

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства
здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Накарякова Наталья Ивановна

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
ПИОНА САДОВЫХ СОРТОВ**

14.04.01 – технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Кандидат фармацевтических наук,
доцент М.М. Смирнова

Пермь – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Сведения о пионе уклоняющемся и пионе садовых сортов.....	16
1.1.1. Характеристика и распространение рода <i>Paeonia</i> L.	16
1.1.2. Морфологическая характеристика.....	17
1.1.3. Распространение.....	19
1.1.4. Заготовка.....	20
1.1.5. Химический состав.....	21
1.2. Основные группы БАВ и их фармакологическое действие.....	21
1.2.1. Монотерпеновые гликозиды (иридоиды).....	21
1.2.2. Флавоноиды.....	23
1.3. Современные подходы к анализу сырья пиона уклоняющегося и пиона молочноцветкового.....	25
1.3.1. Анализ монотерпеновых гликозидов.....	25
1.3.2. Анализ флавоноидов.....	26
1.4. Применение пиона в медицине.....	27
1.4.1. Область применения.....	27
1.4.2. Лекарственные препараты на основе пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов.....	29
1.5. Современное состояние и тенденции разработки фитопрепаратов седативного действия	32
Заключение по главе I.....	41
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Объекты исследования и вспомогательные вещества.....	42
2.1.1. Объекты исследования.....	42
2.1.2. Вспомогательные вещества.....	43
2.2. Методы исследования.....	44
2.2.1. Определение подлинности ЛРС.....	44

2.2.2. Определение числовых показателей ЛРС.....	44
2.2.3. Качественный анализ БАВ.....	45
2.2.3.1. Качественные реакции.....	45
2.2.3.2. Хроматографический анализ БАВ.....	46
2.2.4. Количественное определение монотерпеновых гликозидов.....	47
2.2.5. Исследование микроэлементного состава.....	49
2.2.6. Физико-химические и технологические методы исследования «Пионифит» экстракта сухого.....	49
2.2.6.1. Потеря в массе при высушивании.....	49
2.2.6.2. Растворимость.....	50
2.2.6.3. Степень сыпучести порошков.....	50
2.2.7. Определение микробиологической чистоты.....	51
2.2.8. Методы анализа пленок лекарственных.....	51
2.2.8.1. Определение относительной вязкости.....	51
2.2.8.2. Анализ по физико-химическим показателям.....	51
2.2.9. Биофармацевтические методы исследования пленок лекарственных.....	53
2.2.10. Фармакологические методы исследования.....	53
2.2.10.1 Острая токсичность.....	53
2.2.10.2. Тест Ирвина.....	54
2.2.10.3. Тест спонтанной двигательной активности.....	54
2.2.10.4. Оценка противовоспалительной активности.....	55
2.2.10.5. Анксиолитическое действие.....	56
2.2.11. Обработка результатов.....	57
ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ПИОНА УКЛОНЯЮЩЕГОСЯ И ПИОНА САДОВЫХ СОРТОВ.....	58
3.1. Оценка качества травы пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов...	58
3.1.1. Макроскопический анализ.....	58
3.1.2. Микроскопический анализ.....	60

3.1.3. Товароведческий анализ.....	65
3.2. Фитохимический анализ БАВ пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов.....	66
3.2.1. Качественный анализ флавоноидов.....	66
3.2.2. Качественный анализ монотерпеновых гликозидов.....	67
3.2.3. Исследование БАВ в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов методом ГХ-МС.....	68
3.3. Количественное определение БАВ в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов.....	71
3.3.1. Определение содержания экстрактивных веществ.....	71
3.3.2. Количественное определение флавоноидов.....	71
3.3.3. Количественное определение монотерпеновых гликозидов.....	77
3.3.4. Количественное определение пеонифлорина.....	78
3.3.5. Исследование макро- и микроэлементного состава.....	87
Выводы по главе 3.....	88
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ «ПИОНИФИТ» ЭКСТРАКТА СУХОГО И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ.....	90
4.1. Оптимизация условий экстрагирования травы пиона садовых сортов...	90
4.1.1. Выбор экстрагента.....	90
4.1.2. Определение соотношения сырье – экстрагент.....	91
4.1.3. Определение оптимальной температуры извлечения БАВ из травы пиона садовых сортов.....	92
4.1.4. Определение степени измельчения сырья.....	93
4.1.5. Определение времени наступления равновесной концентрации.....	94
4.1.6. Определение кратности экстракции.....	95
4.2. Технологическая схема получения «Пионифит» экстракта сухого.....	96
4.3. Стандартизация «Пионифит» экстракта сухого.....	99
4.3.1. Определение качественного состава «Пионифит» экстракта сухого.....	99
4.3.1.1. Определение БАВ в «Пионифит» экстракте сухом с использованием	

качественных реакций.....	99
4.3.1.2. Хроматография в тонком слое.....	100
4.3.1.3. Исследование «Пионифит» экстракта сухого методом ГХ-МС.....	105
4.3.2. Количественное определение БАВ в «Пионифит» экстракте сухом ...	106
4.3.2.1. Определение содержания монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом.....	106
4.3.2.2. Количественное определение флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом	111
4.3.2.3. Анализ пеоноифлорина в «Пионифит» экстракте сухом методом ВЭЖХ.....	118
4.3.3. Исследование физико-химических и технологических показателей «Пионифит» экстракта сухого	123
4.3.4. Изучение микробиологической чистоты.....	124
4.3.5. Изучение сроков годности и условий хранения «Пионифит» экстракта сухого	125
Выводы по главе 4.....	129
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ТЕХНОЛОГИИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛЕНОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ «ПИОНИФИТ».....	130
5.1. Разработка состава и технологии пленок лекарственных «Пионифит».....	130
5.1.1. Выбор компонентов основы пленок лекарственных.....	130
5.1.2. Кинетические исследования процесса растворения пленок лекарственных	133
5.1.3. Разработка технологии пленок лекарственных «Пионифит».....	137
5.2. Стандартизация пленок лекарственных «Пионифит».....	140
5.2.1. Анализ по физико-химическим показателям.....	140
5.2.2. Качественный анализ и количественное определение БАВ в пленках лекарственных «Пионифит».....	141
5.3. Изучение микробиологической чистоты пленок лекарственных	

«Пионифит».....	145
5.4. Исследование стабильности пленок лекарственных «Пионифит».....	146
Выводы по главе 5.....	149
ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ПИОНА САДОВЫХ СОРТОВ	150
6.1. Исследование безопасности «Пионифит» экстракта сухого.....	150
6.1.1. Определение острой токсичности.....	150
6.1.2. Исследование нейротоксикологического профиля.....	151
6.1.3. Исследование влияния «Пионифит» экстракта сухого на спонтанную двигательную активность.....	151
6.2. Исследование эффективности препаратов на основе пиона садовых сортов.....	153
6.2.1. Изучение противовоспалительной активности	153
6.2.2. Изучение анксиолитического действия	155
Выводы по главе 6.....	159
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	160
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	162
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	164
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	178

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время важным вопросом в медицине, требующим решения, является терапия неврозов и неврозоподобных состояний, рост которых обусловлен возросшим числом и интенсивностью психотравмирующих факторов, действующих на человека в современном обществе [97].

При лечении невротических расстройств и фармакологической коррекции стресса широко используются транквилизаторы, антидепрессанты и седативные средства [23].

Поскольку данные состояния требуют длительного лечения, особое значение приобретает безопасность и переносимость применяемых лекарственных средств. Использование синтетических лекарственных препаратов для лечения заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) сопровождается рядом побочных эффектов: гиперседация, нарушения памяти и внимания, метаболические, гормональные изменения, развитие лекарственной зависимости и т.д. [57, 58]. Данные факторы ограничивают возможность их применения.

Поэтому особый интерес вызывают препараты растительного происхождения, применяющиеся в медицине для лечения расстройств тревожно-депрессивного спектра. К растениям, используемым для изготовления таких фитопрепаратов, относятся зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) и зверобой пятнистый (*Hypericum maculatum* Crantz), мята перечная (*Mentha piperita* L.), валериана лекарственная (*Valeriana officinalis* L.), пустырник пятилопастный (*Leonurus quinquelobatus* Gilib.) и пустырник сердечный (*Leonurus cardiaca* L.) и т.д. Кроме того, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 80% населения планеты отдают предпочтение именно препаратам растительного происхождения [110].

Одним из перспективных источников для получения фитопрепаратов седативного действия являются растения рода Пион (*Paeonia*). Пион уклоняющийся (*Paeonia anomala* L.) – ценное лекарственное растение, широко применяемое в медицине. Лечебные препараты на его основе обладают

успокаивающим, противосудорожным, анксиолитическим, противовоспалительным, обезболивающим, тонизирующим, бактерицидным действием [5, 87]. Однако в настоящее время объем заготовок сырья этого вида ограничен, поскольку пион уклоняющийся произрастает рассеянно, не образуя продуктивных зарослей, необходимо использование ручного труда при заготовке сырья, повторные заготовки допускается проводить только через 5 лет. Помимо этого, растение занесено в Красную книгу Среднего Урала в 1996 году. Морфологически близкими видами пиона уклоняющегося являются культивируемые пионы садовых сортов. Использование травы пиона садовых сортов в качестве сырья для разработки лекарственных препаратов позволит решить вопрос недостаточности сырьевой базы.

В настоящее время из сырья пиона уклоняющегося предложено изготавливать водные извлечения, кроме того, выпускается настойка, которая является седативным препаратом растительного происхождения. Однако данная лекарственная форма имеет ряд существенных недостатков (неточность дозирования, неудобство применения и транспортировки), имеет ограничения в применении у детей и лиц пожилого возраста, пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Решением данной проблемы является разработка экстракта сухого из сырья пиона садовых сортов с целью получения субстанции для создания новых лекарственных препаратов.

Усиленное развитие научных исследований в области биофармации убедительно показало, что важное значение имеет правильно выбранная лекарственная форма, которая обеспечивает и удобство применения, и эффективность действия содержащихся в ней фармакологически активных веществ. С этой точки зрения перспективной лекарственной формой являются пленки лекарственные. Поэтому разработка пленок лекарственных на основе экстракционных препаратов травы пиона садовых сортов открывает новые возможности для применения данного растения.

Таким образом, актуальным вопросом современной медицины является разработка и внедрение новых препаратов растительного происхождения для профилактики и лечения заболеваний нервной системы.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является сравнительное изучение пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов и разработка экстракционных и полимерных лекарственных форм на основе пиона садовых сортов.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- провести сравнительный анализ травы пиона уклоняющегося и травы пиона садовых сортов по морфологическим признакам и химическому составу;
- подобрать оптимальные условия экстракции основных групп биологически активных веществ (БАВ) из травы пиона садовых сортов и разработать технологию экстракта сухого – «Пионифит»;
- разработать методики качественного и количественного анализа основных групп БАВ в траве пиона садовых сортов и «Пионифит» экстракте сухом;
- разработать состав и технологию пленок лекарственных (ПЛ) «Пионифит»;
- установить оптимальные условия и сроки хранения «Пионифит» экстракта сухого и пленок лекарственных «Пионифит»;
- изучить безопасность и фармакологическую активность «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит».

Научная новизна

На основании фитохимических исследований установлено сходство пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов по морфологическим признакам и химическому составу. Адаптированы методики, и впервые проведено количественное определение флавоноидов и пеонифлорина в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов.

В результате проведенных научно-экспериментальных исследований подобраны условия выделения комплекса БАВ из травы пиона садовых сортов, которые легли в основу способа получения экстракта сухого – «Пионифит». Предложены методы анализа, валидированы методики определения основных групп БАВ, и проведена стандартизация «Пионифит» экстракта сухого. Определены условия и срок хранения «Пионифит» экстракта сухого.

Впервые подобран состав и разработана технология пленок лекарственных «Пионифит». Проведена стандартизация разработанной лекарственной формы по содержанию основных групп БАВ, технологическим и физико-химическим показателям. Изучена стабильность ПЛ при хранении. Проведено исследование острой токсичности и различных видов специфической фармакологической активности препаратов на основе травы пиона садовых сортов, доказано противовоспалительное и анксиолитическое действие.

Подано и зарегистрировано заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение «Способ переработки травы пиона садовых сортов», регистрационный № 2018115893 от 28.04.2018 (приложение 5).

Практическая значимость

Разработан способ получения «Пионифит» экстракта сухого. На основании проведенных исследований разработаны и внедрены:

- опытно-промышленный регламент на производство пиона садовых сортов экстракта сухого, согласованный с ОАО «Биохиммаш» (акт апробации от 14.12.2016) (приложение 1, 2);
- методики количественного определения флавоноидов и монотерпеновых гликозидов в пиона садовых сортов экстракте сухом (акты апробации от 20.02.2017 – воспроизведение методик в условиях лаборатории ФКП «Армавирская фабрика» (приложение 3, 4);
- учебно-методическое пособие «Пленки лекарственные на основе извлечений из травы пиона садового» (утверждено и одобрено Центральным Методическим Советом ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (протокол

№ 6 от «15» мая 2018 г.) (акт внедрения от 08.06.2018; акт апробации от 04.07.2018 в условиях лаборатории РИЦ «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России) (приложение 6, 7);

- технология пленок лекарственных «Пионифит» (акт апробации от 20.06.2018) (приложение 8).

Результаты исследований используются в учебном процессе:

- на кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (акт внедрения от 08.06.2018) (приложение 9);
- на кафедре Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акты внедрения от 30.04.2018) (приложение 10, 11);

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на фармакогностическом изучении лекарственного растительного сырья, основных технологических условиях разработки экстракционных и полимерных лекарственных форм, а также базируется на комплексном подходе разработки унифицированных методик сквозной стандартизации лекарственного растительного сырья и готовых препаратов.

В диссертационном исследовании использованы теоретические, технологические, химические, физико-химические, микробиологические биофармацевтические, фармакологические и статистические методы, обеспечивающие разработку эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Положения, выносимые на защиту

- результаты изучения морфологических признаков, качественного химического анализа и количественного определения БАВ в пиона уклоняющегося траве и пиона садовых сортов траве;

- результаты изучения оптимальных условий экстрагирования БАВ из пиона садовых сортов травы с целью получения экстракта сухого;
- результаты стандартизации «Пионифит» экстракта сухого по органолептическим, технологическим, химическим, микробиологическим параметрам и определения их стабильности;
- результаты по выбору оптимального состава и технологии ПЛ «Пионифит», включая биофармацевтические исследования кинетики высвобождения активных компонентов из ПЛ;
- результаты стандартизации ПЛ «Пионифит» по показателям подлинность, количественное определение БАВ, физико–химическим параметрам, а также изучения их стабильности в процессе хранения ПЛ;
- результаты исследования безопасности и специфической фармакологической активности препаратов пиона садовых сортов (анксиолитической и противовоспалительной).

Степень достоверности

Экспериментальные исследования проводились с использованием современных технологических, химических, физико-химических, биофармацевтических и фармакологических методов, позволяющих получать воспроизводимые и однозначные результаты. Все полученные данные статистически обработаны и достоверны. Статистическая обработка результатов исследований проведена согласно ГФ XIII с использованием программы «Microsoft Excel», статистического пакета «Statistica 6.0». Заключение и научные положения, изложенные в диссертационной работе, достоверны и вытекают из полученных результатов.

Апробация результатов

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на:

- межрегиональной студенческой научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы студенческой молодежной медицинской науки» (г. Рязань, 2014 г.);

- всероссийской научно-практической конференции с международным участием «YSRP–2015» (2015 г.);
- научно-практической конференции памяти профессора А.В. Казьянина «Инновации в биофармацевтике» (г. Пермь, 2015 г.);
- научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука и практика: достижения, инновации, перспективы» (г. Пермь, 2015 г.);
- XXII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2015 г.);
- научно-практической конференции с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки» (г. Пермь, 2016 г.);
- VI всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2016 г.);
- научно-практической конференции с международным участием «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки» (г. Пермь, 2017 г.);
- Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти доцента Пешковой В.А. «Инновационные технологии в фармации» (г. Иркутск, 2018 г.).

Личный вклад автора

Автором диссертационной работы осуществлен научно-информационный поиск и обоснование темы диссертационной работы, выбор объектов исследования, постановка целей и задач. Все экспериментальные фрагменты выполнены при личном участии автора, выполнен комплекс лабораторных исследований и статистическая обработка полученных результатов. Оформлены результаты исследования и подготовлены публикации по теме работы.

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России при поддержке программы «УМНИК» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Пермь, 2015 г.)

Соответствие паспорту научной специальности

Основные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты исследования соответствуют области исследований специальности по пунктам 1, 3, 6.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и 1 – в журнале, индексируемом реферативной базой Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа содержит основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, 4 главы экспериментальных исследований, заключение, список использованной литературы и приложения.

Диссертация изложена на 190 страницах печатного текста, содержит 59 таблиц и 31 рисунок. Список использованной литературы включает 137 литературных источников, в том числе 32 иностранных.

Во введении сформулирована актуальность исследования, цели и задачи, научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту.

Глава 1 посвящена обзору отечественной и зарубежной литературы по исследованию травы пиона. Изложены данные по распространению рода *Paeonia* L., ареалу обитания, химическому составу, применению пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов в научной и народной медицине, анализу ассортимента препаратов пиона. Показана необходимость использования пиона садовых сортов, а также расширения номенклатуры препаратов на основе изучаемого сырья.

В главе 2 описаны объекты, материалы и методы исследования, использованные в работе.

В главе 3 приведены результаты сравнительного фитохимического исследования травы пиона уклоняющегося и травы пиона садовых сортов.

В главе 4 представлены данные по установлению оптимальных условий экстрагирования травы пиона садовых сортов, получению пиона садовых сортов экстракта сухого – «Пионифит», по изучению основных показателей качества, условий и сроков хранения полученного препарата.

В главе 5 представлены результаты исследования оптимального состава ПЛ, технология получения ПЛ «Пионифит», результаты стандартизации полученного препарата.

Глава 6 посвящена изучению безопасности и фармакологического действия препаратов на основе пиона садовых сортов.

В приложении представлены опытно-промышленный регламент на производство пиона садовых сортов экстракта сухого и акт апробации технологии в ОАО «Биохиммаш», акты апробации методик количественного определения суммы флавоноидов и суммы монотерпеновых гликозидов в пиона садовых сортов экстракте сухом и методик контроля качества ПЛ «Пионифит», учебно-методическое пособие «Пленки лекарственные на основе извлечений из травы пиона садового», акты внедрения результатов научных исследований в учебный процесс.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сведения о пионе уклоняющемся и пионе садовых сортов

1.1.1. Характеристика и распространение рода *Paeonia* L.

Род Пион *Paeonia* L. выделен из семейства лютиковые *Ranunculaceae* Juss. в самостоятельное семейство пионовые *Paeoniaceae* Rudolphi и включает 35 видов. Среди рода *Paeonia* различают три раздела: *Moutan* DC., *Onaepia* Lindley и *Paeonia* DC [114, 123].

Раздел *Onaepia* включает 2 эндемичных вида тихоокеанского региона Северной Америки. Данный раздел представлен травянистыми растениями с заметными стаминодиальными дисками и небольшими вогнутыми лепестками.

Раздел *Moutan* распространен в центральной и западной частях Китая и разбит на два подраздела *Delavayanae* и *Vaginatae*. В этот раздел входят шесть видов кустарниковых пионов с заметными стаминодиальными дисками и крупными многочисленными лепестками.

Раздел *Paeonia* («*Рaeон*») – самый большой среди рода *Paeonia* и является эволюционным биомом. Он разделен на два подраздела *Foliolatae* и *Paeonia* («*Dissectifoliae*»). Данный раздел состоит из 27 травянистых видов с незаметными дисками и крупными лепестками, которые располагаются рассеянно или образуют чашеобразную форму. Раздел *Paeonia* распространен в восточной, центральной Азии, западных Гималаях и Средиземноморском регионе [123, 133].

Межконтинентальная дизъюнкция среди пионов сформировалась приблизительно 16,6 млн. лет назад между разделом *Onaepia*, эндемиком западной части Северной Америки, и двумя другими разделами, обитающими в Евразии. Обмен листовенных растений между Восточной Азией и западом Северной Америки осуществлялся через «Берингов мост», а нарушение непрерывного распределения стало причиной формирования межконтинентальной дизъюнкции среди пионов в период Миоцена. Причиной нарушения дизъюнкции могло быть похолодание климата и/или затопление Берингова перешейка.

История распространения самого обширного раздела *Paeonia* связана с плейстоценовым оледенением. После гибридизации с азиатскими видами

европейские популяции пиона были полностью представлены их гибридами. Обширная гибридизация видов пиона привела к образованию различных комбинаций генома. Гибриды, которые адаптировались к климатическим изменениям в период Плейстоцена в Европе, в настоящее время распространены в средиземноморском регионе. Азиатские сорта не прижились в Европе, поэтому диапазон их распространения ограничен восточной Азией, которая в меньшей степени подверглась влиянию плейстоценового оледенения. Гибридные виды *P. xinjiangensis*, *P. emodi*, *P. sterniana* являются потомками восточноазиатских сортов *P. lactiflora*, *P. veitchii*, *P. mairei*. Группа видов *P. clusii*, *P. rhodia*, *P. broteri*, *P. coriacea*, *P. mlokosewitschi*, *P. mascula* ssp. и *hellenica*, ssp. *mascula*, эндемики различных регионов Кавказа и южной части средиземноморского региона, возможно, имеют гибридное происхождение. Ледниковый период привел к географической изоляции и созданию разнообразия среди видов средиземноморского региона *P. arietina*, *P. humilis*, *P. officinalis*, *P. parnassica*, которые также имеют гибридное происхождение [133].

В настоящее время насчитывается около 6 тыс. сортов травянистых и древовидных пионов, из них около 5 тыс. составляют сорта травянистых пионов. Все распространенные в культуре травянистые пионы разделяют на три группы. В первую группу входят сорта, произошедшие от пиона молочноцветкового (*P. lactiflora*), их число составляет приблизительно 70 % от общего числа, вторая группа составляет менее 1% – это сорта, полученные путем отбора и селекции форм пиона лекарственного (*P. officinalis*); третья группа — гибриды, полученные путем межвидовой гибридизации пиона молочноцветкового с другими видами (пионом лекарственным или дикорастущими видами Китая, Средиземноморья и Кавказа [14, 27, 85].

1.1.2. Морфологическая характеристика

Пион уклоняющийся (марьин корень) – *Paeonia anomala* L. (семейство Раеониaceae) – многолетнее травянистое растение высотой до 1 м. На территории России произрастает от 12 до 15 видов пионов, из которых для медицинских целей заготавливается только сырье пиона уклоняющегося [39, 86].

Пион уклоняющийся имеет короткие многоглавые корневища, отходящие от стебля мясистые корни. Стебли прямостоячие, ребристые, голые буровато-зеленого цвета. Листья очередные с короткими черешками, дважды тройчато рассеченные на ланцетовидные сегменты, с верхней стороны темно-зеленого, с нижней – светло-зеленого цвета. Цветки одиночные до 13 см в диаметре с многочисленными тычинками и 3 – 5 пестиками, сидящими на диске. Чашечка состоит из 5 чашелистиков. Лепестки обратнойцевидные розово-красного цвета. Плод – многолистовка, состоит из 3 – 5 крупных звездчато расположенных листовок, к концу созревания может приобретать бордовый оттенок [38, 132].

Сорта садовых травянистых пионов отличаются друг от друга по такому морфологическому признаку, как форма цветка, и согласно этому подразделяются на 5 групп:

1. Немахровая форма (простая). Цветки крупные с широкими лепестками. Венчик одно-двухрядный со множеством пестиков и тычинок.
2. Японская форма является переходной формой от немахровых к полумахровым. Лепестки расположены в 1 – 2 ряда. Тычинки видоизменены в узкие стаминодии, образующие в центре цветка полушар. Лепестки и нижняя часть тычинок имеют одинаковую окраску, верхняя часть тычинок имеет золотистую окантовку.
3. Анемовидная форма – переходная форма от японских пионов к махровым. Венчик одно-двухрядный с широкими нижними лепестками. Тычинки видоизменились в довольно крупные стаминодии, формирующие небольшой шар.
4. Полумахровая форма. Цветки с 3 – 7 рядами лепестков. Тычинки многочисленные, хорошо сформированные.
5. Махровая форма – наиболее распространенная группа. Цветок состоит из плотно сидящих лепестков, образующих 3 яруса. Верхний ярус образует кольцо из лепестков. На среднем ярусе лепестки уже, чем на верхнем и нижнем. Почти все тычинки и плодолистики трансформированы в лепестки. Сорта с махровыми цветками подразделяют на несколько подгрупп в

зависимости от конфигурации цветка и размеров лепестков: розовидные, бомбовидные, корончатые, шаровидные и полушаровидные.

Время цветения пионов – с конца мая до конца июня. Плоды созревают в конце августа – первой половине сентября [12, 98].

1.1.3. Распространение

Пион уклоняющийся (*P. anomala*) – северо-восточноевропейскосибирский вид – распространен на северо-востоке Европейской части России, в Западной и Восточной Сибири, горах Казахстана и Средней Азии (Джунгарский Алатау, Тарбагатай, Тянь-Шань). В Уральском регионе встречается от Полярного до Южного Урала, обильнее всего представлен на Среднем и Северном Урале. Вид встречается в Северо-Западном Китае.

Растет в негустых лиственных, темнохвойных и смешанных лесах. Предпочитает богатые гумусом почвы, свойственные для пойменных лесов, а также открытые и полукоткрытые пространства, поэтому растет по опушкам, высокотравным полянам, на таежных лугах, в речных долинах. Пион уклоняющийся встречается рассеянно, растет отдельными экземплярами или группами, иногда образует заросли.

Пион уклоняющийся – ценное лекарственное растение, которое кроме лечебных свойств обладает высокими декоративными качествами. Поэтому вследствие активных антропогенных изменений, уничтожения во время цветения и расширения эксплуатации фиторесурсов популяции *P. anomala* сокращаются, и данный вид близок к исчезновению [105].

В настоящее время пион уклоняющийся внесен в красные книги среднего Урала, Пермского, Алтайского края, Республик Башкортостан и Коми, Кировской, Архангельской, Свердловской, Челябинской, Курганской и Тюменской областей, ХМАО и ЯНАО, Казахстана [24, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 82, 93].

В настоящее время на территории Российской Федерации насчитывается более 1 тыс. сортов пиона. Активная селекционная работа с пионами в России началась в послевоенное время. Наибольший интерес для селекционной работы

представляет скрещивание сортов пиона китайского или их гибридов с дикорастущими видами. В результате работы отечественных селекционеров получены сорта пиона, устойчивые к неблагоприятным условиям, болезням и вредителям, зимостойкие, засухоустойчивые и жаровыносливые. Благодаря перечисленным показателям декоративные пионы имеют широкое распространение [64].

1.1.4. Заготовка

Соблюдение правил заготовки лекарственного растительного сырья (ЛРС) позволяет получить качественное сырье, предназначенное для изготовления различных лекарственных форм. Заготовка сырья включает ряд последовательных этапов: сбор, сушка, хранение.

Для получения качественного растительного сырья необходимо соблюдать сроки заготовки, когда в растениях максимально накапливаются биологически активные вещества. Траву пиона заготавливают во время цветения. Сырье собирают в сухую погоду после высыхания утренней и до появления вечерней росы. Отбирают здоровые, хорошо развитые, не поврежденные вредителями растения. Корневища и корни выкапывают, очищают от земли и моют в воде. Надземную часть пиона срезают ножом или серпом, чтобы не повредить почки возобновления. Подземные органы растений собирают один раз в 5 – 7 лет, надземные части — один раз в 2 – 3 года. Для возобновления зарослей оставляют 2 – 3 крупных растения на 1 м². При массовой заготовке на открытых местообитаниях восстановление растений происходит примерно через 24 года, в лесах – через 30 – 40 лет.

Сушка предназначена для обеспечения длительного хранения сырья без изменения содержания БАВ. Сырье пиона сушат воздушным способом в тени под навесом или в хорошо проветриваемых помещениях. Допускается его досушивание в сушилках при температуре 45 – 60 °С.

После удаления избыточной влаги сырье закладывают на хранение. Его упаковывают в бумажные и матерчатые мешки, коробки, ящики и хранят в сухих,

защищенных от прямых солнечных лучей, хорошо вентилируемых помещениях при температуре 10 – 15 °С и относительной влажности воздуха 50% [24, 78].

1.1.5. Химический состав

В качестве лекарственного сырья у пиона уклоняющегося используют корневища и корни, траву. В подземных органах содержатся эфирное масло (0,5 – 5 %), бензойная и салициловая кислоты, монотерпеновые гликозиды, основным из которых является пеонифлорин (1 – 2 %), фенологлюкозид салицин, флавоноиды, дубильные вещества (8 – 15 %), алкалоиды, сапонины, концентрируется Zn, Sr, Cu, Ba, Se. В надземной части найдены пеонифлорин, пеонивизианозид, эфирное масло (0,01 – 0,08 %), дубильные вещества, флавоноиды, аскорбиновая кислота, накапливаются микроэлементы [24, 54]. Ранее проведенными исследованиями установлено присутствие в пионе уклоняющемся таких микроэлементов, как Zn, Fe, Cu, Mn и I, причем накопление некоторых микроэлементов в стеблях, листьях и цветках происходит интенсивнее, чем в подземных органах [84].

Одним из самых первых культивируемых растений является китайский травянистый пион (пион молочноцветковый), который содержит монотерпеновые гликозиды, такие как пеонифлорин (0,12 – 9,61 %), оксипеонифлорин, бензоилпеонифлорин, альбифлорин и лактифлорин; эфирные масла, тритерпены, танины, стильбены, флавоноиды и полифенолы [111, 119].

1.2. Основные группы БАВ и их фармакологическое действие

Фармакологическое действие лекарственных растений обуславливается содержанием в них комплекса БАВ. В результате сложного процесса растения синтезируют разнообразные по строению химические вещества (вторичные метаболиты), обладающие специфическим действием на живой организм и определяющие терапевтические эффекты лекарственных растений.

1.2.1. Монотерпеновые гликозиды (иридоиды)

Терпеноиды – класс органических соединений, углеродный скелет которых образован из изопреновых звеньев. Терпеноиды классифицируют в зависимости от количества изопреновых фрагментов, участвующих в построении углеродного

скелета: монотерпеноиды, сесквитерпеноиды, дитерпеноиды, тритерпеноиды, стероиды.

Иридоиды по химической структуре являются циклопентапирановыми монотерпенами, образованными из двух изопреновых фрагментов (C_{10}). Впервые иридоиды (лактон иридомирмецина и диальдегид иридодиаля) были выделены из защитных секретов австралийских муравьев рода *Iridomyrmex*. В основе строения иридоидов лежит циклическая форма иридодиаля (рисунок 1).

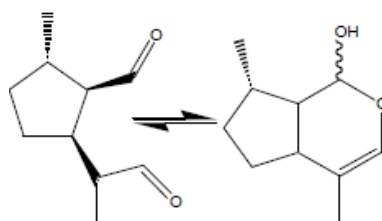


Рисунок 1 – Структурная формула иридодиаля

В свободном виде иридоиды легко окисляются кислородом воздуха, поэтому в растениях обычно присутствуют в виде гликозидов, что позволяет добиться стабилизации неустойчивого ацетального цикла [7, 108, 112, 136].

Иридоиды широко распространены в природе и встречаются в основном в двудольных растениях семейств Кутровые (Asteraceae), Норичниковые (Scrophulariaceae), Жимолостные (Caprifoliaceae), Яснотковые (Lamiaceae), Логаниевые (Loganiaceae), Мареновые (Rubiaceae), Горечавковые (Gentianaceae), Подорожниковые (Plantaginaceae), Валериановые (Valerianaceae) и др. Лекарственные растения, содержащие иридоиды, используются в народной медицине в качестве горьких тоников, седативных, гипотензивных, жаропонижающих средств, средств от кашля и кожных заболеваний.

Современные исследования показали, что иридоиды обладают широким спектром биологической активности и оказывают такие эффекты, как нейропротективный, противоопухолевый, антиоксидантный, антигепатотоксический, желчегонный, гипогликемический, гиполипидемический, спазмолитический, противовирусный, противомикробный,

иммуномодулирующий, противоаллергический, противовоспалительный [109, 135].

Одним из основных биоактивных компонентов корней пиона является монотерпеновый гликозид – пеонифлорин, структура которого представлена на рисунке 2. Установлено, что пеонифлорин обладает антикоагулянтным, спазмолитическим, иммуномодулирующим и гипогликемическим эффектами [119, 120, 125, 128, 134].

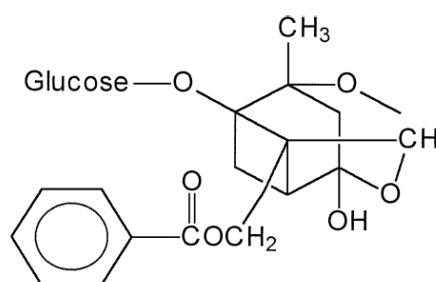


Рисунок 2 – Структурная формула пеонифлорина

1.2.2. Флавоноиды

Флавоноиды – естественные гетероароматические соединения, являющиеся вторичными метаболитами растений. Термин флавоноиды объединяет различные соединения с общей формулой углеродного скелета C₆-C₃-C₆ и их производные. Это бензо[b]пираны, имеющие ароматический заместитель в пирановом кольце, биогенетическим предшественником которых служат халконы. Все флавоноиды можно рассматривать как 2(3)(4)-фенильные производные хромана: флаваны, изофлаваны, неофлаваны или 1,1-, 1,2- и 1,3-дифенилпроизводные пропана.

Флавоноиды – наиболее обширный и многообразный класс природных фенольных соединений с высокой и разносторонней биологической активностью. К настоящему времени установлена структура более 7500 флавоноидов. Ими богаты (от 1 до 30 %) растения семейств: Сложноцветные (Compositae), Бобовые (Fabaceae), Сельдерейные (Apiaceae), Яснотковые (Lamiaceae), Розоцветные (Rosaceae), Гречишные (Polygonaceae), Рутовые (Rutaceae), Березовые (Betulaceae) и др. Они накапливаются преимущественно в цветках, листьях и плодах, в

меньших количествах – в корнях и стеблях как в гликозилированной (рутин и др.), так и в негликозилированной форме (кемпферол, кверцетин, лютеолин и др.).

Для флавоноидов характерно сочетание низкой токсичности с достаточно широким диапазоном терапевтических возможностей; они обладают широким спектром терапевтического действия: противовоспалительным, бактерицидным, гипотензивным, противоатеросклеротическим, желчегонным, кровоостанавливающим, диуретическим, седативным. Большое значение имеет противовоспалительное действие флавоноидов, с которым, вероятно, связаны их жаропонижающее, противоязвенное, ранозаживляющее и вяжущее действие. Противоотечное действие флавоноидов связано с их нормализующим влиянием на лимфоток. Также флавоноиды как слабые кардиотонические средства замедляют ритм сердечных сокращений и увеличивают их амплитуду. Кверцетин, рутин и другие флавонолы нормализуют пульс и способны восстанавливать силу гиподинамического сердца.

Мощная антиоксидантная активность флавоноидов связана с наличием сопряженных структур в молекулах, которые в качестве улавливателей свободных электронов прерывают цепные реакции свободнорадикального окисления. Флавоноиды оказывают модулирующее действие на такие ферменты, как фосфодиэстераза, цикло- и липооксигеназа, скваленмонооксигеназа, тирозиназа, гиалуронидаза и др., а также ингибирующее действие на ферменты цикла Кребса. При этом эффект флавоноидов имеет обратимый характер, что объясняет невысокую токсичность данных веществ. Противоопухолевое действие флавоноидов связано с их способностью вмешиваться в процессы клеточного деления в результате подавления активности нуклеаз.

Соединения, относящиеся к группе флавоноидов, обладают Р-витаминной активностью и, таким образом, способны уменьшать проницаемость и ломкость капилляров.

Таким образом, флавоноиды можно считать источниками средств общего действия, так как они обладают широким диапазоном терапевтического действия

в сочетании с ценным свойством быстрой эвакуации и отсутствием кумуляции [1, 7, 24, 53, 79, 103].

1.3. Современные подходы к анализу сырья пиона уклоняющегося и пиона молочноцветкового

Количественное определение основных групп БАВ лекарственного растительного сырья имеет важное значение при создании препаратов растительного происхождения. Нормативная документация в качестве одного из основных показателей включает нормирование содержания основных БАВ, определение которых проводится с использованием химических и физико-химических методов.

1.3.1. Анализ монотерпеновых гликозидов

Нормативные документы на сырье пиона уклоняющегося включают стандартизацию по содержанию иридоидов (монотерпеновых гликозидов). Так, в ФС 42-531-98 «Корневища и корни пиона уклоняющегося», ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося», частных статьях на траву, корневища и корни пиона уклоняющегося Белорусской фармакопеи приведена методика спектрофотометрического определения суммы иридоидов в пересчете на пеонифлорин. Для корневищ и корней пиона установлено содержание суммы иридоидов не менее 3,5%, в траве – не менее 2,5% [17, 96, 100, 101].

Важным показателем качества корней пиона является содержание пеонифлорина как основного компонента, обеспечивающего фармакологическое действие данного вида сырья. Для анализа пеонифлорина в пионе молочноцветковом *Paeonia lactiflora* предложены методы: тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез [62, 1189, 130].

Метод ВЭЖХ используется для качественного, количественного анализа и оценки чистоты природных соединений. Препаративная и полупрепаративная ВЭЖХ – метод очистки, целью которого является изолирование и извлечение соединений, в то время как аналитическая ВЭЖХ используется для качественного

и количественного анализа. Данный метод популярен в изучении относительно нестабильных иридоидов, которые широко представлены в различных растениях [107, 122, 129].

В Японскую фармакопею включена статья на корни пиона молочнокветкового «*Peony Root*», в которой приведена методика количественного определения пеонифлорина методом жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Данная фармакопейная статья регламентирует содержание пеонифлорина не менее 2% в пересчете на сухое сырье [117].

Также предложен метод H^1 -ЯМР-спектроскопии, не требующий использования органических растворителей, который позволяет количественно определять содержание пеонифлорина за более короткое время, чем метод ВЭЖХ [119].

1.3.2. Анализ флавоноидов

Один из основных и наиболее распространенных методов количественного анализа *флавоноидов* – спектрофотометрия. Спектрофотометрическая методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин включена в частные фармакопейные статьи ГФ XIII издания на ЛРС: гинкго двулопастного листья, бузины черной цветки, зверобоя трава, земляники лесной листья, ноготков лекарственных цветки, полыни горькой трава, ромашки аптечной цветки, фиалки трава, череды трехраздельной трава, эрвы шерстистой трава. Для минимизации вклада сопутствующих ароматических веществ в оптическую плотность исследуемых растворов используется реакция комплексообразования с раствором алюминия хлорида [20, 94].

В Европейскую фармакопею включены частные фармакопейные статьи на ЛРС и препараты растительного происхождения, в которых приведены методики количественного анализа суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом по реакции окрашивания с алюминия хлоридом: березы повислой и березы пушистой листья (*Betulae folia*), ноготков лекарственных цветки (*Calendulae officinalis flores*), бузины черной цветки (*Sambuci nigrae flores*), хвоща полевого

трава (*Equiseti arvensis herba*), горца птичьего трава (*Poligoni avicularis herba*), пустырника пятилопастного и пустырника сердечного трава (*Leonuri herba*).

Европейская фармакопея предлагает метод жидкостной хроматографии для количественного анализа флавоноидов в листьях гинкго билоба, сухом экстракте гинкго билоба. Стандартизация сухого экстракта травы зверобоя проводится по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Анализ проводят методом жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Расчет суммы флавоноидов в пересчете на рутин ведут по площадям пиков экстракта и эталонных растворов [113].

Одним из селективных методов анализа БАВ является метод ВЭЖХ, который используется для идентификации, разделения и определения флавоноидов. В данном случае применяют обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. Разработана методика анализа для сырья гречихи посевной *Fagopyrum sagittatum* Gilib., густого экстракта первоцвета лекарственного *Primula officinalis*, экстракта зверобоя [22, 32, 90].

1.4. Применение пиона в медицине

1.4.1. Область применения

В научной медицине к применению разрешена настойка из корневищ и корней и травы пиона уклоняющегося на 40%-ном спирте, которая обладает седативным, противосудорожным и обезболивающим действием. Настойку пиона назначают при неврастенических состояниях, таких как неврозы, остаточные явления травматической энцефалопатии, бессоннице, фобических и ипохондрических состояниях, вегето-сосудистых нарушениях различной этиологии. Кроме того, настойка пиона стимулирует секрецию желудочного сока, повышает аппетит, применяется для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, гастрита с пониженной секрецией пищеварительных желез, при спазме пищевода [24, 97]. Настойку можно применять при длительных хронических дерматозах, нередко сопровождающихся зудом, а также экземе и псориазе [71].

Пиона уклоняющегося экстракт в виде таблеток, покрытых оболочкой, применяется в медицине в качестве седативного средства при нарушении сна, повышенной нервной возбудимости, нейроциркуляторной дистонии [21].

В народной медицине пион уклоняющийся известен под названием «Марьин корень». Данное растение применяется в качестве противовоспалительного и бактерицидного средства, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, лихорадке, кашле, ревматизме, подагре, гипертонии, туберкулезе кожи, эрозиях, раке матки, а так же входит в состав гепатопротекторных и противоопухолевых сборов [24, 55].

