

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Загузова

Елена Владимировна

**Фармакогностическое изучение и
стандартизация сбора противооксидантного и
листьев земляники восточной**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

**Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор Т. А. Степанова**

Хабаровск-2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
ГЛАВА 1. Лекарственные растения и биологически активные вещества, перспективные и используемые для лечения болезней мочеполовой системы. Стандартизация лекарственных средств растительного происхождения для лечения заболеваний почек (литературный обзор)	11
1.1. Исследование и разработка средств для фитотерапии заболеваний почек	12
1.1.1. Роль биологически активных веществ в растениях, применяемых при заболеваниях почек	14
1.2. Многокомпонентные фитопрепараты диуретического и нефропротекторного действия	16
1.2.1. Разработка сбора противооксалатного на основе лекарственных растений Дальнего Востока	19
1.2.2. Листья земляники как перспективное сырье для медицинской практики	20
1.3. Стандартизация лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов для лечения заболеваний почек	23
Заключение к главе 1	30
ГЛАВА 2. Фармакогностическое изучение и разработка вопросов стандартизации сбора противооксалатного	31
2.1. Изучение макро- и микродиагностических признаков сбора	31
2.2. Качественный анализ БАВ в сборе и разработка физико-химических методик определения подлинности	50
2.2.1. Хроматографическое исследование сбора противооксалатного	51
2.2.2. Хроматографическое определение подлинности сбора	57
2.2.3. Исследование УФ-спектра сбора	64
2.3. Изучение элементного состава сбора противооксалатного	65

2.4. Разработка методики количественного определения флавоноидов в сборе противооксалатном	71
2.4.1. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе противооксалатном	78
2.5. Разработка методики количественного определения арбутина в сборе противооксалатном	82
2.6. Определение количественного содержания БАВ и числовых показателей в сборе противооксалатном	91
2.7. Бактериологические исследования сбора противооксалатного	96
2.8. Исследование изменчивости содержания биологически активных веществ в сборе противооксалатном в процессе хранения	98
Заключение к главе 2	105
ГЛАВА 3. Изучение выхода БАВ в настой сбора противооксалатного	108
Заключение к главе 3	115
ГЛАВА 4. Сравнительное изучение основных биологически активных веществ листьев земляники восточной и земляники лесной	116
4.1. Сравнительный анализ качественного состава листьев земляники восточной и земляники лесной	117
4.2. Сравнительный количественный анализ биологически активных веществ листьев земляники восточной и земляники лесной	124
4.2.1. Разработка методики количественного определения флавоноидов в листьях земляники восточной	124
4.2.2. Разработка методики количественного определения фенольных соединений в листьях земляники восточной	130
4.2.3. Сравнительный анализ количественного содержания флавоноидов, дубильных веществ и фенольных соединений	

в листьях земляники восточной и земляники лесной	138
Заключение к главе 4	146
ГЛАВА 5. Разработка маркетинговой стратегии продвижения сбора	
противооксалатного на фармацевтический рынок	148
5.1. Оценка уровня заболеваемости населения региона	
заболеваниями мочеполовой системы	149
5.2. Анализ регионального рынка ЛП и БАД, воздействующих на	
мочеполовую систему	150
5.3. Определение маркетинговых показателей при организации	
производства сбора противооксалатного	163
Заключение к главе 5	166
Общие выводы	168
Список литературы	170
Приложение 1	195
Приложение 2	225
Приложение 3	234

Введение

Актуальность темы. Многокомпонентные лекарственные препараты природного происхождения, такие как сборы, традиционно пользуются популярностью у населения России. Они отличаются доступностью и хорошо зарекомендовали себя как средства комплексной, реабилитационной терапии и профилактики многих заболеваний.

В настоящее время ассортимент фитопрепаратов для лечения заболеваний почек и мочевыводящих путей незначителен. Расширение номенклатуры растительных сборов на основе отечественного сырья, в том числе и при вышеназванных заболеваниях, является актуальной задачей современной фармакогнозии.

В Дальневосточном государственном медицинском университете разработан сбор для лечения оксалатных нефропатий на основе лекарственных растений Дальнего Востока. Сбор включает траву горца птичьего, листья брусники, плоды шиповника, плоды калины, листья земляники, кукурузные столбики с рыльцами, семена лимонника. Все компоненты сбора имеют надежную сырьевую базу.

Разработка лекарственных препаратов из растительного сырья требует тщательного изучения вопросов их стандартизации. При этом применение точных и избирательных методов анализа для оценки качества препаратов и сырьевых компонентов представляется актуальным для современного решения задач стандартизации.

В последнее время существенно расширилась номенклатура растительного сырья, выпускаемого в фильтр-пакетах, в связи с чем практическое значение имеет разработка вопросов стандартизации сбора противооксалатного не только в форме «ангро» и фасованного в пачки, но и фасованного в фильтр-пакеты.

