

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

УДК 615.32

А.Г. Барсегян^{1, 2}, А.А. Маркарян^{1, 2}, М.С. Бардаханова³

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ФИТОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА «СБОР ОЧИЩАЮЩИЙ»

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)² ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва)³ ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (Улан-Удэ)

Проведено фармакогностическое исследование 6-компонентного сбора, рекомендуемого в качестве лечебно-профилактического средства при заболеваниях печени и желчевыводящих путей, для ускоренной элиминации продуктов азотистого обмена почками, нормализации липидного обмена. Определены нормы числовых показателей, определяющих качество сбора. Установлены значимые макро- и микроскопические диагностические признаки. В результате фитохимического исследования идентифицированы основные группы биологически активных веществ, входящих в состав сбора.

Ключевые слова: фармакогностическое исследование, сбор, флавоноиды, стандартизация, лекарственное растительное сырье

PHARMACOGNOSTIC STUDY OF COMPLEX PHYTOTHERAPEUTIC COMPOSITION “DETOX COMPOSITION”

A.G. Barsegyan^{1, 2}, A.A. Markaryan^{1, 2}, M.S. Bardakhanova³¹ All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow³ Buryat State University, Ulan-Ude

We realized pharmacognostic study of 6-component composition recommended as a therapeutic and prophylactic agent at the hepatic and bile passages disorders, for the accelerated elimination of products of kidneys' nitrogen metabolism and for normalization of lipid metabolism. The norms of indices defining composition's quality and also significant macro- and microscopic characteristics are determined. As the result of phytochemical research we identified main groups of biologically active substances.

Key words: pharmacognostic study, composition, flavonoids, standardization, medicinal plants

Статистические данные последних лет наглядно демонстрируют неуклонный рост патологий, ассоциированных с нарушениями работы гепатобилиарной и мочевыделительной систем, а также липидного обмена [2, 6, 7]. Так, в Российской Федерации число больных с различными хроническими и острыми заболеваниями печени превышает 200 000 человек в год при уровне смертности 80–90 % [4]. Абсолютное число зарегистрированных больных с заболеваниями мочеполовой системы в РФ составило на 2009 г. 15 597 948 человек, что на 25,8 % превышает аналогичный показатель для 2002 г. [1]. В этой связи представляется актуальной задачей разработка комплексного фитотерапевтического средства, направленного на коррекцию и возвращение к физиологической норме процессов, участвующих в развитии заболеваний печени и мочеполовой системы. Поливалентный механизм развития заболеваний, включающий в себя, в том числе, нарушения метаболизма и воспаление, обуславливает необходимость

создания многокомпонентного сбора, компоненты которого будут воздействовать на разные участки патологического процесса.

На основании проведенного фармакологического скрининга и фитохимического исследования предложен состав 6-компонентного лекарственного растительного сбора, условно названного «Очищающий». Сбор содержит в своем составе цветки пижмы и бессмертника, листья брусники, мяты сены и ортосифона тычиночного. Проведенные в Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН доклинические и клинические исследования водного настоя из сбора позволяют рекомендовать его в качестве лечебно-профилактического средства в терапии заболеваний печени и желчевыводящих путей, а также для ускоренной элиминации продуктов азотистого обмена почками и для нормализации липидного обмена.

По данным литературы известно, что цветки пижмы, содержащие в своем составе сумму флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, обладают выраженным

желчегонным действием. Другое сырье, содержащее в своем составе флавоноиды, мезоинозит, органические кислоты и дубильные вещества – листья ортосифона тычиночного – воздействует на мочевыделительную систему. Листья брусники обладают выраженным мочегонным и противовоспалительным действием, благодаря содержащемуся в их составе арбутину, фенолокислотам и другим органическим кислотам. Флавоноидные соединения цветков бессмертника, среди которых преобладают изосалипурпозид, нарингенин и апигенин, воздействуют на гепатобилиарную систему. Листья мяты являются, главным образом, источником эфирного масла, хотя также содержат в своем составе флавоноиды и каротиноиды и оказывают комплексное воздействие на организм, в том числе проявляют желчегонную и противовоспалительную активность. Еще одним компонентом сбора являются измельченные листья сенны, которые, благодаря содержащимся в их составе антрахинонам, оказывают слабительное действие [3, 5].

Все компоненты представленного сбора относятся к группе лекарственного растительного сырья, используемого в виде настоев. Основные биологически активные вещества, содержащиеся в их составе, принадлежат к разным классам фенолопроизводных. В настоящее время сбор зарегистрирован в качестве биологически активной добавки на соответствие требованиям единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) CoGP № RU.77.99.11.003.E.004275.05.13.

