа (верхняя сторона) (200х); Б – эпидермис листа (нижняя сторона) (200х); В – млечники листа (200х); Г – млечники прикорневого листа(150х); Д – листочек обвертки соцветия (200х); Е – основание тычинки цветка с млечником по жилке (180х); Ж – пыльник тычинки (120х); З – поперечный срез стебля: 1 кора, 2- камбий, 3- склеренхима.(100х); И – млечник стебля в продольном срезе, эпидермис чашечки (150х).

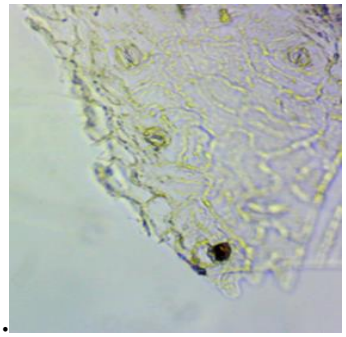
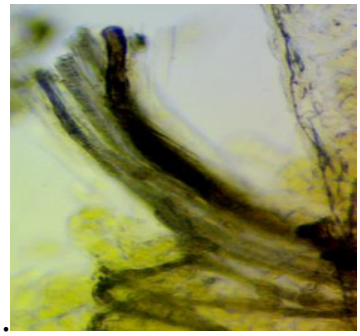
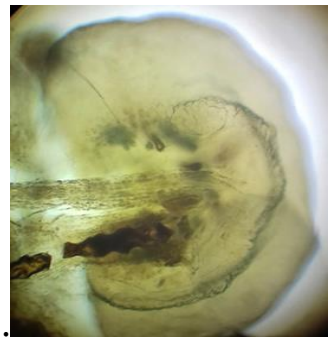
1.  2.  3. 

Рисунок 2 – Микроскопия порошка володушки многожилковой травы:

1 – микроскопия порошка. эпидермис с устьицами листа (200х); 2 – жилка листа с млечником (200х); 3 – фрагменты цветка, пронизанные млечниками (150х).

**Определение основных групп биологически активных веществ**

***Качественные реакции.*** 1 г измельченного сырья заливают 30 мл спирта этилового 70%, нагревают на водяной бане в колбе с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное извлечение охлаждают, фильтруют и упаривают до 1 мл. К извлечению прибавляют 1 мл 95% спирта этилового, 0,1 г порошка магния и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, нагревают на водяной бане 5 мин. Постепенно появляется красное окрашивание, что указывает на наличие флавоноидов.

***Тонкослойная хроматография***

*Приготовление раствора сравнения.*

*Раствор сравнения СО рутина 0,004%.* Навеску 0,04 г СО рутина растворяют в 10 мл 50% спирта этилового при нагревании. Полученный раствор охлаждают, срок годности 3 месяца при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Пластинка:* ТСХ: пластинка со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10х10 см (Sorbfil).

*Подвижная фаза*: н-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:2).

*Наносимый объем пробы*: по 10 мкл в виде полос.

*Фронт подвижной фазы:* не менее 8 см от линии старта.

Высушивание: при температуре от 100 до 105°С.

*Проявление:* пластинку опрыскивают 1% спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают 2-3 минуты при 100–105$^0$С. Через 15 мин пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 360 нм.

Около 1,0 г сырья, измельченного до частиц размером 1 мм помещают в колбу на 50 мл, прибавляют 10 мл 50% спирта этилового, экстрагируют на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют и концентрируют в выпарительной чашке при нагревании на водяной бане до объема 5 мл.

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля наносят 10 мкл испытуемого извлечения в виде полосы 1 см и 5 мкл стандартного образца раствора рутина. Пластинку сушат на воздухе и помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей н-бутанол-уксусная кислота лед.-вода (4:1:2) (предварительное насыщение камеры 60 мин). Хроматографируют восходящим способом, когда растворитель пройдет 80% длины пластинки ее вынимают и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Хроматографическую пластинку обрабатывают 1% спиртовым раствором $AlCl_3$, высушивают и нагревают 5 минут в сушильном шкафу при 100-105°С. Пластинку рассматривают в УФ свете (360 нм). В зоне рутина отмечается пятно с желто-зеленой флюоресценцией, в зоне извлечения основное пятно на уровне зоны рутина и выше 2-3 пятна желтого цвета.

На хроматограмме раствора СО рутина должна обнаруживаться зона адсорбции с желто-зеленой флуоресценцией.

На хроматограмме в зоне испытуемого раствора должны обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне зоны рутина и выше 2-3 пятна желтого цвета.

ИСПЫТАНИЯ

**Влажность.** Цельное, измельченное сырье, порошок – не более 14%.

**Зола общая**. Цельное, измельченное сырье, порошок – не более 10%.

**Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте**. Цельное, измельченное сырье, порошок - не более 3%.

**Измельченность сырья**. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм – не более 5%. *Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм – не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм – не более 5%. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм – не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,18 мм – не более 5%.

**Посторонние примеси**

***Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее).*** Цельное, измельченное сырье – не более 7%.

***Органическая примесь***. Цельное, измельченное сырье – не более 1%.

***Минеральная примесь***. Цельное, измельченное сырье, порошок– не более 1%.

**Тяжелые металлы**. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Радионуклиды.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов 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**. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2%, экстрактивных веществ, извлекаемых водой – не менее 20%.

***Сумма флавоноидов***

*Приготовление растворов.*

*Приготовление раствора СО рутина*. *Испытуемый раствор:* 1мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят колбу до метки 96% спиртом этиловым.

*Раствор сравнения*: 1 мл СО рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Оптическую плотность измеряют через 45 минут при длине волны 412 нм.

Навеску сырья около 1,0000 г, измельченного до частиц размером 1-2 мм, помещают в колбу объемом 250 мл и прибавляют 100 мл 40% спирта этилового и колбу присоединяют к обратному холодильнику. Экстракцию проводят на кипящей водяной бане в течение 1 часа, извлечение охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, при этом отбрасывают первые 10 мл фильтрата.