Одним из компонентов сбора являются листья земляники. Официальный вид земляники - земляника лесная (*Fragaria vesca* L.) - на Дальнем Востоке замещается земляникой восточной *Fragaria orientalis* Losinsk. Значительный

ареал, запасы сырья и систематическое родство с официальным видом делают дальневосточный вид перспективным для изучения и внедрения в практику.

В связи с вышеизложенным, стандартизация оригинального сбора противооксалатного и внедрение дальневосточного вида земляники в качестве потенциального источника ценного лекарственного сырья представляет теоретический и практический интерес для фармации.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка научно-обоснованного метода стандартизации сбора противооксалатного и листьев земляники восточной.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести фармакогностическое исследование сбора противооксалатного;
- разработать методики количественного определения флавоноидов и арбутина в сборе;
- установить показатели подлинности и доброкачественности сбора;
- обосновать сроки годности сбора «ангро», фасованного в пачки и фильтр-пакеты;
- разработать проект нормативного документа на сбор «ангро»; сбор, фасованный в пачки и фильтр-пакеты;
- изучить выход биологически активных веществ (БАВ) в настои, полученные разными способами из сбора, фасованного в пачки и фильтр-пакеты;
- разработать методики количественного определения флавоноидов и фенольных соединений в листьях земляники восточной;
- провести сравнительное изучение биологически активных комплексов листьев земляники восточной и земляники лесной;
- изучить региональный рынок растительных средств диуретического действия и разработать маркетинговые аспекты по продвижению сбора противооксалатного.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Дальневосточного государственного медицинского университета (регистрационный номер 01201459952). Тема работы утверждена научно-плановой комиссией ДВГМУ (Протокол № 2 от 19.11.2003 г.)

Научная новизна. Проведено фармакогностическое исследование оригинального сбора противооксалатного: выявлены макро- и микродиагностические признаки, изучен химический состав сбора. Исследована антимикробная активность сбора. Разработаны методики определения количественного содержания арбутина и флавоноидов в сборе. Установлен характер изменения в содержании БАВ в процессе хранения сбора. Изучено влияние способа получения на выход БАВ в настои сбора противооксалатного.

Впервые определено количественное содержание основных групп фенольного комплекса в листьях земляники восточной. Проведено сравнительное изучение листьев земляники лесной и земляники восточной по содержанию основных групп БАВ. Разработаны методики количественного определения флавоноидов и фенольных соединений в листьях земляники.

Проведены маркетинговые исследования регионального рынка диуретических средств растительного происхождения, разработана стратегия по выводу на фармацевтический рынок сбора противооксалатного.

Практическая значимость работы. Разработан проект Фармакопейной статьи предприятия (ФСП) «Сбор противооксалатный»: обоснованы показатели подлинности и доброкачественности сбора, разработаны современные методики оценки качества сбора.

Обоснованы способы приготовления настоев из сбора, фасованного в пачки и фильтр-пакеты.

Показана возможность расширения сырьевой базы листьев земляники за счет внедрения в фармацевтическую практику дальневосточного вида земляники.

Материалы диссертации используются в учебном процессе Дальневосточного государственного медицинского университета. Получен акт внедрения. Методики определения флавоноидов в сборе, флавоноидов и фенольных соединений в листьях земляники восточной апробированы в КГКУЗ «Центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» министерства здравоохранения Хабаровского края, что подтверждено актами апробации и внедрения. Проект ФСП на сбор противооксидантный передан производителю ООО «ЛЕК С+». Получен акт внедрения.

Результаты исследования по сбору противооксидантному защищены патентом Российской Федерации, что подтверждает их новизну и практическую значимость.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 62-й итоговой научной конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины» (Хабаровск, 2005 г.); Краевой научной конференции «Социально ориентированные научные исследования женщин-ученых Хабаровского края (Хабаровск, 2006 г.); Дальневосточной региональной научно-практической конференции «Организация лекарственного обеспечения рациональной фармакотерапии в условиях реализации национального проекта в Дальневосточном федеральном округе» (Хабаровск, 2008 г.); V Дальневосточном конгрессе «Человек и лекарство» (Владивосток, 2008 г.); Дальневосточной региональной научно-практической конференции «Дальневосточная фармация – основные тенденции развития» (Хабаровск, 2009 г.); межкафедральной научной конференции (Хабаровск, 2009 г.); Всероссийской конференции с международным участием «Состояние лесов Дальнего Востока и актуальные проблемы лесопользования» (Хабаровск, 2009 г.); Региональной научной конференции с международным участием «Биоразнообразие и проблемы экологии Приамурья и сопредельных территорий» (Хабаровск, 2011 г.); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Современное состояние и перспективы фармацевтического образования и науки для повышения

кадрового потенциала Дальневосточного региона», посвященной 50-летию открытия первого на Дальнем Востоке фармацевтического факультета (Хабаровск, 2014 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 6 паспорта специальности «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК, и получен патент РФ на изобретение.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах исследования: проведении анализа отечественных и зарубежных источников по теме диссертации, планировании и проведении научных экспериментов. Диссертантом сформулированы и сделаны выводы по работе, подготовлены статьи, тезисы, доклады, материалы для получения патента и проект ФСП на сбор противооксидантный, разработана маркетинговая стратегия продвижения сбора на фармацевтический рынок, оформлена диссертация и автореферат.