Марьин корень очень популярен и широко используется в народной медицине Западной Сибири, в традиционной тибетской, монгольской и китайской медицине. В монгольской медицине корни пиона применяют при заболеваниях печени, почек, болезни Боткина, а надземную часть – при эпилепсии. В тибетской медицине пион применяют при эпилепсии, нервных заболеваниях, при простудных заболеваниях, туберкулезе, пневмонии, бронхите, при зубной боли, ревматизме и подагре [71, 99].

В традиционной китайской медицине широко известен корень пиона молочнокветкового, который используется для снятия абдоминальных спазмов, ослабления боли и улучшения кровообращения. Он применяется в качестве противоаллергического, противосудорожного, противовоспалительного и спазмолитического средства растительного происхождения [137].

Пион лекарственный (Европейский пион), культивируемый в качестве садового растения, используется в медицине более 2 тыс. лет. Корень пиона лекарственного обладает спазмолитическим, диуретическим, седативным и тонизирующим, антигипертензивным действием и противоязвенной активностью. В Средневековье пион лекарственный рекомендовали для лечения мочекаменной болезни, желтухи, зубной боли, диареи, усталости и психозов. Со времен Гиппократов его использовали для лечения эпилепсии.

В течение многих лет пион лекарственный применяется в традиционной медицинской системе унани и является ингредиентом препаратов, используемых

в качестве спазмолитических, противовоспалительных, кардиотонических, успокоительных, нейропротективных, противоэпилептических средств, для лечения параличей, эпилепсии у детей, хореи, истерии и нервных расстройств.

В аюрведической медицине пион лекарственный входит в состав лекарственных препаратов, используемых при таких заболеваниях, как желтуха, водянка, гепатит, гепатомегалия, метрит, спленомегалия, дисфункция печени и селезенки, анорексия, цирроз.

В гомеопатии пион лекарственный используют как диуретическое, сосудосуживающее, седативное, противосудорожное, обезболивающее средство, применяется для лечения ревматоидного артрита, подагры, мочекаменной болезни, цистита, бронхоспазмов, астмы, желчекаменной болезни, дискинезии желчевыводящих путей, заболеваний печени, нарушений памяти, мигрени, опухолей, конъюнктивита, варикозного расширения вен, депрессии, запоров, параличей, менингита, эпилепсии. Из корня пиона изготавливают суппозитории для снятия спазмов кишечника, лечения варикоза геморроидальных вен [106].

1.4.2. Лекарственные препараты на основе пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов

На фармацевтическом рынке России фитопрепараты занимают весьма небольшую долю: до 8% номенклатуры Государственного реестра лекарственных средств [29].

Однако в последнее время интерес к препаратам растительного происхождения среди населения повышается и развивается с нарастающим темпом. Основными факторами повышения интереса к лечебным свойствам растительных препаратов являются:

- Мягкий терапевтический эффект, связанный с возможностью БАВ легко включаться в биохимические процессы организма.
- Комплексное действие препаратов растительного происхождения, обеспечивающееся за счет содержания различных групп БАВ.
- Относительная безопасность, обусловленная незначительным количеством побочных эффектов, с чем связана возможность длительного применения.

Особенно чувствительны к нежелательным эффектам синтетических лекарств люди пожилого возраста, больные хроническими заболеваниями и дети.

- Возможность рационального сочетания лекарственных растительных препаратов между собой и с синтетическими средствами при комплексной терапии.
- Ценовая доступность.
- Приверженность пациентов лечению фитопрепаратами обусловлена многовековыми традициями и огромным опытом народной медицины [24, 72, 75].

Основная информация об официальных фитопрепаратах содержится в Государственном реестре лекарственных средств, представляющем собой перечень отечественных и зарубежных лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации. Препараты пиона уклоняющегося, включенные в Государственный реестр, представлены в таблице 1 [21].

Таблица 1 – Препараты пиона уклоняющегося, включенные в Государственный реестр лекарственных средств

Наименование	Сырье	Форма выпуска	Страна-производитель	Применение
Пиона уклоняющегося настойка	Пиона уклоняющегося трава, корневища и корни	Настойка	Россия	В качестве седативного средства
Пиона экстракт		Таблетки, покрытые оболочкой	Россия	В качестве седативного средства
Пиона экстракт сухой		Сырье растительное – экстракт сухой	Россия	В качестве сырья для производства биологически активных добавок к пище

На основе пиона садовых сортов выпускаются биологически активные добавки (БАД), прошедшие регистрацию и разрешенные к ввозу и обороту на территории Российской Федерации (таблица 2) [83].

Таблица 2 – Препараты пиона садовых сортов, включенные в реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (БАД)

Наименование	Состав	Форма выпуска	Страна–производитель	Применение
Корневища и корни пиона белоцветкового	корневища и корни пиона белоцветкового	до 50 кг	Россия	Сырье для производства биологически активных добавок к пище
Пион красный	порошок экстракта корней пиона красного	порошок в пакетиках по 1,5 г	Китайская Народная Республика	В качестве биологически активной добавки к пище – источника дубильных веществ и бета-ситостерина
Пион красный	корни пиона красного	по 5,0 кг	Китайская Народная Республика	Сырье для производства биологически активных добавок к пище

Таким образом, среди небольшого объема фитопрепаратов, представленных на Российском фармацевтическом рынке, доля препаратов на основе пиона различных видов весьма скромная. В медицине для лечения заболеваний нервной системы применяются 2 официальных препарата пиона уклоняющегося. В качестве источника сырья используют пион уклоняющийся, который относится к редким исчезающим видам, а сырьем являются корневища и корни, что свидетельствует о нерациональном использовании растения. Кроме того, фармацевтический рынок не отличается разнообразием форм выпуска экстракционных препаратов пиона, а значит, не в полной мере используются ценные свойства данного растения у различных групп пациентов. В качестве

сырья для производства БАД используются садовые сорта пиона (пион молочноцветковый и пион красный), что свидетельствует о возможности использования сырья данного вида для изготовления фитопрепаратов наравне с пионом уклоняющимся.

1.5. Современное состояние и тенденции разработки фитопрепаратов седативного действия

В настоящее время в научной медицине применяется более 300 видов лекарственных растений, из которых около 270 являются официальными и включены в Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации [29].

Среди лекарственных препаратов седативного действия наибольшую долю составляют препараты растительного происхождения, что связано с мягким комплексным и относительно безопасным при длительном применении действием. Наиболее часто в качестве седативного средства используются: пустырник пятилопастный и пустырник сердечный (*Leonurus quinquelobatus* Gilib., *Leonurus cardiac* L., трава), валериана лекарственная (*Valeriana officinalis*, корневища с корнями), мята перечная (*Mentha piperita*, листья), мелисса лекарственная (*Melissa officinalis*, трава), хмель обыкновенный (*Humulus lupulus*, шишки), пион уклоняющийся (*Paeonia anomala*, корневища и корни, трава), пассифлора мясокрасная (*Passiflora incarnata*, трава), душица обыкновенная (*Origanum vulgare*, трава), зверобой продырявленный (*Hipericum perforatum*, трава), синюха голубая (*Polemonium caeruleum*, корневища с корнями) [4, 35, 36].

Основные формы выпуска фитопрепаратов: высушенное сырье (в фильтр-пакетах или россыпью), сборы, настойки, сиропы, таблетки, растворы для приема внутрь, экстракты, бальзамы и т. д. [29].

В таблице 3 представлены препараты растительного происхождения, зарегистрированные в Государственном Реестре лекарственных средств в качестве препаратов, применяемых при заболеваниях нервной системы (седативные, антидепрессанты) [21].

Таблица 3 – Препараты седативного действия на основе лекарственного растительного сырья

Торговое наименование	Состав	Форма выпуска
1	2	3
Валерианы корневища с корнями	Валерианы корневища с корнями	Сырье растительное измельченное
Валерианы настойка	Валерианы корневища с корнями	Настойка
Валерианы экстракт	Валерианы корневищ с корнями экстракт	Таблетки, покрытые оболочкой
Дормиплант-Валериана	Валерианы корневищ с корнями экстракт сухой	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой
Пустырника трава	Пустырника трава	Сырье растительное измельченное
Пустырника настойка	Пустырника трава	Настойка
Пустырник форте	Пустырника трава	Таблетки
Пустырника экстракт	Пустырника экстракт густой	Таблетки
Зверобоя трава	Зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого трава	Сырье растительное измельченное
Негрустин	Зверобоя травы экстракт сухой	Капсулы
Деприм	Зверобоя травы экстракт сухой	Таблетки, покрытые оболочкой
Деприм форте	Зверобоя травы экстракт сухой	Капсулы
Зверобой	Зверобоя травы экстракт сухой	Таблетки
Гелариум Гиперикум	Зверобоя травы экстракт сухой	Драже
Доппельгерц Нервотоник	Зверобоя продырявленного травы экстракт	Эликсир
Негрустин	Зверобоя продырявленного травы экстракт	Раствор для приема внутрь; капсулы
Зверобоя настойка	Зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого трава	Настойка
Мяты перечной листья	Мяты перечной листья	Сырье растительное измельченное
Мятные таблетки	Мяты перечной масло	Таблетки сублингвальные
Мяты перечной настойка	Мяты перечной листья	Настойка
Мелиссы лекарственной трава	Мелиссы лекарственной трава	Сырье растительное измельченное
Мелиссы настойка	Мелиссы лекарственной трава	Настойка
Душицы трава	Душицы обыкновенной трава	Сырье растительное измельченное
Душицы экстракт жидкий	Душицы обыкновенной трава	Экстракт жидкий
Пассифлоры экстракт	Пассифлоры мясочерной экстракт	Таблетки, покрытые оболочкой

Анализ ассортимента препаратов, получаемых из растительного сырья, позволяет разделить их на четыре группы:

- 1) суммарные (галеновые) препараты;
- 2) суммарные максимально очищенные (новогаленовые) препараты;
- 3) препараты индивидуальных веществ из растений (алкалоиды, гликозиды и др.);
- 4) комплексные (комбинированные) препараты, содержащие наряду с биологически активными веществами растений, химические, химико-фармацевтические субстанции.

К суммарным (галеновым) препаратам относятся настойки, экстракты жидкие, густые и сухие, соки растений, сборы (смеси измельченного растительного сырья) и составляют около 40% общей номенклатуры фитопрепаратов. Данные препараты содержат помимо биологически активных веществ различные группы сопутствующих, иногда, балластных веществ. По действию галеновые препараты часто неравноценны выделенным из них очищенным действующим веществам, так как важно не только наличие данных веществ, но и их состояние в препарате (нативный комплекс). Кроме того, сопутствующие вещества способствуют проявлению эффектов действующих веществ, улучшая их всасывание в желудочно-кишечном тракте, возможно развитие синергизма между действующими веществами, что обеспечивает специфичность терапевтического действия суммарных фитопрепаратов [63].

Наиболее рациональным типом экстракционных препаратов являются экстракты сухие, поскольку они удобны в применении, технология позволяет максимально сохранять биологически активные вещества, перспективны для производства твердых лекарственных форм (таблеток, капсул и т.д.).

При использовании новых видов лекарственного растительного сырья (ЛРС) для изготовления фитопрепаратов требуются индивидуальные подходы при разработке технологии с учетом используемого метода, закономерностей экстрагирования сырья и содержания определенных групп биологически активных веществ.

Методы экстрагирования ЛРС подразделяют на статические и динамические.

Статические методы экстрагирования, подразумевающие настаивание ЛРС с экстрагентом определенное время, подразделяются на:

- одноступенчатые (мацерация);
- многоступенчатые (ремацерация, циркуляция, реперколяция по Чулкову)

Динамические методы экстрагирования, предусматривающие постоянную смену экстрагента или экстрагента и сырья, подразделяются на:

1) периодические

- одноступенчатые (перколяция);
- многоступенчатые (реперколяция с законченным и незаконченным циклами);

2) непрерывные

- прямоточные (ЛРС и экстрагент движутся в одном направлении);
- противоточные (ЛРС и экстрагент движутся в противоположных направлениях) [25].

При выборе условий экстрагирования растительного сырья необходимо учитывать влияние таких факторов как природа экстрагента, степень измельчения сырья, разность концентраций, температурный режим и длительность экстракции.

Важное значение имеет выбор экстрагента, который должен обеспечивать полноту извлечения биологически активных веществ при минимальном извлечении балластных веществ и максимальную скорость экстрагирования. Наиболее распространенными экстрагентами при производстве фитопрепаратов являются вода очищенная и спирт этиловый. Использование в качестве экстрагента водно-спиртовых растворов различных концентраций позволяет получать растворы разной степени полярности для избирательного экстрагирования биологически активных веществ.

Степень измельчения сырья влияет на скорость экстрагирования: с увеличением степени измельчения увеличивается поверхность контакта фаз, сокращается путь внутренней диффузии. Недостаточная степень измельчения

сырья замедляет процесс экстракции биологически активных веществ. Однако чрезмерное измельчение сырья ведет к извлечению большого количества балластных веществ, нерастворимых частиц и коллоидов, в результате получается мутная, трудно очищаемая жидкость.

Поскольку диффузионный процесс экстракции протекает до установления динамического равновесия концентрации в системе твердое тело – жидкость, необходимо обеспечение максимальной разности концентраций, что достигается перемешиванием, сменой или циркуляцией экстрагента.

С повышением температуры растворителя усиливается процесс диффузии и диализа, быстрее набухает растительный материал и происходит разрыв клеток, что приводит к интенсификации процесса экстрагирования. Однако в зависимости от характера растительного сырья и свойств БАВ следует подбирать определенный температурный режим, поскольку высокие температуры приводят к разрушению термолабильных веществ, ухудшению растворения некоторых веществ, переходу в извлечение большого количества балластных веществ.

Длительность экстракции влияет на количество веществ, продиффундировавших через слой сырья. Однако длительная экстракция ведет к ухудшению качественного состава извлечения вследствие большого содержания балластных веществ. Поэтому необходимо обеспечение наиболее полной величины извлечения в кратчайший срок, используя факторы, ведущие к интенсификации процесса экстракции [11, 63].

Рациональная фармакотерапия обуславливается не только выбором препарата, но и его правильным использованием, включая путь введения, лекарственную форму, дозу, кратность применения и продолжительность курсов лечения [131].

Актуальной лекарственной формой для растительных препаратов являются пленки лекарственные, которые относятся к классу матричных терапевтических систем диффузионного типа. Пленки представляют собой тонкие пластинки различной формы (прямоугольной, овальной, круглой и т.д.), размеров и

толщиной от 0,1 до 1,5 мм и характеризуются тем, что БАВ и лекарственные средства распределены в массе полимера [2, 26, 28].

Преимуществами лекарственных пленок как лекарственной формы являются:

1. Пролонгированное действие и обеспечение заданной скорости поступления растворенных лекарственных средств.

2. Равномерное высвобождение действующего вещества в месте аппликации и обеспечение постоянства концентрации лекарственного средства (ЛС) в течение продолжительного времени. Данное свойство позволяет использовать пленки не только для лечения, но и для профилактики различных заболеваний.

3. Исключение разрушающего воздействия среды желудочно-кишечного тракта на ЛС.

4. Точность дозирования, что особенно важно при использовании сильнодействующих субстанций.

5. Комплексная терапия в результате местного и системного действия ЛС.

6. Простота технологического процесса.

7. Удобство и эстетичность применения, не требующего вмешательства медицинского персонала.

8. Комфортность применения. ПЛ не вызывают раздражения в месте аппликации и не вызывают дискомфорта, что особенно важно в педиатрии и гериатрии [10, 61, 102].

К ПЛ предъявляются следующие требования:

1. Высокая адгезионная способность к покровам слизистой оболочки полости рта.

2. Отсутствие токсичности, аллергенности, местнораздражающего действия и сохранение анатомо-физиологических свойств слизистой оболочки полости рта.

3. Пролонгирование действия за счет моделирования пленочных композиций.

4. Индивидуализация терапии с учетом наличия сопутствующих заболеваний.

5. Стабильность.

7. Простота изготовления.

8. Экономическая доступность [8, 74, 102].

Для обеспечения оптимальной скорости и продолжительности высвобождения действующих веществ из лекарственных пленок необходим оптимальный состав полимерной основы, состав которой подбирается эмпирически. При этом учитывается способность полимерных основ воспринимать лекарственные средства, равномерно распределяться по поверхности подложки, на которую наносится пленочная масса, быстро высыхать, и обеспечивать максимальное высвобождение лекарственных средств.

К используемому в качестве пленкообразователя мукоадгезивному полимеру (МАП) предъявляются следующие требования:

- 1) он должен характеризоваться определенными физико-химическими свойствами, включая гидрофильность;
- 2) содержать большое количество групп, способных образовывать водородные связи;
- 3) иметь подвижность цепей, достаточную для диффузии, как через слизистую, так и эпителиальную ткань;
- 4) быть нетоксичным;
- 5) не оказывать токсического и местнораздражающего действия [102].

Классификация МАП:

- 1) натуральные и модифицированные природные полимеры: агароза, хитозан, желатин, гиалуроновая кислота, каррагинан, пектин, Na-альгинат;
- 2) синтетические:
 - производные целлюлозы: карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), тиолированная КМЦ, NaКМЦ, гидроксипропилцеллюлоза, метилцеллюлоза (МЦ);
 - полимеры на основе поли(мет)акриловой кислоты: карбопол, поликарбофил, полиакриловая кислота, полиакрилаты;
 - другие: поли-N-2-гидроксипропилметакриламид, полиоксиэтилен, тиолированные полимеры [70, 118, 121, 124, 127].

Большинство разработанных пленок в качестве пленкообразователя содержат производные целлюлозы, которые хорошо высвобождают

лекарственные средства, обеспечивают резорбцию, биологически безвредны.

Широкое применение в изготовлении лекарственных пленок получил природный полимер желатин, способный при застывании образовывать эластичные пленки. К другим природным полимерам, активно используемым в качестве пленкообразователя, относятся: На-альгинат и хитозан, использование которого в качестве полимера-носителя обусловлено наличием в нем реакционноспособных аминогрупп, которые в протонированной форме придают полимеру растворимость в воде [3, 69, 76, 126].

Пленки лекарственные, как современная лекарственная форма, активно изучаются, разрабатываются новые составы, и исследуются различные области применения их в медицине.

Впервые лекарственные пленки как лекарственная форма стали применяться в офтальмологии. Этому способствовало наличие ряда существенных недостатков широко применяемых глазных капель. Пленки готовили путем растворения лекарственных средств в 10%-ном растворе поливинилового спирта (ПВС) с последующим высушиванием при комнатной температуре. Для обеспечения терапевтического эффекта тонкую эластичную пленку вводили пинцетом за веко 2 раза в сутки. В настоящее время разработаны составы глазных лекарственных пленок (ГЛП) с антибиотиками, нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС), фитокомплексами и т.д. ГЛП включены в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания.

Наиболее широкое распространение пленки получили в стоматологии. Они используются в качестве антисептических, противовоспалительных, анальгетических средств. Для лечения стоматитов, эрозий, афт в составе стоматологических лекарственных пленок (СЛП) применяют антибиотики (гентамицина сульфат, метронидазол), кортикостероидные препараты, димедрол, анестезин. СЛП для лечения стоматитов рекомендуют применять 1 раз в сутки, что позволяет сократить расход ЛС, снизить их токсичность. С целью обеспечения аппликационной анестезии в СЛП вводят тримекаин и анилокаин. Также для лечения различных воспалительных заболеваний полости рта широко

используются ПЛ, содержащие растительные комплексы (зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого трава, дуба кора, календулы лекарственной цветки, шалфея лекарственного листья и т.д.). Для минерализации дентина в состав СЛП вводят соли кальция, фосфорной кислоты.

Еще одной областью применения пленок лекарственных является гинекология. Здесь данную лекарственную форму используют в качестве противогрибкового средства, также для лечения бактериального вагиноза.

В отоларингологии применяются лекарственные пленки для лечения больных с грибковыми поражениями полости среднего уха. В ринологии используются биорастворимые ПЛ, содержащие мирамистин, дикаин, сульфацил натрия мезатон, диазепам, димедрол.

Перспективным направлением является использование ПЛ системного действия. Пленки могут быть диспергируемыми в полости рта, быстрорастворимыми или мукоадгезивными буккальными. Диспергируемые ПЛ являются пероральной лекарственной формой, которая при помещении в полость рта растворяется в течение 1 минуты без разжевывания и запивания водой. Сцепление мукоадгезивных пленок со слизистыми оболочками происходит за счет адгезионных свойств матрицы-носителя.

Для предупреждения приступов стенокардии применяют ПЛ с нитроглицерином (тринитролонг), разработан состав быстрорастворимых трансбуккальных пленок с ибупрофеном. [2, 6, 26, 28, 56, 70, 81].

Таким образом, лекарственные пленки, ввиду своей практичности и эффективности, открывают новые возможности для применения различных лекарственных средств синтетического и природного происхождения, в том числе получаемых из лекарственного растительного сырья.

Заключение по главе I

Исходя из литературных данных установлено, что растения рода *Paeonia*, благодаря ценному химическому составу, применяются в научной и народной медицине России, Китая, Индии и других стран для лечения различных заболеваний в качестве спазмолитического, противовоспалительного, успокоительного и противоэпилептического средства.

В качестве седативного средства широко используется пион уклоняющийся. В Российской Федерации зарегистрированы только две лекарственные формы на основе пиона уклоняющегося – настойка и таблетки. Данные лекарственные формы имеют ограничения в применении в связи с содержанием этилового спирта и раздражающего действия БАВ пиона на желудочно-кишечный тракт, поэтому актуальным является вопрос поиска и создания рациональных лекарственных форм. Данное растение относится к редким исчезающим видам, поэтому актуальным вопросом становится поиск источника сырья для создания седативных препаратов растительного происхождения. Исходя из того, что распространенные в культуре садовые сорта пиона в результате межвидовой гибридизации произошли от китайского предка – пиона молочноцветкового, с целью рационального использования и охраны зарослей дикорастущих лекарственных растений, особенно включенных в Красную книгу, введение в медицину садовых сортов, заменяющих лекарственные виды, весьма актуальная задача.

Таким образом, в результате анализа литературных данных можно сделать вывод о возможности использования в качестве источника лекарственного растительного сырья наравне с пионом уклоняющимся пиона садовых сортов, ввиду их схожести и общности происхождения. Поэтому перспективным направлением является комплексное исследование пиона садовых сортов и создание на его основе лекарственных препаратов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования и вспомогательные вещества

2.1.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили:

- образцы травы пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов;
- водно-спиртовые извлечения из сырья, полученные в лабораторных условиях;
- субстанция «Пионифит» экстракт сухой;
- пленки лекарственные, содержащие в качестве активного компонента субстанцию «Пионифит» экстракт сухой.

Трава пиона уклоняющегося заготовлена на территории Пермского края. Образцы травы пиона садовых сортов были заготовлены на садовых участках Пермского края и Свердловской области.

Все образцы были собраны в 2013-2014 гг. в период цветения согласно инструкции по заготовке [78] и высушены воздушно-теневым способом (таблица 4).

Таблица 4 – Объекты исследования

№ п/п	Образец	Дата сбора/ изготовления
1	2	3
1	Цельное сырье пиона уклоняющегося (Пермский край)	07.2014 г.
2	Смешанное сырье пиона садовых сортов «Gladys Hodson», «Mons Jules Elie», «Big Ben» (Пермский край)	07.2013 г.
3	Смешанное сырье пиона садовых сортов «Mons Jules Elie» «Gladys Hodson» (Пермский край)	07.2014 г.
4	Смешанное сырье пиона садовых сортов «Barbara», «Big Ben» (Свердловская область)	07.2014 г.
5	«Пионифит» экстракт сухой	06.2015 г.
6	«Пионифит» экстракт сухой	06.2015 г.
7	«Пионифит» экстракт сухой	10.2015 г.

1	2	3
8	«Пионифит» экстракт сухой	11.2015 г.
9	«Пионифит» экстракт сухой	12.2016 г.
10	ПЛ «Пионифит»	02.2017 г.
11	ПЛ «Пионифит»	02.2017 г.
12	ПЛ «Пионифит»	03.2017 г.

2.1.2. Вспомогательные вещества

В работе были использованы вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению и отвечающие требованиям нормативной документации. Перечень вспомогательных веществ представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика вспомогательных материалов

№ п/п	Наименование	Нормативная документация
1	Вода очищенная	ФС.2.2.0020.15
2	Спирт этиловый 95%	ФС.2.1.0036.15
3	СО рутина	ФС 42-2508-87
4	СО кверцетина	ФС 42-1290-79
5	Пеонифлорин	Sigma-Aldrich CAS: 23180-57-6 Чистота $\geq 98\%$ (HPLC)
6	Натрий карбоксиметилцеллюлоза (NaКМЦ)	ТУ 6-55-39-90
7	Альгинат натрия	ГОСТ 33310-2015
8	Пектин цитрусовый	ГОСТ 29186-91
9	Пектин яблочный	ГОСТ 29186-91
10	Агар-агар	ГОСТ 16280 – 2002
11	Глицерин	ФС.2.2.0006.15

2.2. Методы исследования

Фитохимическое исследование сырья, оценка его качества, технологические исследования по разработке лекарственных форм требуют применения современных, селективных, высокоточных и объективных методов. В работе использованы химические, физико-химические, микробиологические, технологические и фармакологические методы исследования.

2.2.1. Определение подлинности ЛРС

Подлинность сырья определяли макро- и микроскопическими методами анализа. Макроскопический метод основан на определении морфологических признаков, исследование которых проводилось визуально в соответствии с общими правилами проведения макроскопического анализа, указанными в статьях ГФ XIII, ОФС «Листья», «Травы», «Цветки», и ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося» [20, 101]. Микроскопический анализ проводили согласно ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [19]. Определение анатомических признаков проводили с помощью микроскопа марки «Альтами» с окулярами 10х и объективами 4х, 40х и 100х и камерой «Альтами UCMOSO10300KPA».

2.2.2. Определение числовых показателей ЛРС

Определение товароведческих показателей (влажности, золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, допустимых примесей) проводили по стандартным методикам ГФ XIII [19].

Определение содержания экстрактивных веществ в траве пиона проводили по методике ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [19].

2.2.3. Качественный анализ БАВ

2.2.3.1. Качественные реакции

Качественные реакции на основные группы биологически активных веществ проводили по известным методикам. Образцы травы пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов исследовали на присутствие: монотерпеновых гликозидов [13, 65, 101], флавоноидов [20, 89].

Для проведения качественных реакций готовили спиртовые извлечения из образцов травы пиона.

Для этого 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц 1 – 2 мм, заливали 10 мл (1:10) 40% этиловым спиртом, и смесь нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр. Полученное спиртовое извлечение испытывали на присутствие монотерпеновых гликозидов. Водно-спиртовые извлечения, полученные экстракцией 70% спиртом по описанной выше методике, использовали для обнаружения флавоноидов.

Качественные реакции на флавоноиды:

1. Цианидиновая реакция или проба Шинода (Синода). В пробирку наливают 1 мл извлечения и добавляют порошок магнезия. Затем добавляют 5-7 капель концентрированной хлористоводородной кислоты. Должно появляться красное окрашивание.

2. К 1 мл извлечения добавляют 1 мл 0,5% раствора железа (III) хлорида. Должно появляться зеленое окрашивание.

3. К 1 мл извлечения добавляют 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида в 95%-ном спирте. Должно появляться желтое или зеленое окрашивание.

4. К 1 мл извлечения добавляют 2 – 3 капли 1% раствора ацетата свинца. Должен появляться серо-голубой осадок.

5. К 1 мл извлечения добавляют 2 – 3 капли 10% раствора натрия гидроксида. Должно появляться желто-зеленое окрашивание.

Качественные реакции на монотерпеновые гликозиды:

1. Реакция Трим-Хилла. К 0,5 мл извлечения, очищенного пропусканием через колонку, заполненную алюминия оксидом, добавляют несколько капель реактива Трим-Хилла, смесь нагревают до кипения 1 – 2 минуты. Должно появляться синее или фиолетовое окрашивание.

2. Реакция Шталя. К 0,5 мл очищенного извлечения добавляют несколько капель реактива Шталя, смесь нагревают до кипения 1-2 минуты. Должно появляться сине-фиолетовое окрашивание

3. К 0,5 мл очищенного извлечения добавляют несколько капель реактива Бекон-Эдельмана (раствор 0,5 г бензидина-основания и 10 г трихлоруксусной кислоты в 100 мл этанола). Должно появляться желто-коричневое окрашивание.

4. К 3 мл очищенного извлечения добавляют 5 мл щелочного раствора гидроксиламина и оставляют на 20 минут. Через 20 минут добавляют 1 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и 5 мл 1% раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты. Должно появляться красно-фиолетовое окрашивание.

2.2.3.2. Хроматографический анализ БАВ

Хроматография в тонком слое

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали в анализе флавоноидов. Хроматографирование осуществляли в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» [18].

ТСХ проводили на пластинках «Sorbfil» (тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ), в системах органических растворителей различного состава и полярности. Системы растворителей для хроматографирования смешивали в определенных соотношениях непосредственно перед использованием. Смеси помещали в стеклянные хроматографические камеры, стенки которых прокладывали фильтровальной бумагой. Камеры герметично закрывали стеклянными крышками и оставляли для насыщения не менее чем на 30 мин. Аликвоты исследуемых веществ наносили на линию старта хроматографических пластинок. Исследование осуществляли восходящим способом. После прохождения фронта растворителей

пластинку вынимали из камеры и просушивали под тягой на столике для нанесения образцов УСП-1 (температура нагрева на уровне 50 °С) в течение 15 минут. Проявление хроматографических зон осуществляли по гашению флуоресценции индикатора, добавленного к сорбенту, под УФ-лампой (245 нм). Далее пластинки обрабатывали визуализирующими растворами и отмечали положение и окраску хроматографических зон. В качестве детектора использовали 1 % спиртовой раствор алюминия хлорида.

Газовая хроматография с масс-селективной детекцией

С целью качественного анализа органических соединений использовали метод газовой хроматографии согласно ГФ XIII, ОФС.1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография» [18].

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводился в Региональном испытательном центре «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Малковой Т.Л.) на газовом хроматографе Agilent 7890A с масс-спектрометрическим детектором. Газ-носитель – гелий. Колонка капиллярная HP-5 ms. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Температура испарителя 280 °С. Скорость газа-носителя (гелия) 1 мл/мин. Деление потока отсутствует. Температура колонки 100 °С выдерживается в течение 2 минут, далее повышается со скоростью 20 °С/мин до 290 °С. Ионизация методом электронного удара. Регистрация масс-спектров – по полному ионному току. Используемая библиотека: NIST 11.

2.2.4. Количественное определение монотерпеновых гликозидов

Количественное определение суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин проводили в соответствии с ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося» спектрофотометрическим методом по реакции комплексообразования со щелочным раствором гидроксилamina и раствором железа (III) хлорида [101].

Методика: навеску около 5 г (точная навеска) сырья пиона, проходящего через сито с диаметром отверстий 1 мм, помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл 40% этилового спирта, присоединяют к

обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане 45 минут. Фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. В круглодонную колбу прибавляют 15 мл 40% этилового спирта и нагревают на водяной бане в течение 15 минут. Колбу и осадок на фильтре промывают 5 мл 40% этилового спирта и доводят объем раствора 40% этиловым спиртом до метки. 10 мл полученного фильтрата пропускают через стеклянную колонку диаметром 10 мм с 5 г алюминия оксида нейтрального (раствор А).

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл раствора А, прибавляют 5 мл щелочного раствора гидроксиламина и оставляют на 20 минут. Через 20 минут прибавляют 10 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и 5 мл 1% раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, предварительно смоченный водой.

Измерение оптической плотности (А) полученного раствора проводят на спектрофотометре при длине волны 512 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения. К 5 мл воды очищенной прибавляют 5 мл щелочного раствора гидроксиламина, выдерживают в течение 20 минут, прибавляют 10 мл 1М раствора хлористоводородной кислоты и 5 мл 1% раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты.

Содержание суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин и абсолютно сухое сырье в % (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100 \times 25}{16,2 \times m \times 5 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

А – оптическая плотность испытуемого раствора;

16,2 – удельный показатель поглощения продуктов реакции пеонифлорина с гидроксиламином и раствором железа (III) хлорида;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

2.2.5. Исследование микроэлементного состава

Изучение химического состава растительных объектов проводили методом атомно-адсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией на приборе МГА-915М [59] в Региональном испытательном центре «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Малковой Т.Л.).

Метод пламенной фотометрии, основанный на измерении интенсивности излучения, испускаемого атомами металлов при введении раствора пробы в пламя, использовали для обнаружения (калия, натрия и кальция). Определение проводили на пламенном фотометре фирмы Jenway PFP 7 [77]. Магний в объектах определяли методом фотометрии в видимой области спектра [18] по реакции с титановым желтым в щелочной среде. Метод основан на поглощении полихроматического излучения в видимой области спектра окрашенным в красный цвет продуктом реакции. Измерения проводили на фотометре КФК-3 ЗОМЗ.

Пробоподготовка объектов заключалась в предварительной минерализации точной навески сырья (около 1,0000 г) путем сухого озоления по ГОСТ 26929-94. Озоление проводили на электроплитке до «серой золы», затем в электропечи при температуре 450°C с добавлением азотной кислоты для ускорения процесса. Зольный остаток растворяли в 2 мл кислоты хлористоводородной 1:1 и разбавляли водой деминерализованной согласно методике М 04-64-2010. Для определения ртути и мышьяка применяли способ мокрой минерализации, который основан на полном разрушении органических веществ серной и азотной концентрированными кислотами с добавлением оксида водорода 30% при нагревании.

2.2.6. Физико-химические и технологические методы исследования

«Пеонифит» экстракта сухого

2.2.6.1. Потеря в массе при высушивании

Определение потери в массе при высушивании проводили в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» [18].

2.2.6.2. Растворимость

Растворимость экстракта определяли в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость» [18].

2.2.6.3. Степень сыпучести порошков

Технологические характеристики «Пеонифит» экстракта сухого изучали в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков».

Определение сыпучести проводили на кафедре промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Орловой Е.В.) вибрационном устройстве модели ВП-12А. В сухую воронку с закрытым входным отверстием помещали без уплотнения навеску экстракта. Открывали выходное отверстие воронки и определяли время, за которое через отверстие пройдет весь образец.

Сыпучесть V_c вычисляли по формуле:

$$V_c = \frac{m}{t}, \text{ где}$$

V_c – сыпучесть, г/с;

m – масса навески, г;

t – время высыпания порошков, с.

Определение насыпной плотности проводили согласно методике, указанной в ГФ XIII, ОФС 1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [19]. В сухой цилиндр помещали без уплотнения 10,0 г экстракта. Фиксировали насыпной объем до уплотнения.

Показатель насыпной плотности ρ_n вычисляли по формуле:

$$\rho_n = \frac{m}{V}, \text{ где}$$

ρ_n – насыпная плотность, г/мл ;

m – масса материала, г;

V – объем материала, мл.

2.2.7. Определение микробиологической чистоты

Определение микробиологической чистоты проводили по методике ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Новиковой В.В.). Для препаратов категории 3.2 предусматривается количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов.

В 1 г экстракта допускается не более 10^4 общего числа аэробных бактерий, 10^2 общего числа грибов, энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий – не более 10^2 , а также отсутствие *Escherichia coli* в 1 г препарата, *Staphylococcus aureus* – в 1 г, *Salmonella* – в 10 г [18].

2.2.8. Методы анализа пленок лекарственных

2.2.8.1. Определение относительной вязкости

Вязкость растворов пленкообразователей определяли с помощью капиллярного вискозиметра по методике ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0015.15 «Вязкость» [19]. Определение вели относительно глицерина.

Относительную вязкость растворов пленкообразователей η вычисляли по формуле:

$$\eta = \frac{t \cdot \rho}{t_0 \cdot \rho_0}, \text{ где}$$

η – относительная вязкость исследуемого раствора;

t – время истечения исследуемого раствора через капилляр, с;

t_0 – время истечения стандартной жидкости (глицерина), с;

ρ – плотность исследуемого раствора, г/см³;

ρ_0 – плотность стандартной жидкости (глицерина), г/см³.

2.2.8.2. Анализ по физико-химическим показателям

Однородность массы устанавливали согласно ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм» [19]. Среднюю массу пленки 20,0×20,0 мм (терапевтическая доза) определяли взвешиванием 20 образцов с точностью до 0,001 г. Отклонение в массе для пленок массой до 0,1 г допускается $\pm 10\%$.

Толщина пленок определяет степень адгезии и равномерный контакт ЛС со слизистой оболочкой полости рта. Измерения проводили в средней пробе с помощью микрометра МКС-25.

Время растворения зависит от гидрофильности выбранного полимера и является одним из критериев пригодности ЛФ, т.к. характеризует способность пленки растворяться на слизистой оболочке. Время растворения определяли путем растворения образца ПЛ 20,0×20,0 мм в 5 мл воды очищенной при температуре 37 °С и периодическом перемешивании, не допуская прилипания к стенкам колбы. Секундомером замеряли время до полного растворения образца ПЛ.

Потеря в массе при высушивании. Данный показатель является одним из критериев стабильности ПЛ при хранении. Потерю в массе при высушивании определяли согласно ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» [18].

Около 0,1 г (точная навеска) ПЛ помещали в предварительно высушенный до постоянной массы бюкс и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100-105°С в течении 5 часов до постоянной массы. Затем рассчитывали потерю в массе при высушивании по формуле:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\%, \text{ где}$$

m_1 – масса бюкса, доведенного до постоянной массы, г;

m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г;

m_3 – масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

pH водного раствора. Данный показатель может указывать на возможное раздражающее действие ЛФ и должен соответствовать pH ротовой полости. pH водного раствора определяли потенциометрически в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» [18].

Навеску 0,1 г ПЛ растворяли в 50 мл воды очищенной, свободной от диоксида углерода, комнатной температуры, перемешивали до растворения ПЛ, регистрировали pH водного раствора.

2.2.9. Биофармацевтические методы исследования пленок

Биофармацевтические исследования проводились на кафедре общей и органической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Гейна В.Л.).

Для кинетического исследования процесса высвобождения БАВ из полимерной основы применяли кондуктометрический метод анализа – физико-химический метод, основанный на изучении электрической проводимости проводников ионного типа. Биологическая доступность ЛС определяется, прежде всего, скоростью высвобождения их из ЛФ, поэтому с повышением концентрации продуктов реакции при растворении увеличивается электропроводимость растворов.

Методика: на дно цилиндра (объемом 150 см³) помещали около 0,1 г (точная навеска) лекарственной пленки, добавляли 100 мл воды очищенной, опускали платиновые электроды, подключенные к кондуктометру марки HI 8733. Уровень жидкости должен превышать верхние края электродов. В ходе эксперимента система термостатировалась. Через определенные промежутки времени измеряли удельную электрическую проводимость (κ , См $\times$ м⁻¹). Перед каждым замером проводили перемешивание акцепторной фазы.

По результатам эксперимента строили кривые динамики высвобождения БАВ из образцов пленок [18, 92].

2.2.10. Фармакологические методы исследования

2.2.10.1 Острая токсичность

Исследования проводили в лаборатории биологических методов Регионального испытательного центра «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Малковой Т.Л.) в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [91].

Изучение токсичности «Пионифит» экстракта сухого выполняли на 25 белых нелинейных мышах-самцах массой 20 – 30 г при однократном введении. Животные распределялись по группам случайным образом методом

рандомизации. Перед экспериментом животные содержались в условиях вивария на стандартной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92) согласно правилам лабораторной практики проведения доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33216-2014) [15, 16]. За сутки до введения веществ животным ограничивали доступ к воде и пище. На основании данных массы тела животных проводили расчет доз. Тестируемый препарат вводили в виде водного раствора перорально при помощи атравматического зонда, однократно.

Наблюдение за животными осуществлялось в течение 14 суток. В ходе эксперимента фиксировали общее состояние животных, внешний вид, особенности поведения, интенсивность и характер двигательной активности, реакцию на внешние раздражители и другие показатели, характеризующие токсическое действие.

2.2.10.2. Тест Ирвина

Оценка влияния на «психо-неврологический» статус животных проводилась на животных, участвующих в исследовании острой токсичности, по шкале Ирвина. Наблюдение за состоянием мышей осуществлялось в течение четырех суток. Результаты фиксировали через 5, 30, 60, 120, 240 минут, 24 часа и на четвертые сутки с момента введения экстракта [115, 116].

2.2.10.3. Тест спонтанной двигательной активности

Для изучения спонтанной двигательной активности одиночных животных использовалась установка «Активность-2» (ООО НПК «Открытая наука»). Установка представляет собой высокочувствительный 16-канальный актографический программно-аппаратный комплекс.

Эксперимент выполнен на 12 белых нелинейных мышах–самцах массой 20 – 30 г при однократном введении. Перед экспериментом животные содержались в условиях вивария на стандартной диете для лабораторных животных. Экстракт пиона вводили в виде водного раствора перорально в рассчитанных дозах при помощи атравматического зонда, однократно. Экспозиция после введения экстракта перед проведением опыта составила 60 минут.

Регистрация данных о спонтанной двигательной активности осуществлялась в течение одного суточного (циркадного) периода. Отклонения двигательной активности от нормальной кривой оценивались по полученным данным синхронно с данными контрольной группы.