В 2 мерные колбы объемом 25 мл помещают по 2 мл фильтрата. В первую колбу добавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Во вторую колбу (раствор сравнения) к 2 мл фильтрата добавляют, 0,1 мл 30% раствора уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом этиловым. Измерение оптической плотности проводят через 45 минут на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кюветах с толщиной слоя 10мм.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывают по формуле:

$$X=\frac{D\cdot m_0\cdot V_1\cdot V_2\cdot V_3\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot V_4\cdot V_5\cdot V_6\cdot(100-W)}=\frac{D\cdot m_0\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot(100-W)},$$

где $V_1$- объем извлечения, 100 мл; $V_2$- объем разведения извлечения, 25 мл; $V_3$ – аликвота раствора СО рутина, 1мл; $V_4$ – аликвота извлечения, 2 мл; $V_5$ – объем разведения СО рутина, 25 мл; $V_6$ – объем СО рутина, 50 мл; m – масса сырья в г; $m_0$ – масса рутина в г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

Допускается в расчетах использование удельного показателя поглощения рутина с алюминия хлоридом по формуле:

$$X=\frac{D\cdot 100\cdot 25\cdot 100}{E_{1см.}^{1\%}\cdot m\cdot 2\cdot(100-W)}$$

где D - оптическая плотность извлечения; $E_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина с $AlCl_3$ при λ=412 нм в 96% спирте этиловом, равный 257,7; $m$ – навеска сырья, г; W – абсолютная влажность сырья в процентах.

***Примечания***

*Приготовление СО рутина:* Около 0,0500 г рутина помещают в мерную колбу объемом 100 мл и добавляют 80 мл 96% спирта этилового, нагревают на водяной бане до растворения и охлаждают. Далее раствор доводят до метки 96% спиртом этиловым.

*Приготовление 2% спиртового раствора алюминия хлорида*: 2 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу на 100 мл, прибавляют около 50 мл 95% этилового спирта, доводят до метки тем же растворителем.

**Упаковка, маркировка и транспортирование**. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Хранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**УТВЕРЖДАЮ**
**Руководитель Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России**
**_____ Ф.И.О.**
**"___" _____ _____ г.**

**СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**
**Проект**

**(ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет»)**

| | |
|---|---|
| **Экстракт сухой «Ангиофитон»** | **ФСП. 2.5.0000.21** |
| ***Extractum siccum «Angiophiton»*** | **Вводится впервые** |

Срок введения установлен

с «___» _____г.

до «___» _____г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на экстракт сухой «Ангиофитон», полученный на основе многокомпонентного растительного сбора, обладающего ангиопротекторным действием.

Состав сбора (г):
Володушки многожилковой трава (*Bupleuri multinervis herba*) – 20,0
Каштана конского семена (*Aesculi hippocastani semina*) – 20,0
Лобазника вязолистного цветки (*Filipendulae ulmariae flores*) – 30,0
Аронии черноплодной плоды сухие (*Aroniae melanocarpae sicco fructus)* – 10,0
Земляники лесной листья (*Fragariae vescae folia*) – 10,0
Календулы лекарственной цветки (*Calendulae officinalis flores*) – 10,0

СПЕЦИФИКАЦИЯ

| ПОКАЗАТЕЛЬ | МЕТОД АНАЛИЗА | НОРМА СОДЕРЖАНИЯ |
|---|---|---|
| Внешние признаки | Визуальный | Мелкокристаллический порошок светло-коричневого, коричневого цвета, вкус горьковатый, запах слабый. |
| Подлинность | 1.Аналитическая реакция обнаружения флавоноидов (с 1% р-ром $AlCl_3$)<br>2.Аналитическая реакция обнаружения тритерпеновых сапонинов (ванилин с $H_2SO_4$)<br>3. ТСХ (флавоноидов) | Желтое окрашивание<br>красно-коричневое окрашивание<br>рутин, кверцетин |
| Влажность | гравиметрический | Не более 5% |
| Тяжелые металлы | ОФС.1.2.2.2.0012.15 | Не более 0,01% |
| Суммы флавоноидов;<br>суммы фенолкарбоновых кислот | Спектрофотометрический<br>Спектрофотометрический | Не менее 6,0%<br>Не менее 6,5% |
| Срок годности | ОФС.1.1.0009.15 | 2 года |

***Описание***. Экстракт сухой «Ангиофитон» представляет собой порошок светло - коричневого или коричневого цвета, со специфическим ароматным запахом, достаточно гигроскопичен.

***Определение подлинности*** проводят с помощью следующих аналитических реакций:

К 0,1 г экстракта сухого прибавляют 25 мл спирта этилового 40%, растворяют и проводят нагревание на водяной бане в течение 10 мин, полученный раствор фильтруют и проводят реакции:

- к 5 мл полученного р-ра экстракта добавляют 2 мл 2% $AlCl_3$, появляется желтое окрашивание, характерное для флавоноидов;

- к 3 мл р-ра экстракта прибавляют 2 мл воды очищенной, затем по стенке пробирки осторожно приливают 1 мл раствора смеси ванилина в

серной кислоте, на границе слоев должно наблюдаться кольцо красновато-коричневого цвета, что указывает на наличие тритерпеновых сапонинов.

***Тонкослойная хроматография***

Приготовление растворов.

*Раствор СО рутина 0,01%.* Около 0,001 г рутина помещают в градуированную пробирку, отмеривают 10 мл 70% спирта этилового, растворяют Срок годности приготовленного раствора не более 3 месяцев при условии хранения в прохладном, защищенном от света месте.

*Раствор СО кверцетина 0,01%.* Около 0,001 г кверцетина растворяют в 10 мл 70% спирта этилового. Срок годности раствора не более 3 месяцев при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Пластинка: ТСХ: пластинка со слоем силикагеля на алюминиевой подложке размером 10х10 см (Sorbfil).

*Подвижная фаза:* н-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:2).

*Наносимый объем пробы:* по 50 мкл в виде полос.

*Фронт подвижной фазы:* не менее 8 см от линии старта.