Основные положения, выносимые на защиту: результаты фармакогностического изучения сбора противооксидантного; методики количественного определения флавоноидов и арбутина в сборе противооксидантном и обоснование нормативов их содержания; обоснование сроков хранения сбора противооксидантного; результаты изучения выхода основных групп БАВ в настои из сбора, фасованного в пачки и фильтр-пакеты; методики количественного определения флавоноидов и фенольных соединений в листьях земляники; результаты сравнительного анализа содержания действующих веществ в сырье земляники восточной и земляники лесной; данные по маркетинговым исследованиям продвижения сбора противооксидантного на фармацевтический рынок.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 241 странице, содержит 56 рисунков и 50 таблиц.

Диссертация состоит из введения, пяти глав, в том числе четырех глав экспериментальной работы, выводов, списка литературы и трех приложений. Список литературы включает 317 источников, из них 47 на иностранных языках.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи, показана научная новизна и практическая значимость работы.

В литературном обзоре (**глава 1**) приводятся сведения по исследованиям лекарственных растений и БАВ, перспективных и используемых для лечения почечной патологии. Обсуждаются данные, касающиеся изучения листьев земляники, а также обзор по стандартизации фитопрепаратов.

В **главе 2** приведены материалы по фармакогностическому изучению сбора и разработке методик количественного определения суммы флавоноидов и арбутина в сборе, обоснование методик и нормативных показателей подлинности и доброкачественности сбора, даны результаты изучения содержания БАВ в сборе в процессе его хранения.

Глава 3 посвящена изучению параметров экстракции сбора противооксалатного «ангро» и фасованного в пачки и фильтр-пакеты.

Фармакогностическое исследование листьев земляники восточной в сравнении с земляникой лесной и разработка методов количественного определения флавоноидов и фенольных соединений в листьях земляники описаны в **главе 4**.

В **5 главе** представлены материалы по исследованию регионально рынка диуретических средств и описана маркетинговая стратегия продвижения сбора противооксалатного на фармацевтический рынок.

В **приложении 1** приведен проект ФСП «Сбор противооксалатный». В **приложении 2** даны результаты фармакологического изучения сбора противооксалатного. В **приложение 3** включены акты внедрения материалов диссертации.

ГЛАВА 1. Лекарственные растения и биологически активные вещества, перспективные и используемые для лечения болезней мочеполовой системы. Стандартизация лекарственных средств растительного происхождения для лечения заболеваний почек

(Литературный обзор)

Арсенал современных фитопрепаратов является результатом длительного исторического опыта разных народов и исследовательских работ ученых. Лекарственные средства из растений играют важную роль в современной научной медицине [5,192,288,298,313]. Это объясняется тем, что вещества природного происхождения отвечают требованиям терапии многих заболеваний [99,271,284].

В последние десятилетия роль фитопрепаратов в качестве полифункциональных средств значительно возросла. Особенно актуальна фитотерапия в лечении и профилактике поливалентных заболеваний, к которым относятся этиологически различающиеся заболевания почек (ЗП) [7,9,95,119, 152,189,265].

Основные направления фитотерапии ЗП заключаются в уменьшении воспаления, выведении избытка жидкости, подавлении инфекционных процессов [30,89,129,142]. Важное значение в терапии почечных болезней имеет регуляция обмена веществ, повышение сопротивляемости организма, нормализация артериального давления, борьба с иммунными сдвигами [73,124, 206]. Рядом авторов отмечается также необходимость спазмолитического действия, поддержания физиологических значений pH мочи [229, 239].

В последнее время в публикациях специалистов все чаще отмечается важная роль микроэлементов в патогенезе, лечении и профилактике осложнений болезней почек [44,112,135,190,194,292,314], а также значение биологически активных веществ (БАВ), обладающих антиоксидантной активностью в фитотерапии ЗП [11,123,125,131,174,278,285,305].

1.1. Исследование и разработка средств для фитотерапии заболеваний почек

Исследованиям растений и фитопрепаратов, применяемых при ЗП, судя по публикациям, уделяется достаточно большое внимание. Ряд монографий, справочников, обзоров содержат информацию по обсуждаемому вопросу. Так, обзор лекарственных растений, наиболее применяемых при заболеваниях почек и мочевыводящих путей, сделан Л.Г. Кругляк [114]. Внимание лекарственным растениям уделено и в монографиях А.А. Лебедева «Фармакология почек» [122], Я.Ф. Зверева и В.М. Брюханова «Побочные эффекты современных диуретиков: метаболические и токсико-аллергические аспекты» [29].

В отечественных и зарубежных статьях говорится о возможностях фитотерапии при мочекаменной болезни, воспалительных и инфекционных заболеваниях почек [58,118,156,184,263,272,273,283,295,316].