Цель работы: фармакогностическое изучение сбора, включающее его макро- и микроскопическое исследование, товароведческий анализ и фитохимическое изучение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования было выбрано лекарственное растительное сырье, соответствующее требованиям нормативной документации: цветки пижмы по ГФ XI, вып. 2, ст. 11; листья ортосифона тычиночного по ГФ XI изд., вып. 2, ст. 21; листья брусники по ГФ XI, вып. 2, ст. 27; цветки бессмертника по ГФ XI, вып. 2, ст. 9; листья мяты по ГФ XI, вып. 2, ст. 18; листья сенны по ГФ XI, вып. 2, ст. 23.

Сбор как объект исследований готовили в соответствии с требованиями статьи «Сборы», ГФ XI, вып. 1, ст. 266. При приготовлении образцов сбора использовали сырье, закупленное в 2011–2012 гг. производства ОАО «Красногорсклексредства». Сырье было подвергнуто анализу на соответствие требованиям нормативной документации в соответствии со статьями ГФ XI для отдельных видов сырья. Сырье соответствовало требованиям НД, включая радиационный контроль.

Товароведческий анализ проводили в соответствии с требованиями соответствующих статей ГФ XI изд., вып. 1. Изучение внешних признаков растительных смесей проводили по ГФ XI изд., вып. 1, ст. 266–267. Микроскопические исследования сбора проводили по методике ГФ XI изд., вып. 1, с. 277. Испытание радиоактивности проводилось с помощью

гамма-бета-спектрофотометрического комплекса «Прогресс-БГ» по 2 радионуклидам: цезию-137, стронцию-90. Стронций-90 определяли в навеске лекарственного растительного сырья по бета-измерению. Цезий-137 определяли по гамма-измерению в зольном остатке лекарственного растительного сырья.

Наличие основных групп БАВ подтверждали при помощи общепринятых качественных реакций:

К 1 мл водного извлечения прибавляют 1 мл 95% спирта, 0,1 г порошка магния и 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты; постепенно появляется красное окрашивание (флавоноиды);

1,0 г сбора помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл 10% спиртового раствора натра едкого и фильтруют. По охлаждении фильтрат подкисляют разведенной хлористоводородной кислотой до слабокислой реакции и взбалтывают с 10 мл эфира. Эфирный слой окрашивается в зеленовато-желтый цвет; 5 мл эфирного извлечения взбалтывают с равным объемом раствора аммиака: аммиачный слой окрашивается в вишнево-красный цвет (оксиантрахиноны).

К 3 мл испытуемого раствора прибавляют 2–3 капли железо-аммониевых квасцов; появляется черно-синее окрашивание (дубильные вещества).

1,5 мл спиртового извлечения помещают в выпарительную чашку и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. Остаток растворяют в 2 мл воды. Полученный раствор пропускают через колонку, заполненную алюминия оксидом (нейтральный) размером 0,5 × 2 см. К элюату прибавляют 0,1 мл 2% раствора натрия карбоната, 0,1 мл 2% раствора дихлорхинона хлоримида в спирте этиловом. Наблюдается синее окрашивание (арбутин).

К 10 мл испытуемого водного извлечения прибавляют 30 мл 95% спирта и перемешивают; появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

Наличие эфирного масла подтверждали гистохимической реакцией с раствором судана-III.

Фитохимический анализ проводили с использованием качественных химических реакций и хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ). Для ТСХ использовали пластины Kieselgel 60 F254 размером 20 × 20 см и Kieselgel 40 F254 размером 15 × 20 см. В зависимости от группы исследуемых БАВ использовали различные системы растворителей. Идентификацию фенолокислот проводили в системе хлороформ – этилацетат – раствор уксусной кислоты 5% (20 : 20 : 20 : 5), просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм. Флавоноиды исследовали в системе этилацетат – муравьиная кислота – вода (90 : 9 : 6), хроматограмму просматривали после обработки 1% раствором аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты в метаноле. Отдельно исследовали присутствие синенсина в системе толуол – этилацетат – метанол (55 : 40 : 5), идентификация в УФ-свете при 365 нм; арбутина, гидрохинона и галловой кислоты – в системе муравьиная кислота – вода – этилацетат (6 : 6 : 88), наличие искомым веществ определяли после обработки 1% раствором дихлорхинона хлоримида. Идентификацию антраценопроизводных

проводили в системе этилацетат – метанол – вода (100 : 17 : 13), пластины обрабатывали 20% раствором азотной кислоты и 5% раствором калия гидроксида в спирте этиловом 50%. Для определения свободных сахаров использовали систему пиридин – этиацетат – вода (20 : 60 : 40), в качестве проявляющего реактива использовали систему тимол – концентрированная серная кислота – спирт этиловый 95% (0,5 : 5 : 95). Качественный состав аминокислот исследовали в системе н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (40 : 40 : 20), пластины проявляли 0,2% раствором нингидрина в 95% этаноле.