*Высушивание:* при температуре от 100 до 105°С.

*Проявление:* для опрыскивания пластинки используют 2% спиртовой раствор алюминия хлорида и нагревают 2-3 минуты при 100–105°С. Через 15 мин пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

0,05 г экстракта сухого «Ангиофитон» растворяют в 5 мл 40% спирта этилового, проводят нагревание на водяной бане в течение 15 минут, полученный раствор охлаждают, фильтруют. На линию старта хротамографической пластинки наносят готовый исследуемый раствор, объемом 10 мкл наносят в виде полосы в 1см. Рядом наносят по 5 мкл веществ – свидетелей: СО рутина и СО кверцетина. Пластинку с нанесенными пробами подсушивают при комнатной температуре в течение 5 мин. Разделение веществ проводят в камере, предварительно насыщенной в течение 60 мин смесью растворителей н-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт

растворителей пройдет около 80% от линии старта, пластинку вынимают, сушат в вытяжном шкафу до удаления следов растворителей. Затем пластинку опрыскивают 2% спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают в сушильном шкафу в течение 5 минут при температуре 100-105°С. По истечении 15 мин после обработки, хроматографическую пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме растворов СО должны обнаруживаться зоны: рутина и кверцетина, имеющие желто-зеленую флюоресценцию.

На хроматограмме экстракта сухого Ангиофитон имеются зоны, соответствующие стандартным веществам, а также между зонами стандартов располагаются 2-3 зоны желтого цвета и одна зона красного цвета, ниже СО рутина располагается одна или две зоны.

***Потеря в массе при высушивании.*** Не более 5%.

***Тяжелые металлы.*** Не более 0,01%

**Количественное определение.** *Измельченное сырье, порошок:* сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 6%, сумма фенолкарбоновых кислот в пересчете на 3-*О*-кофеилхинную кислоту – не менее 6,5%.

***Сумма флавоноидов***

*Приготовление растворов.*

*Раствор СО рутина*. 1 мл 0,05% р-ра рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 1% р-ра $AlCl_3$, 0,1 мл 30% р-ра $CH_3COOH$ и до метки доводят 96% спиртом этиловым. Раствор сравнения: 1 мл 0,05% р-ра рутина, 0,1 мл 30% р-ра $CH_3COOH$ помещают в мерную колбу на 25 мл и раствор доводят 96% спиртом этиловым до метки, оптическую плотность измеряют при 415 нм.

*Раствор сравнения*: к 1 мл 0,05% раствора рутина прибавляют 1 каплю 10% р-ра $CH_3COOH$ помещают в мерную колбу на 25 мл и раствор доводят 96% спиртом этиловым до метки.

Навеску около 0,1000 г растворяют при нагревании в 50 мл спирта этилового 40%, раствор фильтруют, получают раствор А. Далее 2 мл раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 1%

спиртового раствора $AlCl_3$, 0,1 мл 30% уксусной кислоты и доводят до метки 96% спиртом (получают рпствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре (λ=415 нм) в кюветах толщиной 10 мм. Раствор сравнения содержит 2 мл раствора А, 0,1 мл 30% уксусной кислоты и доведен до метки 96% спиртом.

Процентное содержание флавоноидов в пересчете на СО рутина и абсолютно сухой экстракт вычисляют по формуле:

$$X=\frac{D\cdot m_0\cdot 25\cdot 50\cdot 1\cdot 100\cdot 100}{D_0\cdot m\cdot 100\cdot 2\cdot 25\cdot (100-W)}=\frac{D\cdot 25\cdot\cdot m_0 100}{m\cdot D_0\cdot (100-W)},$$

где D – значение оптической плотности раствора экстракта сухого; $D_0$ – оптическая плотность раствора рутина; m – масса экстракта сухого в г; $m_0$ – масса рутина в г; W – абсолютная влажность экстракта в процентах.

Допускается проведение расчета % содержания суммы флавоноидов по удельному показателю поглощения рутина при λ=415 нм в 96% спирте этиловом:

$$X=\frac{D\cdot 50\cdot 25\cdot 100}{E_{1см}^{1\%}\cdot m\cdot 2\cdot (100-W)},$$

где $D$ – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора; $m$ – навеска экстракта сухого; $E_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина в комплексе с $AlCl_3$ при α=415 нм, равный 248; г; W – абсолютная влажность экстракта в процентах.

### *Примечания*

*Приготовление раствора СО рутина*: около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 130-135°С в течение 3 ч. Помещают в мерную колбу, объемом 100 мл, отмеривают 85 мл 95% спирта этилового, растворяют при нагревании на водяной бане. Полученный раствор охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают.

*Приготовление спиртового раствора алюминия хлорида 1% в спирте этиловом 95%:* 1 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта этилового 95%, и доводят до требуемого объема тем же растворителем.

### *Сумма фенолкарбоновых кислот*

2 мл раствора А, полученного по методике количественного анализа флавоноидов переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% спиртом этиловым (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при λ=325 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 1см. В качестве раствора сравнения используют 96% спирт этиловый.

Процентное содержание фенолкарбоновых кислот с учётом пересчёта на 3-*O*-кофеилхинную кислоту и абсолютно сухой экстракт рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 504 \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора экстракта; m – масса экстракта сухого, г; W – абсолютная влажность экстракта сухого, %; 504 – удельный показатель поглощения 3-*O*-кофеилхинной кислоты при λ=325 нм.