В обзоре о влиянии растений на выделительную функцию почек О.В. Товчига и С. Ю. Штрыголь указывают, что диуретический эффект выявлен экспериментально или клинически более чем у 400 видов растений, причем у 33 видов не только установлен диуретический эффект, но и определен его механизм [226].

Публикации, касающиеся изучения средств для фитотерапии ЗП, охватывают широкий круг вопросов, различаются по подходам, методикам и предметам исследования [80,100,168,183,204,205,219,237].

В последнее десятилетие продолжается выявление новых видов растений, перспективных для использования в терапии ЗП [162,175,275,287,317]. Примером подобных работ являются проведенные в Пермской ГФА исследования свойств хрена обыкновенного, показавшие, что препарат на основе хрена по диуретическому эффекту не уступает настою эрвы шерстистой [232]. Опубликованы результаты изучения диуретической и салуретической активности экстрактов альфредии поникшей [83].

Значительное число статей посвящено углубленному изучению лекарственных растений, давно известных в качестве диуретиков с целью

выявления у них дополнительных фармакологических свойств и механизмов действия [16]. Так в 2008 г. Ю.Н. Нуралиевым и Т.М. Зубайдовой было выявлено гипоурикемическое действия настоя душицы, позволяющее рекомендовать препарат при гиперурикемии разного генеза [153]. Н.Э. Коломиец и Г.И. Калинкина экспериментально подтвердили антибактериальные свойства хвощей [106]. Спектр антимикробного действия извлечений из хвощей в сочетании с другими видами биологической активности подтверждает их использование в народной медицине при заболеваниях мочеполовой системы. Ю.Б. Эрдынеевым была исследована фармакологическая и фармакотерапевтическая эффективность сухого экстракта из ортосифона тычиночного при экспериментальной нефропатии [267]. Показано, что при использовании препарата на фоне нефропатии разной этиологии проявляется выраженная нефропротективная активность, механизмы действия которой обусловлены наличием фенольного комплекса.

Большое внимание, особенно за рубежом, в последнее десятилетие уделено исследованиям нефропротективной и антимикробной активности плодов и сока клюквы при ЗП [280,282,289,297,309,311].

В соответствии с тематикой наших исследований наибольший интерес представляют результаты исследований такого известного в терапии ЗП лекарственного растения, как земляника. Обзор публикаций, относящихся к листьям земляники, представлен в разделе «Сравнительное изучение основных биологически активных веществ листьев земляники восточной и земляники лесной».

В последнее время все большее количество работ посвящается изучению связи фармакологического эффекта с химическим составом растений, изучению действия групп и индивидуальных БАВ из растений при ЗП.

И наконец, большое количество разноплановых публикаций касается изучения фитопрепаратов для лечения ЗП: от монопрепаратов до сборов, от лекарственных средств до биологически активных добавок, от определения

фармакологических эффектов и изучения химического состава до определения механизмов действия и решения вопросов стандартизации фитопрепаратов.

Из огромного числа опубликованных работ для обзора выбраны те, которые в большей мере касаются темы диссертации и подходят для решения ее задач. В связи с этим два последние из перечисленных направлений исследований будут представлены подробнее ниже.

1.1.1. Роль биологически активных веществ в растениях, применяемых при заболеваниях почек

Известно, что при ЗП важное значение имеет реализация таких фармакологических эффектов, как диуретический, спазмолитический, противовоспалительный, антимикробный и др. БАВ растений способны не только к проявлению того или иного эффекта, но и к сочетанному действию, что является результатом их комплексного влияния. Ренальные эффекты лекарственных растений связывают с различными группами органических БАВ, в частности, с производными простых фенолов, фенолкарбоновых кислот, иридоидов, антраценпроизводных, флавоноидов, алкалоидов, терпеноидов и полисахаридов [48,130,218,227,238,281,291,303].

Характерной чертой современных исследований в обсуждаемой области является обоснование фармакологической активности фитопрепаратов с позиций содержания в них определенных БАВ. При исследовании диуретического эффекта экстракта из травы волжанки обыкновенной показана его связь с содержанием в сырье арбутина [85]. С содержанием арбутина связывают мочегонное и антисептическое действие, присущее препарату вереска обыкновенного [248]. Мочегонный и антимикробный эффекты препаратов из листьев бадана, выявленные В.М. Брюхановым и Л.М. Федосеевой, связывают с содержанием арбутина и дубильных веществ [28]. В результате исследований, проводимых в Алтайском ГМУ, установлено, что растения семейства Грушанковые (зимолюбка зонтичная, ортилия однобокая, грушанка круглолистная) обладают противомикробной и диуретической активностью, что также связано с содержанием арбутина и дубильных веществ

в перечисленных объектах [43,255]. При дальнейшем поиске зависимости действия от химического состава подтверждена роль фенольных соединений в активности растений семейства Грушанковые, в том числе противовоспалительной активности [211], а также арбутина и гидрохинона – в антиоксидантном действии [13].