Количественное определение суммы флавоноидов проводили методом спектрофотометрии, на спектрофотометре Gelios (США) в кюветках с толщиной поглощающего слоя 1 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап работы был посвящен выбору оптимального соотношения ингредиентов, входящих в состав сбора. Сбор очищающий является комплексным фитотерапевтическим средством, включающим в свой состав 6 видов лекарственного растительного сырья: цветки пижмы и бессмертника, листья брусники, мяты и сенны, трава почечного чая.

Рецептура сбора была разработана по результатам проведенного анализа литературных данных о лекарственном растительном сырье, с учетом вклада каждого компонента в фармакологическую активность. Спектр биологически активных веществ сбора весьма разнообразен и включает флавоноиды, дубильные вещества, антраценопроизводные, полисахариды и эфирные масла.

Выбор рационального состава и соотношения ингредиентов, входящих в рецептуру сбора, был произведен по результатам сравнительного исследования нескольких вариантов, указанных в таблице 1.

Оценку содержания действующих веществ в каждой из рецептур проводили методом спектрофотометрии при длине волны 400 нм по модифицированной методике количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин. В основе метода лежит реакция комплексообразования хлорида алюминия с кето- и гидроксильными группами флавоноидов.

Количественное определение проводили в сухих экстрактах, полученных следующим способом. Сырьё измельчали согласно, ГФ XI изд., помещали в конические колбы заливали горячей водой (80–90 °С) в соотношении 1 : 10 с учётом коэффициента водопоглощения и экстрагировали на водяной бане в течение 1 часа 3 раза. Контроль за полнотой извлечения биологически активных веществ осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Экстракцию каждого варианта проводили отдельно. Объединенные извлечения для каждого варианта сбора упаривали под вакуумом. Остаток сушили в вакуум-сушильном шкафу при температуре 80 ± 2 °С.

Результаты проведенных исследований (среднее из 3 определений) приведены в таблице 2.

Результаты свидетельствуют о том, что наибольшее количество экстрактивных веществ, извлекаемых водой, и наибольшее количество флавоноидов содержится в сухом экстракте, полученном из 1-го варианта сбора.

Помимо проведенного эксперимента, рациональность взятых соотношений ингредиентов в предложенной прописи была подтверждена фармакологическими испытаниями, проведенными в Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН.

Следующий этап исследования был посвящен установлению товароведческих показателей. Анализ проводили в пяти сериях растительной композиции. Сырьё оценивали по следующим показателям: внеш-

Таблица 1

Варианты соотношения лекарственных растительных средств в рецептуре сбора

№ п/п	Наименование ингредиентов чая	Варианты чая по количеству входящих ингредиентов (г)			
		1	2	3	4
1	Цветки пижмы	10,0	15,0	10,0	15,0
2	Трава почечного чая	15,0	20,0	25,0	15,0
3	Листья брусники	20,0	20,0	15,0	20,0
4	Цветки бессмертника	20,0	25,0	20,0	15,0
5	Листья мяты	15,0	10,0	15,0	15,0
6	Листья сенны	20,0	10,0	15,0	20,0

Таблица 2

Результаты анализа четырех рецептур сбора очищающего с различным соотношением лекарственного растительного сырья

Объект исследования, варианты чая	Содержание экстрактивных веществ в 100 г сырья, %	Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин, %
1-й вариант	17,50	1,28
2-й вариант	14,26	0,93
3-й вариант	14,52	0,98
4-й вариант	13,87	0,91

Результаты товароведческого анализа «Сбора очищающего»