2.2.10.4. Оценка противовоспалительной активности

Изучение противовоспалительной активности «Пеонифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» проводили в лаборатории экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО ПГНИУ (под руководством Марковой Л.Н.).

Противовоспалительный эффект оценивали в тесте «Каррагениновый отек». Испытания проводили на лабораторных крысах стока линии Wistar массой 200 – 250 г в условиях острого опыта. Животные содержались в условиях вивария на стандартной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92) согласно правилам лабораторной практики проведения доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33216-2014), без доступа к воде и пище в течение суток [15, 16].

В качестве препарата сравнения использовали настой ромашки, изготовленный общепринятым методом в соответствии с ГФ XIII ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» [19]. Сырьем для изготовления настоя служили цветки ромашки аптечной (производитель: ОАО «Красногорсклексредства», Московская обл., г. Красногорск). «Пионифит» экстракт сухой вводили в растворенном виде в том же объеме, что и настой ромашки.

Отек вызывали субплантарным введением в заднюю лапу 0,1 мл 1% раствора каррагенина (сульфатированный полисахарид из ирландского морского мха) через час после введения препаратов.

Противовоспалительный эффект оценивали через 1, 3 и 5 часов после введения каррагенина по уменьшению отека и выражали в процентах по отношению к контролю [91].

2.2.10.5. Анксиолитическое действие

Изучение анксиолитического действия «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» проводили в структурном подразделении «Фармаскрин» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Булатова И.П.).

Исследования проводились на белых крысах-самцах линии Wistar массой 200 – 250 г в условиях подострого опыта. Животные содержались в стандартных условиях, в соответствии с действующими нормами, при свободном доступе к воде и пище.

В качестве препарата сравнения выбраны таблетки «Пиона экстракт, 150 мг» (производитель: ЗАО «Вифитех», Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск).

Препараты в виде водных растворов вводили ежедневно в течение 14 суток. Экспозиция после последнего введения перед проведением теста составила 30 минут. При проведении тестов для получения более точных результатов параллельно велась видеосъемка.

Выраженность анксиолитического эффекта оценивали в ряде поведенческих тестов:

- Приподнятый крестообразный лабиринт;
- Темная камера с отверстиями.

Методика теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» основана на навыке предпочтения грызунами темных нор, естественного страха нахождения на открытых площадях и падения с высоты. Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) предназначена для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить: уровень тревожности животного (по предпочтению темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамике поведения «выглядывания»); симптомы неврологического дефицита; привыкание.

Установка представляет собой крестообразную арену, два противоположных рукава которой закрыты бортами по периметру. Арена установлена на подставку, приподнимающую ее на 50 см от пола.

Животное помещали в центр ПКЛ, носом к открытому рукаву. Регистрировали в течение 4 минут латентный период выхода в открытые рукава (от начала до первого полного выхода в рукав), количество полных заходов в открытые и закрытые рукава, центральную зону и общее время нахождения в открытых и закрытых рукавах, а также на центральной зоне, число переходов из одного закрытого рукава в другой.

Методика «Темная камера с отверстиями» – метод изучения поведения грызунов в условиях свободного выбора комфортных условий. Установка «Темная камера с отверстиями» предназначена для изучения поведения грызунов в условиях свободного выбора комфортных условий и позволяет оценить: предпочтение темноты/света, выраженность и динамику поведения «выглядывания», принятие решения выхода из камеры.

Установка представляет собой прямоугольную камеру с восемью отверстиями на верхней крышке диаметром 2,2 см и с одним боковым отверстием, диаметр которого равен 6 см и высота от пола – 6 см.

Животное помещали в один из углов камеры, хвостом к боковому отверстию. В течение 4 минут регистрировали латентное время и число выглядываний в верхние и боковое отверстия; число полувыходов и выходов из бокового отверстия [91].

2.2.11. Обработка результатов

Статистическую обработку результатов химических и технологических исследований проводили согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Статистическую обработку результатов фармакологических исследований вели в соответствии с ГФ XIII, ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности ЛС биологическими методами» [18], с использованием статистического пакета Statistica 6.0.

ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ПИОНА УКЛОНЯЮЩЕГОСЯ И ПИОНА САДОВЫХ СОРТОВ

3.1. Оценка качества травы пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов

С целью обеспечения эффективности и безопасности лекарственных препаратов обязательным является установление соответствия качества исходного сырья регламентируемым нормам. Поэтому первый этап исследований посвящен товароведческому анализу лекарственного растительного сырья.

Оценка качества травы пиона садовых сортов осуществлялась в соответствии с требованиями ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося». Проведено определение подлинности сырья макро- и микроскопическими методами, а также числовых показателей в сравнении с пионом уклоняющимся.

3.1.1. Макроскопический анализ

Изучение внешних признаков проводили на трех образцах пиона садовых сортов, заготовленного на территории Пермского края и Свердловской области, и пиона уклоняющегося, заготовленного на территории Пермского края.

Результаты сравнительного анализа морфологических признаков пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов представлены в таблице 6. Установлены общие морфологические признаки: стебли пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов ребристые, голые до 100 см в длину; листья очередные, с длинным черешком; цветки крупные, правильные, обоеполые с многочисленными тычинками и 3 – 5 пестиками, сидящими на диске; плод состоит из 3 – 5 листовок; цвет стеблей буровато-зеленый, листья с верхней стороны темно-зеленые, с нижней – светло-зеленые [95].

Таблица 6 – Сравнительная таблица морфологических признаков пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов

	Жизненная форма	Характер стебля	Характер листьев	Характер цветков			Характер плодов
				чашечка	венчик		
					окраска лепестков	количество лепестков	
Пион уклоняющийся	многолетнее травянистое растение	прямые ребристые неветвистые высотой 60 – 100 см	листья дважды тройчаторассеченные, листочки глубоко-перисторассеченные на ланцетовидные, длинно заостренные сегменты; листья снизу голые, сверху на жилках очень коротко щетинисто-волосистые темно-зеленого цвета	чашечка состоит из 5 кожистых, широкояйцевидных темно-зеленых чашелистиков	пурпурно-розовая	8 и более, расположенные в 1 ряд	сложная много-листовка, состоящая из 5 листовок звездообразной формы
Пион садовых сортов	многолетнее травянистое растение	прямые ребристые неветвистые высотой до 100 см	листья непарно перистораздельные или тройчатые, с широкими ланцетными долями, тёмно-зелёные, реже сизые	чашечка кожистая, состоящая из 5 тёмно-зеленых или красноватых чашелистиков	белая, розовая, бардовая	многочисленные, расположенные в 1-7 рядов	сложная много-листовка, состоящая из 3 – 5 листовок, звездообразной формы

3.1.2. Микроскопический анализ

При микроскопическом анализе травы пиона садовых сортов и пиона уклоняющегося изучали анатомическое строение стеблей, листьев, цветков (рисунок 3, 4, 5, 6, 7, 8).

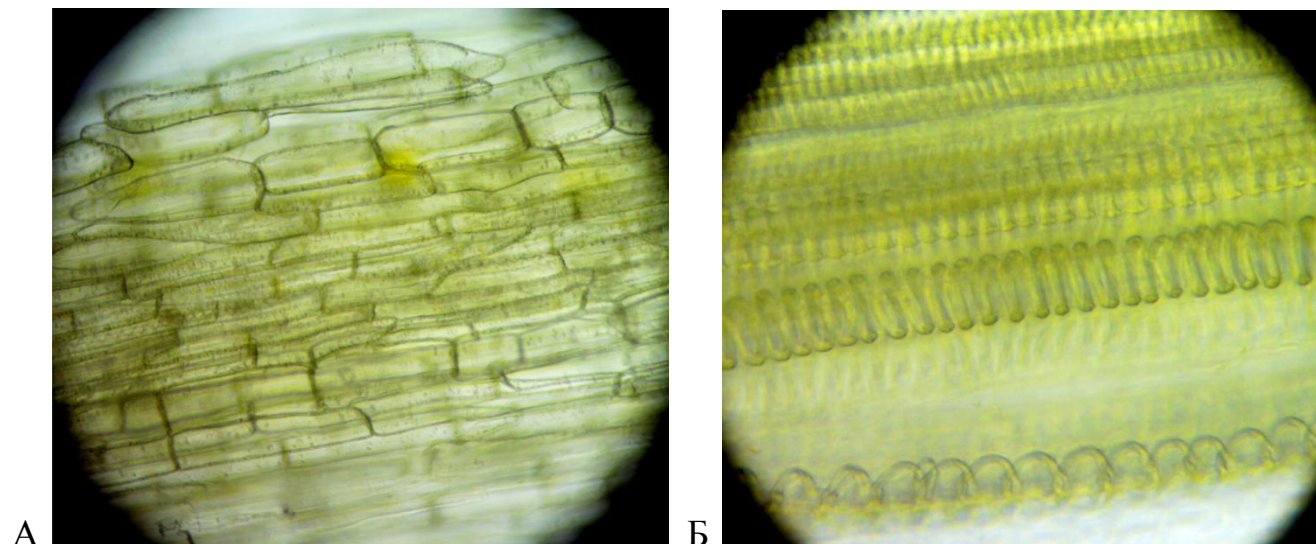


Рисунок 3 – Микроскопическое строение стебля пиона садовых сортов (А – клетки эпидермы, Б - спирально утолщенные сосуды; ув. 400х)

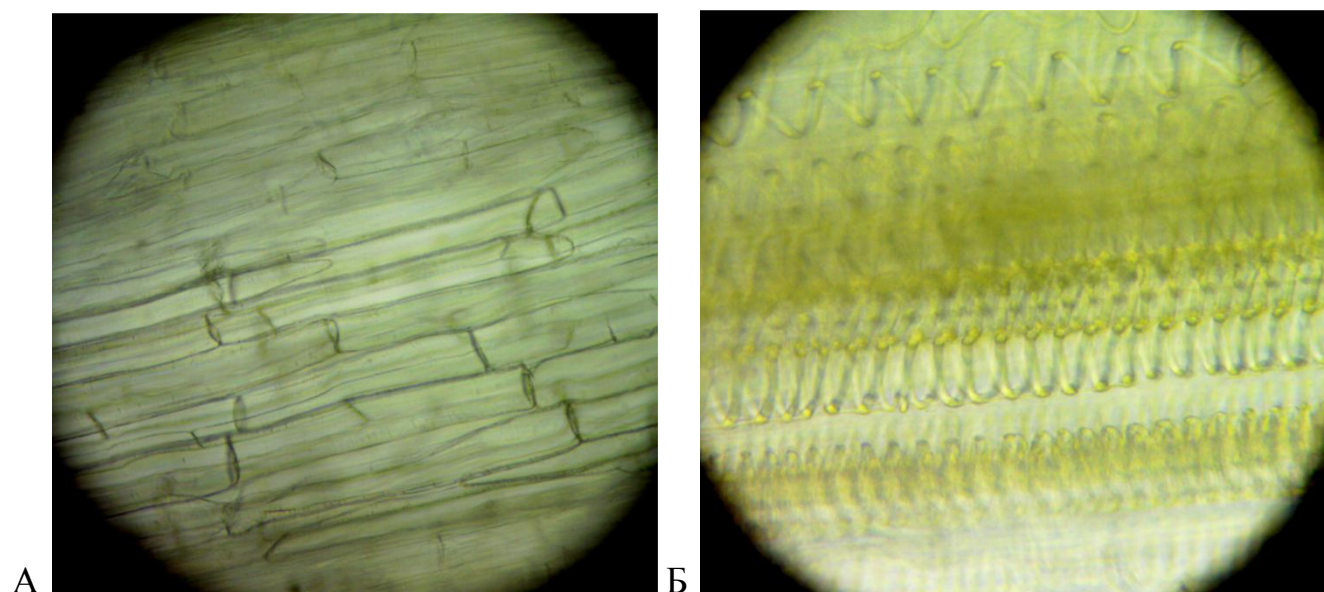


Рисунок 4 – Микроскопическое строение стебля пиона уклоняющегося (А – клетки эпидермы, Б - спирально утолщенные сосуды; ув. 400х)

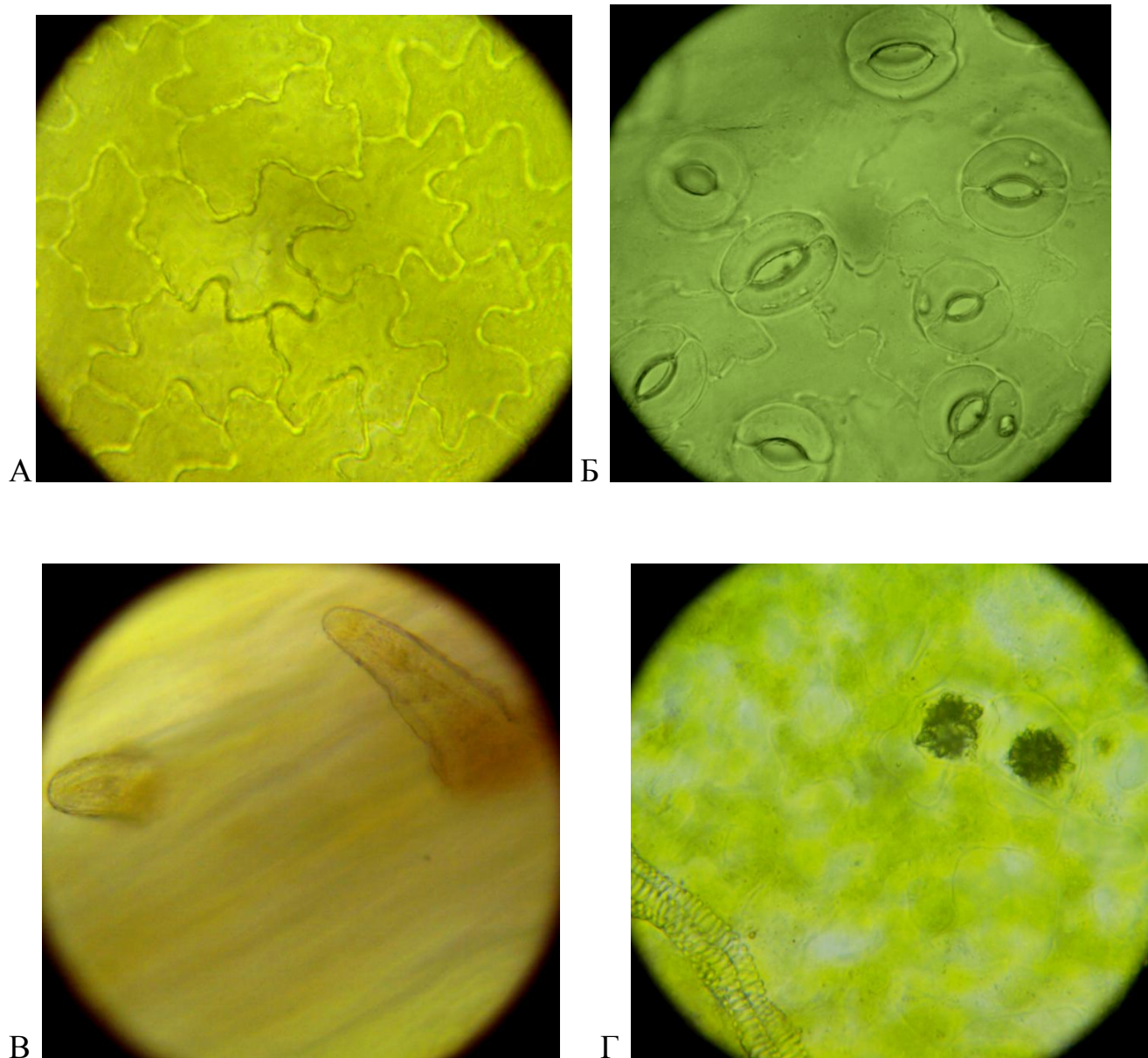


Рисунок 5 – Микроскопическое строение листа пиона садовых сортов (А – клетки эпидермы, Б - устьица, В – волоски, Г – кристаллы оксалата кальция, спирально утолщенные сосуды; ув. 400х)

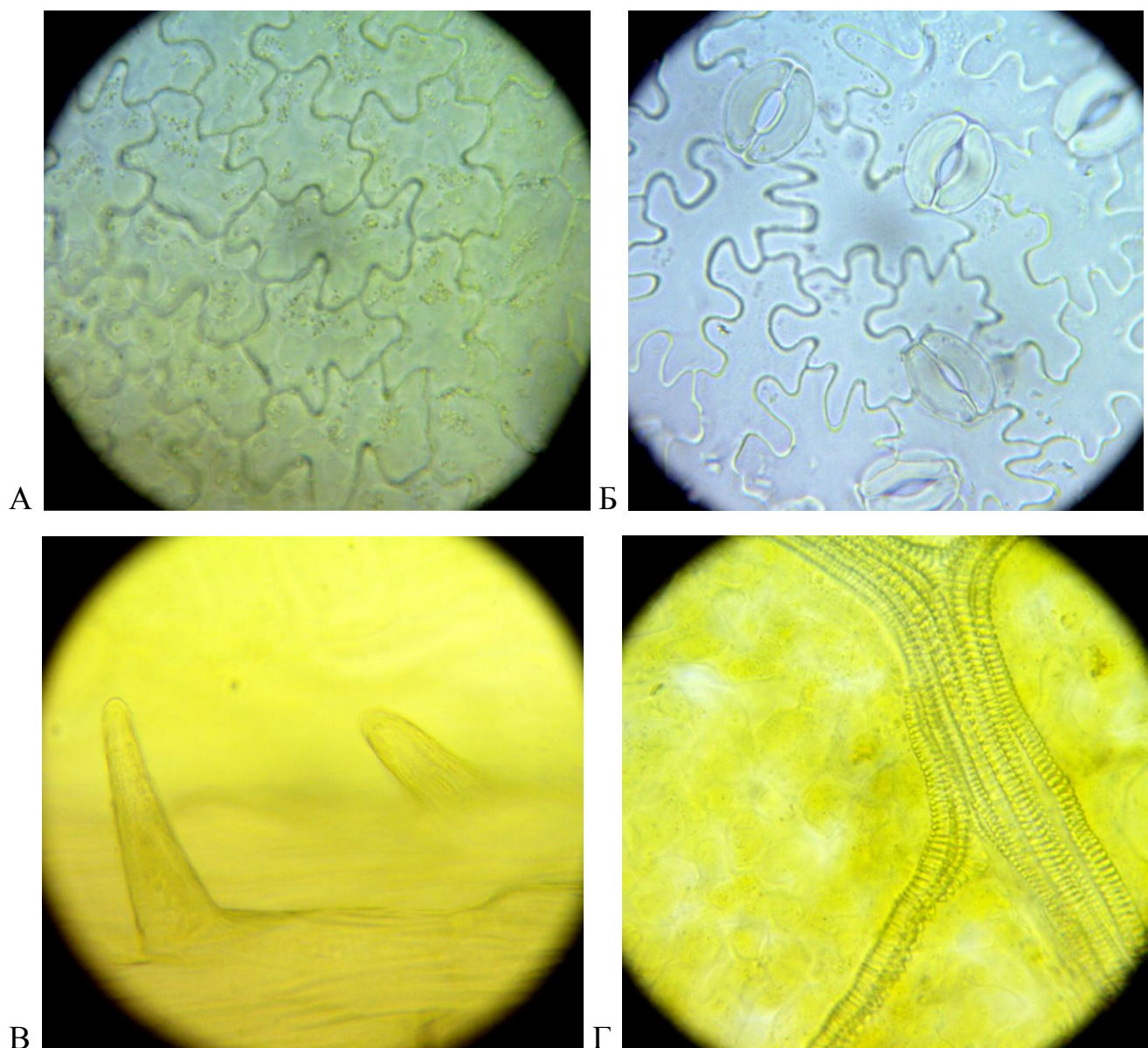


Рисунок 6 – Микроскопическое строение листа пиона уклоняющегося (А – клетки эпидермы с мелкокристаллическими включениями оксалата кальция, Б - устьица, В – волоски, Г –спирально утолщенные сосуды; ув. 400х)

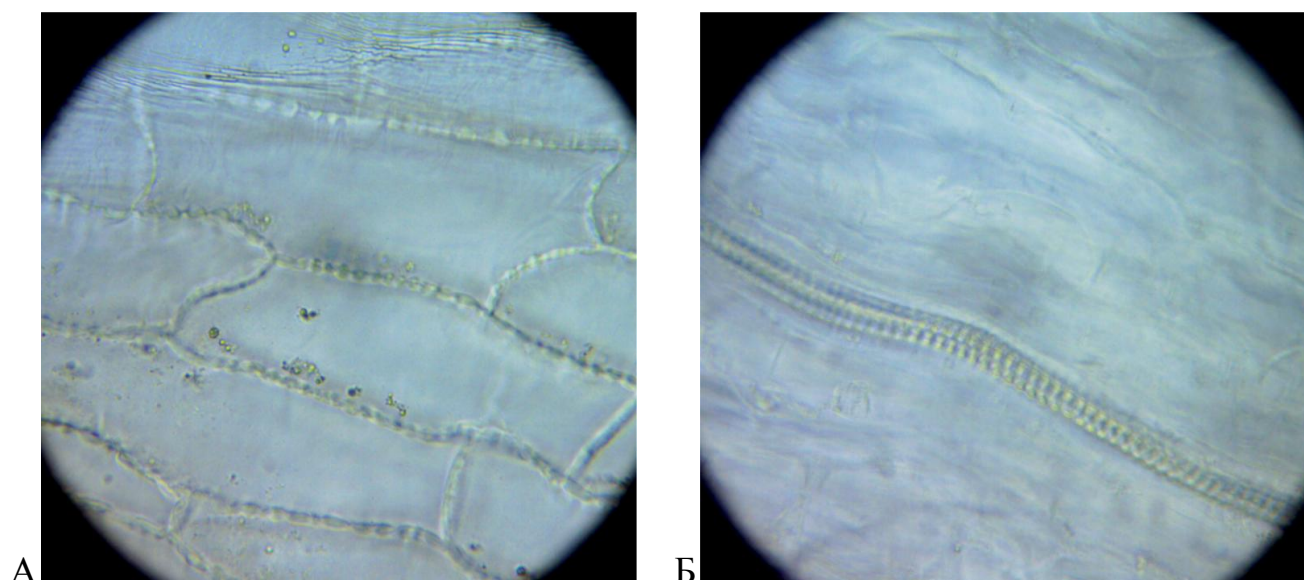


Рисунок 7 – Микроскопическое строение цветка (лепесток) пиона садовых сортов (А – клетки эпидермиса; Б – сосуды; ув. 400х)

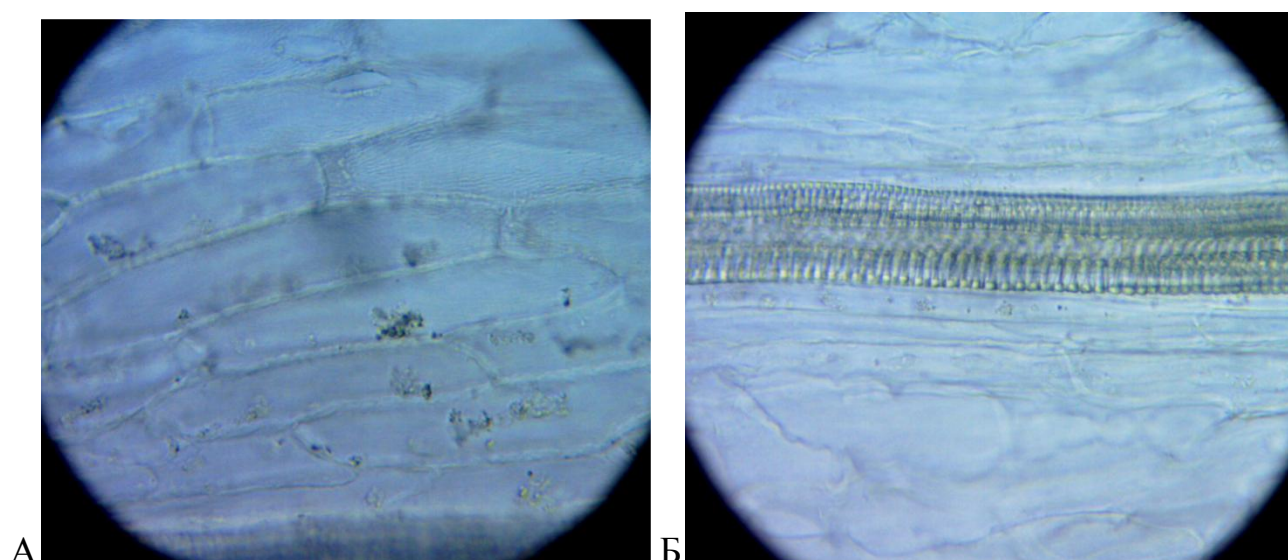


Рисунок 8 – Микроскопическое строение цветка (лепесток) пиона уклоняющегося (А – клетки эпидермиса; Б – спирально утолщенные сосуды; ув. 400х)

При микроскопическом анализе травы пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов установлены общие анатомические признаки: стебель с прозенхимными клетками эпидермы и спирально утолщенными сосудами; клетки эпидермы нижней и верхней поверхности листа с сильно извилистыми стенками, устьичный аппарат аномоцитного типа с 4 – 6 околоустьичными клетками, короткие одноклеточные тонкостенные волоски по жилкам и черешкам листа, в

клетках мезофилла – скопления кристаллов оксалата кальция; вытянутые клетки эпидермиса лепестка со спирально утолщенными сосудами [95]. Сравнительная характеристика анатомических признаков травы пиона уклоняющегося и травы пиона садовых сортов представлена в таблице 7.

**Таблица 7 – Сравнительная характеристика анатомических признаков
травы пиона уклоняющегося и травы пиона садовых сортов**

Признак	Пион уклоняющийся	Пион садовых сортов
1. Анатомические признаки стебля:		
1) характер клеток эпидермиса;	прозенхимные клетки с прямыми стенками	прозенхимные клетки с прямыми стенками и четковидными утолщениями
2) сосуды	спиралевидно утолщенные	спиралевидно утолщенные
2. Анатомические признаки листьев:		
1) характер клеток эпидермы;	клетки с извилистыми стенками	клетки с извилистыми стенками
2) характер устьичного аппарата;	аномоцитного типа с 4 – 6 околоустьичными клетками на нижней стороне листа	аномоцитного типа с 4 – 6 околоустьичными клетками на нижней стороне листа
3) выросты эпидермы;	короткие одноклеточные тонкостенные волоски по жилкам и черешкам листа	короткие одноклеточные тонкостенные волоски по жилкам и черешкам листа
4) характер включений	мелкокристаллические включения оксалата кальция	друзы оксалата кальция
3. Анатомические признаки цветков:		
1) характер клеток эпидермиса;	прозенхимные клетки с прямыми стенками	прозенхимные клетки с прямыми стенками и четковидными утолщениями
2) сосуды	спирально утолщенные сосуды	спирально утолщенные сосуды

3.1.3. Товароведческий анализ

Для оценки доброкачественности и чистоты лекарственного растительного сырья проводили товароведческий анализ травы пиона садовых сортов и травы пиона уклоняющегося по показателям: влажность, зола общая, зола, не растворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, примеси (органические и минеральные). Результаты анализа приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Товароведческие показатели травы пиона садовых сортов и травы пиона уклоняющегося (n=5)

Показатель	Среднее значение		ФС 42-99-98
	Пион садовых сортов	Пион уклоняющийся	
Влажность, %	8,15±0,10	7,90±0,15	Не более 13
Зола общая, %	7,20±0,21	8,18±0,20	Не более 7
Зола нерастворимая в 10% р-ре HCl, %	0,160±0,001	0,190±0,002	Не более 1
Стебли с остатками корневищ, %	1,40±0,03	1,90±0,01	Не более 20
Органическая примесь, %	0,020±0,001	0,020±0,002	Не более 2
Минеральная примесь, %	Не обнаружено	Не обнаружено	Не более 1

Результаты товароведческого анализа образцов травы пиона садовых сортов и пиона уклоняющегося показали, что по числовым показателям сырье удовлетворяет требованиям ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося». Показатель «Зола общая» незначительно превышает показатель, указанный в фармакопейной статье. В результате анализа данных частных фармакопейных статей на морфологическую группу «Травы», определено, что показатель «Зола общая» регламентируется в среднем на уровне не более 10 % [95].

На основании полученных данных и данных ФС 42–99–98 «Трава пиона уклоняющегося» предложены числовые показатели для травы пиона уклоняющегося и травы пиона садовых сортов: влажность не более 13,0%; золы

общей не более 10,0%; золы, не растворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1,0%; стебли с остатками корневищ не более 20%; органических примесей не более 2%; минеральных примесей не более 1,0%.

3.2. Фитохимический анализ БАВ пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов

Целью качественного анализа является определение веществ или групп веществ в исследуемом образце. Химические методы анализа позволяют подтвердить их наличие, а также получить предварительную информацию о структурных особенностях. Нами проведено фитохимическое исследование извлечений из травы пиона садовых сортов и травы пиона уклоняющегося на присутствие основных групп биологически активных веществ согласно общепринятым методикам.

3.2.1. Качественный анализ флавоноидов

Флавоноиды обнаруживали по качественным реакциям, при которых появляется характерное окрашивание или осадок.

Проба Синода основана на восстановлении металлическим магнием в присутствии хлористоводородной кислоты веществ флавоноидной природы (флавонолов, флавононов и флавонов). В результате реакции образовывалось красное окрашивание.

С 1 – 2% раствором алюминия хлорида флавоноиды образовывали комплексы, окрашенные в желтый или зеленый цвет. В данной реакции принимают участие свободные 3- и 5-Н-группы флавоноидов.

Также комплексные соединения образуются в результате взаимодействия с солями других тяжелых металлов (например, свинца, сурьмы, бария и др.). В результате реакции с 1% раствором свинца ацетата основного выпадал осадок, имеющий серо-голубое окрашивание.

В ходе реакции с едкими щелочами (10% раствором натрия гидроксида) происходил разрыв 1 – 2 связи производных флаванона и флавона с образованием халконов, дающих желто-зеленое окрашивание раствора.

Результаты качественного анализа флавоноидов в траве пиона уклоняющегося и пиона садового представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты качественных реакций на флавоноиды

Качественные реакции	Эффект реакции (окрашивание)	
	Пион уклоняющийся	Пион садовых сортов
Проба Синода (цианидиновая проба)	красное	
Реакция с 1% раствором алюминия хлорида	зеленовато-желтое	желтое
Реакция с 1% раствором ацетата свинца основного	серо-голубой аморфный осадок	
Реакция с 10% раствором натрия гидроксида	оливково-зеленое	зеленовато-желтое

Таким образом, по результатам качественных реакций можно судить о наличии флавоноидов в траве пиона уклоняющегося и траве пиона садовых сортов.

3.2.2. Качественный анализ монотерпеновых гликозидов

Качественный анализ сырья на присутствие монотерпеновых гликозидов проводили с использованием химических реакций.

Реакция Трим-Хилла (смесь кислот уксусной ледяной, хлористоводородной концентрированной, раствора меди сульфата). Нагревание извлечения с данной смесью приводило к образованию синего или фиолетового окрашивания, что указывает на присутствие монотерпеновых гликозидов.

Реакция с реактивом Шталя (спиртовой раствор парадиметиламинобензальдегида, подкисленный хлористоводородной кислотой) позволяет определить моно- и бициклические терпены, имеющие свободное α -положение в цикле по отношению к спиртовому гидроксилу, которые способны конденсироваться с ароматическими альдегидами с образованием сине-фиолетового окрашивания.

Для обнаружения монотерпеновых гликозидов использовали реактив Бэкон-Эдельмана (0,5 г бензидина и 10 мл уксусной кислоты в 100 мл этанола). Данная

реакция основана на получении соединений, окрашенных в желто-коричневый цвет.

При проведении реакции с раствором гидроксилamina щелочным и раствором железа (III) хлорида в хлористоводородной кислоте гликоиридоиды, содержащие сложноэфирную группу, образовывали комплекс с железа хлоридом, окрашенный в красно-фиолетовый цвет.

В результате анализа получены характерные для данной группы БАВ окрашивания (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты качественных реакций на монотерпеновые гликозиды

Качественные реакции	Эффект реакции (окрашивание)	
	Пион уклоняющийся	Пион садовых сортов
Реакция Трим-Хилла	сине-голубое	
Реакция с реактивом Шталя	сине-голубое	
Реакция с реактивом Бэкон-Эдельмана	коричневое	
Реакция с щелочным раствором гидроксилamina и раствором железа (III) хлорида	красно-фиолетовое	

Таким образом, данные качественные реакции дают возможность подтвердить присутствие монотерпеновых гликозидов в траве пиона уклоняющегося и траве пиона садовых сортов.

3.2.3. Исследование БАВ в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов методом ГХ-МС

С целью качественного определения органических соединений, содержащихся в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов, использовали метод газовой хроматографии с масс-селективной детекцией (ГХ-МС), обеспечивающий высокоэффективное разделение компонентов сложных смесей в газовой фазе и их идентификацию.

Извлечение БАВ из травы пиона уклоняющегося и травы пиона садовых сортов производили 95% этанолом в соотношении 1:10 при нагревании на

кипящей водяной бане с обратным холодильником. Исследование проводилось на газовом хроматографе Agilent 7890A с масс-спектрометрическим детектором.

В результате хроматографирования спиртовых извлечений получили хроматограммы, фрагменты которых представлены на рисунке 9.

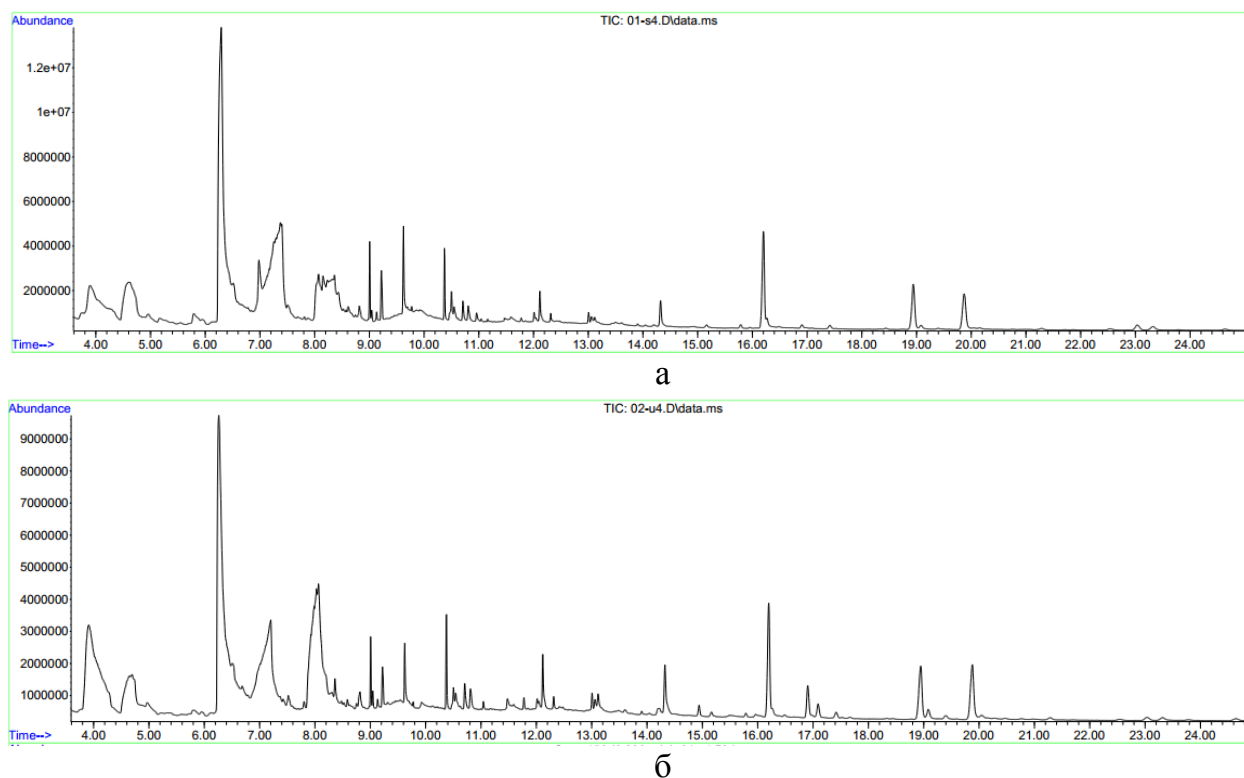


Рисунок 9 – Хроматограммы спиртового извлечения из травы пиона уклоняющегося (а) и травы пиона садовых сортов (б)

В результате сравнения масс спектров с библиотечными данными NIST 11 в траве пиона уклоняющегося и траве пиона садовых сортов установлено наличие органических веществ, представленных в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты определения органических соединений в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов методом ГХ-МС (n=5)

№ п/п	Соединение	Время удерживания, мин	Трава пиона уклоняющегося	Трава пиона садовых сортов
1	2	3	4	5
1	1,2,3- тригидроксибензол $C_6H_6O_3$	6,31	+	+
2	Бензойная кислота C_6H_5COOH	4,60	+	+

1	2	3	4	5
3	Метил-β-D- глюкопиранозид $C_7H_{14}O_6$	8,07	+	+
4	н-Гексадекановая кислота $CH_3(CH_2)_{14}COOH$	9,62	+	+
5	Фитол $C_{20}H_{40}O$	10,37	+	+
6	Токоферол $C_{29}H_{50}O_2$	16,90	+	+
7	γ-ситостерол $C_{29}H_{50}O$	19,87	+	+

Полученные данные показывают, что самый интенсивный пик на хроматограмме (вещество со временем удерживания 6,31 мин) соответствует трехатомному фенолу – пирогаллолу. Данное вещество является антисептиком и природным антиоксидантом [67].

В сырье пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов обнаружена бензойная кислота – простейшая одноосновная карбоновая кислота ароматического ряда – обладает антимикробным действием и является природным консервантом, а также н-гексадекановая кислота, относящаяся к жирным кислотам.

Кроме того, в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов установлено наличие моносахаров, которые в результате реакции со спиртом образуют продукт алкилирования – метил-β-D-глюкопиранозид, дитерпены (фитол – компонент молекулы хлорофилла), фитостерины (γ-ситостерол), витамин Е.

Таким образом, результаты исследования спиртовых извлечений из сырья пиона садовых сортов методом ГХ-МС подтверждают сходство химического состава с травой пиона уклоняющегося.

3.3. Количественное определение БАВ в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов

3.3.1. Определение содержания экстрактивных веществ

Содержание экстрактивных веществ – важный показатель доброкачественности лекарственного растительного сырья, используемого для получения экстракционных препаратов. Данный показатель характеризует содержание в сырье всей суммы биологически активных веществ, что будет обеспечивать комплексное действие препаратов.

Проводили сравнительное определение содержания экстрактивных веществ в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов гравиметрическим методом согласно ГФ XIII, ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». При этом осуществлялся подбор экстрагента, обеспечивающего наиболее полное извлечение веществ (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты определения содержания экстрактивных веществ в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов

Тип экстрагента	Содержание экстрактивных веществ, %	
	пион уклоняющийся	пион садовых сортов
Вода	51,92 ± 2,19	43,85 ± 1,93
40% этанол	59,95 ± 2,51	54,21 ± 2,33
70% этанол	56,77 ± 2,63	47,50 ± 2,17

Таким образом, установлен тип экстрагента для анализа по показателю «Экстрактивные вещества» – спирт этиловый 40%, и определено содержание экстрактивных веществ в сырье пиона. Из таблицы следует, что содержание экстрактивных веществ в сырье пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов отличаются в незначительной степени.

3.3.2. Количественное определение флавоноидов

Определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводили спектрофотометрическим методом с использованием реакции

комплексобразования с 2% раствором алюминия хлорида. Данный метод наиболее избирателен и специфичен, позволяет проводить количественное определение при исследовании растительных объектов, содержащих окрашенные сопутствующие вещества. За основу взята методика количественного определения флавоноидов в траве зверобоя [20].

С целью обеспечения наиболее точных результатов количественного определения осуществлялся подбор оптимальных условий извлечения флавоноидов из травы пиона садовых сортов. Изучали влияние таких факторов, как тип экстрагента, измельченность сырья, соотношение сырья и экстрагента, продолжительность и кратность экстракции.

Важным условием спектрофотометрического определения является выбор максимальной длины волны. Максимум поглощения (λ_{max}) комплекса извлечения из травы пиона с 2 % раствором алюминия хлорида наблюдается при 405 нм, что практически совпадает с максимумом поглощения комплекса рутина. Спектры поглощения комплекса с алюминия хлоридом флавоноидов и рутина представлены на рисунке 10.