М.Н. Кодакова и А.В. Дубищев провели сравнительную оценку диуретической активности фитопрепаратов тополя, осины и ивы [102,103]. Действие фитопрепаратов из представителей семейства Ивовые связывают с эффектами простых фенолов, фенилпропаноидов и флавоноидов. В этих и более поздних работах была показана нефропротекторная активность не только экстракционных фитопрепаратов, но и индивидуальных веществ – гликозида салицина и фенолгликозида тремулоидина [161,163].

Еще в большей степени, чем арбутин и другие фенольные соединения, нас интересовали флавоноиды в связи с их активностью при ЗП, что и отражено в дальнейшем обзоре.

Как показано в обзоре [226] и подтверждено в ряде других работ [15,57, 230,293], основным классом действующих веществ мочегонных лекарственных растений являются флавоноиды. Диуретическая активность присуща флавоноидам разных групп – флавонов, флаванонов, изофлавонов и др. Установлено, что кверцетин, кверцитрин, авикулярин, изорамнетин, лютеолин и некоторые другие оказывают дозозависимый мочегонный эффект.

В целом ряде опубликованных работ мочегонный и противовоспалительный эффект при ЗП связывают с содержанием флавоноидов. Это относится к ортилии однобокой, ренальные эффекты которой исследователи обосновывают содержанием флавоноидов, из которых идентифицирован рутин, и фенолкарбоновых кислот, из которых идентифицированы хлорогеновая, кофейная и п-кумаровая [81,136].

В Пятигорской ГФА исследована диуретическая активность травы змееголовника молдавского и иссопа лекарственного, основными

действующими веществами которых также являются фенольные соединения, преимущественно флавоноиды [82].

Изучение иссопа лекарственного проводилось также в Курском ГМУ. В.Н. Бубенчиковой и соавторами показана противовоспалительная активность иссопа лекарственного и вероники дубравной; установлен антибактериальный эффект вероники в отношении возбудителей инфекций мочевой системы и связь активности с наличием фенольных комплексов в растениях [35,84,88].

Б.А. Самура и др. изучили влияние суммы флавоноидов из листьев можжевельника красного на функцию почек, при этом доказано стимулирующее действие флавоноидов на мочевыделение [45].

Диуретическую и противовоспалительную активность американского растения *Fabiana imbricata* R. et P., известного в Чили и Аргентине, связывают с фенольными соединениями-антиоксидантами, а именно с кофейной кислотой, скополетином и рутином [307].

При исследовании итальянскими учеными еще одного аргентинского растения *Lophophytum leandri*, используемого в качестве мочегонного средства, установлено, что активная фракция содержит четыре известных флавоноида, главный из которых кверцетин-3-глюкозид [286]. Авторами, кстати, показано, что активность экстракта и наиболее активных фракций была выше, чем у индивидуальных веществ.

Бразильские ученые при исследовании спиртового экстракта из тропеолиума показали диуретическое действие экстракта, установили механизм его действия и показали, что основная активность связана с наличием в растении изокверцетина [300].

1.2. Многокомпонентные фитопрепараты диуретического и нефропротекторного действия

В последнем абзаце предыдущего раздела приведен пример, свидетельствующий о большей активности комплекса веществ по сравнению с индивидуальными веществами. В фитотерапии довольно распространено

мнение и практика увеличения комплексов природных БАВ за счет соединения в одном препарате нескольких сырьевых источников со сходными эффектами, но различными механизмами действия. Иногда в состав многокомпонентных препаратов включаются растения с разными фармакологическими эффектами, что делается исходя из поливалентности заболеваний, для лечения которых эти препараты предназначены [6,64,107,140,200,233,256]. Все вышесказанное относится и к многокомпонентным фитопрепаратам для лечения ЗП, в частности к сборам [76,126,166,169,170,171, 172,203,269].

Более чем десятилетие в Алтайском ГМУ проводятся исследования по сборам, влияющим на функцию почек [113,167,201,202,231].

С.В. Замятиной установлено влияние сборов из лекарственных растений Алтайского края, обладающих мочегонными, противовоспалительными, противомикробными эффектами на процессы свободно-радикального окисления. Показано, что исследованные сборы (в опытах *in vivo*) обладают выраженным антиоксидантным действием [78].

Е.А. Вичкуткиной с соавторами исследована антиоксидантная активность некоторых сборов, влияющих на почечную функцию, при этом проводился поиск зависимости противовоспалительного действия от химического состава [10]. Авторами показана роль фенольных соединений – арбутина, салициловой кислоты, флавоноидов и оксикоричных кислот в фармакологической активности. В диссертационной работе Е. А. Вичкуткиной проведено исследование сбора «Нефролен», состоящего из 5-ти сырьевых компонентов. Выбор компонентов сбора обосновывался содержанием в них вышеперечисленных БАВ, определяющих фармакологическую активность извлечений из сбора. В опытах на животных нефролен проявил противовоспалительное, антиоксидантное, противомикробное и диуретическое действие [42].