№ п/п	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% HCL	Влажность	Примеси		Амбарные вредители
				Органические	Минеральные	
1	8,77	3,16	8,13	1,34	0,99	Не обнаружены
2	7,85	3,25	9,36	1,29	1,13	Не обнаружены
3	7,69	2,88	7,56	2,22	1,22	Не обнаружены
4	6,97	3,75	7,85	2,51	1,34	Не обнаружены
5	6,84	3,99	6,45	1,89	1,56	Не обнаружены
Среднее	7,62	3,41	7,87	1,85	1,25	Не обнаружены
№ п/п	Части растения, изменившие цвет	Измельченность		Радионуклеиды, Бек/кг		Органолептические показатели (цвет, аромат, вкус водн. извлеч.)
		частиц > 2 мм	частиц < 0,25 мм	Cs 137	Sr 90	
1	Отсутствуют	4,5	13,8	1,23	1,6	Соответствует
2	Отсутствуют	5,0	14,3	1,24	1,04	Соответствует
3	Отсутствуют	3,6	16,9	1,35	1,17	Соответствует
4	Отсутствуют	5,1	14,5	1,67	0,98	Соответствует
5	Отсутствуют	4,8	13,0	1,22	0,98	Соответствует
Среднее	Отсутствуют	4,6	14,5	1,34	1,15	Соответствует

ние признаки; зола общая; зола, нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте; влажность; примеси органические и минеральные; измельченность; содержание радионуклидов. Результаты анализа приведены в таблице 3.

Полученные данные позволили установить следующие показатели для сбора очищающего: смесь неоднородных частиц растительного сырья зеленого цвета с желтыми и лимонно-желтыми включениями; содержание общей золы не более 10 %; золы, нерастворимой в 10% хлористоводородной кислоте, – не более 4 %; массовая доля влаги – не более 14 %; степень измельчения частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, не более 5 %; степень измельчения частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,25 мм, не более 15 %; органической примеси – не более 3 %, минеральной примеси – не более 2 %; массовая доля металломагнитной примеси – не более 0,0005 %. Зараженность амбарными вредителями, плесень, затхлость, посторонние запахи и привкусы не допускаются.

Для определения критериев подлинности был проведен макро- и микроскопический анализ и установлены основные анатомо-диагностические признаки сбора, соответствующие описаниям ГФ XI издания.

Наличие групп основных БАВ было установлено в ходе фитохимического исследования.

На первом этапе исследования были проведены качественные реакции с водным и спиртовым извлечением. В данной композиции предполагалось наличие следующих групп БАВ: флавоноидов, антраценопроизводных, дубильных веществ, полисахаридов и эфирного масла.

Для установления качественного состава БАВ сбора очищающего был использован метод хроматографии в тонком слое сорбента. Установлено

присутствие в составе сбора фенольных соединений – кислот хлорогеновой, розмариновой, хризотановой и галловой, флавоноидов – рутина, гиперозида, гесперидина, изосалипурпозиды, нарингенина, апигенина, арбутина, синенсина, гидрохинона и сеннозиды А, а также свободных сахаров и аминокислот (табл. 4).

По результатам проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. С учетом фармакологического скрининга и предварительного фитохимического исследования разработан состав и обосновано соотношение компонентов сбора очищающего.

2. Проведен товароведческий анализ, в ходе которого установлены нормы числовых показателей, определяющих качество сбора.

3. Установлены значимые анатомо-диагностические признаки.

4. В результате фитохимического исследования с использованием качественных реакций и тонкослойной хроматографии установлено присутствие основных групп биологически активных веществ. Разработанные показатели будут включены в нормативную документацию на сбор очищающий.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Аполихин О.И., Сивков А.В., Бешлиев Д.А., Солнцева Т.В. и др. Анализ урологической заболеваемости в Российской Федерации в 2002–2009 годах по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология. – М., 2011. – № 1. – С. 4–10.

Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Beshliev D.A., Solntseva T.V. et al. Analysis of urologic morbidity in Russian Federation in 2002–2009 according to the data of official statistics // Experimental and Clinical Urology. – Moscow, 2011. – N 1. – P. 4–10. (in Russian)