***Радионуклиды.*** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов 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.*** Категория 4Б в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

***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».

***Хранение.*** В сухом, защищенном от света месте при температуре от 15 до 25°С.

***Срок годности.*** 2 года.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 4**

# ВЭЖХ-ХРОМАТОГРАММЫ, МАС-СПЕКТРЫ, ЭЛЕКТРОННЫЕ СПЕКТРЫ СОЕДИНЕНИЙ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОЛОДУШКИ МНОГОЖИЛКОВОЙ ТРАВЫ

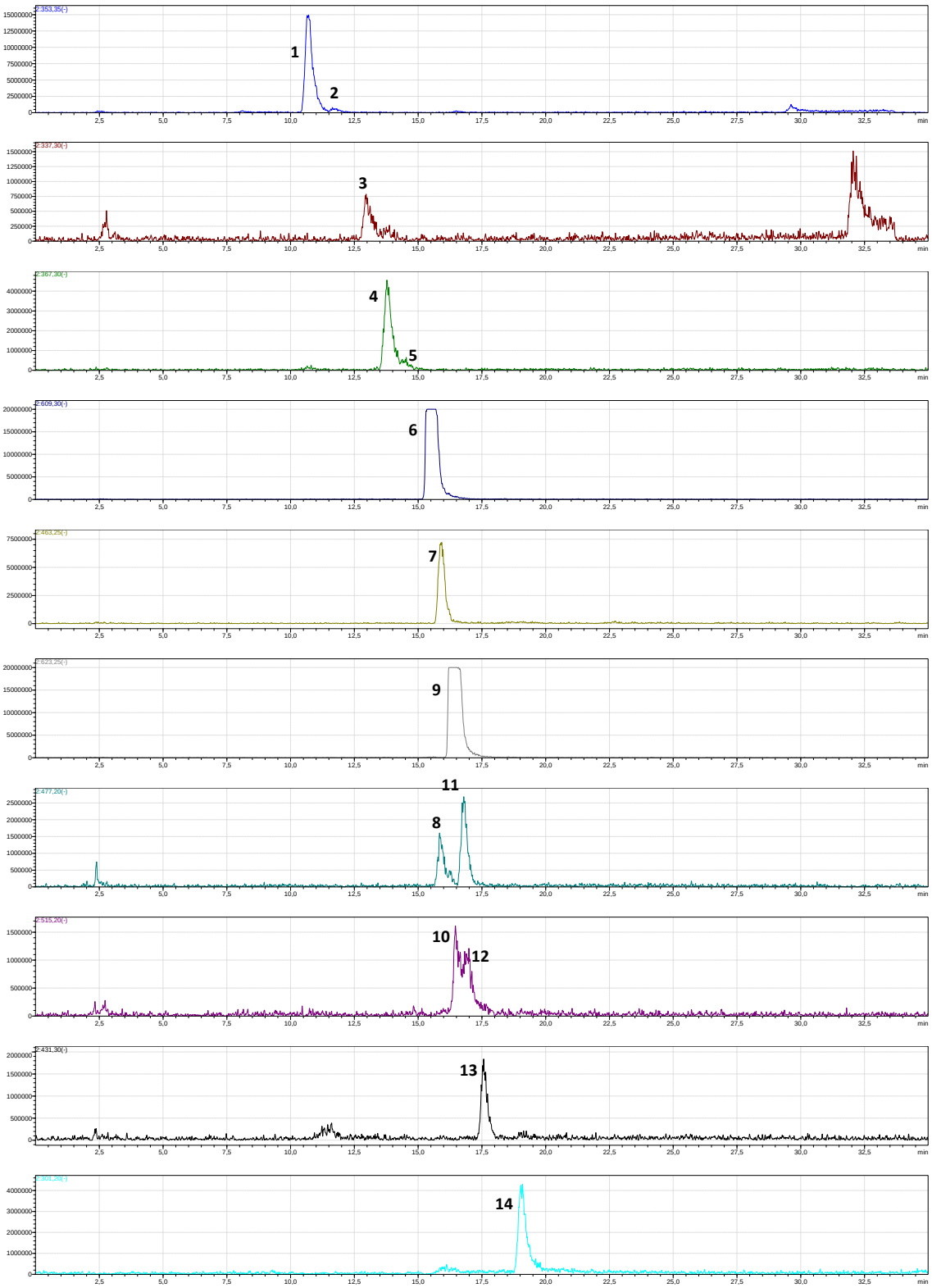
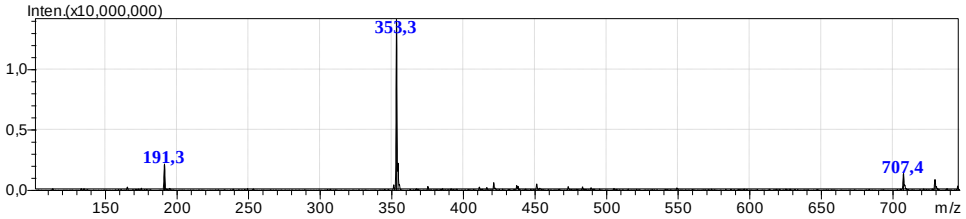
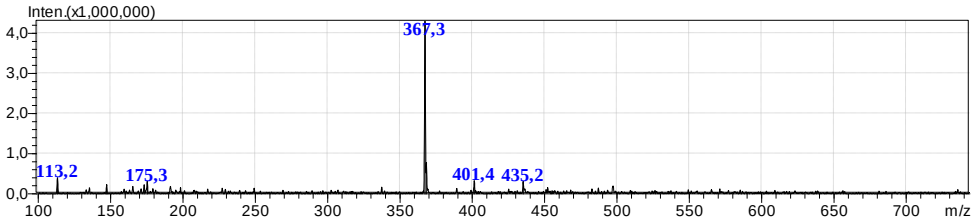


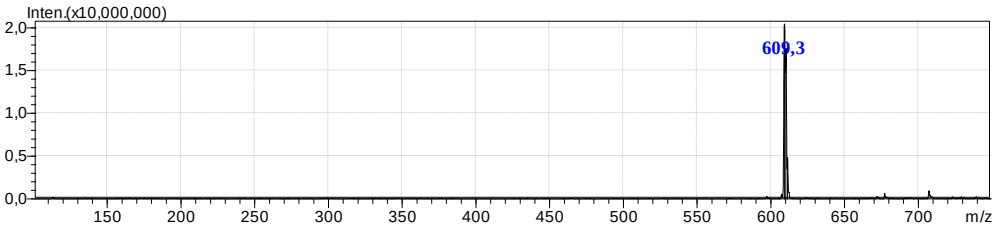
Рисунок 1 - Выделенные хроматограммы для отдельных ионов (SIM) из хроматограммы спиртового извлечения надземных органов *B. multinerve*, приведенной на рисунке 2 В (стр. 108).