В 2008 году в Алтайском медицинском университете подготовлена диссертация по фармакогностическому изучению сборов для лечения ЗП [207]. Ю.С. Сивова показала, что в исследованных сборах содержатся простые

фенолы, флавоноиды, фенолокислоты; определила количественное содержание флавоноидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты; установила, что более рациональная экстемпоральная форма для изученных сборов – отвар.

В последнее десятилетие исследования по многокомпонентным препаратам, преимущественно сборам, для лечения ЗП проводились в ряде российских научных центров, в том числе в Бурятии. И.С. Бутуханова исследовала фармакотерапевтическую эффективность растительного средства "фитолисан" при экспериментальном уролитиазе [38]. В препарат входят 7 растительных сырьевых компонентов. Автор установила, что фитолисан обладает гипоазотемической, диуретической, противовоспалительной, спазмолитической, антимикробной, мембраностабилизирующей и антиоксидантной активностью.

Некоторые многокомпонентные фитопродукты, предназначенные для использования при ЗП, разрабатываются авторами в категории биологически активные добавки. В частности, в Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН разработан фиточай «Байкальский-6», основными действующими веществами которого являются флавоноиды [60,79]. Клинические исследования фиточая показали его эффективность в комплексном лечении инфекций мочевой системы у детей.

Е.С. Кириллова и соавторы исследовали фитопрепараты ТАН № 20 и ТАН № 22, обладающие спазмолитической и антибактериальной активностью. Указанные препараты также вызывают диуретический эффект и окисляют мочу при ее щелочной реакции. Авторами отмечается, что активность препаратов обусловлена наличием в них фенольных соединений [94,239].

Многокомпонентные препараты для лечения ЗП представлены в разных формах, в том числе сиропов и экстрактов. Так, сотрудниками Пятигорской ГФА изучено нефропротективное действие сиропа «Урокам», состоящего из четырех сырьевых источников: экстрактов листьев толокнянки, брусники, березы и сока клюквы [86].

Комплекс сухих экстрактов также из четырех растений под условным названием «Нефрофит» оказывает нефропротекторное и антиоксидантное действие при нефропатиях токсического и ишемического генеза, а также лекарственной нефропатии [12,234,268].

Примером успешного сочетания 15 компонентов растительного происхождения, витаминов и минералов является препарат «Антилит», рекомендуемый в комплексном лечении больных с мочекаменной болезнью [253]. Показано, что у больных оксалатным нефролитиазом комбинация традиционной медикаментозной терапии с антилитом дает более быструю нормализацию показателей крови и pH мочи, снижает активность камнеобразования, способствует отхождению камней.

Следует отметить, что наибольшее количество публикаций по рассматриваемой теме относится к лекарственному средству «Канефрон Н», состоящему из экстрактов травы золототысячника, корней любистока и листьев розмарина, и к биологически активной добавке «Пролит», представляющей экстракты растений: осота огородного, шелковочашечника курчавого, папайи, филлантуса нирури, почечного чая, императы цилиндрической, перца кубебы [25,47,67,96,151,182,193,195,225]. Необходимо подчеркнуть, что положительные эффекты пролита и канефрона при нефролитиазе специалисты связывают с комплексным действием БАВ, главным образом фенольных соединений.

1.2.1. Разработка сбора противооксалатного на основе лекарственных растений Дальнего Востока

Учитывая актуальность проблемы профилактики и лечения ЗП, в частности уролитиаза [2,26,68,210,254,294,308], с одной стороны и огромный потенциал дальневосточной лекарственной флоры – с другой, в Дальневосточном государственном медицинском университете был разработан противооксалатный сбор. Сбор включает 7 сырьевых источников: траву горца птичьего, плоды калины Саржента, плоды шиповника морщинистого, плоды других видов шиповника, семена лимонника китайского, кукурузные рыльца,

листья земляники восточной [165]. Проведенные исследования показали, что настой из сбора обладает диуретическим и противовоспалительным действием, а также проявляет антиоксидантный эффект, способствует ощелачиванию мочи, уменьшает кальцийурию, оксалурию и кристаллизацию мочи.

В ходе проведенных предварительных исследований показана эффективность сбора при лечении больных оксалатными нефропатиями [49].

Изучение сбора с разных сторон показало перспективность его использования в медицинской практике и возможность производства [223,224]. Сырьевая база сбора обеспечена. Тем не менее, если исходить из региональной сырьевой базы, то возникает вопрос, касающийся сырья земляники [216,260]. В связи с этим изучение листьев земляники восточной для введения ее в официальную медицину представляется актуальным, и в обзоре литературы наибольшее внимание уделено именно этому объекту.

1.2.2. Листья земляники как перспективное сырье для медицинской практики

Земляника лесная – известное лекарственное растение, применяемое в официальной и народной медицине. В качестве лекарственного сырья используются плоды и листья земляники.