Таблица 4

Идентификация биологически активных веществ сбора очищающего методом ТСХ

Система	Rf зон	Идентификация
Хлороформ – Этилацетат – Раствор уксусной кислоты 5%	0,38	Хлорогеновая кислота
	0,45	Не идентифицирована
	0,69	Розмариновая кислота
	0,79	Хризофановая кислота
Этилацетат – Муравьиная кислота – Вода	0,10	Рутин
	0,15	Гиперозид
	0,18	Геспередин
	0,24	Гиперозид
	0,32	Не идентифицирована
	0,37	Не идентифицирована
	0,40	Изосалипурпозид
	0,46	Не идентифицирована
	0,51	Не идентифицирована
	0,61	Нарингенин
	0,64	Апигенин
Толуол – Этилацетат – Метанол	0,22	Не идентифицирована
	0,30	Не идентифицирована
	0,35	Синенсестин
	0,44	Не идентифицирована
	0,52	Не идентифицирована
Муравьиная кислота – Вода – Этилацетат	0,2	Арбутин
	0,67	Галловая кислота
	0,85	Гидрохинон
Этилацетат – Метанол – Вода	0,22	Не идентифицирована
	0,27	Не идентифицирована
	0,37	Сеннозид А
	0,55	Не идентифицирована
	0,63	Не идентифицирована
	0,75	Не идентифицирована
	0,81	Не идентифицирована
	0,85	Не идентифицирована
Пиридин – Этиацетат – Вода	0,17	Сахароза
	0,22	Галактоза
	0,30	Глюкоза
	0,40	Фруктоза
	0,63	Не идентифицирована
	0,76	Рамноза
	0,82	Не идентифицирована
	0,87	Не идентифицирована
н-Бутанол – Ледяная уксусная кислота – Вода	0,21	Аргинин
	0,35	Глицин
	0,5	Метионин

2. Комшилова К.А., Трошина Е.А., Бутрова С.А.
Неалкогольная жировая болезнь печени при ожирении

// Ожирение и метаболизм. – М., 2011. – № 3. – С. 3–11.

Komshilova K.A., Troshina E.A., Butrova S.A. Non-alcoholic fatty liver disease at the obesity // *Obesity and Metabolism*. – Moscow, 2011. – N 3. – P. 3–11. (in Russian)

3. Лекарственные растения государственной фармакопеи / Под ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева. – М: Анми, 1999. – 448 с.

Medicinal herbs of state pharmacopeia / Ed. by I.A. Samylyna, V.A. Severtsev. – Moscow: Anmi, 1999. – 448 p. (in Russian)

4. Петракова О.С., Черниогло Е.С., Терских В.В., Калистратова Е.Н. и др. Использование клеточных технологий в лечении патологий печени // *Acta Naturae*. – М., 2012. – Т. 4, № 3 (14). – С. 18–33.

Petrakova O.S., Cherioglo E.S., Terskikh V.V., Kalistratova E.N. et al. Use of cell technologies in the treatment of liver pathologies // *Acta Naturae*. – Moscow, 2012. – Vol. 4, N 3 (14). – P. 18–33. (in Russian)

5. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов); 2-е изд., перераб. и доп. / Под ред. В.А. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. – 1239 с.

Pharmacognosy: Textbook for pharmaceutic students; 2nd ed., revised and enlarged. // Ed. by V.A. Kurkin. – Samara: Ofort LLC, Samara State Medical University, 2007. – 1239 p. (in Russian)

6. Шнайдер Н.А., Шаповалова Е.А. Липидный обмен: введение // *Вестник Клинической больницы № 51. – Железногорск*, 2008. – № 1 (1), Т. III. – С. 9–18.

Shneider N.A., Shapovalova E.A. Lipid metabolism: Introduction // *Herald of Clinical hospital N 51. – Zheleznogorsk*, 2008. – N 1 (1), Vol. III. – P. 9–18. (in Russian)

7. Goldstein J.L., Brown M.S. Familial hypercholesterolemia // In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Ed. by C.H. Scriver, A.L. Beaudet. – N.-Y.: McGraw Hill, Medical Publishing Division, 2001.

Сведения об авторах

Барсегян Антон Геворкбекович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (117216, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1; тел.: 8 (495) 388-46-54; e-mail: Anton.barseg@mail.ru)

Маркарян Артем Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России (127018, г. Москва, ул. Складочная д. 1, стр. 17; тел.: 8 (495) 656-25-85; e-mail: markaryan1med@gmail.com)

Бардаханова Мария Салдамаевна – преподаватель кафедры фармакологии медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36; тел.: 8 (3012) 44-55-03)

Information about the authors

Barsegyan Anton Gevorgbekovich – candidate of biological science, senior scientific officer of All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Grin Str., 7, constr. 1, Moscow, 117216; tel.: +7 (495) 388-46-54; e-mail: Anton.barseg@mail.ru)

Markaryan Artem Aleksandrovich – doctor of pharmaceutical science, professor, head of the department of pharmacy of pharmaceutical faculty of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Skladochnaya Str., 1, constr. 17, Moscow, 127018; tel.: +7 (495) 656-25-85; e-mail: markaryan1med@gmail.com)

Bardakhanova Maria Saldamaevna – lecturer of the department of pharmacy of medical faculty of Buryat State University (Oktjabrskaya Str., 36, Ulan-Ude, 670002; tel.: 8 (3012) 44-55-03)