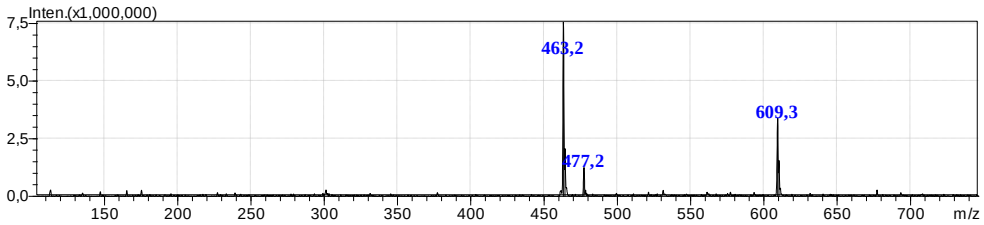

5-*O*-кофеилхинная кислота (соединение **1**)



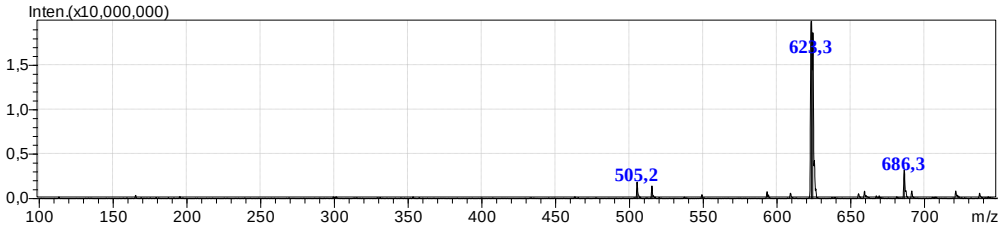

5-*O*-ферулоилхинная кислота (соединение **4**)



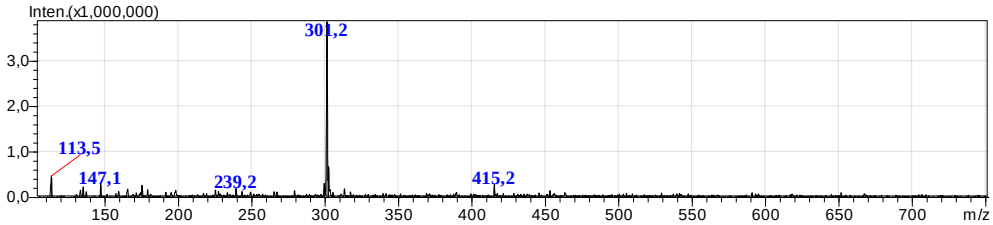

кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин; соединение **6**)



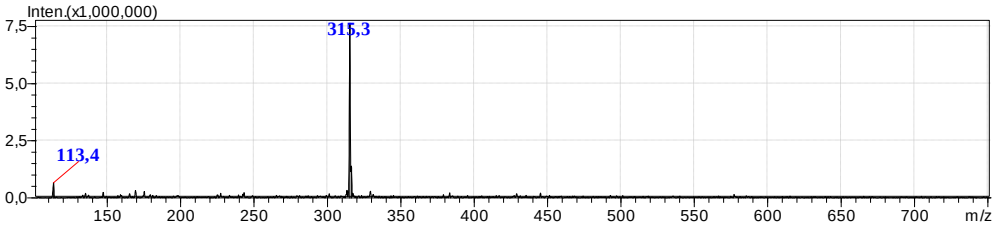

кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин; соединение **7**)



изорамнетин-3-*O*-рутинозид (нарциссин; соединение **9**)




кверцетин (соединение **14**)




изорамнетин (соединение **15**)

Рисунок 2 - Масс-спектры некоторых соединений в режиме отрицательной ионизации.