На Дальнем Востоке земляника лесная замещается родственным видом – земляникой восточной [222]. Информация о химическом составе, фармакогностических и фармакологических свойствах листьев земляники восточной до начала наших исследований практически отсутствовала. В связи с этим особое внимание было уделено сбору и анализу информации, относящейся к другим видам земляники, в первую очередь – к официальному родственному виду – землянике лесной.

К относительно давним публикациям (1986-1988 гг.) относятся результаты изучения земляники лесной, проведенные в Витебском медицинском институте и ВИЛРе [108]. М.М. Коноплевой изучено диуретическое действие фенольных соединений земляники лесной. В дальнейшем по результатам ее исследований в 2008 году была разработана

спектрофотометрическая методика количественного определения суммы фенольных соединений в листьях земляники лесной, в основе которой лежит реакция окисления фенольных соединений фосфорномолибденово-вольфрамовым реактивом [109]. Количественное содержание фенольных соединений автором предложено рассчитывать по удельному показателю поглощения галловой кислоты.

В последнее десятилетие специалистами проявлен большой интерес к изучению земляники как в нашей стране [3,4,8,18,19,23,34,40,46,87,137,240,250,251], так и за рубежом [274,276,279,296,301,304,312,315]. Наибольший вклад в изучение земляники лесной в этот период сделали фармакогносты Курского медицинского университета. Диссертация Н.И. Воротынцевой посвящена фармакогностическому изучению представителей рода земляника [51]. В диссертационной работе И.Л. Дроздовой при исследовании химического состава установлено наличие в листьях земляники 26 веществ фенольной природы, идентифицировано – 15. Установлено, что в листьях официального вида преобладают арбутин, рутин, скополетин, эллаговая и феруловая кислоты. Отмечено существенное содержание галловой и неохлорогеновой кислот и флавоноидов кверцетина и лютеолина [72]. В этом же институте проведены исследования, показавшие диуретическую и анальгезирующую активность сухого экстракта, а также антиоксидантную активность полифенольного комплекса листьев земляники лесной [33,36,70,71]. В.Н. Бубенчикова и И.Л. Дроздова, проводя комплексные исследования земляники, разработали показатели качества листьев земляники лесной, которые включили в нормативную документацию. Качество листьев земляники предложено оценивать по содержанию флавоноидов, количество которых определяют спектрофотометрически. В качестве стандарта обосновано использование РСО рутина. Рекомендуемый разработчиками норматив содержания суммы флавоноидов - не менее 1% [31]. Этими же авторами разработан состав и технология гранул на основе сухого экстракта из листьев земляники лесной [32].

Диссертационная работа, посвященная фармакогностическому изучению листьев земляники лесной и земляники садовой региона Урала, выполнена в 2003 году О.В. Петуховой в Пермской государственной фармацевтической академии [177]. В ходе экспериментальных исследований показано, что в листьях земляники лесной и земляники садовой (сорт «ананасная») присутствуют флавоноиды, идентичные по качественному составу. Среди них обнаружены рутин, кверцетин, кверцитрин, кемпферол; содержание флавоноидов колеблется от 2,1 до 2,6%. Исследованы УФ-спектры водных и водно-спиртовых извлечений из листьев земляники лесной и садовой и показано, что они совпадают. Установлено, что условия произрастания и сроки заготовки не влияют на содержание флавоноидов в листьях земляники лесной и садовой. Показано также, что сбор сырья можно проводить в течение всей вегетации, при этом заготовка листьев после плодоношения более предпочтительна, так как позволяет получить сырье с высоким содержанием БАВ и при этом сохранить урожай плодов [91,176]. Диссертантом также проведены исследования по стандартизации листьев земляники садовой и по технологии экстракта.

В Пятигорской фармакадемии в 2005 году проведено изучение настоя из листьев земляники ананасной, которое подтвердило выраженное диуретическое и умеренно урикозурическое действие исследуемого объекта [121].

Еще одна диссертация, в данном случае по фармакологии земляники лесной, выполнена в 2006 году в г. Томск Д.А. Климентовой. Диссертантом проведено изучение спектра фармакотерапевтического действия комплексных извлечений из надземной части земляники лесной. Впервые была экспериментально установлена выраженная противовоспалительная и обезболивающая активность водных и спиртовых извлечений из надземной части растения. Показано также их ранозаживляющее и гастропротективное действие, а также способность стимулировать моторику желудочно-кишечного тракта. Установлено, что извлечения из земляники лесной обладают широким

спектром фармакологического действия, в том числе антигипоксическими и выраженными стрессо-протективными свойствами [98].

К этому же времени (2006 г.) относится работа Т.Б. Киреевой, которая изучила особенности динамики накопления аскорбиновой кислоты и дубильных веществ у земляники лесной в условиях Удмуртии [93]. В воздушно-сухих листьях этого вида максимальное содержание витамина С наблюдается в фазе бутонизации накануне цветения, максимальное содержание дубильных веществ приходится на конец плодоношения.