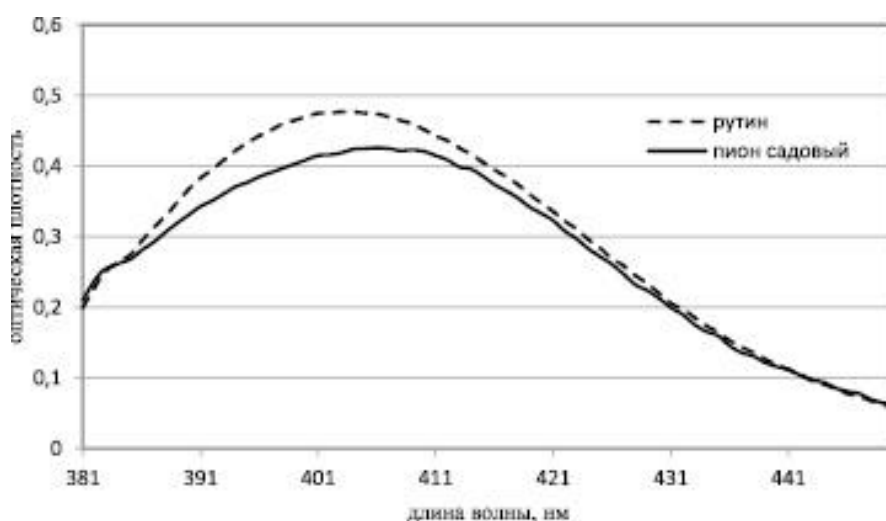


Рисунок 10 – Спектр поглощения комплекса флавоноидов травы пиона садовых сортов и раствора СО рутина с алюминия хлоридом

При выборе оптимального экстрагента для экстракции растительного сырья использовали воду очищенную и водно-спиртовые растворы 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90% концентрации. Установлено, что наиболее полное извлечение

флавоноидов из травы пиона достигается при использовании в качестве экстрагента 70% этанола. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Влияние типа экстрагента на степень извлечения флавоноидов из травы пиона садовых сортов (n=5)

Тип экстрагента	Содержание флавоноидов, %
Вода	1,10 ± 0,02
20 % этанол	1,37 ± 0,03
30 % этанол	1,39 ± 0,05
40 % этанол	1,48 ± 0,03
50 % этанол	1,53 ± 0,02
70 % этанол	1,73 ± 0,05
90 % этанол	1,70 ± 0,03

При изучении влияния степени измельчения растительного материала на выход флавоноидов сырье измельчали до размера 0,5 – 3 мм. Результаты показали, что измельчение сырья до размера частиц 1 мм позволяет увеличить выход флавоноидов (концентрация флавоноидов составляет $1,94 \pm 0,05$ %). Результаты представлены на рисунке 11.

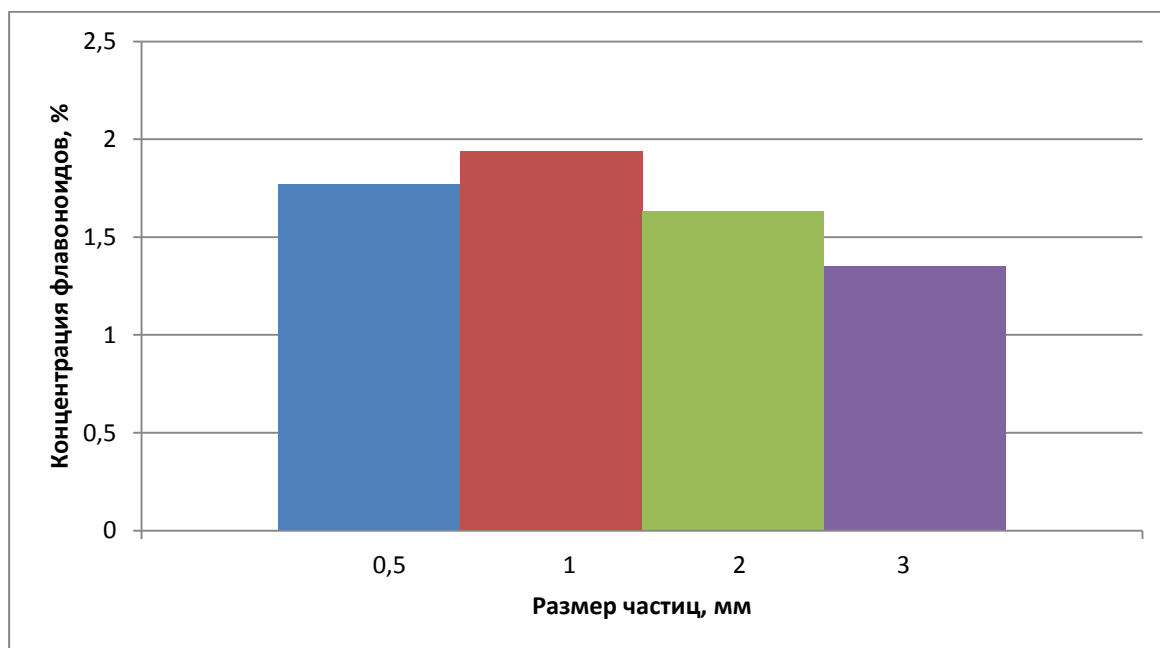


Рисунок 11 – Зависимость концентрации флавоноидов от степени измельчения травы пиона садовых сортов

При изучении фактора «сырье – экстрагент» установлен максимальный выход флавоноидов $1,82 \pm 0,04$ % при соотношении 1:10 (таблица 14).

**Таблица 14 – Содержание флавоноидов в зависимости от соотношения
сырье–экстрагент (n=5)**

Соотношение «сырье – экстрагент»	Содержание флавоноидов, %
1:5	$0,98 \pm 0,03$
1:10	$1,82 \pm 0,04$
1:15	$1,73 \pm 0,04$
1:20	$1,50 \pm 0,03$

Для установления продолжительности экстракции определяли время наступления равновесной концентрации с соблюдением подобранных оптимальных условий: траву пиона садовых сортов, измельченную до размера частиц 1 мм, заливали 70% этанолом в соотношении 1:10 и настаивали с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Определение содержания флавоноидов проводили через каждые 10 минут до прекращения прироста концентрации. Результаты исследований показали, что равновесная концентрация устанавливается через 30 минут. Равновесная концентрация на второй и третьей ступени наступала также через 30 минут.

На достоверность результатов спектрофотометрического определения влияет величина оптической плотности, а также время измерения. Достоверные результаты могут быть получены при величине оптической плотности 0,2 – 0,7 о.е. Для получения оптимального значения оптической плотности изучалось соотношение объемов извлечения и 2 % раствора алюминия хлорида. Разведения готовили в мерной колбе вместимостью 25 мл в соотношениях 1:1, 1:2, 1:3. Результаты, представленные в таблице 15, показывают, что оптимальным является соотношение извлечения и 2 % раствора алюминия хлорида 1:2.

Таблица 15 – Зависимость оптической плотности от соотношения «объем извлечения – объем 2 % раствора алюминия хлорида» (n=5)

Объем 2 % раствора алюминия хлорида, мл	Оптическая плотность	Содержание суммы флавоноидов, %
1	0,175	1,82
2	0,223	2,37
3	0,180	1,90

С целью установления времени устойчивости комплекса флавоноидов с хромогенным реагентом измерение величины оптической плотности фотометрируемого раствора проводили через каждые 10 минут в течение 1 часа с момента получения комплекса и через 1,5 часа. Данные, представленные в таблице 16, показывают, что эффект реакции стабилизируется через 40 минут с момента получения комплекса, в течение 1 часа стабильность сохраняется. Через 1,5 часа после получения комплекса происходит незначительное изменение оптической плотности.

Таблица 16 – Результаты определения времени устойчивости комплекса флавоноидов с 2 % раствора алюминия хлорида (n=5)

Время реакции, мин	Оптическая плотность	Концентрация флавоноидов, %
10	0,204	2,13
20	0,205	2,14
30	0,212	2,22
40	0,211	2,21
50	0,211	2,21
60	0,211	2,21
90	0,206	2,15

Подобранные параметры экстракции и спектрофотометрии позволили модифицировать методику количественного определения суммы флавоноидов применительно к траве пиона [73].

Методика количественного определения флавоноидов. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл 70% этанола. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая. Горячее извлечение фильтровали через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Вату помещали обратно в колбу. В колбу для экстрагирования прибавляли 30 мл 70% этанола. Экстракцию повторяли еще дважды при описанных выше условиях каждый раз, используя 30 мл экстрагента. Извлечение фильтровали в ту же мерную колбу. После охлаждения извлечения доводили объем раствора 70% этанолом до метки и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл раствора А и 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30% и доводили объем колбы 95% этанолом до метки. Через 40 минут измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Jenway Portlab 511 UV при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл раствора А, 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30% и доводили до метки 95% этанолом.

Приготовление раствора СО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130 – 150 °С в течение 3 часов, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 85 мл этанола 95% при нагревании на водяной бане и доводили тем же спиртом до метки (раствор А СО рутина). 1 мл раствора А СО рутина, 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили спиртом этиловым 95% до метки (раствор Б СО рутина).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) вычисляли по формуле:

$$x = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m_x \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутина;

m_x – масса сырья, г;

m_0 – масса рутина, г;

W – влажность сырья, %.

Результаты количественного определения флавоноидов в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты количественного определения флавоноидов в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов (n=5)

№ п/п	Образец сырья	Содержание флавоноидов, %
1	Цельное сырье пиона уклоняющегося (Пермский край) 2014 г.	3,69±0,15
2	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Пермский край) 2013 г.	3,15±0,12
3	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Пермский край) 2014 г.	3,31±0,17
4	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Свердловская область) 2014 г.	3,59±0,17

Таким образом, содержание флавоноидов в траве пиона садовых сортов составило от 3,15±0,12 до 3,59±0,17 %, в траве пиона уклоняющегося – 3,69±0,15 %. Полученные данные свидетельствуют о близких значениях содержания флавоноидов в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов.

3.3.3. Количественное определение монотерпеновых гликозидов

Монотерпеновые гликозиды являются значимой группой, влияющей на фармакологическую активность сырья пиона. Содержание суммы монотерпеновых гликозидов определяли спектрофотометрическим методом по реакции окрашивания с раствором гидроксилamina щелочным и железа (III)

хлоридом по методике количественного определения суммы иридоидов в пересчете на пеонифлорин в траве пиона уклоняющегося согласно ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося», представленной в главе 2. Результаты количественного определения монотерпеновых гликозидов в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты количественного определения монотерпеновых гликозидов в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов (n=5)

№ п/п	Образец сырья	Содержание монотерпеновых гликозидов, %
1	Цельное сырье пиона уклоняющегося (Пермский край) 2014 г.	6,15±0,30
2	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Пермский край) 2013 г.	7,06±0,33
4	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Пермский край) 2014 г.	5,83±0,25
5	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Свердловская область) 2014 г.	7,81±0,38

В результате количественного определения установлено содержание монотерпеновых гликозидов в траве пиона уклоняющегося 6,15±0,30% и пиона садовых сортов от 5,83±0,29% до 7,81±0,38%.

3.3.4. Количественное определение пеонифлорина

Поскольку согласно литературным данным среди монотерпеновых гликозидов пиона основным компонентом, обеспечивающим проявление фармакологического действия, является пеонифлорин, важное значение приобретает разработка методики его количественного определения. Данный показатель может использоваться для стандартизации сырья и для включения в НД.

Для количественного определения пеонифлорина в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов за основу взяли и адаптировали

методику, предложенную Японской фармакопеей XVI издания [117]. Исследования проводились на базе лаборатории химических и инструментальных методов регионального испытательного центра «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (под руководством Малковой Т.Л.).

На первом этапе хроматографические условия, описанные в Японской Фармакопее для количественного определения пеонифлорина в сырье пиона молочнокветкового, были апробированы на извлечении из травы пиона садовых сортов. При использовании в качестве подвижной фазы состава вода-ацетонитрил-кислота фосфорная (850:150:1) не происходило четкого разделения пика пеонифлорина от пиков соэкстрактивных веществ в извлечении из травы пиона. Оптимального разделения пиков удалось добиться в результате введения в состав элюента фосфатного буферного раствора (рН 3). Для вымывания из колонки сильноудерживаемых на обращенной фазе компонентов извлечения использовали режим градиентного элюирования после выхода пеонифлорина.

Таким образом, предложена следующая методика количественного определения пеонифлорина в траве пиона.

Методика. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в круглодонную колбу, прибавляли 50 мл метанола, нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут, фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу для экстрагирования прибавляли 50 мл метанола, экстракцию повторяли при описанных выше условиях, извлечение фильтровали в ту же мерную колбу, доводили метанолом до метки. Раствор стандартного образца: 5,0 мг стандартного образца пеонифлорина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяли в метаноле.

Условия хроматографирования:

- подвижная фаза: элюент А – фосфатный буфер (рН 3), элюент Б – ацетонитрил;

- режим элюирования:

Время, мин.	Фосфатный буфер (рН 3), %	Ацетонитрил, %	Режим элюирования
0 – 18	85	15	изократический
18 – 25	85 → 20	15 → 80	градиентный (вымывание сильно- удерживаемых компонентов)
25 – 30	20 → 85	80 → 15	градиентный (возврат к первоначальному составу элюента)

- скорость потока элюирования: 1 мл/мин;
- температура термостата колонки: 25 °С;
- объем вводимой пробы: 10 мкл.

Детектирование пеонифлорина осуществляли при длине волны 231 ± 1 нм (рисунок 12).

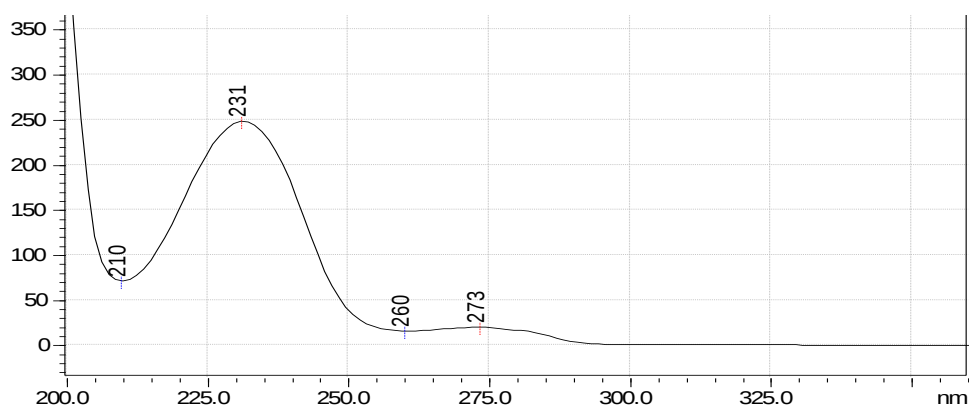


Рисунок 12 – УФ-спектр стандартного раствора пеонифлорина

Для подтверждения линейности методики строили калибровочный график в диапазоне концентраций растворов стандартного образца пеонифлорина 10,5 – 380 мкг/мл (рисунок 10). График зависимости площади пика пеонифлорина от его концентрации в калибровочных растворах описывается уравнением $S = 13721 \times C$, где S – площадь хроматографического пика пеонифлорина, C – концентрация пеонифлорина. Коэффициент корреляции $R^2 = 0.9997$ имеет значение, близкое к единице, что указывает на линейность методики.

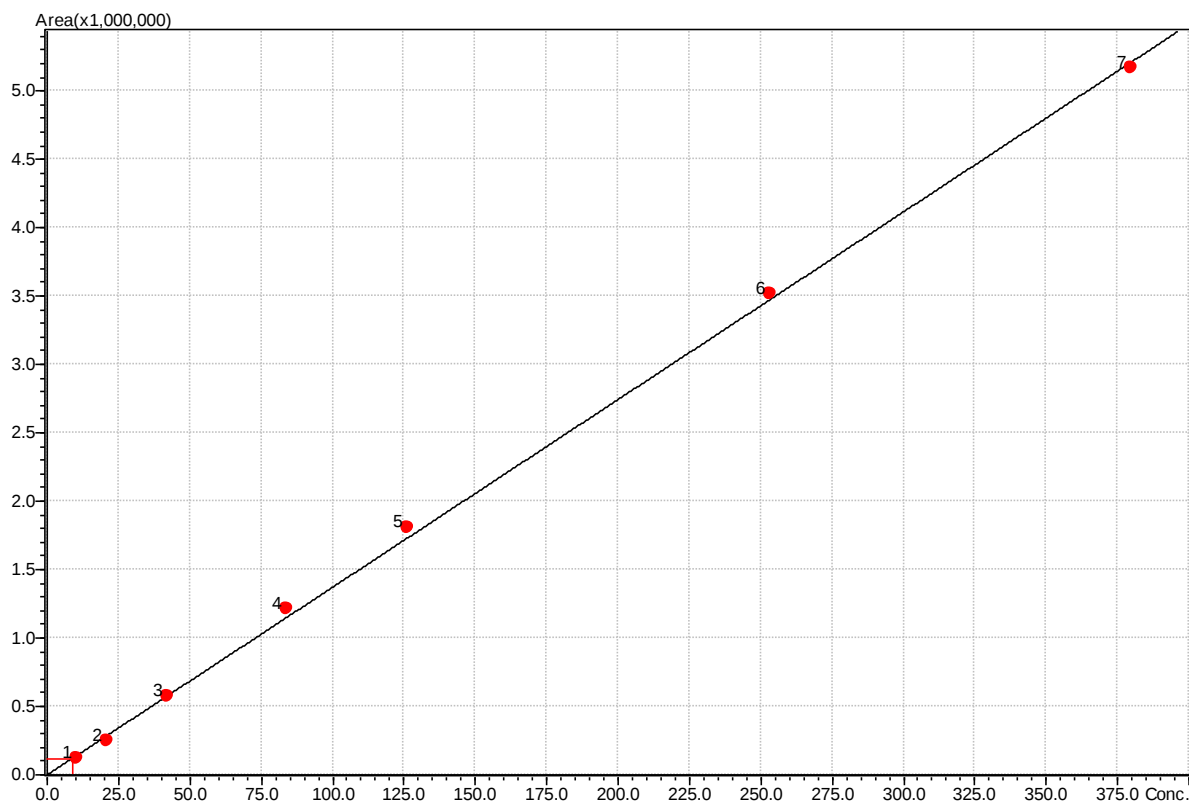


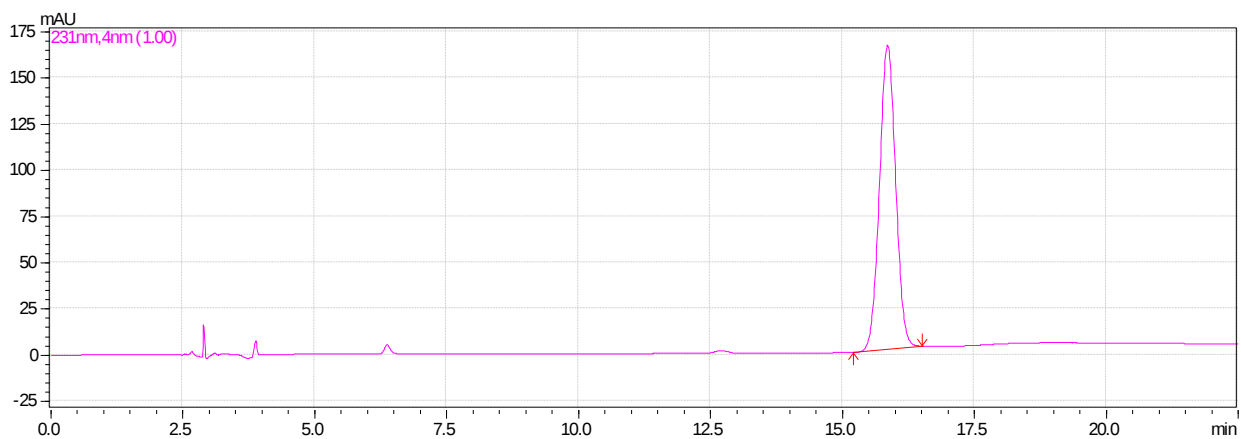
Рисунок 13 – Градуировочный график зависимости аналитического сигнала от количества пеонифлорина

Также в ходе исследования установлен предел обнаружения пеонифлорина при использовании разработанной методики – 0,5 мкг/мл. Предел количественного определения пеонифлорина составил 1 мкг/мл (отношение сигнал – шум для данного значения составляет >5).

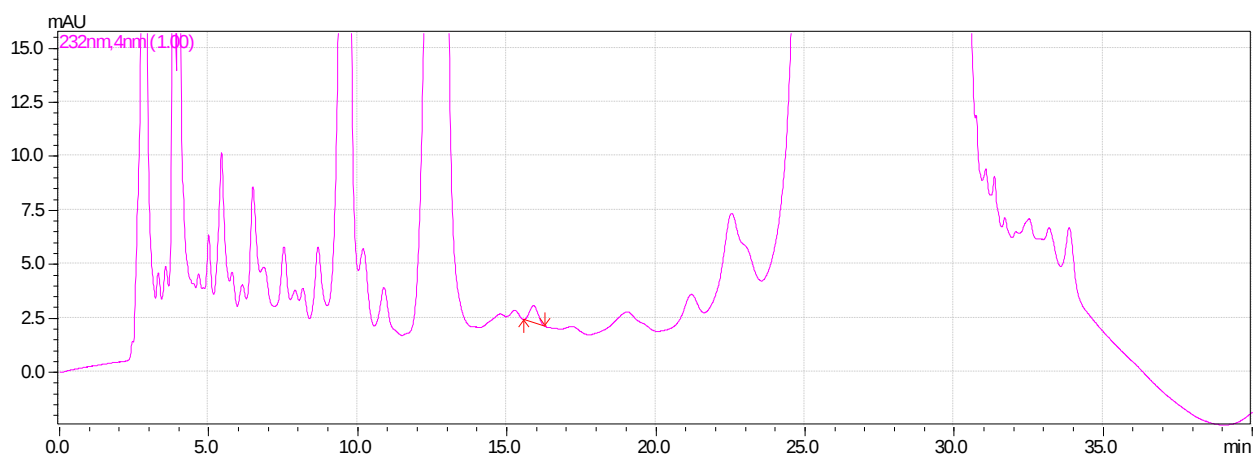
С целью установления пригодности методики ВЭЖХ для количественного определения пеонифлорина в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов проводили валидацию в соответствии с требованиями ГФ XIII по следующим параметрам: специфичность, прецизионность в условиях повторяемости (сходимость), линейность, правильность [18, 88].

Для оценки специфичности разработанных хроматографических условий проведен анализ раствора СО пеонифлорина, извлечения из травы пиона уклоняющегося, извлечения из травы пиона садовых сортов и растворителя метанола. Результаты представлены на рисунке 14. Установлено, что время удерживания пика пеонифлорина ($15,8 \pm 0,05$ мин) на хроматограмме стандартного раствора совпадает со временем удерживания вещества на хроматограмме

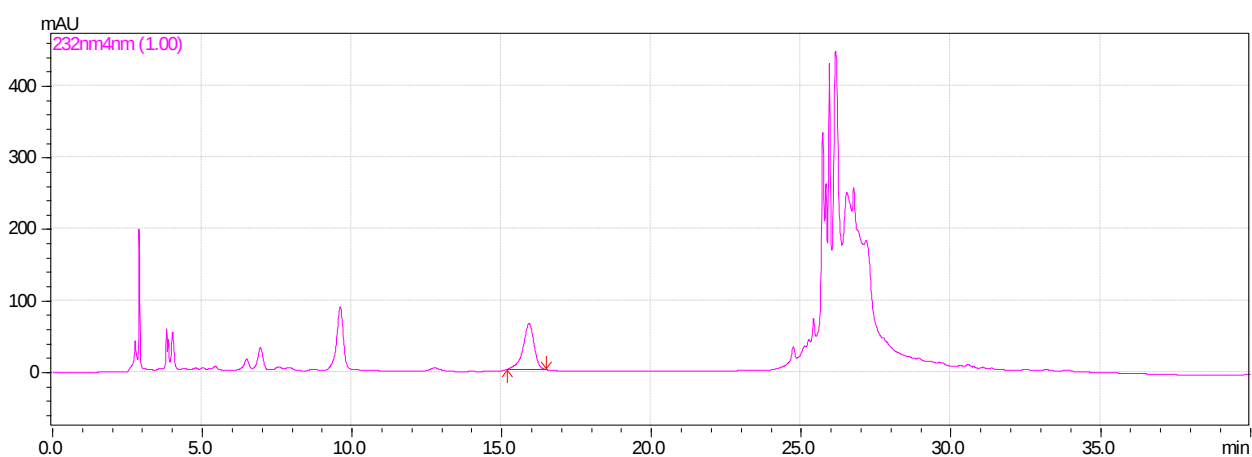
испытуемых извлечений. На хроматограмме растворителя отсутствуют пики, мешающие определению пеонифлорина.



а



б



в

Рисунок 14 – Хроматограммы стандартного образца пеонифлорина (а), извлечения из травы пиона уклоняющегося (б) и извлечения из травы пиона садовых сортов (в).

Оценка пригодности хроматографической системы проводилась по эффективности хроматографической колонки, воспроизводимости инъекции, степени разделения пиков и коэффициенту асимметрии пика.

Параметры, характеризующие пригодность хроматографической системы представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Оценка пригодности хроматографической системы

Эффективность хроматографической колонки, т.т.	Воспроизводимость инъекций, %	Коэффициент асимметрии пика пеонифлорина	Коэффициент разделения (Rs) пика пеонифлорина и соседних пиков
12757	0,24	0,95	Более 3,5

В результате анализа шести извлечений из травы пиона садовых сортов устанавливали сходимость результатов количественного определения (прецизионность в условиях повторяемости). Результаты представлены в таблице 20. Рассчитанное значение относительного стандартного отклонения (RSD) составляет 0,30429, что не превышает 1% и свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов.

Таблица 20 – Оценка сходимости методики количественного определения пеонифлорина в траве пиона садовых сортов

Повторность	Концентрация пеонифлорина, %	Метрологические характеристики (n=6, P=95%)
1	1,21	$\bar{x} = 1,20$ SD = 0,00894 RSD = 0,30429
2	1,19	
3	1,19	
4	1,20	
5	1,21	
6	1,20	

Для оценки линейности разработанной методики проводили анализ извлечений из травы пиона садовых сортов с содержанием пеонифлорина на уровне 50 – 150% от установленного номинального содержания вещества, принятого за 100%.

Концентрированное извлечение: около 5,00 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в круглодонную колбу, прибавляли 25 мл метанола, нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут, охлаждали и фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл, далее процесс повторяли, доводили метанолом до метки (раствор А с концентрацией пеонифлорина 1200 мкг/мл).

Растворы извлечений с необходимой концентрацией пеонифлорина готовили путем варьирования аликвот концентрированного извлечения:

50% – аликвота извлечения 2,5 мл – объем раствора 50 мл;

80% – аликвота извлечения 4,0 мл – объем раствора 50 мл;

100% – аликвота извлечения 5,0 мл – объем раствора 50 мл;

120% – аликвота извлечения 6,0 мл – объем раствора 50 мл;

150% – аликвота извлечения 7,5 мл – объем раствора 50 мл.

На рисунке 15 представлен калибровочный график количественного определения пеонифлорина в извлечении из травы пиона садовых сортов методом ВЭЖХ. Зависимость площади пика пеонифлорина от его концентрации в испытуемых растворах описывается уравнением $S = 10244 \times C$, где S – площадь хроматографического пика пеонифлорина, C – концентрация пеонифлорина. Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9989$ указывает на линейность методики в выбранном диапазоне.

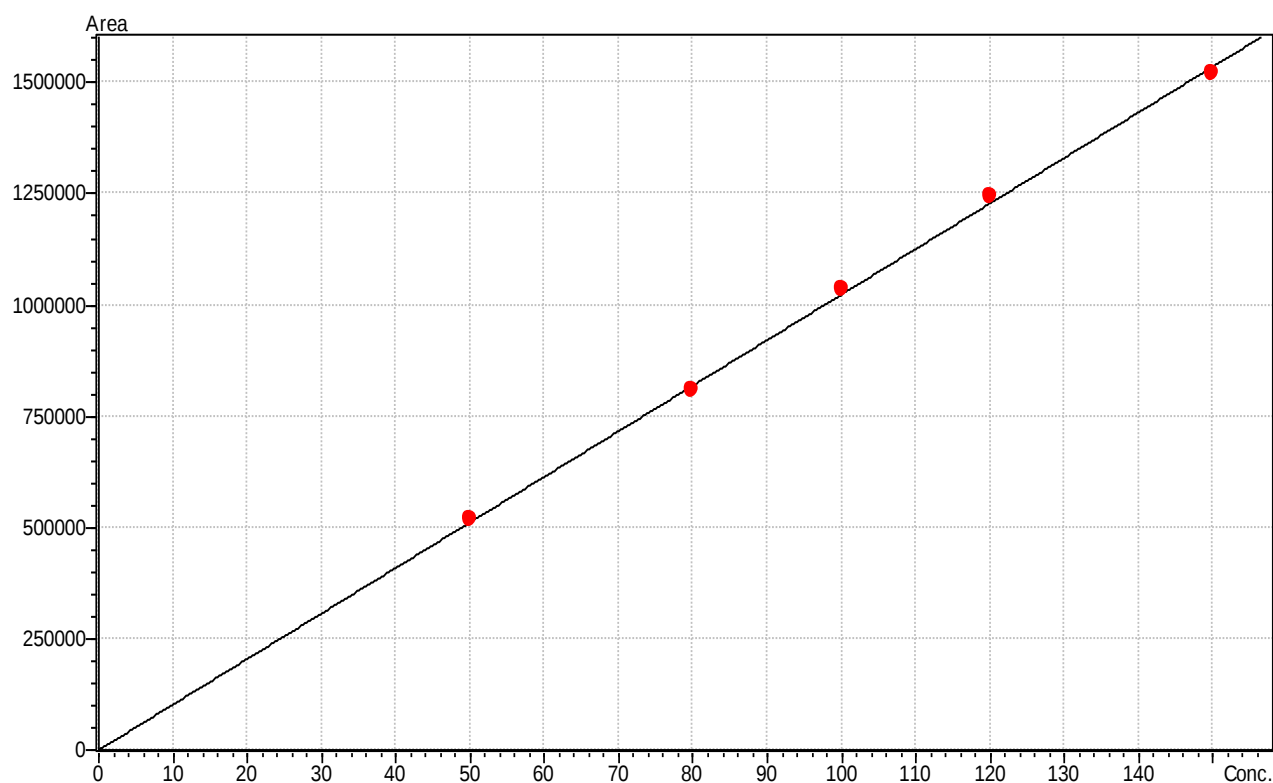


Рисунок 15 – Калибровочный график методики количественного определения пеонифлорина в траве пиона садовых сортов.

Для установления правильности методики количественного определения пеонифлорина в траве пиона садовых сортов использовали метод добавок. Модельные растворы готовили путем добавления к концентрированному извлечению с содержанием пеонифлорина 1200 мкг/мл определенных объемов раствора стандартного образца пеонифлорина до получения концентраций 80, 100, 120% от номинальной концентрации.

Раствор стандартного образца пеонифлорина: 60,0 мг пеонифлорина помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в метаноле и доводили метанолом до метки.

Модельные растворы:

80% – 5 мл раствора А, 3 мл раствора СО пеонифлорина – объем раствора 25 мл;

100% – 5 мл раствора А, 5 мл раствора СО пеонифлорина – объем раствора 25 мл;

120% – 5 мл раствора А, 7 мл раствора СО пеонифлорина – объем раствора 25 мл.

Результаты представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Оценка правильности методики количественного определения пеонифлорина в траве пиона садовых сортов

Концентрация	Исходное содержание пеонифлорина, мг	Добавлено СО пеонифлорина, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Открываемость, %	Средний процент восстановления, %
80%	6,00	3,60	9,60	9,63	100,31	$\bar{x} = 100,29$ $SD = 1,25$ $\Delta \bar{x} = 0,96$
	6,00	3,60	9,60	9,61	101,10	
	6,00	3,60	9,60	9,40	97,90	
100%	6,00	6,00	12,00	12,09	100,75	
	6,00	6,00	12,00	11,95	99,58	
	6,00	6,00	12,00	11,86	98,83	
120%	6,00	8,40	14,40	14,50	100,69	
	6,00	8,40	14,40	14,45	100,35	
	6,00	8,40	14,40	14,70	102,07	

Истинное содержание пеонифлорина в приготовленных модельных растворах лежит внутри доверительных интервалов средних результатов, полученных в ходе эксперимента, что свидетельствует о правильности разработанной методики.

Результаты количественного определения пеонифлорина в траве пиона уклоняющегося и траве пиона садовых сортов методом ВЭЖХ представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты количественного определения пеонифлорина в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов (n=5)

№ п/п	Образец сырья	Содержание пеонифлорина, %
1	Цельное сырье пиона уклоняющегося (Пермский край) 2014 г.	0,103±0,004
2	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Пермский край) 2013 г.	1,203±0,020
3	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Пермский край) 2014 г.	1,190±0,010
4	Смешанное сырье пиона садовых сортов (Свердловская область) 2014 г.	1,214±0,010

В результате количественного определения установлено содержание пеонифлорина в траве пиона уклоняющегося $0,103 \pm 0,004$ и в траве пиона садовых сортов от $1,190\% \pm 0,010$ до $1,214 \pm 0,010\%$.

3.3.5. Исследование макро– и микроэлементного состава

Изучение микроэлементного состава лекарственных растений имеет большое значение, так как содержащиеся в них химические элементы не только непосредственно оказывают влияние на физиологические процессы животных организмов, но и обладают синергизмом по отношению к другим веществам, содержащимся в данном растении.

Содержание микроэлементов изучалось в траве пиона садовых сортов и траве пиона уклоняющегося. Точные навески сырья около 1,0000 г подвергались минерализации согласно ГОСТ 26929-94.

Для определения содержания элементов (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni) в растительном сырье использовали метод атомно-адсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией. Определение проводили на атомно-абсорбционном спектрометре МГА-915М. Анализ К, Na и Са проводили методом пламенной фотометрии на пламенном фотометре фирмы Jenway PFP 7. Для исследования содержания Mg использовали метод фотометрии в видимой области спектра по реакции с титановым желтым в щелочной среде. Измерения проводили на фотометре КФК-3 ЗОМЗ.

В результате элементарного анализа выявлено наличие 3 макроэлементов (Na, Ca, Mg) и 5 микроэлементов таких, как Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, содержание которых в надземной части пиона садовых сортов сопоставимо с их содержанием в траве пиона уклоняющегося. Результаты представлены в таблице 23.

Кроме того, в траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов отмечено отсутствие токсичных элементов, таких как Hg, As, Cd, Pb.

Таблица 23 – Элементный состав травы пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов

Элемент	Содержание, мг/кг	
	пион уклоняющийся	пион садовых сортов
Макроэлементы		
Na (г/кг)	0,33±0,01	0,22±0,01
Ca	12190,0±590,0	9752,0±477,0
Mg	1940,0±85,0	2202,0±105,0
Микроэлементы		
Fe	77,80±2,89	63,73±2,98
Zn	32,94±1,04	18,90±0,84
Cu	4,30±0,15	4,10±0,19
Mn	39,75±1,48	52,16±2,45
Ni	1,96±0,07	2,27±0,11

Данный комплекс макро- и микроэлементов позволяет рекомендовать траву пиона для создания препаратов, используемых при заболеваниях нервной системы, а также в комплексной терапии различных патологических состояний.

Выводы по главе 3

1. Установлены идентичные морфолого-анатомические признаки травы пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов. Товароведческий анализ образцов сырья показал, что сырье соответствует требованиям ФС 42-99-98 «Трава пиона уклоняющегося».
2. Доказано присутствие в траве пиона садовых сортов и траве пиона уклоняющегося флавоноидов и монотерпеновых гликозидов качественными реакциями.
3. Установлена идентичность органических соединений в траве пиона садовых сортов и траве пиона уклоняющегося. Методом ГХ-МС обнаружены пирогаллол, бензойная кислота, метил-β-D-глюкопиранозид, н-гексадекановая кислота, фитоол, токоферол, γ-ситостерол.

3. Подобраны условия экстракции и установлено содержание экстрактивных веществ в траве пиона уклоняющегося $59,95 \pm 2,51$ %, в траве пиона садовых сортов – $54,2 \pm 2,33$ %.
4. Адаптирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин применительно к траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов, и установлено количественное содержание флавоноидов в траве пиона уклоняющегося $3,69 \pm 0,15$ %, в траве пиона садовых сортов – от $3,15 \pm 0,12$ до $3,59 \pm 0,17$ %.
5. Установлено количественное содержание суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин в траве пиона уклоняющегося $6,15 \pm 0,30$ %, в траве пиона садовых сортов – от $5,83 \pm 0,29$ % до $7,81 \pm 0,38$ %.
6. Адаптирована методика количественного определения пеонифлорина методом ВЭЖХ применительно к траве пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов и проведена ее валидационная оценка. Содержание пеонифлорина в образце травы пиона уклоняющегося составило $0,103 \pm 0,004$ % и в трех образцах травы пиона садовых сортов от $1,190\% \pm 0,010$ до $1,214 \pm 0,010$ %.
7. Установлен близкий по качественному и количественному содержанию элементный состав травы пиона садовых сортов и пиона уклоняющегося методом атомно-абсорбционной спектрометрии, пламенной фотометрии и фотометрии в видимой области спектра. Элементный состав образцов пиона уклоняющегося и пиона садовых сортов представлен 8 химическими элементами: железо, цинк, медь, натрий, кальций, марганец, никель и магний при отсутствии тяжелых металлов.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ «ПИОНИФИТ» ЭКСТРАКТА СУХОГО И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Экстракционные препараты на основе лекарственного растительного сырья являются группой ценных лекарственных препаратов. Однако жидкие экстракты имеют ряд серьезных недостатков (насыщенность балластными веществами, большое количество экстрагента, малая транспортабельность).

Поэтому целью дальнейших исследований являлась разработка способа получения суммарного экстракционного препарата из травы пиона садовых сортов – экстракта сухого, названного нами «Пионифит», а также его стандартизация.

При получении препаратов растительного происхождения решающее значение имеет процесс экстрагирования из лекарственного растительного сырья, параметры которого влияют на выход комплекса БАВ и эффективность готового лекарственного препарата.

4.1. Оптимизация условий экстрагирования травы пиона садовых сортов

Задача экстракции состоит в том, что бы наиболее полно перевести вещества из растительной ткани в среду растворителя, для чего необходимо подобрать условия, облегчающие данный процесс.

В нашей работе изучены следующие факторы экстракции: вид экстрагента, соотношение сырья и экстрагента, степень измельчения сырья, температура процесса, продолжительность и кратность экстракции. Количественная оценка проводилась по содержанию суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин (содержание в сырье $5,83 \pm 0,25$ %) и суммы флавоноидов в пересчете на рутин (содержание в сырье $3,15 \pm 0,12\%$).

4.1.1. Выбор экстрагента

Экстрагент как активный компонент системы влияет на полноту извлечения БАВ, качество и скорость процесса экстрагирования. В качестве экстрагента использованы вода очищенная и водно-спиртовые извлечения различной концентрации (20, 30, 40, 50, 70 и 90%), поскольку при смешивании этанола с

водой получают растворы различной степени полярности, в результате чего возможна избирательная экстракция некоторых биологически активных веществ. Результаты приведены в таблице 24.

Таблица 24 – Содержание БАВ в зависимости от типа экстрагента (n=5)

Экстрагент	Содержание, %		Степень истощения сырья, %	
	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды
Вода	1,25±0,06	4,46±0,18	39,80±3,03	76,50±3,20
20% этанол	1,59±0,02	4,20±0,14	50,40±1,01	72,08±2,48
30% этанол	1,69±0,04	4,09±0,14	53,70±2,02	70,22±2,48
40% этанол	1,88±0,02	4,08±0,18	59,60±1,01	70,09±3,10
50% этанол	1,89±0,05	3,57±0,08	60,10±2,52	61,29±1,36
70% этанол	1,97±0,04	2,24±0,14	62,40±1,53	55,58±2,35
90% этанол	1,97±0,03	–	62,40±1,51	–

Как видно из таблицы, с увеличением концентрации водно-спиртовых растворов повышается содержание суммы флавоноидов. Данные вещества лучше извлекаются из травы пиона садовых сортов этанолом в концентрации 70 – 90%. Содержание монотерпеновых гликозидов достигает высоких значений при экстрагировании водой очищенной и спиртом этиловым в концентрации 20 – 40%. Поскольку целью исследования является получение суммарного экстракционного препарата, необходимо обеспечить извлечение комплекса БАВ, отвечающего за фармакологическое действие растения. В связи с этим оптимальным экстрагентом выбран спирт этиловый 40%.

4.1.2. Определение соотношения сырье – экстрагент

Для установления соотношения сырье – экстрагент для экстракции использовали 40% спирт этиловый в различных соотношениях к количеству сырья: 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 (расчет количества экстрагента проводили с учетом коэффициента спиртопоглощения). Результаты определения монотерпеновых гликозидов и флавоноидов в зависимости от соотношения сырья и экстрагента представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты определения содержания флавоноидов и монотерпеновых гликозидов в зависимости от соотношения сырье - экстрагент (n=5)

Соотношение «сырье – экстрагент»	Содержание, %		Степень истощения сырья, %	
	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды
1:5	1,06±0,03	1,74±0,06	33,50±1,09	29,80±1,39
1:10	2,21±0,05	3,92±0,09	70,07±1,82	67,20±2,36
1:15	2,29±0,06	4,34±0,19	72,60±2,19	74,40±3,12
1:20	2,27±0,04	4,26±0,17	72,20±1,46	73,10±3,15

Полученные данные свидетельствуют о том, что при соотношении сырья и экстрагента 1:10 и выше, содержание БАВ отличается в незначительной степени. В связи с этим увеличение объема экстрагента нерационально, так как это приводит к нежелательному разбавлению экстракта. Кроме того, увеличивается расход экстрагента и время получения экстракта. Поэтому выбрано оптимальное соотношение сырья и экстрагента 1:10.