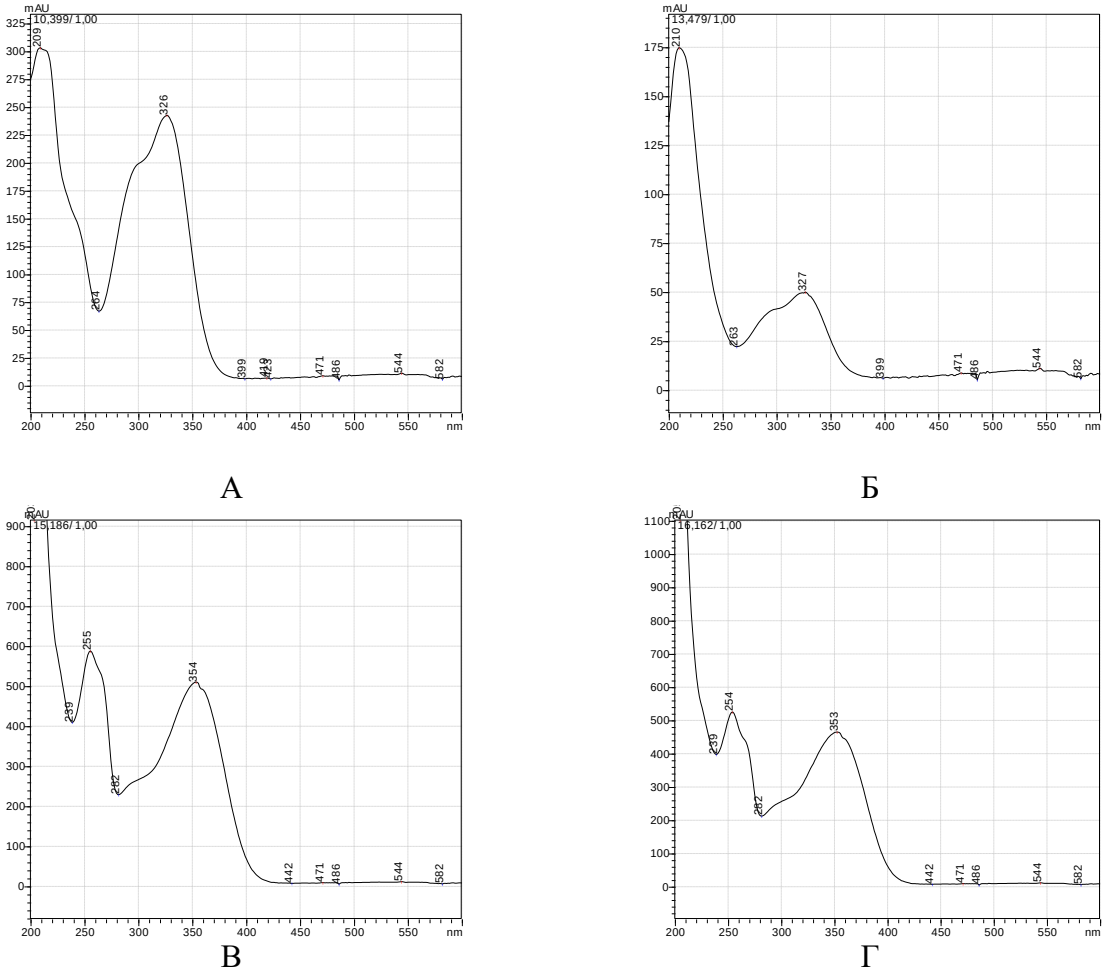



Рисунок 5.2.5 – Электронные спектры поглощения соединений **1**, **2**, **10**, **12** (А), **4**, **5** (Б), **6**, **7**, **14** (В), **9**, **11**, **15** (Г).

# ПРИЛОЖЕНИЕ 5

## Заключение о результатах по изучению фармакологической активности сбора ангиопротекторного

Цели исследования: провести доклинические исследования сбора ангиопротекторного.

Задачи исследования:

- определить токсичность сбора ангиопротекторного;
- изучить каппиляроукрепляющую активность сбора ангиопротекторного;
- изучить противовоспалительное действие сбора ангиопротекторного;
- изучить антиоксидантную активность.

Материалы и методы.

Сбор ангиопротекторный был получен в Иркутском государственном медицинском университете на кафедре фармакогнозии и фармацевтической технологии, который включает в себя сырье растений володушки многожильчатой (20%), каштана конского (20%), лабазника вязолистного (30%), аронии черноплодной (10%), земляники лесной (10%), календулы лекарственной (10%). Сбор ангиопротекторный представляет собой смесь кусочков листьев, стеблей, цветков, плодов с размером частиц размером до 7 мм.

Исследования проводили на крысах линии Wistar обоего пола массой 180-200 г, содержащихся на стандартном рационе питания при свободном доступе к воде и пище в условиях вивария. Исследования с животными проводили в соответствии с «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей».

### Определение острой токсичности

Определение острой токсичности сбора ангиопротектороного проводили на крысах по методу Кербера (А.О. Лойт, М.Ф. Савченков, 1994). При энтеральном введении водного извлечения (в пересчете на сухой остаток)

в дозах от 1000 до 5000 мг/кг гибели животных не наблюдалось. У крыс, получавших препарат, не наблюдалось интоксикации: поведенческие реакции и состояние не отличалось от контрольной группы животных, получавших воду в эквиобъемном количестве. По классификации токсичности веществ, сбор ангиопротекторный, можно отнести к IV группе «вещества малотоксичные».

**Определение капилляроукрепляющего действия**

Для исследования капилляроукрепляющего действия сбора ангиопротекторного использовали модель локальной воспалительной реакции с помощью ксилола на крысах - самках массой 180-200 г по методу К.Н. Монаковой. Животные были разбиты на 3 группы по 6 особей в каждой. Первая группа – интактные животные. Вторая группа получала раствор рутина в качестве препарата сравнения. Третьей группе за 30 мин до эксперимента вводили ангиопротекторный сбор. Препараты вводились per os в объёме 3 мл (100 мг/кг сухого вещества) за 1 час до введения индикатора проницаемости, роль которого выполнял раствор трипановой сини. Регистрировали время появления петехий и отчетливого их прокрашивания. Показателем проницаемости капилляров служило время появления на коже сине-окрашенных пятен и их. По разнице во времени появления пятен и их диаметру до и после введения препаратов судили об их действии на проницаемость капилляров.

Ангиопротекторный сбор превосходит по капилляроукрепляющему действию рутин (табл. 1). Как видно из таблицы, в контроле время появления петехий составляло в среднем 76 сек; время отчетливого прокрашивания 110 сек. Эти показатели мы приняли за 100%. В группе животных, получавших раствор рутина, время появления петехий составило 111 сек и время отчетливого прокрашивания – 126 сек. При введении сбора ангиопротекторного, эти показатели составляли соответственно 126 сек и 138 сек, относительно контроля. В процентном выражении это выглядит следующим образом.

Таблица 1 - Сравнительная оценка влияния сбора ангиопротекторного на проницаемость стенки капилляров (M±m), n=6.

| Группы | Время появления петехий (сек) | % от контроля | Время отчётливого прокрашивания петехий | % от контроля |
|---|---|---|---|---|
| Контроль (вода) | 76 ±5,2 | | 110±6,3 | |
| Сбор ангиопротекторный | 126±6,4 | 65,7 | 138±5,1 | 25,5 |
| Рутин | 111±5,8 | 46,1 | 124±5,5 | 12,7 |

Раствор рутина повышал время появления петехий на 46,1% и время отчетливого прокрашивания на 12,7%, тогда как в группе, получавшей ангиопротекторный сбор, эти показатели были соответственно 65,7% и 25,5%.

**Определение противовоспалительного действия**

Опыты проведены на 34 белых крысах линии Wistar обоего пола, массой 180-200 г. Исследования противовоспалительной активности ангиопротекторного сбора проводили тремя сериями опытов и сводились к оценке влияния их на экссудативную фазу воспаления (Стрельников, 1969), фазу пролиферации (Тринус, 1975) и на процессы альтерации (Ойвин, 1961). Во всех экспериментах энтерально вводились животным водное извлечение сбора ангиопротекторного в дозе 100 мг/кг. Первой группе крыс и в виде препарата сравнения - водное извлечение цветков ромашки. Животным контрольной группы в равном объеме вводили воду по аналогичной схеме.

В первой серии опытов антиэкссудативное действие ангиопротекторного сбора изучали на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапку крыс 0,1 мл 2% водного раствора формалина.

Во второй серии опытов изучали влияние ангиопротекторного сбора на процессы альтерации и регенерации в очаге воспаления путем подкожного введения 0,5 мл 9% раствора уксусной кислоты в область спины крыс с

предварительно выстриженной шерстью. Одновременно с этим крысам вводили раствор декстрана внутрибрюшинно в дозе 300 мг/кг.

В третьей серии опытов изучали влияние ангиопротекторного сбора на процессы пролиферации путём имплантирования стерильных ватных шариков массой 15 мг под кожу крыс в области спины в асептических условиях.

В результате установлено, что ангиопротекторный сбор снижает формалиновый отек лапок крыс на 39%, тогда как ромашка - на 30% по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 2 - Влияние сбора ангиопротекторного на пролиферативную фазу воспаления (M±m), n=10

| Группа животных | Масса образовавшейся грануляционно-фиброзной ткани, мг | Стимуляция образования гранулемы, % |
|---|---|---|
| Контроль ($H_2O$) | 16,80±1,34 | 0 |
| Сбор ангиопротекторный | 20,40±0,80* | +21 |
| Ромашка аптечная | 9,20±0,80* | -45 |

$p<0,05$ в сравнении с контролем

Таблица 3 - Влияние сбора ангиопротекторного на альтеративную фазу воспаления (M±m), n=10

| Группа животных | 9 сутки | | 29 сутки | |
|---|---|---|---|---|
| | Площадь некротизированной ткани, $см^2$ | Степень уменьшения повреждения кожных покровов, % | Площадь некротизированной ткани, $см^2$ | Степень уменьшения повреждения кожных покровов, % |
| Контроль ($H_2O$) | 5,43±0,39 | - | 2,80±0,23 | - |
| Сбор ангиопротекторный | 3,53±0,32 | 35,00 | 1,15±0,12 | 58,90 |
| Ромашка аптечная | 3,30±0,34 | 39,20 | 2,04±0,17 | 27,10 |

$p<0,05$ в сравнении с контролем

Кроме того, ангиопротекторный сбор уменьшал степень повреждения ткани (табл. 3). В частности, на 9 сутки у крыс, получавших ангиопротекторный сбор, площадь некротизированной ткани была на 35%

меньше, чем у крыс контрольной группы, а у животных, получавших ромашку - на 39%. Ангиопротекторный сбор эффективно стимулировал регенераторные процессы, следствием чего явилось уменьшение площади альтерации на 29 сутки опыта на 59%, тогда как у крыс, получавших ромашку, площадь повреждения уменьшалась на 27% (табл. 3).

В результате проведенной третьей серии опытов установлено, что у животных, получавших ангиопротекторный сбор, масса извлеченных гранулем превышала контроль на 21% по сравнению с контролем. Использованный в качестве сравнения препарат ромашки, наоборот, снижал массу гранулём на 45 % по сравнению с контролем.

Таким образом, ангиопротекторный сбор обладает выраженной противовоспалительной активностью. Ангиопротекторный сбор относительно эффективно снижал формалиновый отёк и альтрацию и способствовал процессу пролиферации.

**Антиоксидантная активность**

Антиоксидантную активность изучали на сыворотке донорской крови в опытах in vitro. Методика: к 2 мл сыворотки донорской крови прибавляли 1 мл тестируемого извлечения, 0,1 мл 0,5 М раствора сульфата меди (II), в качестве индуктора перекисного окисления липидов. Для сравнения использовали контроль без исследуемого извлечения. Реакционную смесь инкубирования 24 часа при 37°С. Далее исследовали на содержание диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА).

Извлечение из сбора снижает образование ДК в сравнении с контролем (вода очищенная) на 37%. и МДА на 67,33% (табл. 4).

Извлечение из сбора содержит наибольшее количество биологически активных веществ и обладает высокой антиоксидантной активностью.

Таблица 4 – Определение антиоксидантной активности сбора ангиопротекторного

| Препарат | ДК | | МДА | |
|---|---|---|---|---|
| | Содержание в мкмоль/мл | Ингибирование, в % | Содержание в мкмоль/мл | Ингибирование, в % |
| Извлечение из сбора | 47,51±1,49 | 37,00 | 4,62±0,45 | 67,33 |
| Контроль (вода очищенная) | 75,5±3,11 | | 14,14±1,02 | |

ДК- диеновые коньюгаты, МДА – малоновый диальдегид

Выводы.

Проведенные исследования показали, что сбор ангиопртекторный не токсичен, обладает противовоспалительным, капилляроукрепляющим и антиоксидантным действием.

Проректор по НИР
ФГБОУ ВО «Иркутский
государственный медицинский
университет», д.м.н., профессор И.Ж. Семинский
09.09.2019

Подпись Семинского И.Ж. Достоверно
Специалист по кадровой работе
«09» сентября 2019 г.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 6**

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО
«Иркутский государственный
медицинский университет»
Минздрава России
д.м.н., профессор
_____ И.В. Малов
«27» января 2021 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

**Наименование разработки:** результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в растительном сборе ангиопротекторном спектрофотометрическим методом.

**Кем предложено:** кафедра фармакогнозии и фармацевтической технологии Иркутского государственного медицинского университета; зав. каф., д.ф.н. Мирович В.М., ассистент кафедры Посохина А.А.

**Где внедрено:** кафедра фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

**Результаты применения предложения за период:** с 1.09.2020г. по настоящее время.

**Эффективность внедрения:** результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в сборе ангиопротекторном спектрофотометрическим методом используются в учебном процессе по дисциплине фармацевтическая химия и на курсах повышения квалификации провизоров по специальности фармацевтическая химия и фармакогнозия в цикле «Контроль качества лекарственных средств».