4.1.3. Определение оптимальной температуры извлечения БАВ из травы пиона садовых сортов

Температурный фактор оказывает значительное влияние на процесс экстрагирования флавоноидов и монотерпеновых гликозидов. Извлечение БАВ осуществляли при нагревании на водяной бане при 20, 30, 50, 70 и 90 °С. Данные, представленные в таблице 26, показывают, что с увеличением температуры до 70°С повышается выход БАВ. Повышение температуры экстракции до 80 – 90 °С приводит к снижению концентрации флавоноидов и монотерпеновых гликозидов, в то же время увеличивается выход балластных веществ.

Таблица 26 – Результаты определения содержания флавоноидов и монотерпеновых гликозидов в зависимости от температуры (n=5)

Температура, °С	Содержание, %		Степень истощения сырья, %	
	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды
20	0,50±0,03	0,87±0,03	15,79±3,15	14,92±0,51
30	1,82±0,02	2,26±0,11	57,80±2,10	38,77±1,89
50	1,96±0,02	2,62±0,15	62,30±2,10	44,94±2,57
70	2,28±0,01	3,60±0,09	72,40±1,05	61,74±1,54
90	1,95±0,03	2,65±0,13	61,90±3,15	45,45±2,23

Таким образом, в результате исследования влияния температуры на содержание флавоноидов и монотерпеновых гликозидов, выбрана оптимальная температура экстрагирования – 70°С.

4.1.4. Определение степени измельчения сырья

Степень измельчения сырья оказывает значительное влияние на выход действующих веществ и интенсивность процесса экстрагирования. При определении оптимальной степени измельчения сырье измельчали до размера частиц 1, 3 и 5 мм. Экстракцию осуществляли 40% этиловым спиртом при соотношении сырья и экстрагента 1:10 и температуре 70 °С (таблица 27).

Таблица 27 – Результаты определения содержания флавоноидов и монотерпеновых гликозидов в зависимости от степени измельчения сырья (n=5)

Степень измельчения сырья, мм	Содержание, %		Степень истощения сырья, %	
	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды
1	1,86±0,04	3,70±0,12	59,12±1,46	63,40±2,87
3	1,59±0,07	3,37±0,15	50,36±2,55	57,84±1,64
5	1,12±0,03	2,52±0,09	35,47±1,09	43,23±1,29

На основании экспериментальных данных выбрана степень измельчения сырья 3 мм, которая обеспечивает высокий выход флавоноидов и монотерпеновых гликозидов. Уменьшение размера частиц до 1 мм приводит к увеличению выхода балластных веществ и затруднению процесса фильтрования, поскольку увеличивается вязкость извлечения за счет большого количества взвешенных частиц, а при измельчении сырья до 5 мм снижается выход БАВ.

4.1.5. Определение времени наступления равновесной концентрации

При определении времени наступления равновесной концентрации экстракцию осуществляли с учетом выбранных ранее условий. Концентрацию флавоноидов определяли через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минут. Результаты исследования времени наступления равновесной концентрации флавоноидов при экстрагировании из травы пиона садовых сортов представлены на рисунке 16.

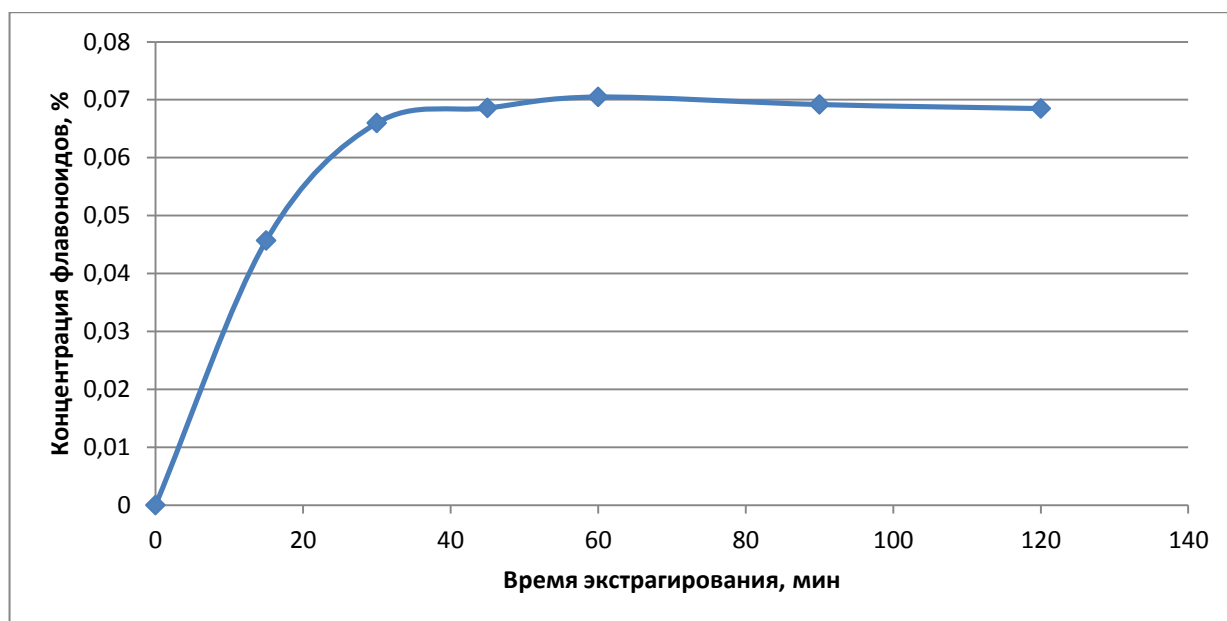


Рисунок 16 – Результаты определения времени наступления равновесной концентрации флавоноидов

Экспериментальные данные, представленные на рисунке 16, свидетельствуют о том, что равновесная концентрация устанавливается через 30 минут от начала экстрагирования. Более продолжительная экстракция не рациональна, так как увеличение времени экстракции свыше 30 минут не приводит к значительному повышению выхода БАВ из травы пиона садовых сортов.

4.1.6. Определение кратности экстракции

С целью максимального извлечения БАВ из травы пиона садовых сортов и обеспечения рационального использования растительного сырья проводилось определение количества ступеней экстракции. Для этого проводили трехкратную экстракцию по 30 минут с соблюдением разработанных ранее условий. Экспериментальные данные представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты исследования влияния кратности экстракции на выход БАВ из травы пиона садовых сортов (n=5)

Степень экстракции	Концентрация, %		Степень истощения сырья, %	
	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды	флавоноиды	монотерпеновые гликозиды
1	2,13±0,03	4,03±0,15	67,68±1,51	69,13±2,57
2	0,82±0,02	1,46±0,13	25,96±1,16	25,04±2,23
3	0,15±0,01	0,29±0,09	4,90±0,24	4,97±1,54
Итого:			98,54	99,14

Как видно из таблицы, трехкратная экстракция обеспечивает максимальный выход флавоноидов и монотерпеновых гликозидов из травы пиона садовых сортов.

В результате проведенных исследований установлены оптимальные условия экстрагирования травы пиона садовых сортов:

- экстрагент – спирт этиловый 40%;
- степень измельчения сырья – 3мм;
- соотношение сырья и экстрагента 1:10;
- температурный режим экстракции – 70 °С;
- кратность экстракции – трехкратная экстракция по 30 минут.

Таким образом, выбранные оптимальные параметры экстрагирования травы пиона садовых сортов позволяют извлечь 98,54% суммы флавоноидов в пересчете на рутин и 99,14% суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин от общего содержания в сырье [34].

4.2. Технологическая схема получения «Пионифит» экстракта сухого

Технологическая схема «Пионифит» экстракта сухого отработана на промышленном оборудовании ОАО «Биохиммаш» г. Москва (акт апробации от 14.12.2016).

Основные стадии технологического процесса:

ВР 1. Подготовка персонала и оборудования к работе.

ВР 2. Подготовка сырья и экстрагента.

ТП 3. Получение готового продукта.

УМО 4. Фасовка, упаковка, маркировка пиона садового экстракта сухого.

ВР 2. Подготовка сырья и экстрагента

Растительное сырье – трава пиона садовых сортов, представляющая собой смесь стеблей, листьев, цветков и бутонов измельчали на мельнице для размола сухих проб. С помощью просеивающей машины, оснащенной виброситами, получали 1,50 кг сырья с размером частиц 3 мм.

Измельченное сырье подавали на следующую стадию технологического процесса.

В емкость заливали 22,14 л спирта этилового 95% (плотность 0,8042 г/см³) и 30,42 л воды очищенной. Получали 51 л спирта этилового 40% плотностью 0,935 г/см³, который использовали для экстракции травы пиона садовых сортов.

ТП 3. Получение готового продукта

ТП 3.1. Экстракция сырья

Экстрагирование сырья проводили в реакторе объемом 75 л, оснащенном якорной мешалкой, паровой рубашкой для подогрева, перемешивающим устройством и термопарой. 1,5 кг измельченного сырья загружали в реактор, заливали 21 л 40% спирта, соблюдая соотношение сырье – экстрагент 1:10 (с учетом коэффициента спиртопоглощения). Экстракцию осуществляли при постоянном перемешивании при температуре 70±5 °С в течение 30 минут. Первое извлечение сливали и передавали на следующую стадию.

Шрот заливали 15 л спирта этилового 40%, нагревали до температуры $70\pm 5^{\circ}\text{C}$ и выдерживали при перемешивании в течение 30 минут. Второе извлечение в объеме 15 л сливали.

Шрот заливали 15 л спирта этилового 40% и осуществляли экстракцию аналогичным способом. Третье извлечение в объеме 15 л сливали.

Полученный объединенный экстракт (жидкость зеленовато-бурого цвета) передавали на стадию ТП 3.2.

ТП. 3.2. Фильтрация экстракта

Объединенное водно-спиртовое извлечение фильтровали на друк-филтре объемом 50 л при пониженном давлении. Жидкий экстракт в объеме 45 л передавали на стадию ТП. 3.3.

ТП. 3.3. Концентрирование экстракта

Концентрирование жидкого экстракта осуществляли на вакуум выпарной установке УВВ-50 при температуре $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ и давлении 0,01 МПа. Концентрированный жидкий экстракт в объеме 15,8 л (плотность $0,995\text{ г/см}^3$) передавали на стадию ТП 3.4.

ТП 3.4. Высушивание концентрированного экстракта

Концентрированный экстракт сушили на распылительной сушилке РС-20. Режим работы: температура теплоносителя на выходе $50 - 100^{\circ}\text{C}$, давление сжатого воздуха 0,4 МПа, производительность по испаренной влаге 20 кг/ч.

В результате получен экстракт сухой в количестве 0,69 кг. Выход составил 45,9 % от массы абсолютно сухого сырья.

УМО 4.1. Контроль качества

Готовый продукт: «Пионифит» экстракт сухой представляет собой аморфный порошок зеленовато-бурого цвета со специфическим запахом, горьковатого вкуса. Гигроскопичен. Растворим в спиртовых растворах (40% – 70%), легко растворим в воде. Потеря в массе при высушивании – $4,59\pm 0,49\%$.

УМО 4.2. Фасовка, УМО 4.3. Упаковка и маркировка

Полученный продукт («Пионифит» экстракт сухой) расфасовывают и упаковывают в соответствии с ГОСТ 17768-90 в банку из стекломассы с винтовой

горловиной и навинчиваемой пластмассовой крышкой или термосвариваемый полиэтиленовый пакет.

Схема получения «Пионифит» экстракта сухого представлена на рисунке 17.

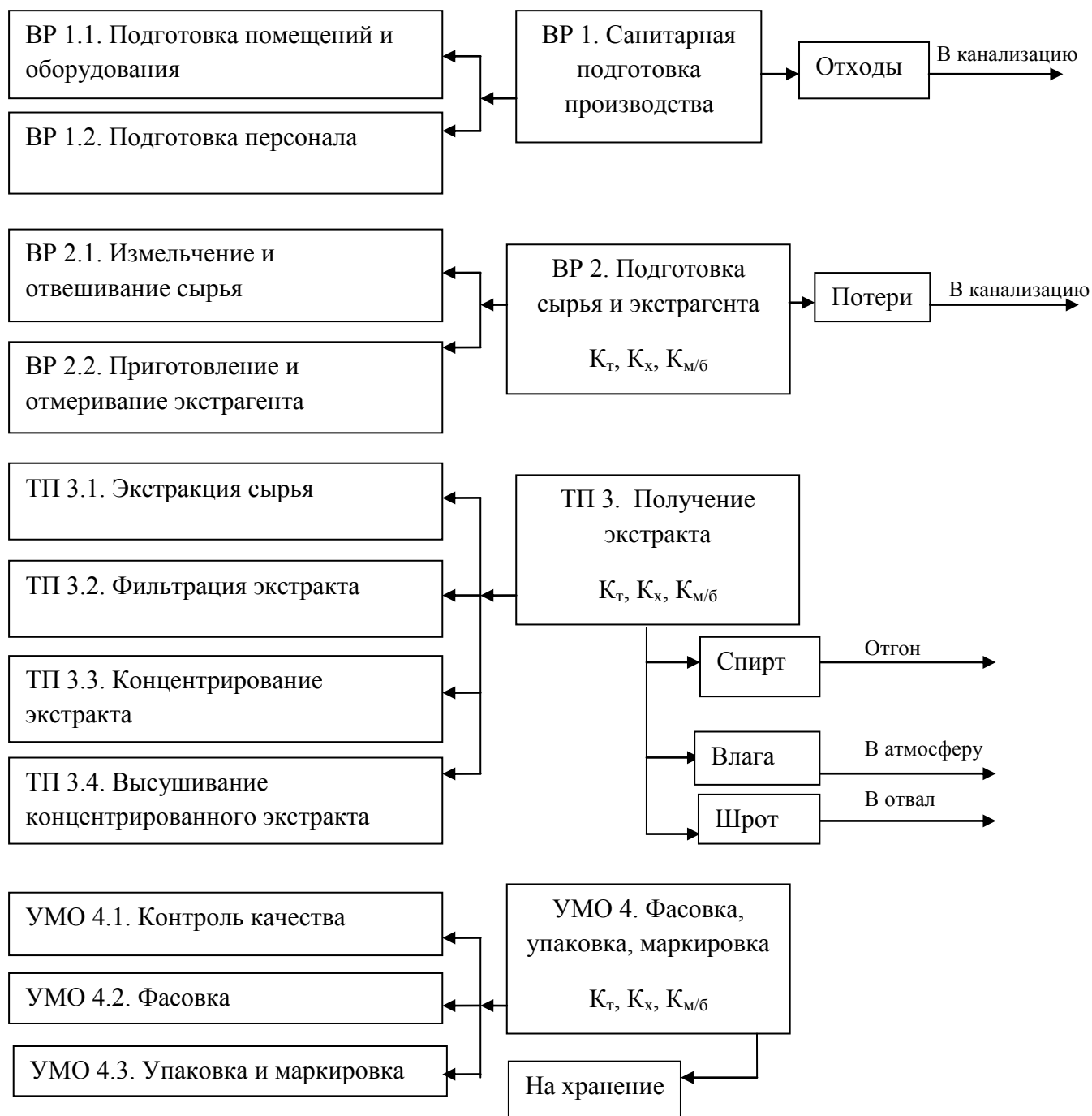


Рисунок 17 – Технологическая схема получения «Пионифит» экстракта сухого (К_т – контроль технологический, К_х – контроль химический, К_{м/б} – контроль микробиологический).

4.3. Стандартизация «Пионифит» экстракта сухого

С целью внедрения «Пионифит» экстракта сухого в медицинскую практику и обеспечения качества готового продукта проведена его стандартизация, которую осуществляли на нескольких сериях экстракта по показателям: подлинность, содержание основных групп БАВ, потеря в массе при высушивании, растворимость, насыпной объем, тяжелые металлы, микробиологическая чистота.

Для подтверждения подлинности «Пионифит» экстракта сухого предложены методики качественных реакций на монотерпеновые гликозиды и флавоноиды и метод тонкослойной хроматографии определения флавоноидов.

Для установления количественного содержания БАВ в экстракте сухом предложены методики количественного определения суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин, суммы флавоноидов в пересчете на рутин, а также методика количественного определения пеонифлорина.

4.3.1. Определение качественного состава «Пионифит» экстракта сухого

4.3.1.1. Определение БАВ в «Пионифит» экстракте сухом с использованием качественных реакций

Для изучения химического состава полученного экстракта пиона проведен качественный анализ на содержание основных групп БАВ. В качестве объектов исследования использовали 5 серий экстракта, полученных в лабораторных условиях. Предварительно 0,05 г экстракта растворяли в 10 мл воды очищенной. Подтверждали присутствие флавоноидов и монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом с помощью качественных реакций, приведенных в главе 2. Все серии экстракта давали характерные эффекты реакций, указанные в таблице 29.

**Таблица 29 – Результаты качественного анализа «Пионифит»
экстракта сухого (n=5)**

Монотерпеновые гликозиды			
Реактив Трим-Хилла	Реактив Штала	Реактив Бекон-Эдельмана	Гидроксамовая реакция
сине-голубое окрашивание	сине-голубое окрашивание	коричневое окрашивание	коричневое окрашивание
Флавоноиды			
Проба Синода	Раствор железа (III) хлорида	Раствор алюминия хлорида	
розовое окрашивание	зеленое окрашивание	ярко-желтое окрашивание	

4.3.1.2. Хроматография в тонком слое

Для идентификации флавоноидов предложен метод тонкослойной хроматографии по методике, приведенной в главе 2.

Предварительная пробоподготовка объекта заключалась в растворении навески (0,05 г) «Пионифит» экстракта сухого в воде очищенной (10 мл). Параллельно проводили хроматографирование спиртовых извлечений из травы пиона садовых сортов на 70% этаноле. В качестве свидетелей (метчиков) использовали СО рутина и кверцетина. По 30 мкл раствора экстракта сухого и спиртового извлечения из травы пиона садовых сортов и по 10 мкл спиртовых растворов стандартов наносили микропипеткой на линию старта хроматографической пластинки. Пластинку с нанесенными пробами помещали в камеру со смесью растворителей и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителей проходил 10 см, пластинку вынимали из камеры, сушили, обрабатывали 1 % спиртовым раствором алюминия хлорида.

В исследованиях применяли хроматографические системы, использующиеся при анализе флавоноидов:

1. толуол – этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:20:5:2);
2. хлороформ – метанол – вода (26:14:3);

3. этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12);
4. хлороформ – этанол 95 % (14:7) – модифицированная система № 2, то есть метанол и вода заменены на этанол 95% [30].

На хроматограммах, в системах растворителей № 1 (толуол – этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:20:5:2)) и № 2 (хлороформ – метанол – вода (26:14:3)) не наблюдали эффективного разделения компонентов смеси. Наиболее оптимальными хроматографическими системами являлись: № 4 (хлороформ – этанол 95 % (14:7)) и № 3 (этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12)).

В системе растворителей состава **хлороформ – этанол 95 % (14:7)** на хроматограмме для раствора «Пионифит» экстракта сухого отмечали наличие 4 пятен, имеющих желтое окрашивание. На стадии детектирования обнаружено: при просматривании пластин в УФ-свете пятно № 1 с величиной R_f в среднем 0,22 см имело темно-оранжевое окрашивание, после обработки 1 % спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдалась яркая темно-желтая флуоресценция, что характерно для флавонол-3-гликозидов, флавонов или их гликозидов; данные эффекты детектирования и величина R_f соответствуют показателям СО рутина. Пятно № 3 с величиной R_f в среднем 0,80 см при облучении УФ-светом имело желто-зеленое окрашивание, которое после нанесения 1 % спиртового раствора алюминия хлорида переходило в яркую желто-зеленую флуоресценцию; данные эффекты детектирования и величина R_f аналогичны показателям СО кверцетина (таблица 30, рисунок 18).

**Таблица 30 – Хроматографические параметры флавоноидов
«Пионифит» экстракта сухого в системе хлороформ – этанол 95 % (14:7)**

№ пят-на	Величина Rf, см	Окраска пятна в видимом свете	Окраска пятна в УФ-свете (254 нм)	Флуоресценция после обработки 1 % спиртовым раствором алюминия хлорида
Спиртовое извлечение из травы пиона садовых сортов				
1	0,25±0,03	бледно-желтая	темно-оранжевая	темно-желтая
2	0,67±0,03	желтая	коричнево-оранжевая	ярко-желтая
3	0,80±0,03	желтая	желто-зеленая	ярко желто-зеленая
4	0,93±0,03	желтая	розовая	розовая
Раствор «Пионифит» экстракта сухого водный				
1	0,22±0,03	бледно-желтая	темно-оранжевая	темно-желтая
2	0,66±0,03	желтая	коричневая	ярко-желтая
3	0,80±0,03	желтая	желто-зеленая	ярко желто-зеленая
4	0,90±0,03	желтая	розовая	розовая
СО кверцетина				
	0,83±0,03	желтая	желто-зеленая	ярко желто-зеленая
СО рутина				
	0,20±0,03	бледно-желтая	темно-оранжевая	темно-желтая

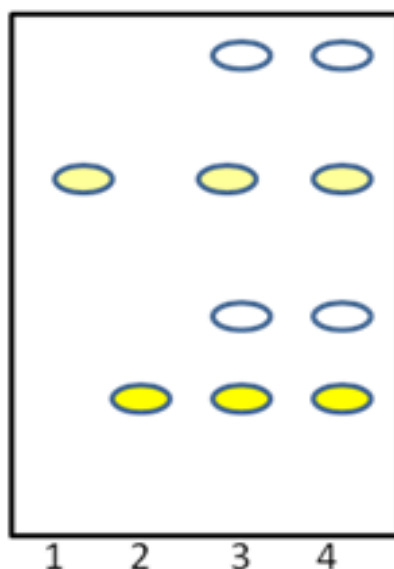


Рисунок 18 – Сводная хроматограмма в системе хлороформ– этанол 95 % (14:7): 1 – СО кверцетина; 2 – СО рутина; 3 – водный раствор «Пионифит» экстракта сухого; 4 – спиртовое извлечение из травы пиона садовых сортов

На хроматограмме в системе растворителей **этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12)** отмечали наличие 5 пятен, окрашенных от бледно-желтого до желтого цвета. При детекции установлено: пятно № 1 с величиной R_f в среднем 0,22 см соответствует параметрам идентификации СО рутина, а пятно № 4 с величиной R_f в среднем 0,88 см – параметрам идентификации СО кверцетина (таблица 31, рисунок 19).

**Таблица 31 – Хроматографические параметры флавоноидов
«Пионифит» экстракта сухого в системе этилацетат – безводная муравьиная
кислота – вода (80:8:12)**

№ пятна	Величина Rf, см	Окраска пятна в видимом свете	Окраска пятна в УФ-свете (254 нм)	Флуоресценция после обработки 1 % спиртовым раствором алюминия хлорида
Спиртовое извлечение из травы пиона садовых сортов				
1	0,20±0,03	бледно-желтая	желтая	ярко-желтая
2	0,79±0,03	бледно-желтая	бледно-желтая	бледно-желтая
3	0,83±0,03	бледно-желтая	бледно-желтая	бледно-желтая
4	0,87±0,03	желтая	желтая	оранжево-желтая
5	0,99±0,03	желтая	розовая	розовая
Раствор «Пионифит» экстракта сухого водный				
1	0,22±0,03	бледно-желтая	желтая	ярко-желтая
2	0,75±0,03	бледно-желтая	бледно-желтая	бледно-желтая
3	0,80±0,03	бледно-желтая	бледно-желтая	бледно-желтая
4	0,88±0,03	желтая	желтая	оранжевая
5	0,97±0,03	желтая	розовая	розовая
СО кверцетина				
	0,91±0,03	желтая	желтая	ярко-желтая
СО рутина				
	0,27±0,03	бледно-желтая	оранжево-желтая	оранжевая

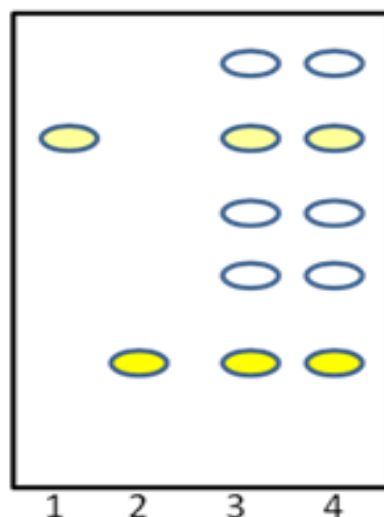


Рисунок 19 – Сводная хроматограмма в системе *этилацетат – безводная муравьиная кислота – вода (80:8:12)*: 1 – СО кверцетина; 2 – СО рутина; 3 – водный раствор «Пионифит» экстракта сухого; 4 – спиртовое извлечение из травы пиона садовых сортов

4.3.1.3. Исследование «Пионифит» экстракта сухого методом ГХ-МС

Пробоподготовка «Пионифит» экстракта сухого заключалась в растворении навески экстракта в 95% этаноле.

Результаты хроматографирования «Пионифит» экстракта сухого представлены на рисунке 20.

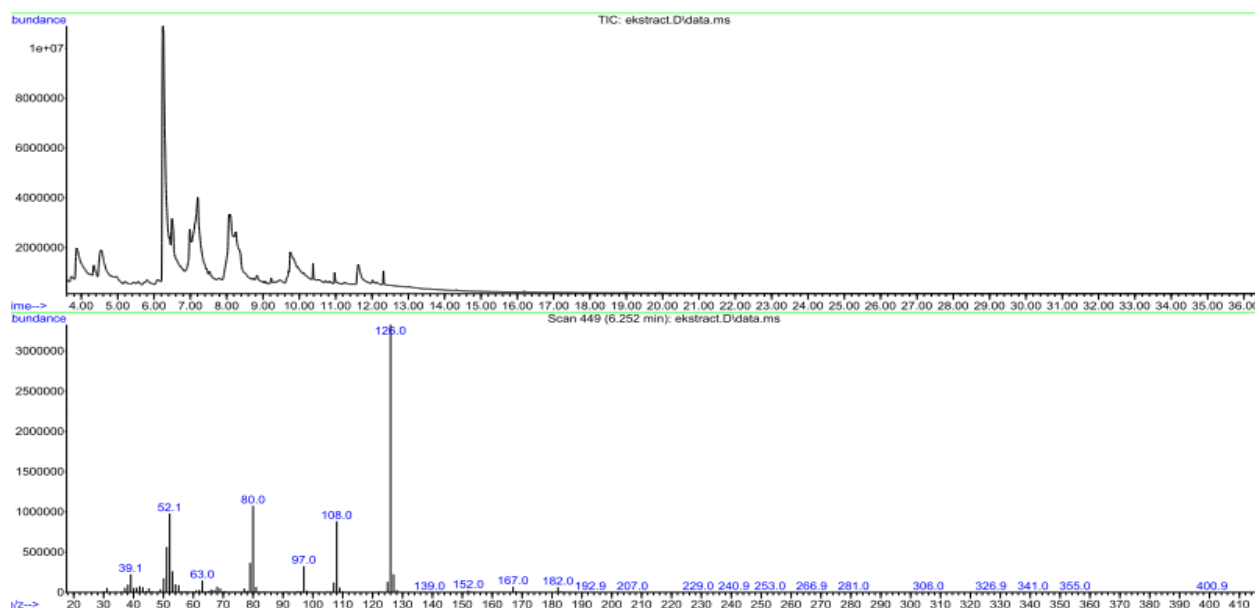


Рисунок 20 – Фрагмент хроматограммы «Пионифит» экстракта сухого (верхняя часть рисунка) и масс-спектр в пике со временем удерживания 6,25 мин (нижняя часть рисунка)

При исследовании хроматограммы «Пионифит» экстракта сухого установлено наличие интенсивного пика вещества 1,2,3-Benzenetriol (пирогаллол) со временем удерживания 6,25 мин [62].

Аналогично со спиртовым извлечением из травы пиона садовых сортов, в «Пионифит» экстракте сухом обнаружена бензойная кислота (время удерживания 4,54 мин) и фитол (время удерживания 10,38 мин)

4.3.2. Количественное определение БАВ в «Пионифит» экстракте сухом

Для установления количественного содержания БАВ в «Пионифит» экстракте сухом предложены методики количественного определения суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин и суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Разработка методик количественного определения в экстракте проводилась по принципу сквозной стандартизации на основе методики, разработанной для исходного лекарственного растительного сырья.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для количественного определения пеонифлорина, предложенный Японской фармакопеей XVI издания для стандартизации корней пиона молочноцветкового и адаптированный для травы пиона садовых сортов, применен для анализа «Пионифит» экстракта сухого с целью включения в нормативную документацию.

4.3.2.1. Определение содержания монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом

Методика количественного определения суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин в траве пиона садовых сортов модифицирована нами применительно к «Пионифит» экстракту сухому.

Методика: около 0,1 г (точная навеска) экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл воды очищенной, объем доводили водой очищенной до метки. 10 мл полученного раствора пропускали через стеклянную колонку диаметром 10 мм, заполненную 2 г алюминия оксида основного. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 5 мл элюата, добавляли 5 мл раствора гидроксиламина щелочного и оставляли на 20 минут. Через 20 минут прибавляли 10 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и 5 мл 1% раствора

железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр, смоченный водой.

Измерение оптической плотности (А) полученного раствора проводили на спектрофотометре Jenway Portlab 511 UV при длине волны 512 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 5 мл воды очищенной, 5 мл раствора гидроксилamina щелочного, 10 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и 5 мл 1% раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты.

Содержание суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин в экстракте пиона в % (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \times 25 \times 25 \times 100}{16,2 \times a \times 5 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A_x – оптическая плотность исследуемого раствора;

16,2 – удельный показатель поглощения продуктов реакции пеонифлорина с гидроксиламином и железа (III) хлоридом;

a – навеска экстракта пиона, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Для того чтобы аналитическая методика могла быть включена в нормативную документацию, она должна гарантировать достоверные и точные результаты. С этой целью осуществлялась валидация методики количественного определения монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом по следующим характеристикам: сходимость (прецизионность в условиях повторяемости), линейность.

Повторяемость (сходимость) методики определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени.

Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности $P = 95\%$, вычисленные значения величины

коэффициента вариации $S_{\bar{x}} = 1,19\%$ и относительной ошибки среднего результата $\bar{\varepsilon} = 3,05\%$ не превышают критериев приемлемости – 5%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (таблица 32).

Таблица 32 – Результаты оценки повторяемости методики количественного определения монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом

Повторность	Оптическая плотность	Содержание монотерпеновых гликозидов, %	Метрологические характеристики
1	0,176	13,25	$\bar{X} = 13,71\%$ $S = 0,3990$ $S_{\bar{x}} = 1,19$ $\bar{\varepsilon} = 3,05\%$
2	0,170	13,73	
3	0,179	14,19	
4	0,178	14,08	
5	0,164	13,24	
6	0,171	13,80	

Прецизионность аналитической методики также оценивалась по результатам трех определений для каждого из трех уровней определяемых величин, лежащих в аналитической области методики. Растворы с концентрацией суммы монотерпеновых гликозидов 80, 100 и 120% от принятого опорного значения готовили в соответствии с методикой путем изменения навески экстракта:

80% – навеска экстракта 0,08 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл;

100% – навеска экстракта 0,10 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл;

120% – навеска экстракта 0,12 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл.

Величина относительного стандартного отклонения среднего результата (коэффициент вариации, $S_{\bar{x}}$) составила 0,75%, что не превышает предельного значения критерия приемлемости (5%) при доверительной вероятности $P = 95\%$ (таблица 33).

Таблица 33 – Результаты оценки прецизионности методики количественного определения монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом

Уровень	Навеска экстракта	Оптическая плотность	Содержание монотерпеновых гликозидов, %	Метрологические характеристики
1/1	80%	0,130	13,23	$\bar{X} = 13,50\%$ $S = 0,247004$ $S_{\bar{x}} = 0,75\%$ $\bar{\varepsilon} = 1,44\%$
1/2		0,133	13,56	
1/3		0,135	13,59	
2/1	100%	0,170	13,74	
2/2		0,173	13,97	
2/3		0,164	13,26	
3/1	120%	0,200	13,49	
3/2		0,194	13,38	
3/3		0,168	13,27	

Линейность аналитической методики устанавливали на пяти уровнях концентраций 50 – 150%. Растворы готовили путем изменения навески «Пионифит» экстракта сухого. Оценку линейности проводили по графику зависимости сигнала как функции от количества определяемого компонента. Характеристики линейности методики количественного определения монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом приведены в таблице 34.

Таблица 34 – Результаты оценки линейности методики

Навеска, г	Оптическая плотность	Концентрация монотерпеновых гликозидов, мг/мл	Коэффициент корреляции	Y=bx+a	
				b	a
0,0513	0,106	0,3272	0,9972	0,3191	0,0022
0,0804	0,147	0,4536			
0,1017	0,188	0,5702			
0,1200	0,218	0,6920			
0,1504	0,268	0,8272			

В ходе определения линейности методики установлено, что график зависимости имеет линейный характер в области концентрации суммы монотерпеновых гликозидов 0,3272 – 0,8272 мг/мл и описывается уравнением $y = 0,3191x + 0,0022$. Величина коэффициента корреляции лежит в пределах $0,99 \leq R^2 \leq 1,0$. Полученные данные свидетельствуют о линейной зависимости оптической плотности от концентрации монотерпеновых гликозидов (рисунок 21).

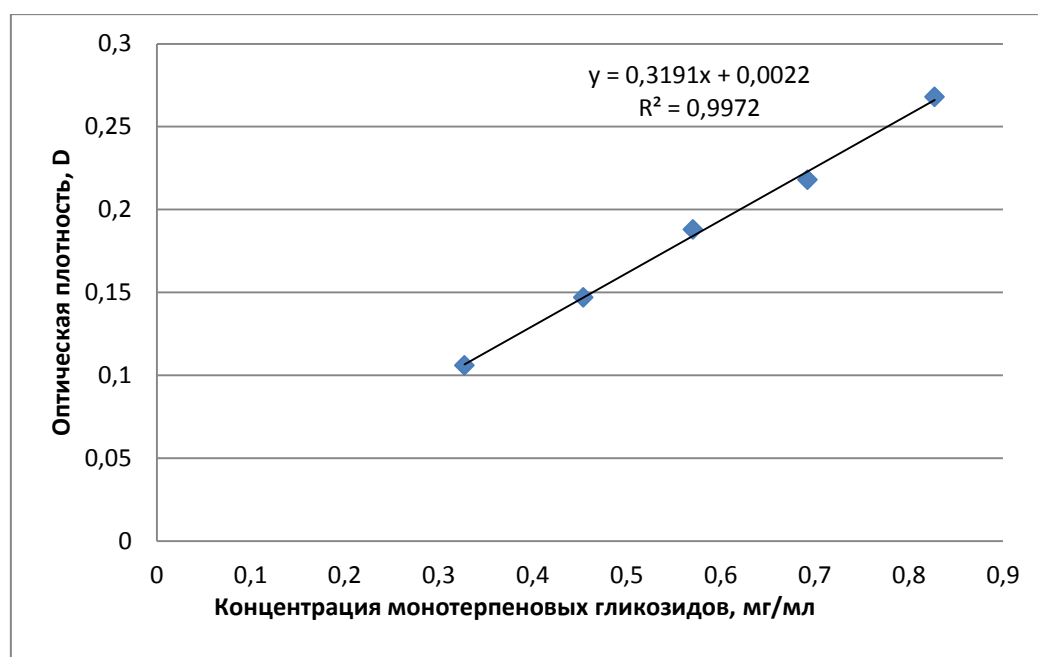


Рисунок 21 – График линейной зависимости оптической плотности от навески «Пионифит» экстракта сухого

В ходе исследований установлено, что предлагаемая методика спектрофотометрического определения суммы монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом отличается сходимостью (прецизионностью в условиях повторяемости) и линейностью.

По данной методике количественного определения монотерпеновых гликозидов проведен анализ 5 серий «Пионифит» экстракта сухого (таблица 35).

**Таблица 35 – Результаты количественного определения
монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом (n=5)**

№ серии	Содержание суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин, %
1	13,71±0,42
2	12,31±0,62
3	12,18±0,61
4	13,30±0,39
5	13,38±0,49

Установлено, что количество монотерпеновых гликозидов в «Пионифит» экстракте сухом составляет в среднем 12,98±0,49 %.

Согласно приведенной метрологической характеристике методики относительная ошибка среднего результата составляет 3,78% (таблица 36), что говорит о достоверности результатов исследований.

**Таблица 36 – Метрологические характеристики результатов
количественного определения монотерпеновых гликозидов в «Пионифит»
экстракте сухом (n = 5, P = 95%)**

f	$\bar{X}$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$S_{\bar{X}}, \%$	T(P,t)	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\varepsilon, \%$	$\bar{\varepsilon}, \%$
4	12,98	0,47105	0,68633	0,30694	2,36	2,78	1,90800	0,49104	8,46	3,78

4.3.2.2. Количественное определение флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом

В связи с тем, что флавоноиды являются действующими веществами экстракта пиона садовых сортов и обеспечивают его фармакологические эффекты, существует необходимость стандартизации экстракта по содержанию данной группы БАВ. Для количественного определения суммы флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом выбран спектрофотометрический метод, основанный на определении продуктов реакции комплексообразования с

алюминия хлоридом. За основу взяли методику количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве пиона садовых сортов [73].

Для усовершенствования методики количественного определения осуществлен выбор растворителя для «Пионифит» экстракта сухого. Установлено, что оптимальным растворителем является вода очищенная. При использовании воды очищенной выход флавоноидов составил $5,93 \pm 0,25\%$, тогда как при использовании спирта этилового 40% выход составил $5,23 \pm 0,18\%$, спирта этилового 70% – $5,39 \pm 0,27\%$, спирта этилового 95% – $5,20 \pm 0,17\%$.

Методика: около 0,1 г (точная навеска) экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл воды очищенной, объем доводили водой очищенной до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и 1 каплю уксусной кислоты разведенной 30%, перемешивали. Объем раствора доводили до метки 95% этанолом. Через 40 минут измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А и 1 капли уксусной кислоты разведенной 30%, доведенный до метки 95% этанолом в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_x \times a_0 \times 25 \times 100}{A_0 \times a_x \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО рутин;

a_x – масса экстракта пиона, г;

a_0 – масса СО рутин, г;

W – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Валидацию методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в «Пионифит» экстракте сухом проводили по показателям: специфичность, прецизионность в условиях повторяемости (сходимость),

воспроизводимость (внутрилабораторная прецизионность), линейность, правильность.

Специфичность методики определяли путем сравнения спектров раствора «Пионифит» экстракта сухого со спектром стандартного образца рутина после проведения реакции с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида. Регистрацию спектров проводили в диапазоне длин волн от 390 до 440 нм (рисунок 22). Согласно полученным результатам максимумы поглощения флавоноидов «Пионифит» экстракта сухого и раствора СО рутина совпадают и находятся при аналитической длине волны 405 нм. Данные свидетельствуют о том, что сопутствующие вещества, содержащиеся в экстракте, не искажают результат, что подтверждает специфичность методики.

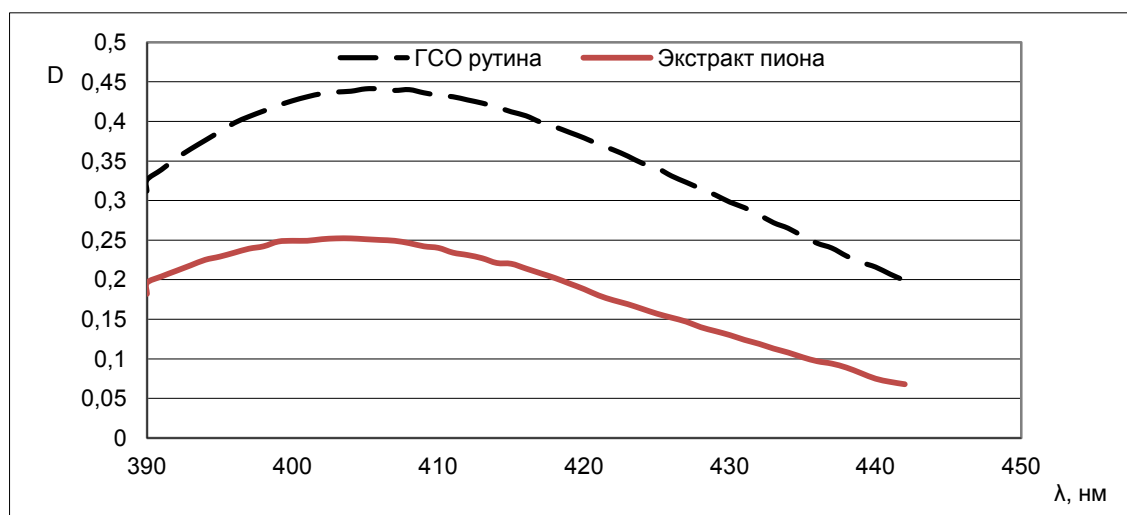


Рисунок 22 – Спектры поглощения комплекса раствора СО рутина и комплекса флавоноидов «Пионифит» экстракта сухого с раствором алюминия хлорида

Для установления прецизионности методики изучали повторяемость, которая характеризует степень совпадения результатов индивидуальных испытаний при многократном использовании. Проводили 6 параллельных определений в условиях одной лаборатории.