«27» января 2021г.

Зав. каф.фармацевтической и
токсикологической химии ФГБОУ ВО
«Иркутский государственный
медицинский университет», Минздрава России
д.х.н., профессор Е.А. Илларионова

Подпись Илларионовой Е.А. удостоверяю
Специалист по кадровой работе
О.М. Флоусова
«27» января 2021г.

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО
«Иркутский государственный
медицинский университет»
Минздрава России
д.м.н., профессор
_____ И.В. Малов
«27» января 2021 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

**Наименование разработки:** результаты разработки анатомо-диагностических признаков лекарственного растительного сырья – травы володушки многожилковой.

**Кем предложено:** кафедра фармакогнозии и фармацевтической технологии Иркутского государственного медицинского университета, ассистент кафедры Посохина А.А.

**Где внедрено:** кафедра фармакогнозии и фармацевтической технологии Иркутского государственного медицинского университета.

**Результаты применения предложения за период:** с 1.09.2020г. по настоящее время.

**Эффективность внедрения:** результаты разработки анатомо-диагностических признаков лекарственного растительного сырья – травы володушки многожилковой используются при чтении лекций и на практических занятиях по соответствующим темам по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Основы фитотерапии».

«27» января 2021г.

Зав. каф.фармакогнозии и фармацевтической технологии
ФГБОУ ВО «Иркутский государственный
медицинский университет», Минздрава России
д.фарм.н., профессор В.М. Мирович

Подпись Мирович В.М. удостоверяю
Специалист по кадровой работе
«27» января 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО
«Иркутский государственный
медицинский университет»
Минздрава России
д.м.н., профессор
_____ И.В. Малов
«27» января 2021 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

**Наименование разработки:** результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом «Ангиофитон» спектрофотометрическим методом.

**Кем предложено:** кафедра фармакогнозии и фармацевтической технологии Иркутского государственного медицинского университета; зав. каф., д.ф.н. Мирович В.М., ассистент кафедры Посохина А.А.

**Где внедрено:** кафедра фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

**Результаты применения предложения за период:** с 1.09.2020г. по настоящее время.

**Эффективность внедрения:** результаты разработки и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом «Ангиофитон» спектрофотометрическим методом используются в учебном процессе по дисциплине фармацевтическая химия и на курсах повышения квалификации провизоров по специальности фармацевтическая химия и фармакогнозия в цикле «Контроль качества лекарственных средств».

«27» января 2021г.

Зав. каф.фармацевтической и
токсикологической химии ФГБОУ ВО
«Иркутский государственный
медицинский университет», Минздрава России
д.х.н., профессор Е.А. Илларионова

Подпись Илларионовой Е.А. удостоверяю
Специалист по кадровой работе
О.Н. Гнеушева
«27» января 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Иван-чай»

_____ А.А. Ляхов

«15» октября 2020 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

(разработки, рекомендации, материалов)

**Наименование разработки (рекомендации, материалов):**

1. Состав сбора ангиопротекторного, обладающего капилляроукрепляющей, противовоспалительной и антиоксидантной активностью.

2. Анатомо-диагностические признаки лекарственного растительного сырья – сбора ангиопротекторного.

3. Методики количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот сбора ангиопротекторного спектрофотометрическим методом.

**Авторы:** Мирович В.М., Посохина А.А.

**В виде документации:** проект ФС «Сбор ангиопротекторный», разработанной в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00. Для использования в качестве нормативного документа на сбор ангиопротекторный в контрольно-аналитической группе ООО «Иван-чай».

**Эффект внедрения:** производство средств с использованием сбора ангиопротекторного.

Генеральный директор

ООО «Иван-чай» Ляхов А.А.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Иван-чай»

_____А.А. Ляхов

«15» октября 2020 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

(разработки, рекомендации, материалов)

**Наименование разработки (рекомендации, материалов):**

Анатомо-диагностические признаки лекарственного растительного сырья – травы володушки многожилковой; методика количественного определения суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом.

**Авторы:** Мирович В.М., Посохина А.А.

**В виде документации:** проект ФС «Володушки многожилковой трава», разработанной в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00. Для использования в качестве нормативного документа на сырье володушки многожилковой в контрольно-аналитической группе ООО «Иван-чай».

**Эффект внедрения:** производство средств с использованием травы володушки многожилковой.

Генеральный директор

ООО «Иван-чай» Ляхов А.А.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Иван-чай»

_____А.А. Ляхов

«15» октября 2020 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

(разработки, рекомендации, материалов)

**Наименование разработки (рекомендации, материалов):**

Технология получения экстракта сухого «Ангиофитон», обладающего капилляроукрепляющей, противовоспалительной и антиоксидантной активностью; методика количественного определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот экстракта сухого «Ангиофитон» спектрофотометрическим методом.

**Авторы:** Мирович В.М., Посохина А.А.

**В виде документации:** проект ФСП «Экстракт сухой «Ангиофитон»», разработанной в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00. Для использования в качестве нормативного документа на экстракт сухой «Ангиофитон» в контрольно-аналитической группе ООО «Иван-чай».

**Эффект внедрения:** производство средств с использованием экстракта сухого «Ангиофитон».

Генеральный директор

ООО «Иван-чай» Ляхов А.А.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 7**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

# ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2729784**

**РАСТИТЕЛЬНЫЙ СБОР, ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИОКСИДАНТНЫМ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И КАПИЛЛЯРОУКРЕПЛЯЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ**

Патентообладатель: ***Мирович Вера Михайловна (RU)***

Авторы: ***Мирович Вера Михайловна (RU), Посохина Алина Алексеевна (RU), Петухова Светлана Андреевна (RU), Цыренжапов Арсен Владимирович (RU)***

Заявка № **2020100538**
Приоритет изобретения **09 января 2020 г.**
Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **12 августа 2020 г.**
Срок действия исключительного права на изобретение истекает **09 января 2040 г.**

*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Ивлиев*