Результаты, полученные при проведении 6 параллельных определений в условиях одной лаборатории, представлены в таблицах 37 и 38. Вычисленные значения коэффициента вариации $S_{\bar{g}}$ составили 0,84% и 0,99%; относительной

ошибки среднего результата $\bar{\varepsilon}$ – 2,15% и 2,55%, что не превышает критериев приемлемости $\pm 5\%$. Данные свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 37 – Результаты оценки сходимости методики количественного определения флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом

№ анализа	Аналитик № 1		Аналитик №2	
	Оптическая плотность	Концентрация флавоноидов, %	Оптическая плотность	Концентрация флавоноидов, %
1	0,210	5,75	0,241	5,78
2	0,237	5,62	0,227	5,92
3	0,212	5,91	0,216	5,72
4	0,238	5,61	0,224	5,95
5	0,240	5,68	0,212	5,65
6	0,203	5,62	0,245	6,01

Таблица 38 – Метрологические характеристики (n = 6, P = 95%)

Аналитик	f	$\bar{X}$	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	$S_{\bar{\delta}}, \%$	T(P,t)	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	$S_{\bar{\delta}}, \%$ метода
№1	5	5,69	0,0137	0,1169	0,0477	0,84	2,57	0,3004	2,15	1,30
№2	5	5,84	0,0203	0,1425	0,0582	0,99	2,57	0,1495	2,55	

Проведение испытаний в условиях одной лаборатории разными исполнителями при использовании разного оборудования (спектрофотометр Jenway Portlab 511 UV и спектрофотометр UV-1800 Shimadzu) позволило установить внутрилабораторную прецизионность (таблица 37, 38). Результаты, полученные после статистической обработки данных, ($S_{\bar{\delta}} = 1,30\%$ не превышает 10%), свидетельствуют о прецизионности методики в условиях воспроизводимости.

Прецизионность методики также оценивали на трех разных уровнях. Количественное определение проводили в растворах с содержанием суммы флавоноидов пределах 80 – 120% от номинального содержания в экстракте, что

достигалось в результате варьирования навесок экстракта. Определение проводилось в трех повторностях для каждой концентрации. Установлено, что величина относительного стандартного отклонения среднего результата (коэффициент вариации, $S_{\bar{x}}$) составила 1,18%, что не превышает предельного значения критерия приемлемости (5%) при доверительной вероятности $P=95\%$ (таблица 39).

Таблица 39 – Результаты оценки прецизионности методики количественного определения флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом

Уровень	№ анализа	Оптическая плотность	Содержание флавоноидов, %	Метрологические характеристики
80%	1/1	0,072	5,62	$\bar{X} = 5,62\%$ $S = 0,19827$ $S_{\bar{x}} = 1,18\%$ $\bar{\varepsilon} = 2,72\%$
	1/2	0,067	5,33	
	1/3	0,066	5,66	
100%	2/1	0,085	5,94	
	2/2	0,080	5,45	
	2/3	0,081	5,59	
120%	3/1	0,105	5,80	
	3/2	0,097	5,77	
	3/3	0,111	5,44	

Линейность методики устанавливали по результатам определения количественного содержания флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом на пяти уровнях концентраций 50-150%, полученных путем изменения навески экстракта:

- 1 уровень: навеска экстракта 0,05 г (т.н.) – объем раствора 25 мл (50%);
- 2 уровень: навеска экстракта 0,08 г (т.н.) – объем раствора 25 мл (80%);
- 3 уровень: навеска экстракта 0,10 г (т.н.) – объем раствора 25 мл (100%);
- 4 уровень: навеска экстракта 0,12 г (т.н.) – объем раствора 25 мл (120%);
- 5 уровень: навеска экстракта 0,15 г (т.н.) – объем раствора 25 мл (150%).

Установлено, что график зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов имеет линейный характер и описывается уравнением $y = 0,8816x + 0,0352$. Значение коэффициента корреляции составляет 0,9980, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне (рисунок 23).

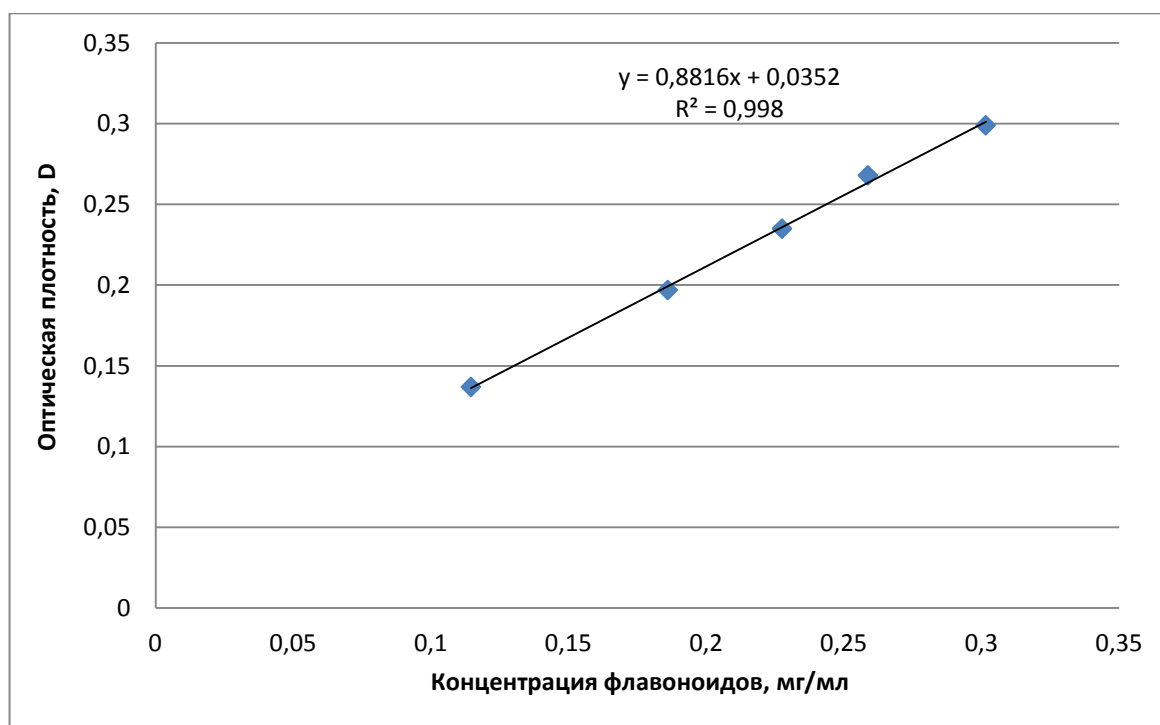


Рисунок 23 – График линейной зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов

Правильность методики устанавливали методом добавок. Определение проводили в растворах, полученных путем добавления известного количества СО рутина к образцам на трех уровнях концентраций. Критерием приемлемости правильности методики является средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, средняя величина которого должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$. В данной методике процент восстановления находился в пределах от 95,32 до 97,77% и его средняя величина составила – 96,40%, что свидетельствует о правильности разработанной методики (таблица 40).

Таблица 40 – Результаты оценки правильности методики

Содержание флавоноидов, мг	Добавлено СО рутин, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Открываемость, %	Средний процент восстановления, %
4,440	1,490	5,930	5,701	96,13	96,46
4,511	1,490	6,001	5,747	95,76	
4,396	1,490	5,886	5,652	96,02	
2,880	2,980	5,860	5,683	96,98	
2,871	2,980	5,851	5,708	97,55	
2,920	2,980	5,900	5,657	95,88	
1,483	4,470	5,953	5,815	97,69	
1,290	4,470	5,760	5,497	95,43	
1,283	4,470	5,753	5,561	96,67	

В ходе исследований подтверждены валидационные характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в «Пионифит» экстракте сухом: специфичность, сходимость, внутрилабораторная прецизионность, линейность и правильность.

Результаты анализа 5 серий «Пионифит» экстракта сухого согласно приведенной методике представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Результаты количественного определения флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом (n=6)

№ серии	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
1	5,60±0,28
2	5,83±0,31
3	5,69±0,23
4	5,78±0,20
5	5,27±0,18

Таким образом, содержание флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом составляет $5,63 \pm 0,28\%$. Согласно приведенной метрологической характеристике методики относительная ошибка среднего результата составляет 4,89% (таблица 42), что говорит о достоверности полученных результатов [80].

**Таблица 42 – Метрологические характеристики результатов
количественного определения флавоноидов в «Пионифит»
экстракте сухом (n = 5, P = 95%)**

f	$\bar{X}$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$S_{\bar{X}}, \%$	T(P,t)	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\varepsilon, \%$	$\bar{\varepsilon}, \%$
4	5,63	0,04915	0,22170	0,09915	1,76	2,78	0,61633	0,27563	10,95	4,89

4.3.2.3. Анализ пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом методом ВЭЖХ

С целью идентификации и количественного определения индивидуального монотерпенового гликозида – пеонифлорина – в «Пионифит» экстракте сухом использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, по методике, разработанной для травы пиона садовых сортов.

Методика. Около 0,25 г (точная навеска) экстракта сухого растворяли в метаноле в мерной колбе вместимостью 25 мл. Стандартный раствор: 5,0 мг стандартного образца пеонифлорина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяли в метаноле.

Условия хроматографирования:

- подвижная фаза: элюент А – фосфатный буфер (рН 3), элюент Б – ацетонитрил;
- режим элюирования: изократический, с 18 мин – градиентный (с целью вымывания сильноудерживаемых компонентов)
- скорость потока элюирования: 1 мл/мин;
- температура термостата колонки: 25 °С;
- объем вводимой пробы: 10 мкл;
- длина волны детектирования 231 ± 1 нм.

Валидация методики количественного определения пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом методом ВЭЖХ проводилась по показателям: специфичность, линейность, прецизионность в условиях повторяемости (сходимость), правильность.

Для оценки специфичности проанализированы стандартный раствор пеонифлорина и раствор «Пионифит» экстракта сухого. Установлено, что время удерживания вещества на хроматограмме раствора экстракта составляет $15,8 \pm 0,05$ мин и совпадает со временем удерживания пика пеонифлорина на хроматограмме стандартного раствора (рисунок 24). При хроматографировании растворителя на хроматограмме не наблюдалось пиков, мешающих определению пеонифлорина.

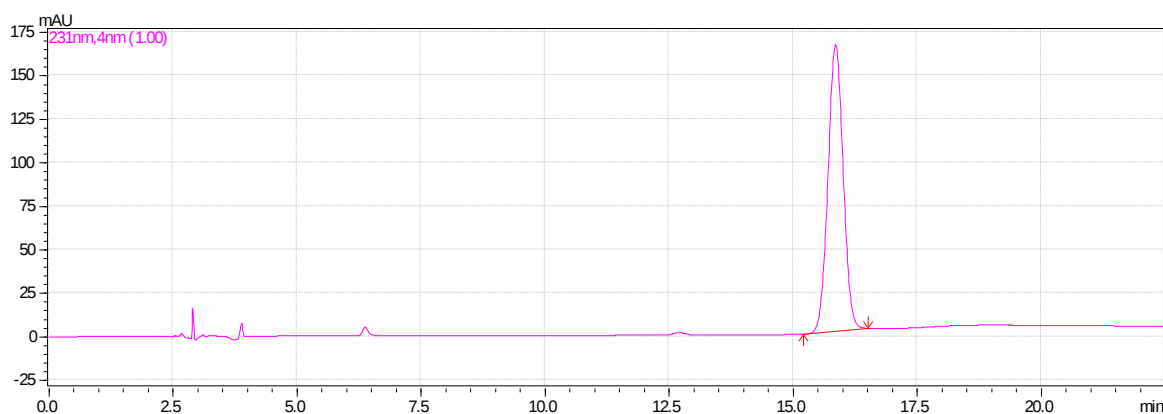
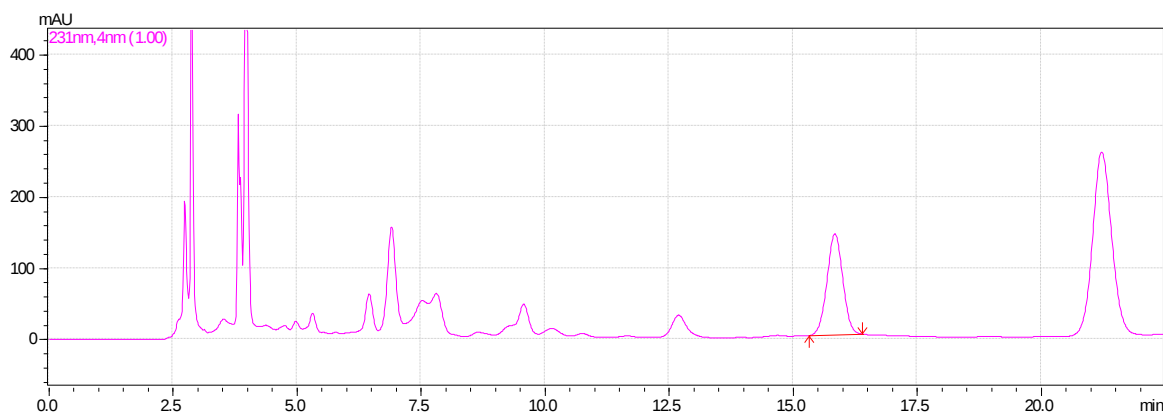
**а****б**

Рисунок 24 – Хроматограммы раствора стандартного образца пеонифлорина (а) и испытуемого раствора «Пионифит» экстракта сухого (б)

Сходимость результатов количественного определения (прецизионность в условиях повторяемости) устанавливали по результатам анализа шести отдельно подготовленных проб однородного «Пионифит» экстракта сухого (таблица 43). Рассчитанное значение относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 1%, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов.

Таблица 43 – Оценка сходимости методики количественного определения пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом

Повторность	Концентрация пеонифлорина, %	Метрологические характеристики (n=6, P=95%)
1	1,52	$\bar{x} = 1,512$ SD = 0,013 RSD = 0,86
2	1,51	
3	1,51	
4	1,49	
5	1,51	
6	1,53	

Для оценки линейности разработанной методики проводили анализ растворов «Пионифит» экстракта сухого с содержанием пеонифлорина на уровне 50 – 150% от установленного номинального содержания вещества в экстракте, принятого за 100%. Растворы экстракта с необходимой концентрацией пеонифлорина готовили путем варьирования навесок экстракта:

50% – навеска экстракта 0,125 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл;
80% – навеска экстракта 0,200 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл;
100% – навеска экстракта 0,250 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл;
120% – навеска экстракта 0,300 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл;
150% – навеска экстракта 0,375 г (точная навеска) – объем раствора 25 мл.

На рисунке 25 представлен график зависимости площади пика пеонифлорина от его концентрации. График имеет линейную зависимость и характеризуется уравнением $S = 21431 \times C$, где S – площадь хроматографического пика пеонифлорина, C – концентрация пеонифлорина. Коэффициент корреляции

R^2 составляет 0,9977, что указывает на линейность методики в выбранном диапазоне.

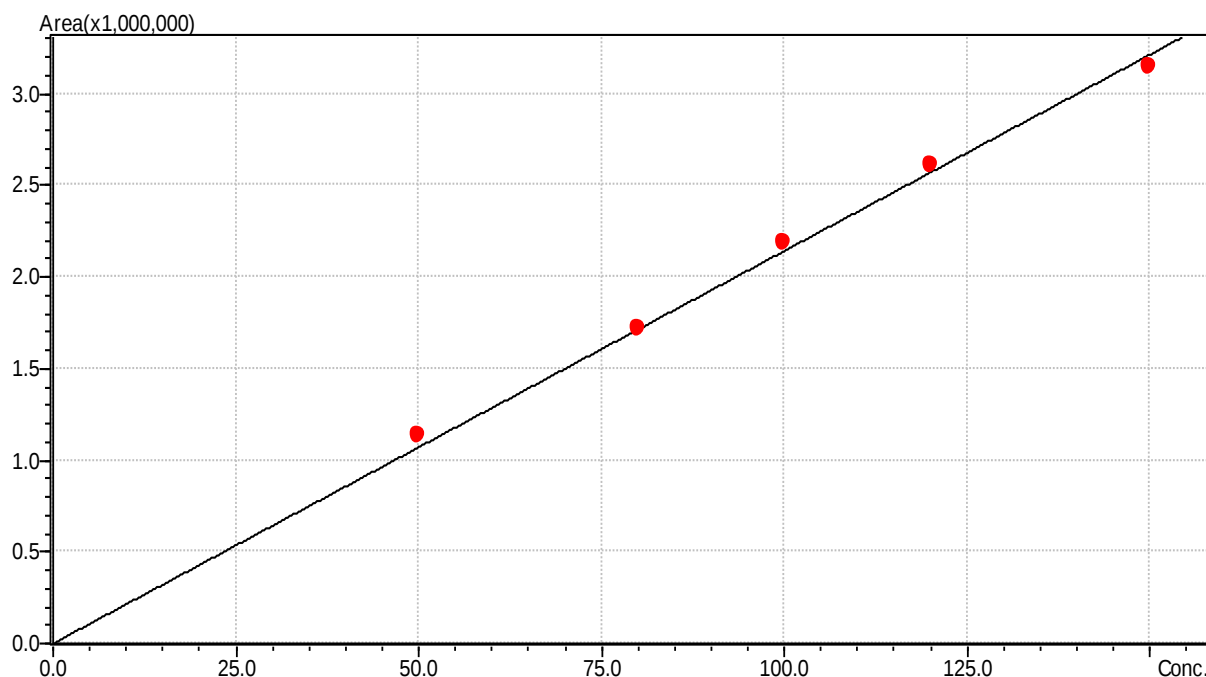


Рисунок 25 – Калибровочный график методики количественного определения пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом

Для установления правильности методики количественного определения пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом использовали метод добавок. Модельные растворы готовили путем добавления к раствору экстракта с известным содержанием пеонифлорина определенных объемов раствора стандартного образца пеонифлорина до получения концентраций 80, 100, 120% от номинальной концентрации.

Концентрированный раствор экстракта: навеску экстракта 0,62 г помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в метаноле, и раствор доводили метанолом до метки (раствор А с концентрацией пеонифлорина 0,372 мкг/мл).

Раствор стандартного образца пеонифлорина: 18,70 мг пеонифлорина помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в метаноле и доводили метанолом до метки.

Модельные растворы:

80% – 5 мл раствора А, 3 мл раствора СО пеонифлорина – объем раствора 25 мл;

100% – 5 мл раствора А, 5 мл раствора СО пеонифлорина – объем раствора 25 мл;

120% – 5 мл раствора А, 7 мл раствора СО пеонифлорина – объем раствора 25 мл.

Результаты анализа модельных растворов представлены в таблице 44.

Таблица 44 – Оценка правильности методики количественного определения пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом

Кон-цен-тра-ция	Исходное содержание пеонифлорина, мг	Добавлено СО пеонифлорина, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Откры-ваемость, %	Средний процент восстановления, %
80%	1,860	1,122	2,982	3,003	100,69	$\bar{x} = 100,59$ $SD = 2,40$ $\Delta \bar{x} = 1,85$
	1,860	1,122	2,982	3,019	101,25	
	1,860	1,122	2,982	2,957	99,17	
100%	1,860	1,870	3,730	3,661	98,15	
	1,860	1,870	3,730	3,870	103,76	
	1,860	1,870	3,730	3,593	96,34	
120%	1,860	2,618	4,478	4,633	103,46	
	1,860	2,618	4,478	4,555	101,71	
	1,860	2,618	4,478	4,511	100,74	

Истинное содержание пеонифлорина в приготовленных модельных растворах лежит внутри доверительных интервалов средних результатов, полученных в ходе эксперимента, что свидетельствует о правильности разработанной методики.

По разработанной методике количественного определения пеонифлорина методом ВЭЖХ проанализированы 5 серий «Пионифит» экстракта сухого. Результаты представлены в таблице 45.

**Таблица 45 – Результаты количественного определения пеонифлорина в
«Пионифит» экстракте сухом (n=5)**

Номер серии экстракта	Содержание пеонифлорина, %
1	1,54±0,05
2	1,50±0,05
3	1,57±0,04
4	1,55±0,05
5	1,51±0,04

По результатам анализа «Пионифит» экстракта сухого с помощью валидированной методики установлено количественное содержание пеонифлорина от 1,50 до 1,57%.

4.3.3. Исследование физико-химических и технологических показателей «Пионифит» экстракта сухого

В ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» предусмотрены следующие требования к экстрактам сухим: описание, потеря в массе при высушивании (не более 5%), содержание тяжелых металлов (не более 0,01%), растворимость. Данные показатели определены в 5 сериях пиона садового экстракта сухого (таблица 46).

**Таблица 46 – Результаты определения физико-химических свойств
«Пионифит» экстракта сухого (n=5)**

№ серии	Описание	Потеря в массе при высушивании, %	Растворимость	Тяжелые металлы
1	Аморфный порошок зеленовато-бурого цвета со специфическим запахом	4,86±0,14	Растворим в воде, умеренно растворим в этаноле	Не более 0,01%
2		4,64±0,12	- « -	- « -
3		3,86±0,09	- « -	- « -
4		4,90±0,17	- « -	- « -
5		4,70±0,12	- « -	- « -

Полученные данные свидетельствуют о том, что «Пионифит» экстракт сухой отвечает требованиям нормативной документации.

Изучение технологических свойств экстракта имеет важное значение при использовании изучаемой субстанции для получения других лекарственных форм, поскольку позволяет подобрать вспомогательные вещества с целью оптимизации технологического процесса и получения лекарственной формы требуемого качества.

Исследование технологических характеристик экстракта проводилось по следующим показателям: сыпучесть, насыпная плотность (таблица 47).

Таблица 47 – Результаты определения технологических свойств «Пионифит» экстракта сухого

№ п/п	Сыпучесть, г/с	Насыпная плотность ρ_n , г/мл	
		до уплотнения	после уплотнения
1	5,61	0,69	0,86
2	5,25	0,72	0,83
3	5,44	0,71	0,83
4	5,28	0,72	0,84
5	5,49	0,72	0,83

Представленные данные свидетельствуют о том, что «Пионифит» экстракт сухой обладает удовлетворительной сыпучестью (3,0 – 6,5 г/с) и входит в группу средних порошков ($1,1 > \rho_n > 0,6$).

4.3.4. Изучение микробиологической чистоты

Определение микробиологической чистоты проводили по методике ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота». Для препаратов категории 3.2 предусматривается количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов. Результаты исследований, проведенных на трех сериях «Пионифит» экстракта сухого, представлены в таблице 48.

**Таблица 48 – Результаты исследования микробиологической чистоты
«Пионифит» экстракта сухого**

№ сери и	Количество в 1 г образца (КОЕ/г)		Наличие/отсутствие в 1 г образца			Наличие/ Отсутст- вие в 10 г образца	Коли- чество энтеро- бактерий, КОЕ в 1 г
	аэробных бактерий	грибов плесне- вых и дрожже- вых	E. coli	P. aeruginos a	S. aureus	Salmo- nella spp.	
1	$\leq 1 \times 10^2$	$\leq 10^1$	отсут- ствует	отсут- ствует	отсут- ствует	отсут- ствует	$\leq 1 \times 10^1$
2	$\leq 1 \times 10^2$	$\leq 10^1$	отсут- ствует	отсут- ствует	отсут- ствует	отсут- ствует	$\leq 1 \times 10^1$
3	$\leq 1 \times 10^2$	$\leq 10^1$	отсут- ствует	отсут- ствует	отсут- ствует	отсут- ствует	$\leq 1 \times 10^1$
Тре- бова- ния НД	$\leq 1 \times 10^4$	$\leq 10^2$	отсут- ствие	отсут- ствие	отсут- ствие	отсут- ствие	$\leq 1 \times 10^2$

Согласно данным, представленным в таблице, все исследованные серии «Пионифит» экстракта сухого соответствуют требованиям ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» для категории 3.2.

4.3.5. Изучение сроков годности и условий хранения

«Пионифит» экстракта сухого

Исследования по определению сроков годности «Пионифит» экстракта сухого проводились в естественных условиях согласно ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств». Для обеспечения максимального срока годности экстракта его упаковка должна обеспечивать защиту от воздействия влаги и солнечного света. С этой целью выбрано два вида упаковки: полиэтиленовые пакеты, запаянные термосвариванием, стеклянные банки темного стекла, герметично укупоренные.

Хранение экстракта осуществлялось в следующих условиях:

- при температуре 15 – 25 °С и относительной влажности воздуха не более 60±5%;
- при температуре 8 – 15 °С и относительной влажности воздуха не более 60±5%.

Проверку показателей экстракта проводили по истечении 6, 12, 18, 24, 30 месяцев.

Данные, представленные в таблицах 49 и 50, свидетельствуют о том, что оба вида упаковки обеспечивают стабильность экстракта как при температуре 15 – 25 °С, так и не выше 8 – 15 °С и относительной влажности воздуха не более 60±5%. Установлено, что «Пионифит» экстракт сухой выдерживает хранение в течение 2 лет.

Таблица 49 – Результаты определения качества образцов «Пионифит» экстракта сухого при хранении при температуре 15 – 25 °С и относительной влажности воздуха не более 60 ± 5%

№ се- рии	Срок хране- ния, мес.	Описание	Подлин- ность	Содержание		Потеря в массе при высуши- вании, %	Микро- биологи- ческая чистота
				монотерпеновых гликозидов, %	флавоноидов, %		
Вид упаковки: стеклянный флакон							
4	0	аморфный порошок зеленовато-бурого цвета со специфическим запахом, горьковатого вкуса	Положи- тельна	13,30±0,49	5,78±0,20	4,90	соотв.
	6	-«-	-«-	13,27±0,56	5,80±0,20	4,94	соотв.
	12	-«-	-«-	13,03±0,59	5,78±0,18	4,53	соотв.
	18	-«-	-«-	12,20±0,56	5,50±0,20	4,62	соотв.
	24	-«-	-«-	12,21±0,51	5,47±0,23	4,66	соотв.
	30	-«-	-«-	12,18±0,50	5,45±0,21	4,68	соотв.
Вид упаковки: полиэтиленовый пакет							
5	0	аморфный порошок зеленовато-бурого цвета со специфическим запахом, горьковатого вкуса	Положи- тельна	13,38±0,39	5,27±0,18	4,70	соотв.
	6	-«-	-«-	13,23±0,36	4,92±0,21	4,65	соотв.
	12	-«-	-«-	12,55±0,52	4,89±0,19	4,27	соотв.
	18	-«-	-«-	12,50±0,50	4,90±0,24	4,30	соотв.
	24	-«-	-«-	12,43±0,57	4,86±0,24	4,31	соотв.
	30	-«-	-«-	12,40±0,55	4,84±0,23	4,34	соотв.

Таблица 50 – Результаты определения качества образцов «Пионифит» экстракта сухого при хранении при температуре 8 - 15 °С и относительной влажности воздуха не более 60 ± 5%

№ се- рии	Срок хране- ния, мес.	Описание	Подлин- ность	Содержание		Потеря в массе при высуши- вании, %	Микро- биологи- ческая чистота
				монотерпеновых гликозидов, %	Флавоноидов, %		
Вид упаковки: стеклянный флакон							
4	0	аморфный порошок зеленовато-бурого цвета со специфическим запахом, горьковатого вкуса	Положи- тельна	13,30±0,49	5,78±0,20	4,90	соотв.
	6	-«-	-«-	13,12±0,45	5,72±0,18	4,35	соотв.
	12	-«-	-«-	13,10±0,52	5,65±0,20	4,40	соотв.
	18	-«-	-«-	13,19±0,60	5,67±0,25	4,45	соотв.
	24	-«-	-«-	13,30±0,56	5,62±0,23	4,53	соотв.
	30	-«-	-«-	13,27±0,53	5,59±0,20	4,60	соотв.
Вид упаковки: полиэтиленовый пакет							
5	0	аморфный порошок зеленовато-бурого цвета со специфическим запахом, горьковатого вкуса	Положи- тельна	13,38±0,39	5,27±0,18	4,70	соотв.
	6	-«-	-«-	13,11±0,40	4,93±0,18	4,50	соотв.
	12	-«-	-«-	13,17±0,51	4,93±0,21	4,35	соотв.
	18	-«-	-«-	13,30±0,64	4,90±0,21	4,90	соотв.
	24	-«-	-«-	13,36±0,60	4,95±0,20	4,92	соотв.
	30	-«-	-«-	13,32±0,58	4,90±0,20	4,98	соотв.

Выводы по главе 4

1. Установлены оптимальные условия экстрагирования травы пиона садовых сортов, позволяющие извлечь 98,54% суммы флавоноидов и 99,14% суммы монотерпеновых гликозидов от общего содержания в сырье.
2. Разработана и апробирована технологическая схема «Пионифит» экстракта сухого.
3. По методикам качественного анализа, адаптированным относительно экстракта, определены основные группы БАВ: флавоноиды и монотерпеновые гликозиды.
4. Подобраны условия идентификации флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухого методом ТСХ, и установлено наличие в экстракте таких флавоноидов, как рутин и кверцетин.
5. Установлено присутствие полифенольных соединений: пирогаллол и бензойная кислота методом ГХ-МС.
6. Адаптированы и валидированы методики количественного определения монотерпеновых гликозидов и флавоноидов. Содержание в экстракте монотерпеновых гликозидов составило 12,18-13,71%, флавоноидов – 5,27-5,83%.
7. Адаптирована и валидирована методика количественного определения пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом методом ВЭЖХ и установлено содержание пеонифлорина $1,53 \pm 0,03\%$.
8. Проведена стандартизация полученного экстракта по показателям: описание, подлинность, потеря в массе при высушивании, содержание тяжелых металлов. Установлено, что исследованные образцы «Пионифит» экстракта сухого соответствуют требованиям ОФС «Экстракты».
9. Определены технологические показатели «Пионифит» экстракта сухого (сыпучесть и насыпная плотность). Результаты позволяют отнести его к группе средних порошков.
10. Проведена стандартизация «Пионифит» экстракта сухого по показателю «Микробиологическая чистота». Установлено его соответствие требованиям НД.
11. Установлен срок хранения «Пионифит» экстракта сухого 2 года при температуре не выше 25 °С и относительной влажности воздуха не более $60 \pm 5\%$.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ТЕХНОЛОГИИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛЕНОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ «ПИОНИФИТ»

Пленки лекарственные являются современной лекарственной формой, характеризующейся тем, что БАВ и лекарственные средства распределены в массе полимера. Данная лекарственная форма отличается точностью дозирования, возможностью регулирования скорости высвобождения лекарственных средств, удобством и эстетичностью применения. При поступлении лекарственных средств через слизистую оболочку исключается воздействие ферментов желудочно-кишечного тракта, а равномерное высвобождение действующего вещества в месте аппликации обуславливает длительность терапевтического эффекта с сохранением постоянства концентрации вещества в крови, что позволяет использовать пленки не только для лечения, но и для профилактики различных заболеваний.

С этой точки зрения использование «Пионифит» экстракта сухого в форме лекарственных пленок открывает новые возможности для применения данного препарата.

5.1. Разработка состава и технологии пленок лекарственных «Пионифит»

5.1.1. Выбор компонентов основы пленок лекарственных

Основополагающим фактором, обеспечивающим эффективное функционирование пленок как аппликационной ЛФ, является состав полимерной основы, поскольку он придает пленкам определенные структурно-механические, технологические и потребительские свойства. Поэтому первый этап посвящен выбору оптимального состава полимерной матрицы-носителя. Ранее проведенными исследованиями установлено, что состав для получения ПЛ должен включать гидрофильный полимер и пластификатор.

Для обеспечения оптимальных параметров технологического процесса, с целью равномерного нанесения поливочного раствора на подложку, необходимо учитывать вязкость пленкообразующего раствора. Данный показатель характеризует внутреннее трение и текучесть, что определяет способность

пленочной массы к равномерному распределению на подложке и как следствие однородность распределения БАВ по всей площади пленки. Вязкость поливочного раствора определяется типом и концентрацией полимера в растворе.

Исследование реологических показателей проводили с помощью капиллярного вискозиметра Оствальда. Для осуществления опыта готовили растворы плацебо различных пленкообразователей в воде очищенной в нескольких концентрациях с добавлением пластификатора (глицерина) в концентрации 2%. Вязкость полученных растворов определяли путем измерения времени истечения жидкости между верхней и нижней меткой мениска относительно глицерина. Измерения проводились при комнатной температуре.

Результаты определения относительной вязкости растворов пленкообразователей представлены в таблице 51.

Таблица 51 – Результаты определения относительной вязкости (η) растворов пленкообразователей ($n=5$)

	NaКМЦ			Na альгинат			Пектин цитрусовый		Пектин яблочный	
	2%	3%	4%	2%	3%	4%	4%	6%	4%	6%
η	11,67	38,15	111,34	1,45	2,18	3,63	8,55	13,09	20,18	34,81
	$\pm 0,43$	$\pm 0,90$	$\pm 1,57$	$\pm 0,06$	$\pm 0,09$	$\pm 0,12$	$\pm 0,35$	$\pm 0,48$	$\pm 0,85$	$\pm 1,30$

В результате изучения вязкости в качестве пленкообразователя выбран NaКМЦ, поскольку относительная вязкость 3%-ного раствора составила 38,15; 4%-ного раствора – 111,34. Растворы на основе Na-альгината и пектинов в концентрации 6% обладают низкими значениями относительной вязкости. Поэтому их использование в качестве пленкообразователей нецелесообразно ввиду неэкономичности технологии.

Кроме того, изучалась возможность использования загустителя – агар-агара. Добавление к 3%-ному раствору NaКМЦ агар-агара в концентрации 0,5% позволило увеличить вязкость до 126,5.

Таким образом, оптимальным значением вязкости обладают растворы NaКМЦ в концентрациях 3 и 4% и раствор NaКМЦ в концентрации 3% с

добавлением агар-агара в концентрации 0,5%, которые использованы в дальнейшем исследовании [37].

Согласно Методическим рекомендациям 2.3.1.1915 – 04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ» суточная норма потребления флавоноидов составляет 30 мг [60]. Учитывая среднюю концентрацию суммы флавоноидов в «Пионифит» экстракте сухом 5,63 %, определена разовая доза экстракта в одной дозе лекарственной пленки (20,0×20,0 мм) в количестве 50 мг (содержание флавоноидов 2,8 мг), что составляет около 10% суточной дозы и является минимальной рекомендуемой разовой дозой, что расширяет область применения данного препарата, в том числе позволяет использовать ПЛ в педиатрии. В 100,0 пленочной массы содержится 60 доз ПЛ, что соответствует 3,0 «Пионифит» экстракта сухого.

На втором этапе проводилась оценка выбранных составов по внешним показателям. Пленки получали методом «полива» на подложку с последующей сушкой при температуре 40 – 45°C в течение 12 – 13 часов. Коэффициент усушки пленок составил $17,39 \pm 0,40$.

В процессе исследования получены пленки, составы которых представлены в таблице 52.

Таблица 52 – Состав пленочных композиций

№ состав	Состав ПЛ	Описание
1	NaКМЦ 3,0 Глицерин 2,0 «Пионифит» экстракт сухой 3,0 Воды очищенной до 100,0	Пленки светло-коричневого цвета, эластичные, прозрачные, гладкие, со специфическим запахом и вкусом
2	NaКМЦ 4,0 Глицерин 2,0 «Пионифит» экстракт сухой 3,0 Воды очищенной до 100,0	Пленки темно-зеленого цвета, шероховатые, плотные, ломкие, со специфическим запахом и вкусом
3	NaКМЦ 3,0 Агар-агар 0,5 Глицерин 2,0 «Пионифит» экстракт сухой 3,0 Воды очищенной до 100,0	Пленки коричневого цвета, эластичные, гладкие, со специфическим запахом и вкусом

При оценке внешнего вида, установлено, что пленки с высокой концентрацией полимера имели более плотную структуру, кроме того затруднялась деаэрация раствора, в результате чего готовые пленки содержали включения пузырьков воздуха, легко ломались. ПЛ, содержащие в качестве пленкообразователя NaКМЦ в концентрации 3%, и ПЛ, содержащие в качестве пленкообразователя NaКМЦ в концентрации 3% и загуститель агар-агар в концентрации 0,5%, имели удовлетворительный внешний вид: гладкая, равномерная поверхность и эластичная структура.

5.1.2. Кинетические исследования процесса растворения пленок лекарственных

Биологическая доступность лекарственных средств определяется, прежде всего, скоростью высвобождения их из лекарственной формы, поэтому с

повышением концентрации продуктов реакции при растворении увеличивается электропроводимость растворов. Для кинетического исследования процесса высвобождения ЛС из полимерных основ применяли физико-химический метод анализа – кондуктометрию.

В ходе проведения опытов через определенные промежутки времени измеряли удельную электропроводимость на кондуктометре марки HI 8733. Эксперименты проводили при температуре 310 К до полного растворения ПЛ. Для устранения погрешности измерений, связанной с изменением температуры исследуемых растворов, применяли схему температурной коррекции. Перед каждым замером проводили перемешивание акцепторной среды. В условиях проводимого эксперимента сопротивление мембраны диффузионному потоку ЛС равно нулю, ее функцию выполняла вода, имитирующая кровеносную систему организма, что обеспечивало полное высвобождение компонентов матрицы. По результатам эксперимента строили кривые динамики высвобождения ЛС из образцов пленок.

Значение удельной электропроводимости обладает свойством аддитивности, т.е. складывается из проводимости всех компонентов раствора. В связи с этим изучали кинетику растворения ПЛ с «Пионифит» экстрактом сухим, а также плацебо.

Процесс растворения пленок протекает в две стадии. Первая стадия – взаимодействие пленок с растворителем, которая завершается образованием вокруг пленок насыщенного раствора. На второй стадии осуществляется переход растворенного вещества в объем раствора путем диффузии. Перемешиванием раствора перед каждым измерением стремились исключить влияние диффузии на кинетику процесса. Это приводило к уменьшению толщины диффузного слоя и возрастанию константы скорости диффузии.

Кинетические кривые растворения пленок лекарственных с «Пионифит» экстрактом сухим трех составов и высвобождение из них БАВ приведены на рисунках 26, 27. Из экспериментальных данных видно, что растворение полимерных матриц и высвобождение из них БАВ происходит быстрее у пленок

состава №3. Полное растворение ПЛ на основе NaКМЦ в концентрации 3 и 4% происходит за $52 \pm 0,5$ и $51 \pm 0,5$ минут, соответственно, а пленок на комбинированной основе – за $45 \pm 0,5$ минут.

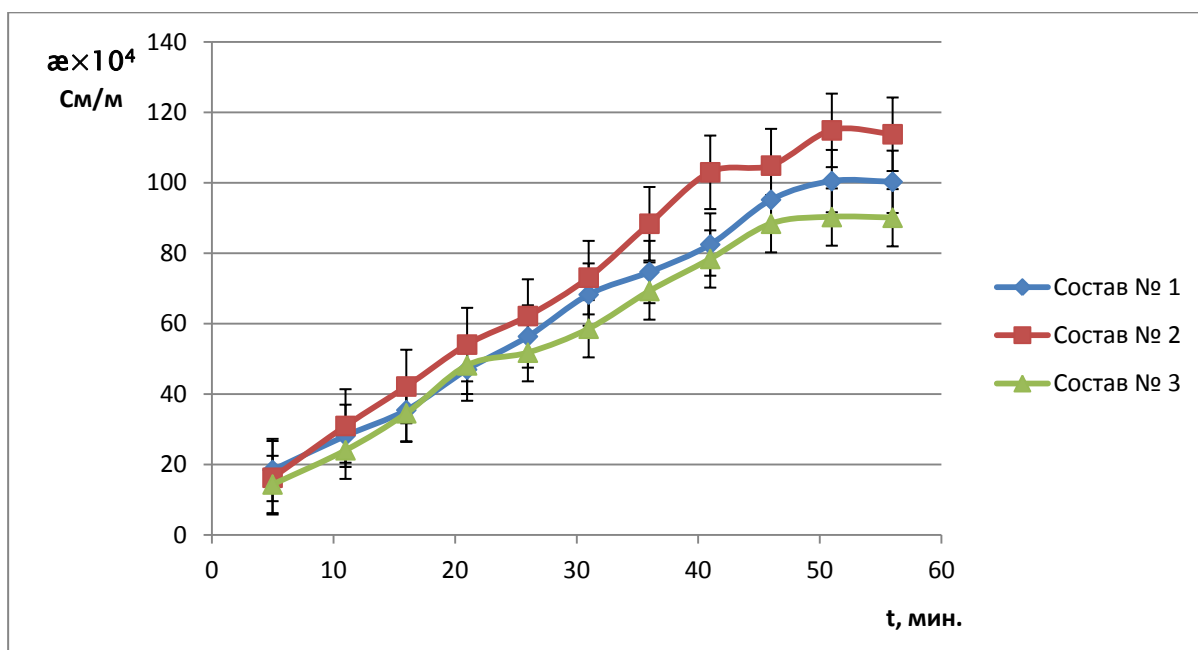


Рисунок 26 – Кинетическая закономерность высвобождения БАВ из ПЛ с экстрактом

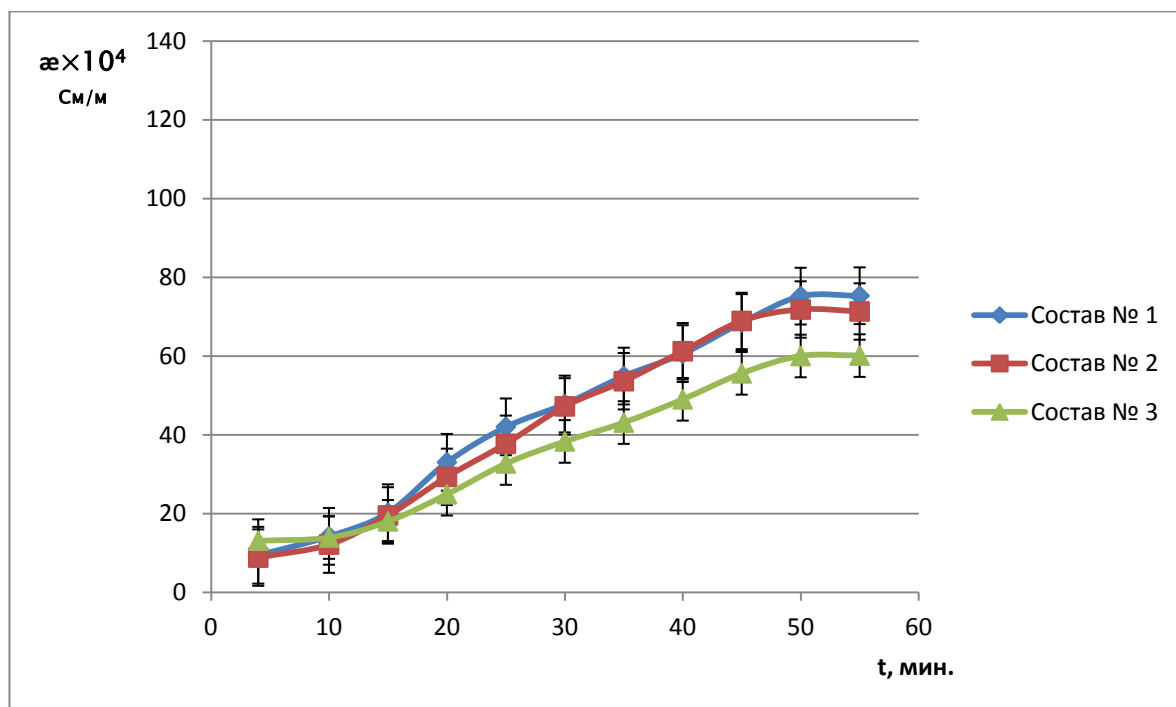


Рисунок 27 – Кинетическая закономерность растворения плацебо ПЛ

По данным кинетических исследований определен порядок реакции. По полученным экспериментальным данным установлена линейная зависимость в

координатах $\ln (\alpha_{\max} - \alpha_i) = f(t)$, что указывает на соответствие процесса высвобождения ЛС из полимерных матриц реакции первого порядка.

Из графика зависимости $\ln (\alpha_{\max} - \alpha_i) = f(t)$ определены константы растворения пленок, как тангенс угла наклона к положительному направлению оси абсцисс. Константы растворения пленок на основе NaКМЦ в концентрации 3 и 4% составляют $0,69 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $0,89 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, соответственно, причем увеличение концентрации полимера способствует увеличению растворимости пленки. Добавление агар-агара к NaКМЦ увеличивает растворимость пленок, что выражается в увеличении константы растворения $k=1,39 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, что в 2 раза больше, чем у пленок на основе NaКМЦ в концентрации 3%. Константы растворения ПЛ с экстрактом меньше, чем константы растворения плацебо. Данные представлены на рисунке 28.

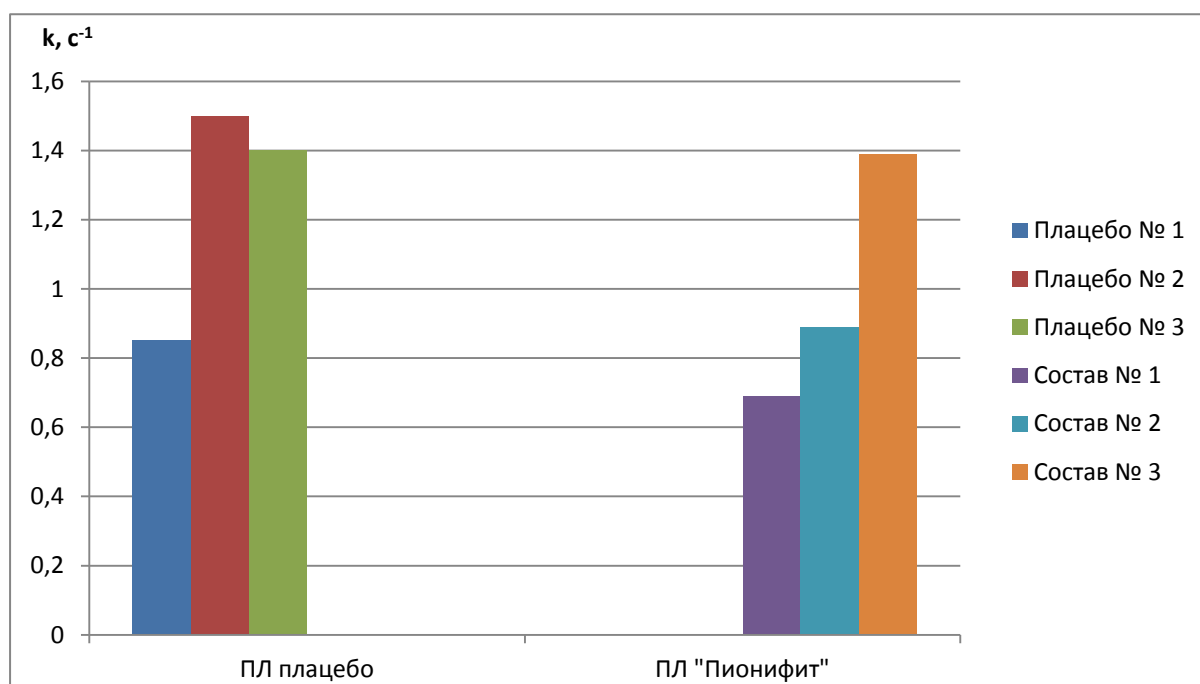


Рисунок 28 – Константы скорости растворения ПЛ

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что пленки лекарственные на основе NaКМЦ в концентрации 3% имеют удовлетворительный внешний вид, а добавление загустителя агар-агара к пленкообразователю обеспечивает оптимальные структурно-механические

характеристики поливочного раствора, а также увеличивает растворимость ПЛ, что выражается в увеличении константы растворения.

5.1.3. Разработка технологии пленок лекарственных «Пионифит»

В результате проведенных реологических и биофармацевтических исследований разработан состав пленок лекарственных «Пионифит», содержащих в качестве активного компонента «Пионифит» экстракт сухой.

Состав:

«Пионифит» экстракт сухой	3,0
NaКМЦ	3,0
Агар-агар	0,5
Глицерин	2,0
Вода очищенная	до 100,0

Технологическая схема ПЛ «Пионифит», апробированная на базе аптечной организации ООО «Межбольничные аптеки», представлена на рисунке 29.



Рисунок 29 – Технологическая схема получения ПЛ «Пионифит»
 (K_t – контроль технологический, K_x – контроль химический, $K_{м/б}$ – контроль микробиологический).

Процесс получения пленок лекарственных «Пионифит» состоит из следующих стадий:

ВР 1. Вспомогательные работы

ТП 2. Изготовление поливочного раствора

ТП 3. Получение лекарственной пленки

УМО 4. Контроль качества и оформление готовой продукции

ВР 1. Вспомогательные работы:

ВР 1.1. Подготовка оборудования, помещения, персонала и вспомогательного материала, осуществляемая в соответствии с Приказом №309 от 21.10.97 «Об утверждении инструкции по санитарному режиму аптечных организаций».

ВР 1.2. Отвешивание «Пионифит» экстракта сухого, пленкообразователя (NaКМЦ), пластификатора (глицерин), загустителя (агар-агар) с точностью до 0,01 г.

ТП 2. Изготовление поливочного раствора.

ТП 2.1. Растворение экстракта сухого. 72 мл воды очищенной нагревают до температуры 60 °С, растворяют 3,0 г «Пионифит» экстракта сухого.

ТП 2.2. Введение в раствор пленкообразователя и загустителя. Раствор экстракта переносят в емкость для изготовления поливочного раствора с мешалкой якорного типа и при перемешивании со скоростью 90 – 100 об/мин добавляют небольшими порциями 3,0 г NaКМЦ. Полученный раствор гомогенизируют до полного растворения полимера. Добавляют 2,0 глицерина. Агар-агар в количестве 0,5 г растворяют в 20 мл горячей воды, оставляют на 10 – 15 минут, после этого доводят до кипения, постоянно помешивая, до полного растворения порошка. Полученный раствор загустителя вводят в поливочный раствор при постоянном перемешивании.

ТП 2.3. Поливочный раствор фильтруют через двойной слой марли.

ТП 2.4. Деаэрацию поливочного раствора проводят путем отстаивания смеси в течение 30 – 40 мин при комнатной температуре.

ТП 3. Получение пленки.

ТП 3.1. Полимерную массу разливают на предварительно взвешенные подложки. Высота поливочного слоя 6 ± 1 мм.

ТП 3.2. Сушку проводят в сушильном шкафу с калорифером и принудительной вентиляцией воздуха при температуре $40 - 45^{\circ}\text{C}$ в течение 13 – 14 часов.

ТП 3.3. Снятие пленок с подложек и дозирование.

УМО 4. Контроль качества и оформление готовой продукции.

УМО 4.1. Контроль качества пленок осуществляют по технологическим и физико-химическим показателям.

УМО 4.2. Пленки фасуют в полиэтиленовые пакеты по ГОСТ 10-354-82, запаиваемые методом термосваривания, по 10 терапевтических доз.

УМО 4.3. Упаковка и оформление готовой продукции.

Оформляют к отпуску в соответствии с приложением к приказу № 751н от 26.10.2015 г. «Правила изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность».

5.2. Стандартизация пленок лекарственных «Пионифит»

5.2.1. Анализ по физико-химическим показателям

С целью стандартизации ПЛ «Пионифит» определяли следующие показатели: внешний вид, однородность массы, толщина, время растворения, pH водного раствора, потеря в массе при высушивании.

Анализ пленок лекарственных проводили по методикам, приведенным в главе 2.

По внешнему виду ПЛ представляют собой плоские эластичные пластины коричневого цвета со специфическим запахом. Не содержат механических включений, пузырьков и микротрещин.

Показатель «Однородность массы» влияет на точность дозирования и определяется путем взвешивания 20 образцов пленок с точностью до 0,001 г.

Отклонение от средней массы допускается $\pm 10\%$. Средняя масса одной терапевтической дозы (пленки площадью 2 см^2) составила $0,115 \pm 0,003 \text{ г}$, что свидетельствует о достаточной точности дозирования ПЛ.

Толщина ПЛ влияет на степень адгезии и равномерность контакта лекарственного средства со слизистой оболочкой полости рта. Толщину ПЛ определяли с помощью микрометра марки МКС-25. Для разработанного состава толщина составила $0,22 \pm 0,06 \text{ мм}$.

Время растворения пленок определяется путем растворения образца в воде очищенной при температуре 37°C при периодическом встряхивании. Время растворения ПЛ «Пионифит» составило $40,0 \pm 0,5$ минут. Значения данного показателя показывают, что высвобождение действующих веществ обеспечивается постепенно в течение установленного времени.

pH водного раствора ПЛ является показателем комфортности. Определение проводили потенциометрическим методом. Полученное значение pH исследуемых пленок – $5,60 \pm 0,04$ – имеет близкое значение к pH ротовой полости.

Потерю в массе при высушивании как показатель стабильности и микробиологической чистоты определяли путем высушивания образцов ПЛ в сушильном шкафу в течение 5 часов при температуре $100 - 105^\circ\text{C}$. Потеря в массе при высушивании в исследуемых пленках составила $5,20 \pm 0,02\%$ [68].

В результате проведенных исследований подтверждена доброкачественность разработанного состава ПЛ по физико-технологическим показателям, и установлены нормы качества ПЛ «Пионифит».

5.2.2. Качественный анализ и количественное определение БАВ в пленках лекарственных «Пионифит»

Поскольку основными группами действующих веществ «Пионифит» экстракта сухого являются монотерпеновые гликозиды и флавоноиды испытания на подлинность включают качественные реакции на данные группы веществ, методики которых описаны в главе 2. Предварительно $0,2 \text{ г}$ ПЛ растворяли в 10 мл воды очищенной. В результате анализа ПЛ «Пионифит» получены

характерные для монотерпеновых гликозидов и флавоноидов окрашивания (таблица 53).

Таблица 53 – Результаты качественного анализа ПЛ «Пионифит» (n=5)

Группа БАВ	Реактив	Эффект реакции (окрашивание)
Монотерпеновые гликозиды	Трим-Хилла	сине-голубое
	Шталя	голубое
	Бекон-Эдельмана	коричневое
	Щелочной раствор гидроксиламина и раствор железа (III) хлорида	коричневое
Флавоноиды	Магний металлический и хлористоводородная кислота концентрированная	розовое
	Раствор железа (III) хлорида	желто-зеленое
	Раствор алюминия хлорида	желтое

Для оценки количественного содержания флавоноидов и монотерпеновых гликозидов в пленках лекарственных использовали методики спектрофотометрического анализа, предложенные для анализа «Пионифит» экстракта сухого и модифицированные применительно к пленкам.

Пробоподготовку осуществляли следующим способом: навеску измельченных пленок около 0,2 г (точная навеска) отвешивали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 10 мл воды очищенной и растворяли, доводили до метки спиртом этиловым 40%. Отстаивали, выпавшие в осадок полимеры отфильтровывали (Раствор А).

Количественное определение монотерпеновых гликозидов проводили спектрофотометрическим методом по реакции комплексообразования с щелочным раствором гидроксиламина и раствором железа (III) хлорида.

10 мл раствора А пропускали через стеклянную колонку диаметром 10 мм, заполненную 2,0 г алюминия оксида. К 5 мл элюата прибавляли 5 мл раствора гидроксиламина щелочного и оставляли на 20 минут. Через 20 минут добавляли 10 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и 5 мл 1% раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты. Перемешивали и

измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Janway Portlab 511 UV в УФ области спектра при длине волны 512 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения: к 5 мл элюата прибавляли 5 мл воды очищенной, 10 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и 5 мл 1% раствора железа (III) хлорида в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты.

Содержание монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин (%) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \times 25 \times 25}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times 5 \times a},$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения продуктов реакции пионифлорина с гидроксиламином и железа (III) хлоридом, который равняется 16,2;

a – точная навеска пленок, г.

Количественное определение суммы флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом по реакции комплексообразования с раствором алюминия хлорида.

Помещали 1 мл раствора A в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, доводили спиртом этиловым 95% до метки и оставляли на 40 минут, после чего перемешивали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Janway Portlab 511 UV в УФ области спектра при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения: 1 мл раствора A помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли одну каплю уксусной кислоты разведенной 30%, доводили спиртом этиловым 95% до метки и оставляли на 40 минут, после чего перемешивали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре в УФ области спектра при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Определение проводили относительно СО рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m_x \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot (100 - w)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot m_x \cdot (100 - w)}, \text{ где}$$

A_x – оптическая плотность исследуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО рутин;а;

m_x – точная навеска пленок, г;

m_0 – точная навеска СО рутин;а, г;

w – потеря в массе при высушивании пленок, %.

Количественное определение пеонифлорина в ПЛ «Пионифит» проводили методом ВЭЖХ по методике, разработанной для травы пиона садовых сортов.

Около 0,08 г (точная навеска) измельченных пленок отвешивали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде очищенной, доводили водой до метки (раствор А). 25 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили метанолом до метки. Раствор стандартного образца пеонифлорина готовили по методике количественного определения пеонифлорина в траве пиона садовых сортов, описанной в главе 3.

Данные, полученные в результате количественного определения БАВ пленок лекарственных «Пионифит» представлены в таблице 54.

Таблица 54 – Результаты количественного определения БАВ в образцах пленок лекарственных «Пионифит»

серия	Метрологические характеристики					
	X	$\bar{X}$	S	$\Delta \bar{x}$	$S\bar{s}, \%$	$\bar{\varepsilon}, \%$
1	2	3	4	5	6	7
Содержание монотерпеновых гликозидов в одной дозе ПЛ, мг (n=3)						
1	6,440±0,128	6,430	0,16762	0,20840	2,6053	3,24
2	6,499±0,132					
3	6,150±0,207					
4	6,490±0,201					
5	6,590±0,232					

1	2	3	4	5	6	7
Содержание флавоноидов в одной дозе ПЛ, мг (n=3)						
1	2,382±0,090	2,350	0,04534	0,05636	1,9295	2,40
2	2,413±0,101					
3	2,323±0,090					
4	2,310±0,084					
5	2,320±0,100					
Содержание пеонифлорина в одной дозе ПЛ, мг (n=3)						
1	0,718±0,026	0,725	0,00647	0,00804	0,8913	1,11
2	0,722±0,028					
3	0,735±0,024					
4	0,728±0,021					
5	0,724±0,031					

На основании результатов количественного определения БАВ в ПЛ «Пионифит» установлено содержание монотерпеновых гликозидов на массу одной терапевтической дозы (пленки площадью 2 см²) – 6,430±0,208 мг и флавоноидов – 2,350±0,056 мг, что составляет 99 % и 83 % от содержания данных веществ в «Пионифит» экстракте сухом соответственно, перешедших в водный раствор. Установлено содержание пеонифлорина в одной дозе ПЛ 0,725±0,008 мг, что составляет 97 % от содержания пеонифлорина в «Пионифит» экстракте сухом.

5.3. Изучение микробиологической чистоты пленок лекарственных «Пионифит»

Определение микробиологической чистоты осуществляли согласно ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» для препаратов категории 2. Результаты представлены в таблице 55.

**Таблица 55 – Результаты исследования микробиологической чистоты ПЛ
«Пионифит»**

№	Нормируемые показатели	Результат	Требования НД
1	Общее число аэробных микроорганизмов	$1,2 \times 10^2$ КОЕ/г	$\leq 2 \times 10^2$ КОЕ/г
	Общее число дрожжевых и плесневых грибов	$\leq 1 \times 10^1$ КОЕ/г	$\leq 1 \times 10^1$ КОЕ/г
	<i>Staphylococcus aureus</i>	отсутствуют в 1 г	отсутствие в 1 г
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	отсутствуют в 1 г	отсутствие в 1 г

Согласно данным, представленным в таблице, ПЛ «Пионифит» соответствуют требованиям ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» для категории 2.

5.4. Исследование стабильности пленок лекарственных «Пионифит»

Стабильность ПЛ «Пионифит» определяли путем оценки технологических и физико-химических показателей, подлинности и количественного определения действующих веществ при хранении при температуре 15 – 25 °С и относительной влажности не более 60±5% в термосвариваемых полиэтиленовых пакетах без вторичной упаковки на 3 сериях ПЛ.

Сравнительная оценка значений показателей качества ПЛ «Пионифит» представлена в таблице 55. Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о стабильности физико-химических показателей и количественного содержания действующих веществ в ПЛ в течение срока наблюдения.

Таблица 56 – Результаты изучения стабильности ПЛ «Пионифит»

№ серии	Срок хранения, мес.	Описание	Технологические параметры					Подлинность	Содержание, мг		
			толщина, мм	средняя масса, г	время растворения, мин	потеря в массе при высушивании, %	pH		Монотерпеновые гликозиды	Флавоноиды	Пеонифлорин
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	Пленки коричневого цвета со специфическим запахом	0,22±0,06	0,115±0,001	40,0±0,5	5,20±0,02	5,60±0,04	положит.	6,440±0,190	2,382±0,050	0,718±0,006
	6		0,22±0,06	0,115±0,001	40,0±0,5	8,34±0,02	5,66±0,04	положит.	6,421±0,190	2,379±0,048	0,715±0,005
	12		0,22±0,06	0,118±0,001	40,0±0,5	10,87±0,02	6,00±0,04	положит.	6,403±0,180	2,370±0,045	0,705±0,005
2	0	Пленки коричневого цвета со специфическим запахом	0,24±0,06	0,116±0,001	40,0±0,5	5,54±0,02	5,78±0,04	положит.	6,499±0,200	2,413±0,052	0,722±0,008
	6		0,24±0,06	0,118±0,001	40,0±0,5	7,85±0,02	6,00±0,04	положит.	6,485±0,190	2,410±0,050	0,721±0,008

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	12		0,24±0,06	0,118±0,001	40,0±0,5	10,63±0,02	6,17±0,04	положит.	6,447±0,190	2,395±0,050	0,715±0,007
3	0	Пленки коричневого цвета со специфическим запахом	0,20±0,06	0,113±0,001	40,0±0,5	5,38±0,02	6,02±0,04	положит.	6,150±0,180	2,323±0,048	0,735±0,008
	6		0,20±0,06	0,115±0,001	40,0±0,5	8,15±0,02	6,20±0,04	положит.	6,000±170	2,230±0,048	0,729±0,006
	12		0,20±0,06	0,117±0,001	40,0±0,5	10,78±0,02	6,23±0,04	положит.	5,990±0,170	2,156±0,046	0,720±0,006

Выводы по главе 5

1. Произведен выбор оптимального состава матрицы-носителя в результате реологических, биофармацевтических исследований и оценки качества по внешним показателям.
2. Разработан состав и технология пленок лекарственных «Пионифит», апробированная на базе аптечной организации ООО «Межбольничные аптеки».
3. Проведена стандартизация ПЛ «Пионифит» по показателям «Подлинность», «Количественное определение». Подтверждено наличие основных групп БАВ в ПЛ и установлено содержание монотерпеновых гликозидов в одной дозе $6,430 \pm 0,208$ мг, флавоноидов – $2,350 \pm 0,056$ мг, пеонифлорина – $0,7250 \pm 0,0008$ мг.
4. Определены физико-химические показатели ПЛ «Пионифит»: средняя масса ПЛ $0,115 \pm 0,003$ г, толщина $0,22 \pm 0,06$ мм, время растворения $40,0 \pm 0,5$ мин, pH водного раствора ПЛ $5,60 \pm 0,04$, потеря в массе при высушивании $5,20 \pm 0,02\%$, что свидетельствует о доброкачественности ПЛ разработанного состава.
5. Установлено постоянство показателей ПЛ «Пионифит» в течение 1 года при хранении при температуре от 15 до 25 °С и относительной влажности не более $60 \pm 5\%$ в термосвариваемых полиэтиленовых пакетах в результате изучения стабильности ПЛ.
6. Разработано учебно-методическое пособие «Пленки лекарственные на основе извлечений из травы пиона садового».

ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ПИОНА САДОВЫХ СОРТОВ

6.1. Исследование безопасности «Пионифит» экстракта сухого

Важной частью доклинических исследований является доказательство безопасности лекарственных средств. При взаимодействии фармакологического вещества с организмом возможно проявление различных токсических эффектов. Поэтому исследования общетоксического действия лекарственных средств направлены на выявление переносимых и токсических доз, а также установление органов и систем, подверженных повреждающему действию фармакологического вещества.

6.1.1. Определение острой токсичности

Острую токсичность «Пионифит» экстракта сухого оценивали по методике, приведенной в главе 2, на 25 белых нелинейных мышах-самцах массой 20–30 г. Мышей разделили на 5 групп по 5 особей в каждой. Первой группе экстракт вводили в дозировке 10мг/кг, второй – 50мг/кг, третьей – 100мг/кг, четвертой – 500 мг/кг, пятой – 1000 мг/кг. Введение экстракта осуществляли перорально (per os). Растворы готовили непосредственно перед введением. Навеску экстракта растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия до получения однородной взвеси.

В каждой группе осуществлялось наблюдение за состоянием и поведением животных в течение 14 дней. В первый день после введения животные находились под непрерывным наблюдением.

При однократном внутрижелудочном введении «Пионифит» экстракта сухого в выбранных дозах не наблюдали смерть животных.

Через 30 минут после введения экстракта в дозах 10 – 1000 мг/кг наблюдается незначительное снижение активности животных, которая полностью восстанавливается через сутки. С увеличением дозы «Пионифит» экстракта сухого у животных данный эффект выражен в большей степени. Общее состояние и поведение животных носили нормальный характер, не обнаружили явлений,

свидетельствующих о влиянии на функционально-поведенческий статус животных и токсичности исследуемого экстракта.

Дозу выше 1000 мг/кг не вводили, то есть ЛД₅₀ при пероральном введении «Пионифит» экстракта сухого составила более 1000 мг/кг. С учетом классификации токсичности по Hodge и Sterner, испытуемый экстракт можно отнести к IV классу (малотоксичный препарат) [33].

6.1.2. Исследование нейротоксикологического профиля

В оценке безопасности новых лекарственных препаратов важное значение имеют токсикологические исследования. Одним из этапов в этих исследованиях является оценка неврологического статуса животных на фоне введения лекарственного препарата.

Оценка влияния «Пионифит» экстракта сухого на «психо-неврологический» статус животных проводилась на животных, участвующих в исследовании острой токсичности, в диапазоне доз 10 – 1000 мг/кг. Регистрировали поведенческие реакции животных, нервно-мышечную возбудимость и вегетативные эффекты в течение четырех суток и выражали спектр внешне наблюдаемых изменений количественно по шкале Ирвина.

В результате исследования установлено, что «Пионифит» экстракт сухой не оказывает действия на поведенческие, нервно-мышечные и вегетотропные реакции исследуемых животных. Таким образом, «Пионифит» экстракт сухой на функционально-поведенческий статус животных не влияет, и нейротоксикологической активности исследуемого экстракта не выявлено.

6.1.3. Исследование влияния «Пионифит» экстракта сухого на спонтанную двигательную активность

Спонтанная двигательная активность (СДА) – произвольная активность, обусловленная взаимодействием организма с окружающей средой.

В опыте использованы 12 мышей. Животные разделены на три группы: контрольная группа и две экспериментальные группы, экспонированные «Пионифит» экстрактом сухим в дозах 10 и 100 мг/кг (однократно). Во время теста животные содержались в клетках (регистрирующих камерах) поодиночке.

Динамика СДА под воздействием «Пионифит» экстракта сухого в дозах 10 и 100 мг/кг представлена на рисунках 30, 31. Рисунки показывают, что непосредственно после введения экстракта не наблюдается выраженных эффектов. Подавление двигательной активности экспонированных животных по сравнению с контрольной группой наблюдается после 380-й минуты и длится 40 – 60 минут и после 860-й минуты и длится 30 – 40 минут.

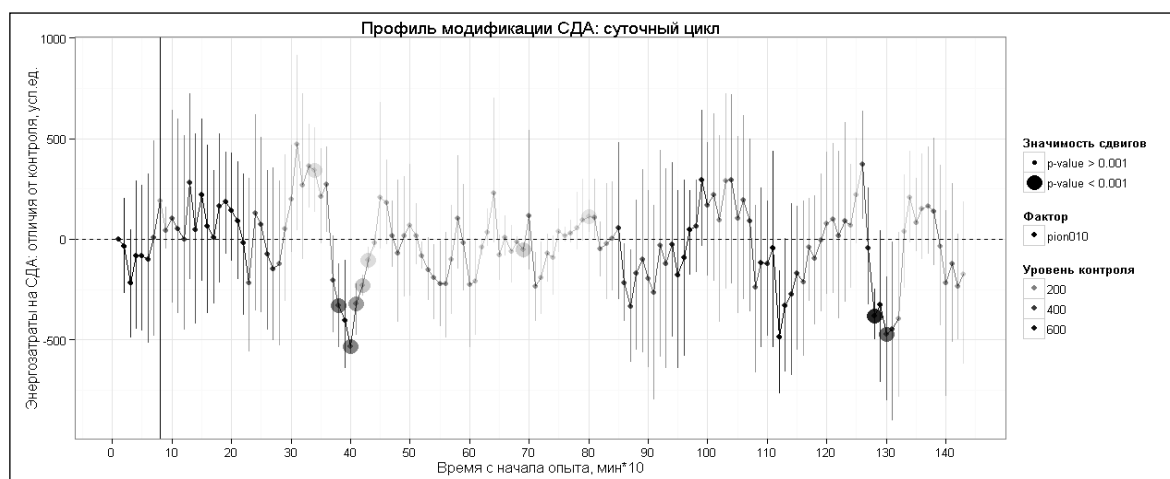


Рисунок 30 – Отклонения динамики энергозатрат на СДА при дозе «Пионифит» экстракта сухого 10 мг/кг от контрольной кривой*

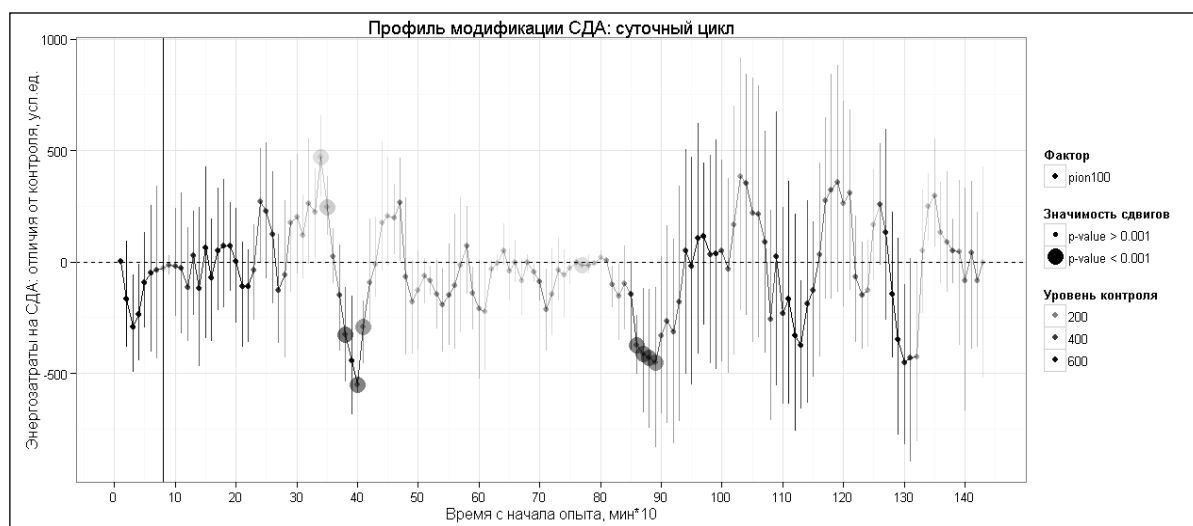


Рисунок 31 – Отклонения динамики энергозатрат на СДА при дозе «Пионифит» экстракта сухого 100 мг/кг от контрольной кривой*

*по оси абсцисс – время с начала опыта в десятках минут; по оси ординат – магнитуды отклонений пиковых энергозатрат животных в опытной группе от аналогичного показателя в контрольной, в условных единицах; точками обозначены оценки средних значений групп, усами – верхний и нижний 95 % доверительные интервалы.

В результате исследования установлено, что «Пионифит» экстракт сухой не вызывает интенсивного дозозависимого подавления двигательной активности, что позволяет констатировать безопасность и «мягкий» по отношению к психомоторным функциям ЦНС тип действия.

6.2. Исследование эффективности препаратов на основе пиона садовых сортов

Доклинические исследования эффективности «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» включают в себя изучение специфической фармакологической активности. Исходя из установленного химического состава «Пионифит» экстракта сухого исследовали противовоспалительное действие препаратов пиона. С целью установления фармакологической эквивалентности препаратов пиона садовых сортов и препаратов пиона уклоняющегося изучали анксиолитическую активность.

6.2.1. Изучение противовоспалительной активности

Исследования противовоспалительной активности «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» выполнялись с использованием лабораторных крыс стока линии Wistar массой 200 – 250 г. Животные разделялись на 6 групп по 6 особей: контрольная группа, четыре экспериментальные группы, группа сравнения.

Для изучения противовоспалительной активности препаратов пиона выбраны дозы 25 мг/кг и 125 мг/кг.

При подборе доз руководствовались рекомендуемой суточной дозой пиона уклоняющегося экстракта для человека (300 мг). Доза, эквивалентная для лабораторных крыс, составила 25 мг/кг.

В результате ранее выполненных исследований установлено содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в «Пионифит» экстракте сухом 5,27 – 5,83%. При применении дозы «Пионифит» экстракта сухого 125 мг/кг (доза, эквивалентная для человека 800 мг) концентрация флавоноидов составляет 1,32 – 1,46 мг/мл. При этом следует учесть, что в «Пионифит» экстракте сухом

содержатся другие потенциальные противовоспалительные агенты – монотерпеновые гликозиды.

В качестве препарата сравнения выбран настой ромашки. Согласно литературным данным основными противовоспалительными агентами ромашки аптечной являются флавоноиды, содержание которых в сырье составляет 1,54 – 2,11% [9] (концентрация в настое 1,54 – 2,11 мг/мл), что сопоставимо с вводимой дозой «Пионифит» экстракта сухого.

Навеску экстракта сухого и ПЛ растворяли в воде и вводили перорально – при помощи атравматического зонда.

Настой ромашки аптечной, используемый в качестве эталона, вводили в том же объеме аналогичным способом. Контрольной группе в том же объеме и тем же способом вводили физиологический раствор.

Противовоспалительную активность оценивали через 1, 3 и 5 часов после введения каррагенина по торможению отека в результате измерения объема лапы. Результаты представлены в таблице 56.

Таблица 57 – Результаты исследования противовоспалительной активности «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» при остром воспалении конечности у крыс

	Показатели					
	Прирост объёма конечности, %	Угнетение отека, %	Прирост объёма конечности, %	Угнетение отека, %	Прирост объёма конечности, %	Угнетение отека, %
1	2	3	4	5	6	7
Время измерения, мин	60		180		300	
Контроль	31,8±1,4	–	135,1±2,5	–	163,7±4,0	–
Группа сравнения (настой ромашки)	30,5±1,3	4,1	63,1±1,8*	53,3*	123,0±1,1	24,8
«Пионифит» экстракт 25 мг/кг	23,5±1,2	26,1	60,6±1,1**	55,1**	104,2±13,2*	36,3*

1	2	3	4	5	6	7
«Пионифит» экстракт 125 мг/кг	25,9±2,0	18,5	109,6±3,8	18,8	121,1±22,0*	26,0*
ПЛ «Пионифит» 25 мг/кг	24,3±1,0	23,6	60,0±1,4**	55,6**	111,8±11,4*	31,7*
ПЛ «Пионифит» 125 мг/кг	26,4±1,3	17,0	110,4±4,8	18,3	118,1±14,9*	27,9*

*изменение достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$)

**изменение достоверно относительно эталона ($p \leq 0,05$)

Данные, представленные в таблице, показывают, что в группе сравнения статистически значимое торможение отека наблюдалось через 3 часа после введения каррагинина. В экспериментальных группах значимое уменьшение объема отека наблюдалось через 3 и 5 часов после введения каррагинина для дозовой группы 25 мг/кг и через 5 часов – для дозовой группы 125 мг/кг.

При введении «Пионифит» экстракта сухого в дозе 25 мг/кг торможение отека составило 55,1%, ПЛ «Пионифит» – 55,6%. Введение данной дозы препаратов пиона садовых сортов вызывало статистически значимое торможение отека ($p < 0,05$) относительно контрольной группы и группы сравнения через 3 часа после введения каррагинина [66].

Результаты изучения противовоспалительной активности «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» показывают, что противовоспалительный эффект данных препаратов в дозе 25 мг/кг сопоставим с эффектом настоя ромашки и при этом обладает большей длительностью и амплитудой.

5.2.2. Изучение анксиолитического действия

Для оценки анксиолитической активности «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» использовали следующие методы исследования:

- Приподнятый крестообразный лабиринт;
- Темная камера с отверстиями.

Исследования проводились на белых крысах-самцах линии Wistar массой 200 – 250 г в условиях субхронического опыта. Животные были разделены на четыре группы по 6 особей в каждой: две экспериментальные группы, группа сравнения и контрольная группа.

Препаратом сравнения при изучении анксиолитического действия препаратов пиона садовых сортов выбран «Пиона экстракт, таблетки покрытые оболочкой 150 мг» (производитель: ЗАО «Вифитех»; серия: 050915), содержащий в качестве активного компонента экстракт из травы, корневищ и корней пиона уклоняющегося сухой, который обладает выраженным снотворным эффектом и применяется для коррекции невротических состояний [86, 103]. Высшая суточная доза для человека составляет 600 мг. Доза для крыс с учетом коэффициента межвидового пересчета ($k=5,9$) составила 50 мг/кг. Таблетки измельчали, затем навеску растворяли в воде и вводили перорально при помощи атравматического зонда. Навески «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» растворяли в воде и вводили перорально в дозе 50 мг/кг. Контрольной группе в том же объеме и тем же способом вводили физиологический раствор.

Анксиолитический эффект препаратов пиона оценивали в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» по времени нахождения в открытых и закрытых рукавах, а также на центральной площадке. Двигательная активность оценивалась по числу заходов в открытые и закрытые рукава и по вертикальным стойкам.

Результаты, полученные в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», приведены в таблице 57.

Таблица 58 – Результаты изучения анксиолитического действия препаратов пиона в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Группа	Двигательная активность		Время нахождения животного в отсеке, сек		
	Количество вертикальных стоек	Количество заходов	Закрытый рукав	Открытый рукав	Центр
Контроль	5,0±0,8	22,8±0,7	166,3±0,4	34,7±0,1	38,5±0,1
Пиона уклоняющегося экстракт 50 мг/кг (группа сравнения)	13,6±0,5*	27,0±0,7	199,5±0,7	22,8±0,1	29,8±0,1
«Пионифит» экстракт 50 мг/кг	13,2±0,6*	25,7±0,9	198,0±0,7	26,7±0,1	21,7±0,1
ПЛ «Пионифит» 50 мг/кг	12,9±0,5*	24,9±1,1	184,0±0,5	27,9±0,1	23,4±0,1

*изменение достоверно относительно контроля тест Манна-Уитни ($p \leq 0,05$)

Данные, представленные в таблице, показывают, что у животных исследуемых групп и группы сравнения возросла двигательная активность. Изменения значимы ($p \leq 0,05$) относительно контроля. Между исследуемыми группами и группой сравнения статистически значимых различий нет.

С целью изучения поведения грызунов в условиях свободного выбора комфортных условий проводили тест «Темная камера с отверстиями». Для оценки анксиолитического действия «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» регистрировали латентное время и число заглядываний в верхнее и боковое отверстия, число полувыходов. Результаты представлены в таблице 58.

Таблица 59 – Результаты изучения анксиолитического действия препаратов пиона в тесте «Темная камера с отверстиями»

Группа	Верхнее отверстие		Боковое отверстие		Полувыход	
	Первое заглядывание, сек	Общее число	Первое заглядывание, сек	Общее число	Первый полувыход, сек	Общее число
Контроль	80,7±0,9	7,2±0,4	33,5±0,3	4,3±0,3	56,8±0,8	1,0±0,1
Пиона уклоняющегося экстракт 50 мг/кг (группа сравнения)	32,3±0,5*	12,5±0,2*	14,7±0,2*	8,8±0,1*	33,8±0,6	2,2±0,1
«Пионифит» экстракт 50 мг/кг	22,0±0,4*	14,8±0,2*	11,5±0,2*	9,0±0,1*	55,3±0,8	1,7±0,1
ПЛ «Пионифит» 50 мг/кг	23,3±0,5*	13,4±0,2*	12,8±0,2*	8,5±0,1*	51,1±0,6	2,1±0,1

*изменение достоверно относительно контроля тест Манна-Уитни ($p \leq 0,05$)

Данные теста «Темная камера с отверстиями» показывают, что в исследуемых группах и группе сравнения возросло общее число заглядываний в отверстия, а латентное время первого заглядывания уменьшилось. Изменения относительно контроля значимы ($p \leq 0,05$), между исследуемыми группами и группой сравнения статистически значимых различий нет [31].

Данные, полученные в проведенных тестах, свидетельствуют об уменьшении тревожности крыс в условиях стрессовых ситуаций. Исходя из этого можно судить об эквивалентном анксиолитическом действии «Пионифит» экстракта сухого, ПЛ «Пионифит» и пиона уклоняющегося экстракта.

Выводы по главе 6

1. Установлено отсутствие токсических эффектов и нейротоксической активности «Пионифит» экстракта сухого. ЛД₅₀ «Пионифит» экстракта сухого – более 1000 мг/кг.
2. Подтверждена безопасность «Пионифит» экстракта сухого по отношению к психомоторным функциям ЦНС: результаты исследования влияния экстракта на спонтанную двигательную активность показывают отсутствие интенсивного дозозависимого подавления двигательной активности животных.
3. Доказано антиэкссудативное действие «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» в дозе 25 мг/кг и 125 мг/кг сопоставимое с настоем ромашки аптечной, но отличающееся большей длительностью и амплитудой при введении в дозе 25 мг/кг.
4. Установлено наличие анксиолитического действия «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Темная камера с отверстиями».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате морфолого-анатомического исследования травы пиона уклоняющегося и травы пиона садовых сортов установлены идентичные морфолого-анатомические признаки. Установлено содержание основных групп биологически активных веществ: флавоноидов в пересчете на рутин в траве пиона уклоняющегося $3,69 \pm 0,15\%$, в траве пиона садовых сортов – от $3,15 \pm 0,12$ до $3,59 \pm 0,17\%$; монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин в траве пиона уклоняющегося $6,15 \pm 0,30\%$, в траве пиона садовых сортов – от $5,83 \pm 0,29\%$ до $7,81 \pm 0,38\%$; пеонифлорина в траве пиона уклоняющегося $0,103 \pm 0,004\%$, в траве пиона садовых сортов от $1,190\% \pm 0,010$ до $1,214 \pm 0,010\%$.
2. Подобраны оптимальные условия экстракции травы пиона садовых сортов, позволяющие извлечь $98,54\%$ суммы флавоноидов и $99,14\%$ суммы монотерпеновых гликозидов от общего содержания в сырье. Разработана технологическая схема получения «Пионифит» экстракта сухого.
3. Разработаны методики качественного анализа и количественного определения биологически активных веществ в пиона садовых сортов траве и «Пионифит» экстракте сухом. Установлено содержание основных групп биологически активных веществ в «Пионифит» экстракте сухом: флавоноидов в пересчете на рутин $5,27 - 5,83\%$, монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин $12,18 - 13,71\%$, пеонифлорина $1,53 \pm 0,03\%$.
4. В результате проведенных органолептических, реологических и биофармацевтических исследований разработан состав и технология пленок лекарственных «Пионифит». Установлено содержание основных групп БАВ на 1 дозу ПЛ: флавоноидов в пересчете на рутин $2,350 \pm 0,056$ мг, монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин $6,430 \pm 0,208$ мг, пеонифлорина $0,725 \pm 0,008$ мг. Определены физико-химические параметры ПЛ «Пионифит»: описание, однородность массы, толщина, время растворения, pH водного раствора, потеря в массе при высушивании.

Данные показатели подтверждают доброкачественность разработанного состава и позволяют контролировать качество лекарственной формы в процессе изготовления и хранения.

5. Исследованы условия и сроки хранения «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит». Определен срок хранения «Пионифит» экстракта сухого 2 года при температуре не выше 25 °С и относительной влажности воздуха не более 60±5%. Установлена стабильность ПЛ «Пионифит» в течение 1 года при хранении при температуре 15 – 25 °С и относительной влажности не более 60±5%.
6. Установлено, что «Пионифит» экстракт сухой относится к IV классу (малотоксичный препарат) согласно классификации токсичности по Hodge и Sterner. Доказано наличие противовоспалительной активности «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» в дозах 25 мг/кг и 125 мг/кг на модели каррагенинового отека. Подтверждено анксиолитическое действие «Пионифит» экстракта сухого и ПЛ «Пионифит» в дозе 50 мг/кг в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Темная камера с отверстиями».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NaКМЦ – натрий карбоксиметилцеллюлоза

БАВ – биологически активные вещества

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЛП – глазные лекарственные пленки

ГСО – государственный стандартный образец

ГФ – государственная фармакопея

ГХ–МС – газовая хроматография с масс–селективной детекцией

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

МАП – мукоадгезивный полимер

МЦ – метилцеллюлоза

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ОФС – общая фармакопейная статья

ПВС – поливиниловый спирт

ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт

ПЛ – пленки лекарственные

СДА – спонтанная двигательная активность

СЛП – стоматологические лекарственные пленки

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовый свет

ФГБОУ ВО ПГНИУ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный научно-исследовательский университет»

ФГБОУ ВО ПФА – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФС – фармакопейная статья

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарова, О. В. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия / О. В. Азарова, Л. П. Галактионова // Химия растительного сырья. – 2012. – № 4. – С. 61 – 78.
2. Алексеева, И. В. Обоснование состава и технологии пленок лекарственных с анилокаином / С. Л. Алексеева, Т. Е. Рюмина // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12. – С. 158 – 163.
3. Ананьев, В. Н. Лекарственные желатиновые пленки в медицине / В. Н. Ананьев // Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке. – 2010. – № 1. – С. 33 – 35.
4. Андреева, Н. А. Маркетинговый анализ рынка лекарственных препаратов седативного действия / Н. А. Андреева, О. Г. Ивченко, Т. И. Кабакова // Фармацевтические науки – 2011. – № 10 – С. 604 – 607.
5. Антигипоксические свойства сухого экстракта *Raeonia Anomala* / Р. С. Романова [и др.] // Вестник Бурятского государственного университета. – 2014. – № 12. – С. 27 – 29.
6. Ассортимент и характеристики трансмукозальных лекарственных форм (ассортимент лекарственных пленок) / Н. В. Шестаков [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 2 (19). – С. 96 – 101.
7. Белянин, М. Л. Биологически активные вещества природного происхождения / М. Л. Белянин. – Томск: Изд-во Томск. политех. ун-та, 2010. – 144 с.
8. Блинова, О. А. Теоретические и экспериментальные аспекты создания лекарственных средств на основе сырья природного происхождения: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук: 15.00.01. / Блинова О. А. – Пермь, 2009. – 43 с.
9. Бубенчикова, В. Н. Разработка методик качественного и количественного определения флавоноидов в сырье ромашки аптечной / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Кондратова // Кубан. науч. мед. вестник. – 2006. – № 10. – С. 19 – 20.

10. Быстрорастворимые пленки – инновационный способ доставки лекарственных средств / А. С. Егорова [и др.] // Вестник РУДН: Серия Медицина. – 2013. – № 3. – С. 100 – 104.
11. Васильев, А. С. Краткий анализ современных технологий экстракции и основных факторов, влияющих на процесс экстракции / А. С. Васильев, Ю. В. Суханов // Экономическая наука сегодня: теория и практика: сб. материалов IX Междунар. науч.-практ. конф. – Чебоксары, 2018. – С. 28 – 31.
12. Васильева, М. Ю. Методические указания по первичному сортоизучению травянистого пиона / М. Ю. Васильева. – Ленинград : Изд-во ВИР, 1972. – 26 с.
13. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е. А. Краснов [и др.]; под ред. Е. Е. Сироткиной. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1987. – 184 с.
14. Голиков, К. А. Лучшие пионы для Подмосковья / К. А. Голиков // Цветоводство. – 2002. – № 5. – С. 36 – 39.
15. ГОСТ 33216–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. – Введ. 2016–07–01. – Москва: Стаднартинформ, 2016. – 9 с.
16. ГОСТ Р 50258–92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. – Введ. 1994–01–01. – Москва: Госстандарт России, 1992. – 7 с.
17. Государственная Фармакопея Республики Беларусь. – Т II. – 2007. – 471 с.
18. Государственная Фармакопея РФ [Электронный ресурс]. – 13-е изд. – Москва, 2015. – Т. 1. – 1470 с. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1_html/HTML/
19. Государственная Фармакопея РФ [Электронный ресурс]. – 13-е изд. – Москва, 2015. – Т. 2. – 1004 с. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/

20. Государственная Фармакопея РФ [Электронный ресурс]. – 13-е изд. – Москва, 2015. – Т. 3. – 1294 с. – Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/
21. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
22. Дайнека, В. И. ВЭЖХ в исследовании флавоноидов. Определение Рутина / В. И. Дайнека, А. М. Григорьев, В. М. Староверов // Хим. –фарм. журн. – 2004. – № 9. – С. 23 – 25.
23. Дикевич, Е. А. Применение препаратов растительного происхождения в лечении соматоформных расстройств / Е. А. Дикевич, Д. М. Иванова // Рус. мед. журн. – 2008. – № 26.— С. 1801 – 1804.
24. Дикорастущие лекарственные растения Урала: учебное пособие / Е. С. Васфилова [и др.] – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. – 204 с.
25. Дубашинская, Н. В. Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация (часть II) / Н. В. Дубашинская, О. М. Хишова, О. М. Шимко // Вестник фармации. – № 2 (36). – 2007. – С. 1 – 10.
26. Ерофеева, Л. Н. Лекарственные пленки. История и современность / Л. Н. Ерофеева // Университетская наука: взгляд в будущее: Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2018. – С. 52 – 57.
27. Ефимов, С. В. Род *Raeonia* L. Современные направления интродукции и методы оценки декоративных признаков: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05 / Ефимов С. В. – Москва, 2008. – 24 с.
28. Жезняковская, Л. Ф. Стоматологические пленки на основе растительных экстрактов / Л. Ф. Жезняковская, Д. Г. Долинина, Л. Б. Оконенко // Фармация. – 2012. – № 7. – С. 35 – 37.
29. Изучение аптечного ассортимента фитопрепаратов / О. А. Русакова [и др.] // Фармация и фармакология. – 2015. – № 6 (13). – С. 54 – 59.

30. Изучение флавоноидов экстракта пиона садового сухого / Н. И. Накарякова [и др.] // Вестник ПГФА. – 2015. – № 15. – С. 186 – 188.
31. Исследование анксиолитического действия экстракта пиона садового сухого / Н. И. Накарякова [и др.] // Инновационные технологии в фармации: Материалы Всерос. науч.–практ. конф. с междунар. участием, посвящ. памяти доц. Пешковой В. А. – Иркутск: ИГМУ, 2018. – Вып. 5. – С. 272 – 276.
32. Исследование качественного и количественного состава флавоноидных соединений густого экстракта первоцвета лекарственного / Г. М. Латыпова [и др.] // Химия раст. сырья. – 2009. – № 4. – С. 113 – 116.
33. Исследование острой токсичности пиона садового экстракта сухого / Н. И. Накарякова [и др.] // Вестник ПГФА. – 2015. – № 16. – С. 81 – 82.
34. Исследование по созданию новых лекарственных средств на основе травы пиона садового / М. М. Смирнова [и др.] // Биофарм. журн. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 9 – 12.
35. Кабакова, Т. И. Результаты социологического опроса потребителей седативных препаратов безрецептурного отпуска / Т. И. Кабакова, Н. А. Андреева, Е. А. Попова // Фарм. науки. – 2011. – № 11 – С. 202 – 207.
36. Кадацкая, Д. В. Перспективные антидепрессанты растительного происхождения / Д. В. Кадацкая // Разработка, исследование и маркетинг ново фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Пятигорск: Пятигор. гос. фарм. акад., 2005. – Вып. 60. – С. 348 – 350.
37. Калимуллина, З. Р. Разработка состава пленок лекарственных с экстрактом пиона садового сухим / З. Р. Калимуллина, Т. Е. Рюмина, Н. И. Накарякова // Вестник ПГФА. – 2017. – № 19. – С. 157 – 158.
38. Киселева, К. В. Флора средней полосы России. Атлас-определитель / К. В. Киселева, С. Р. Майоров, В. С. Новиков. – Москва: Фитон+, 2010. – 544 с.
39. Королева Л. Р. Фитотерапия при невротических расстройствах/ Л. Р. Королева, А. В. Покровская / Рос. мед. журн. – 2004. – № 4 – С. 26 – 29.

40. Красная книга Алтайского края / О. В. Александрова [и др.]; под ред. Р. В. Камелина. – Барнаул: ОАО «ИПП «Алтай», 2006. – 262 с.
41. Красная книга Архангельской области / под ред. А. П. Новоселова [и др.]. – Архангельск: Ком. по экологии Архангельск. обл., 2008. – 351 с.
42. Красная книга Казахской ССР. Ч. 2. Растения / под ред. Б. А. Быкова. – Алма-ата: Наука, 1981. – 263 с.
43. Красная книга Кировской области: животные, растения, грибы. – Изд. 2-е / под ред. О. Г. Барановой [и др.]. – Киров: Киров. обл. тип., 2014. – 336 с.
44. Красная книга Курганской области / под ред. В. Н. Болшакова – Изд. 2-е. – Курган: Изд-во Курган. гос. ун-та, 2012. – 448 с.
45. Красная книга Пермского края / под ред. А. И. Шепеля. – Пермь: Книжный мир, 2008. – 256 с.
46. Красная книга Республики Башкортостан: в 2 т. Т. 1: Растения и грибы / под ред. Б. М. Миркина. – Уфа: МедиаПринт, 2011. – 384 с.
47. Красная книга Республики Коми [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ib.komisc.ru>. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 28.08.2018).
48. Красная книга Среднего Урала: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений / под ред. В. Н. Большакова, П. Л. Горчаковского. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 1996. – 279 с.
49. Красная книга Тюменской области. – Режим доступа: <http://краснаякнига.игс.рф>.
50. Красная книга Ханты-Мансийского автономного округа – Югры: животные, растения, грибы / отв. ред. А. М. Васин, А. Л. Васина. – Изд. 2-е. – Екатеринбург: Баско, 2013. – 460 с.
51. Красная книга Челябинской области [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://igz.ilmeny.ac.ru>. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 28.08.2018).
52. Красная книга Ямало-Ненецкого автономного округа: животные, растения, грибы / отв. ред. С. Н. Эктова, Д. О. Замятин. – Екатеринбург: Баско, 2010. – 308 с.

53. Куркин, В. А. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений / В. А. Куркин, А. В. Куркина, Е. В. Авдеева // Фарм. науки. – 2013. – № 11. – С. 1897 – 1901.
54. Лавренов, В. К. Современная энциклопедия лекарственных растений / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова – Москва: ОЛМА Медиа Групп, 2007. – 272 с.
55. Лекарственные растения Сибири / А. В. Положий [и др.]; под ред. А. В. Положий. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1995. – 325 с.
56. Литвиненко, Т. Н. Перспективы использования полимерных пленок для лечения воспалительных заболеваний мочеполовой системы у женщин / Т. Н. Литвиненко // Запорожский медицинский журнал – 2014. – № 2. – С. 115 – 117.
57. Малин, Д. И. Побочное действие психотропных средств / Д. И. Малин – Москва: Вузов. кн., 2000. – 208 с.
58. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 14 изд., перераб., испр., и доп. – Москва: Новая Волна, 2002. – 540 с.
59. Методика М 04-64-2010. Продукты пищевые и сырье продовольственное, корма, комбикорма и сырье для их производства. Методика измерений массовой доли кадмия, свинца, мышьяка, ртути, хрома, олова методом атомно-абсорбционной спектроскопии с использованием атомно-абсорбционного спектрометра с электротермической атомизацией модификаций МГА-915, МГА-915М, МГА-915МД. – Санкт-Петербург, 2010. – 37 с.
60. Методические рекомендации. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. – Москва: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.
61. Мизина, П. Г. Биоадгезия. Методы определения / П. Г. Мизина // Хим.–фарм. журн. – 2001. – № 10. – С. 27 – 29.
62. Миназова, Г. И. Тонкослойная хроматография в анализе природного сырья / Г. И. Миназова // Башкир. хим. журн. – 2010. – Т. 17, № 5. – С. 105 – 107.

63. Минина, С. А. Химия и технология фитопрепаратов / С. А. Минина, И. Е. Каухова. – Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 560 с.
64. Миронова, Л. А. Пионы. Достижения отечественных селекционеров / Л. Н. Миронова, А. А. Реут // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2013. – № 2. – С. 349 – 358.
65. Мнацаканян, В. А. Иридоидные гликозиды / В. А. Мнацаканян. – Ереван: Изд-во АН АрмССР, 1986. – 187 с.
66. Накарякова, Н. И. Исследование противовоспалительной активности экстракта пиона садового сухого / Н. И. Накарякова, М. М. Смирнова, А. И. Андреев // Сеченовский Вестник. – 2018. – № 2(32). – С. 63 – 66.
67. Накарякова, Н. И. Исследование состава экстракционных препаратов пиона садового методом ГХ–МС / Н. И. Накарякова, П. С. Мащенко, М. М. Смирнова // Вестник ПГФА. – 2016. – № 18. – С. 20 – 23.
68. Накарякова, Н. И. Разработка пленок лекарственных с экстрактом пиона садового сухим / Н. И. Накарякова, М. М. Смирнова, О. А. Олешко // Вестник ПГФА. – 2017. – № 20. – С. 190 – 192.
69. Новый подход к созданию материалов с контролируемым выделением лекарственного вещества / Н. Р. Кильдеева [и др.] // Вестник Моск. ун-та. – 2000. – № 6(41). – С. 423 – 425.
70. Ножкина, Н. Н. Обоснование состава стоматологической лекарственной пленки пролонгированного действия с кислотой янтарной и цетилпиридиния хлоридом / Н. Н. Ножкина, Е. В. Симонян, А. И. Синицкий // Сборник материалов IV Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Здоровье нации». – 2016. – С. 459 – 462.
71. Носаль, М. А. Лекарственные растения в народной медицине / М.А. Носаль, И. М. Носаль. – Москва: Внешиберики, 1991. – 256 с.
72. Обзор российского рынка лекарственных трав и сборов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.marketcenter.ru/content/doc-2-10792.html>. – (дата обращения 18.07.2018).

73. Определение суммы флавоноидов в траве пиона / М. М. Смирнова [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 12. – С. 164 – 168.
74. Основные подходы к стандартизации пленок лекарственных [Электронный ресурс] / А. Л. Голованенко [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – № 2. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru>. – (Дата обращения: 28.08.2018).
75. Особенности фармацевтической разработки лекарственных средств на основе растительных субстанций / О. И. Езерская [и др.] // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр.* – Пятигорск: Пятигор. мед.-фарм. ин-т-филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 2015. – Вып. 70. – С. 109 – 112.
76. Плетнева, И. В. Разработка технологии лекарственной полимерной пленки, содержащей настойку эвкалипта / И. В. Плетнева, В. О. Фомиченко, Н. В. Голованенко // *Современная фармация: проблемы и перспективы развития*. – 2015. – С. 218 – 221.
77. Полуэктов, Н. С. Методы анализа по фотометрии пламени / Н. С. Полуэктов. – 2 изд. – Москва: Химия, 1967. – 307 с.
78. Правила сбора и сушки лекарственных растений: сб. инструкций. – Москва: Медицина, 1985. – 328 с.
79. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корокульник [и др.]. – Новосибирск: Академ. из-во «ГЕО», 2007. – 229 с.
80. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в экстракте пиона садового сухом / Н. И. Накарякова [и др.] // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*. – 2018. – Т. 21, № 4. – С. 3 – 7.
81. Разработка технологии пленок лекарственных реминерализующего действия / А. Л. Голованенко [и др.] // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2017. – № 6. – С. 138 – 141.
82. Растения. Красная книга Свердловской области [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://semantic.uraic.ru>. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 28.08.2018).

83. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая управления) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://fp.crc.ru/gosregfr>.
84. Реут, А. А. Исследование элементного и аминокислотного состава растительного сырья некоторых представителей рода *Paeonia* L. / А. А. Реут, Л. Н. Миронова // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2013. – Т. 48. – С. 200 – 203.
85. Реут, А. А. Пионы. Биология и размножение. / А. А. Реут, Л. Н. Миронова. – Saarbrücken: LAP LAMBER Academic Publishing, 2012. – 201 с.
86. Род *Paeonia* (Paeoniaceae) в России и на сопредельных территориях: ревизия с использованием методов кариосистематики и молекулярной систематики / Е. О. Пунина [и др.] // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: материалы Всерос. конф. – Петрозаводск, 2008. – С. 68 – 71.
87. Романова, Р. С. Психотропное действие сухого экстракта *Paeonia anomala* L. / Р. С. Романова, А. Г. Мондодоев, Л. Н. Шантанова // Вестник Бурят. гос. ун-та. – 2014. – № 12. – С. 112 – 114.
88. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / под ред. Н. В. Юргеля [и др.]. – Москва: Спорт и культура – 2000, 2007. – 192 с.
89. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии: Учебное пособие / под ред. И. А. Самылиной, А. А. Сорокиной. – Москва: Мед. информ. агентство, 2007. – 672 с.
90. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – Москва: Фед. центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 240 с.
91. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А. Н. Миронова. – Ч. 1. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.
92. Рюмина, Т. Е. Использование кондуктометрического метода анализа в фармакокинетических исследованиях биорастворимых лекарственных

- пленок «Крона» / Т. Е. Рюмина, Л. Н. Олешко, О. А. Блинова // Фармация. – 2001. – № 3. – С. 22 – 24.
93. Савиных, Н. П. Особенности биологии и экологии *Raeonia anomala* L. на территории Кировской области / Н. П. Савиных, О. Н. Пересторонина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – № 1(9). – С. 2288 – 2290.
94. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / А. В. Булатов [и др.] // Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 358 – 362.
95. Сравнительное изучение пиона уклоняющегося и пиона садового / Н. И. Накарякова [и др.] // Фундам. исследования. – 2014. – № 11. – С. 372 – 376.
96. Стандартизация лекарственных форм на основе растительного сырья корневищ с корнями валерианы, травы пустырника и плодов боярышника / О. М. Хишова [и др.] // Хим.–фарм. журн. – 2004. – Т. 38, № 2. – С. 37 – 40.
97. Стукалова, Л. А. Лекарственные растения в психиатрии / Л. А. Стукалова, С. Н. Боков. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1991. – 88 с.
98. Успенская, М. С. Пионы / М. С. Успенская. – Москва: Фитон +, 2002. – 208 с.
99. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения: учеб. пособие / Г. П. Яковлев [и др.]; под ред. Г. П. Яковлева. – 2-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010. – 863 с.
100. ФС 42-531-98. Корневища и корни пиона уклоняющегося *Rhizomata et radices Raeoniae anomale*. Взамен ФС 42-531-72; введ. 09.12.1998. – Москва: МЗ РФ Фармакопейный государственный комитет, 2000. – 16 с.
101. ФС 42-99-98. Трава пиона уклоняющегося *Herba Raeoniae anomalae*. Взамен ФС 42-99-72; введ. 09.12.1998. – Москва: МЗ РФ Фармакопейный государственный комитет, 2000. – 15 с.
102. Харенко, Е. А. Мукоадгезивные лекарственные формы: количественная оценка взаимодействия пленок из синтетических и

- природных полимеров со слизистой тканью / Е. А. Харенко, Н. И. Ларионова, Н. Б. Демина // Хим.-фарм. журн. – 2008. – № 7. – С. 17 – 24.
103. Цыдендамбаев, П. Б. Биологические эффекты флавоноидов / П. Б. Цыдендамбаев, Б. С. Хышиктуев, С. М. Николаев // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 6 (52). – С. 229 – 233.
 104. Шантанова, Л. Н. Исследование снотворного действия сухого экстракта пиона уклоняющегося / Л. Н. Шантанова, А. Г. Мондодоев, Р. С. Романова // Бюл. ВСНЦ СО РАМН – 2012. – № 6 (88). – С. 173 – 175.
 105. Шаяхметов, И. Ф. Поиск альтернативных продуцентов вторичных метаболитов растения *Paeonia Anomala* L. в связи с сохранением биологического разнообразия природных фитоценозов / И. Ф. Шаяхметов, З. М. Баширова // Вестник ОГУ. – 2009. – № 6. – С. 429 – 430.
 106. Ahmad, F. Medicinal uses and phytoconstituents of *Paeonia Officinalis* / F. Ahmad, N. Tabassum, S. Rasool // International research journal of pharmacy. – 2012. – № 3. – P. 85 – 86.
 107. Application of novel HPLC method to the analysis of regional and seasonal variation of the active compounds in *Paeonia lactiflora* / Namsoo Kim [et al] // Food Chemistry. – 2006. – № 96. – P. 496 – 502.
 108. Bianco, A. The chemistry of iridoids / A. Bianco // Studies in Natural Products Chemistry. – 1990. – Vol. 7. – P. 439 – 497.
 109. Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments / Rosa Tundis [et al] // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. – 2008. – № 8. – P. 399 – 420.
 110. Boullata, J. I. Safety Issues with Herbal Medicine / J. I. Boullata, A. M. Nace // Pharmacotherapy. – 2000. – № 20(3). – P. 257 – 269.
 111. Chunhua Zhou. Hrbaceous Peony as an alternative Source of Oleanolic and Ursolic Acids / Chunhua Zhou, Ying Zhang, Yanle Sheng // International Journal of molecular Sciences. – 2011. – № 12. – P. 655 – 667.
 112. Dinda, B. Monoterpenes: Iridoids / B. Dinda, S. Debnath // Natural Products. – Springer Berlin Heidelberg, – 2013. – P. 3009 – 3067.

113. European pharmacopoeia 7.0. – 2010. – Vol. 1. – 1211 p.
114. Hong, D. Y. Peonies of the world. Pt. 2 : Polymorphism and diversity / D. Y. Hong. – London: Kew Publ., 2011. – 112 p.
115. Irwin, S. Comprehensive observational assessment. Ia. A. Systematic quatitative procedure for assesing the Behavioural and physiologic state of the mouse / S. Irwin // *Psychopharmacologia (Berl.)*. – 1968. –Vol. 13. – P. 222 – 257.
116. Irwin, S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals / S. Irwin // *Animal and Clinical Pharmacologic Techniques in drug evaluation*. Chicago: Year Book Medical. – 1964. – P. 36 – 54.
117. Japan Pharmacopeya. – 16th ed. – 2011. – 2326 p.
118. Javier O.Morales. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films / Javier O.Morales, Jason T.McConville // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2011. – Vol. 77, № 2. – P. 187 – 199.
119. Jong-Su Yoo. Quantitative analysis of paeoniflorin from *Paeonia lactiflora* using H-NMR/ Jong-Su Yoo, Myoung-Chong Song, Un-Mi Ahn // *Natural product Sciences*. – 2006. – № 12. – P. 237 – 240.
120. Keiichi Tabata. Paeoniflorin, a major constituent of Peony Root, reverses muscarinic M₁-receptor antagonist-induced suppression of long-term potentiation in the rat hippocampal slice / Keiichi Tabata, Kinzo Matsumoto, Hitoshi Watanabe // *Japanese journal of pharmacology*. – 2000. – № 83. – P. 25 – 30.
121. Kok Khiang Peh. Polymeric Films as Vehicle for Buccal Delivery: Swelling, Mechanical, and Bioadhesive Properties / Kok Khiang Peh, hoy Fun Wong // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 1999. – № 2. – 53 – 61.
122. Liang, Z. T. Determination of iridoid glucosides for quality assessment of *Herba Oldenlandiae* by high-performance liquid chromatography / Z. T. Liang [et al] // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. – 2006. – Vol. 54. – №. 8. – P. 1131 – 1137.

123. Ni Jia. Identification and characterization of anthocyanins by High-performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry in Herbaceous Peony Species / Ni Jia, Qing-Yan Shu, Dan-Hua Wang // *Journal of the American society for horticultural science*. – 2008. – № 133. – P. 418 – 426.
124. Orally fast dissolving films: innovations in formulation and technology / Bhupinder Bhyan [et al] // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. – 2011. – Vol. 9, № 2. – P. 50 – 57.
125. Paeoniflorin attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease by activation of adenosine A₁ receptor / Hua-Qing Liu [et al] // *British Journal of Pharmacology*. – 2006. – № 148. – P. 314 – 325.
126. Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers / Jian-Hwa Guo [et al] // *Pharmaceutical Science and Technology Today*. – 1998. – Vol. 1, № 6. – P. 254 – 261.
127. Pharmaceutical significance of cellulose: A review / S. Kamel [et al] // *eXPRESS Polymer Letters*. – 2008. – Vol. 2, № 11. – P. 758 – 778.
128. Pharmacokinetics of Paeoniflorin After Oral Administration of Shao-yao Gan-chao Tang in Mice / Lih-Chi Chen [et al] // *The Japanese Journal of Pharmacology*. – 2002. – № 88. – P. 250 – 255.
129. Rilka Taskova. HPLS of Iridoids / Rilka Taskova, Tetsuo Kokubun, Kalina Alipieva // *Chromatographic Science series. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. – 2010. – Vol. 102. – P. 709 – 722.
130. Samylina, I. A. Iridoids in medicinal plants: recent approaches to standardization of raw materials and herbal medicines / I. A. Samylina, K. I. Eller, A. A. Zhogova // *The 18th international congress — Phytopharm 2014. Abstracts book*. – 2014. – Vol. 12. – P. 54.
131. Shakib, S. Individualising therapy. The right dose, dosage form, frequency and duration / S. Shakib, A. George // *Aust Fam Physician*. – 2003. – № 32 (7). – P. 504 – 507.

132. Shulkina, T. Ornamental plants from Russia and adjacent states of the former Soviet Union: a botanical guide for travelers and gardeners / T. Shulkina. – London: Kew Publ., 2004. – 175 p.
133. Tao Sang. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) / Tao Sang, Daniel J. Crawford, Tod F. Stuessy // *American Journal of Botany*. – 1997. – № 84 (9). – P. 1120 – 1136.
134. The antidepressant-like effects of paeoniflorin in mouse models / Fengmei Qiu [et al] // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2013. – № 5. – P. 1113 – 1116.
135. Tundis, R. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments // R. Tundis [et al] // *Mini-reviews in medicinal chemistry*. – 2008. – Vol. 8. – P. 399 – 420.
136. Villasenor, I. M. Bioactivities of iridoids / I. M. Villasenor // *Anti-inflammatory and anti-allergy agents in medicinal chemistry*. – 2007. – Vol. 6. – P. 307 – 314.
137. Yuh-Fung Chen. *Paeonia lactiflora* extract attenuating cerebral ischemia and arterial intimal hyperplasia is mediated by paeoniflorin via modulation of VSMC Migration and Ras/MEK/ERK Signaling Pathway / Yuh-Fung Chen, Kuo-Jen Wu, G. Gibson Wood // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2013. – 12 p.

ПРИЛОЖЕНИЯ

«УТВЕРЖДАЮ»Зам. Генерального директора
ОАО «Биохиммаш» по науке, к.м.н.

Украинцев А.Д.

«14» декабря 2016г.



АКТ
проведения апробации технологии
экстракта пиона садового сухого

В ОАО «Биохиммаш» (г. Москва) проведена апробация технологии экстракции пиона садового с получением готового продукта в виде мелкодисперсного сухого порошка по схеме лабораторного регламента, предложенного асс. Накаряковой Н.И., доц. Смирновой М.М., доц. Люст Е.Н., проф. Олешко О.А., сотрудниками кафедры фармацевтической технологии и токсикологической химии ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Апробация показала полное соответствие показателей качества экстракта требованиям проекта ФС «Экстракт пиона садового сухой», а также рациональность и воспроизводимость предложенной технологии и возможность ее использования в промышленных условиях.

Разработанный лабораторный регламент может являться основой для составления опытно-промышленного и промышленного регламента.

Нач. отдела биотехнологии
ОАО «Биохиммаш», к.т.н.
Муратов В.С.

УТВЕРЖДЕНО

Ректор ФГБОУ ВО «Пермская

государственная фармацевтическая

академия» Министерства здравоохранения

РФ

А.Ю. Турышев

«26» 2016 г.



ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ
на производство экстракта пиона садового сухого

ОПР №

Срок действия до «__» _____ 20__ г.

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ОАО «Биохиммаш»



ФКП «Армавирская биофабрика»
Производство лекарственных средств медицинского назначения
Отдел контроля качества лекарственных средств
(Лицензия № 00008-ЛС от 15.06.2015 г.)

«20» февраля 2017 года

Акт апробации

Предмет апробации: «Разработка методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в экстракте пиона садового сухом».

Кем предложено, адрес исполнителя: Н.И. Накаряковой, ассистентом кафедры фармацевтической технологии; М.М. Смирновой, доцентом кафедры фармацевтической технологии, кандидатом фармацевтических наук; Е.Н. Люст, доцентом кафедры токсикологической химии, кандидатом фармацевтических наук федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Пермский край, г. Пермь, ул. Крупской 46, (342)2825864.

Цель апробации: воспроизведение предлагаемой методики в условиях лаборатории с целью включения в проект фармакопейной статьи на экстракт пиона садового сухой.

Результат апробации: апробация предлагаемой методики определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом, в основу которой положена реакция комплексообразования с 2% раствором алюминия хлорида, в экстракте пиона садового сухого показала, что предлагаемая методика хорошо воспроизводима и может быть использована для контроля качества указанного объекта.

Заключение: представленные материалы имеют практическую значимость для фармацевтических целей.

Начальник ОКК-Уполномоченное лицо по качеству

Г.А. Никульча

Начальник производства ЛС МН-Уполномоченное лицо по производству ЛС,
к.ф.н.

В.А. Коваленко



ФКП «Армавирская биофабрика»
Производство лекарственных средств медицинского назначения
Отдел контроля качества лекарственных средств
(Лицензия № 00008-ЛС от 15.06.2015 г.)

«20» февраля 2017 года

Акт апробации

Предмет апробации: «Разработка методики спектрофотометрического определения суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин в экстракте пиона садового сухом».

Кем предложено, адрес исполнителя: Н.И. Накаряковой, ассистентом кафедры фармацевтической технологии; М.М. Смирновой, доцентом кафедры фармацевтической технологии, кандидатом фармацевтических наук; Е.Н. Люст, доцентом кафедры токсикологической химии, кандидатом фармацевтических наук федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Пермский край, г. Пермь, ул. Крупской 46, (342)2825864.

Цель апробации: воспроизведение предлагаемой методики в условиях лаборатории с целью включения в проект фармакопейной статьи на экстракт пиона садового сухой.

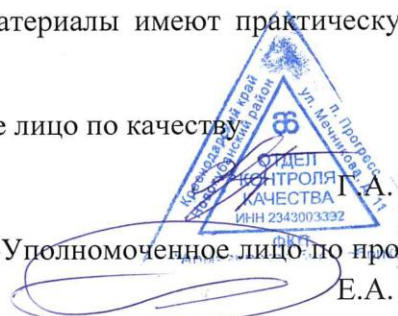
Результат апробации: апробация предлагаемой методики определения суммы монотерпеновых гликозидов в пересчете на пеонифлорин, в основу которой положена реакция со щелочным раствором гидроксилamina и 1 % раствором хлорида железа, в экстракте пиона садового сухого показала, что предлагаемая методика хорошо воспроизводима и может быть использована для контроля качества указанного объекта.

Заключение: представленные материалы имеют практическую значимость для фармацевтических целей.

Начальник ОКК-Уполномоченное лицо по качеству

Г.А. Никульча

Начальник производства ЛС МН-Уполномоченное лицо по производству ЛС,
к.ф.н. Е.А. Коваленко



Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

**Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение**

**«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

26.04.2018	024765	2018115893
<i>Дата поступления</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

Заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		
ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ (в 5-значном формате) 26 АПР 2018	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ № 024765	ВХОДЯЩИЙ № 2018115893
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
С. 011117 (регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленная национальным ведомством) ☐ (87) (номер и дата международной публикации международной заявки) ☐ (96) (номер европейской заявки и дата ее подачи) ☐ (97) (номер и дата публикации европейской заявки)	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (почтовый адрес, фамилия и инициалы или наименование адреса) 614990, Пермь, ул. Полевая 2, ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, патентный отдел Телефон: (342) 233-35-53 Факс: (342) 233-55-01 E-mail: perm@pfla.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ (заполняется при подаче заявки на секретное изобретение)	
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		
(34) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Способ переработки травы пиона садовых сортов		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (согласно удостоверяющему документу), место жительства или место нахождения, название страны и почтовый индекс) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПГФА), 614990, г. Пермь, Екатеринбургская, 101, Российская Федерация, RU. ☐ Изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: ☐ государственным заказчиком ☐ муниципальным заказчиком исполнитель работ (указать наименование) ☐ исполнителем работ по: ☐ государственному контракту ☐ муниципальному контракту заказчик работ (указать наименование) Контракт от _____ № _____		ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1025900536760 КПП 590201001 ИНН 5902291011 КОД СТРАНЫ (если он установлен) RU
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ (указывается фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) лица, назначенного заявителем своим представителем для ведения дела по подаче заявки от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности или являющегося таковым в силу закона)		☐ патентный поверенный ☐ представитель по доверенности ☐ представитель по закону

ОТД 17
28 АПР 2018
240 60 15

Сергеев

Общее количество документов в листах	32	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Сергеева Н.Н.
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу « www.fips.ru » в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

**ПЛЕНКИ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ НА ОСНОВЕ
ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ ТРАВЫ ПИОНА САДОВОГО**

Учебно-методическое пособие

Пермь, 2018

ПЛЕНКИ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ ТРАВЫ ПИОНА САДОВОГО

Учебно-методическое пособие подготовлено ассистентом кафедры фармацевтической технологии Накаряковой Н.И., доцентом кафедры фармацевтической технологии Смирновой М.М., доцентом кафедры токсикологической химии Люст Е.Н., профессором кафедры фармацевтической технологии Олешко О.А.

Учебно-методическое пособие предназначено для обучающихся по специальности «Фармация», а также слушателей ФДПО, обучающихся по дополнительной профессиональной программе повышения квалификации и профессиональной переподготовки

Пленки лекарственные на основе извлечений из травы пиона садового: учебно-методическое пособие / Н.И. Накарякова, М.М. Смирнова, Е.Н. Люст, О.А. Олешко – Пермь: ПГФА, 2018. – 28 с.

Рецензент: Березина Е.С., доцент кафедры фармацевтической химии ФДПО и ФЗО, к.фарм.н.

Утверждено и одобрено Центральным Методическим Советом ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (протокол № 6 от «15» мая 2018 г.)

**«УТВЕРЖДАЮ»**
Ректор ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава
России
_____ А.Ю. Турышев
«04» _____ 2018 г.

Акт апробации

Предмет апробации: Разработка методик контроля качества пленок лекарственных с настойкой пиона и пленок лекарственных с экстрактом пиона садового сухим по показателям «Подлинность» и «Количественное определение».

Разработчики, адрес исполнителя: ассистент кафедры фармацевтической технологии Накарякова Н.И., доцент кафедры фармацевтической технологии Смирнова М.М., к.ф.н., доцент кафедры токсикологической химии Люст Е.Н., к.ф.н., профессор кафедры фармацевтической технологии Олешко О.А., д.ф.н федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Пермский край, г. Пермь, ул. Крупской, 46.

Цель апробации: воспроизведение предлагаемых методик в условиях лаборатории с целью включения в учебно-методическое пособие «Пленки лекарственные на основе извлечений из травы пиона садового».

Результат апробации: установлено, что методики определения основных групп биологически активных веществ в пленках лекарственных являются специфичными, отличаются линейностью и прецизионностью.

Заключение: представленные материалы имеют практическую значимость для контроля качества лекарственного препарата, методики могут быть рекомендованы для включения в нормативную документацию.

Руководитель РИЦ «Фарматест»
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,
д. фарм. н., профессор



Т.Л. Малкова

УТВЕРЖДАЮ
 Директор ООО «Межбольничные аптеки»
 А.М. Недоносков
 « 08 » 2018 г.



АКТ АПРОБАЦИИ

результатов научно-исследовательской работы

в ООО «Межбольничные аптеки» проведена апробация технологии пленок лекарственных с экстрактом пиона садового сухим, разработанной сотрудниками кафедры фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» Минздрава России Накаряковой Н.И., Смирновой М.М., Олешко О.А. и кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» Минздрава России Люст Е.Н.

Технология воспроизводима и не вызывает затруднений. Полученные результаты могут быть использованы для внедрения в практику аптечных организаций.

Провизор-технолог
 ООО «Межбольничные аптеки»



Шапранова И.Ю.

Провизор-уполномоченный по качеству
 ООО «Межбольничные аптеки»



Богатырева Л.Л.

Проректор по учебно-
воспитательной работе ФГБОУ
ВО ПГФА Минздрава России
Е.Р. Курбатов
«08» 06 2018 г.



Ly3

Н.А. Пулина

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной, внеучебной
и воспитательной работе ФГБОУ
ВО «Южно-уральский
государственный медицинский
университет» Министерства
здравоохранения Российской
Федерации

Л.М. Рассохина

«30» сч 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложения для внедрения: Результаты сравнительного анализа травы пиона уклоняющегося и травы пиона садового по морфологическим признакам и химическому составу

Авторы разработки: Накарякова Наталья Ивановна, ассистент кафедры фармацевтической технологии; Смирнова Марина Мироновна, доцент кафедры фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Где и куда внедрено: в учебный процесс кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-уральского государственного медицинского университета» Минздрава России

Результаты внедрения: Использование материалов диссертационного исследования Накаряковой Н.И. в учебном процессе способствовало расширению и углублению теоретических знаний, развитию практических навыков в области фармакогностического анализа лекарственного растительного сырья, которыми должны обладать выпускники, имеющие квалификацию провизор по специальности «Фармация» в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования

Заведующий кафедрой Фармации и
химии фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО «Южно-уральский государственный
медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
канд. фарм. наук, доцент

Е.В. Симонян



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной, внеучебной
и воспитательной работе ФГБОУ
ВО «Южно-уральский
государственный медицинский
университет» Министерства
здравоохранения Российской
Федерации

Л.М. Рассохина

«30» 04 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложения для внедрения: Результаты качественного и количественного анализа экстракта пиона садового сухого методами ТСХ, УФ-спектрофотометрии и методом ВЭЖХ.

Авторы разработки: Накарякова Наталья Ивановна, ассистент кафедры фармацевтической технологии; Смирнова Марина Мироновна, доцент кафедры фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Пермской государственной фармацевтической академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Где и куда внедрено: в учебный процесс кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-уральского государственного медицинского университета» Минздрава России

Результаты внедрения: Использование материалов диссертационного исследования Накаряковой Н.И. в учебном процессе способствовало расширению и углублению теоретических знаний, развитию практических навыков в области фармацевтического анализа, которыми должны обладать выпускники, имеющие квалификацию провизор по специальности «Фармация» в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования

Заведующий кафедрой Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
канд. фарм. наук, доцент

Е.В. Симонян

ПОДПИСЬ ЗАВЕДУЮЩЕГО
начальник управления
кадров и спецчасти
Т.В. Казакова
20 г.