1.3. Стандартизация лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов для лечения заболеваний почек

Разработке вопросов стандартизации фитопрепаратов в России уделяется большое внимание, особенно в последнее десятилетие [1,24,39,90,105,111,120,128,132,160,179,191,208,259,262,264,310]. Анализируя опубликованные материалы можно выделить основные направления работы по стандартизации сырья и фитопрепаратов:

- выявление и обоснование индивидуальных веществ или группы БАВ, по содержанию которых будет оцениваться качество сырья и фитопрепаратов, т.е. поиск маркеров качества;
- реализация принципа сквозной стандартизации сырья и препарата;
- разработка современных подходов и методик определения подлинности;
- разработка избирательных методов количественного определения основных действующих веществ;
- валидационная оценка методик, предлагаемых для стандартизации сырья и фитопрепаратов.

Работа по выбору БАВ для наиболее адекватной оценки качества сырья и фитопрепаратов предполагает наличие данных об их химическом составе и подтверждение связи определенных веществ с фармакологической активностью препарата. Выбор маркеров качества фитопрепаратов, которые могут быть специфическими или приоритетными, является чрезвычайно актуальным для стандартизации многокомпонентных препаратов [74,117,181,185,186].

Правильно выбранные маркеры обеспечивают фитопрепаратам, приготовленным из нескольких сырьевых источников, защиту от подделок, в частности недовложения дорогостоящих сырьевых компонентов.

Реализация принципа сквозной стандартизации в фармакогнозии обеспечивает объективную оценку качества сырья и гарантирует соответствие произведенного препарата нормативным показателям при соблюдении технологического регламента. В этом направлении при стандартизации многокомпонентных фитопрепаратов есть свои сложности: если в сырьевых источниках количественно оценивается содержание разных БАВ, то при стандартизации такого препарата особенно убедительно должен быть обоснован выбор БАВ для количественной оценки. Возможно, потребуются разработка дополнительных методик, как например, в случае с разработанным в ДВГМУ лекарственным средством «Элима» [134,221] и рядом других препаратов [17,212,220].

Разработка стандартизации многокомпонентных препаратов в трех последних направлениях также требует дополнительных исследований и обоснований, что связано с усложнением химического состава этих препаратов. В частности, при определении подлинности многокомпонентных препаратов требуется подтверждение присутствия каждого из сырьевых компонентов. Важную роль в решении этого вопроса играют специфические маркеры. Более сложный химический состав поликомпонентных препаратов по сравнению с монопрепаратами требует и более селективных методик, к которым относятся в чистом виде хроматографические методы, а также в сочетании с другими, например, хроматоспектрофотометрия [75,116,217,228,270].

Для более полного представления о современных методах стандартизации нами был проведен анализ НД на отечественные и зарубежные фитопрепараты, применяемые при ЗП и реализуемые на российском фармацевтическом рынке. Данные представлены в таблице 1 [53-55,143-150,242-247]. Как видно из таблицы, стандартизация лекарственных средств, применяемых при заболеваниях почек, проводится на разном уровне: в более

поздних нормативных документах на отечественные и зарубежные препараты уровень оценки их качества, безусловно, выше. Во всех представленных препаратах предусмотрено химическое определение подлинности и количественное определение содержания БАВ. Тем не менее, из 17 анализируемых фитопрепаратов современные физико-химические методы количественного определения БАВ применяются только при стандартизации - 8, а хроматография для определения подлинности 9 препаратов. Наиболее избирательные инструментальные методы (ВЭЖХ, ГХ) идентификации БАВ и их количественного определения включены в НД только для фитолизина, леспенефрила и хофитола. Необходимо отметить, что в большинстве случаев определение подлинности проводится с применением ТСХ по стандартной хроматограмме с использованием веществ-маркеров (СОВС), что также дает более или менее полное представление о сырьевых источниках и отсутствии фальсификаций. И если при определении подлинности сборов важную роль играет макро- и микроанализ, то для идентификации таких многокомпонентных препаратов, как фитолизин (паста), канефрон (раствор), гинджалелинг (капсулы), цистон (таблетки) и урофлукс (порошок чая для настоя) основное значение имеет хроматография. Как следует из таблицы, в качестве дополнительной характеристики при идентификации сборов используется УФ-спектр. При стандартизации препаратов, применяемых при ЗП, оценивается количественное содержание либо эфирных масел (для соответствующих препаратов), либо фенольных соединений, причем чаще флавоноидов. Это согласуется с описанными выше результатами изучения активности БАВ при патологиях мочевыводящей системы.

Таблица 1 – Стандартизация лекарственных средств растительного происхождения, применяемых при заболеваниях почек

Наименование препарата, форма выпуска	Растительные сырьевые источники	Нормативная документация	Определение подлинности (физико-химические методы)	Количественное определение	
				метод	норматив
1	2	3	4	5	6
Брикет сбора Бекворин круглый	листья ортосифона тычиночного (почечного чая), листья березы, трава хвоща полевого.	ВФС 42-2486-95	ТСХ (силуфол или сорбфил) - стандартная хроматограмма	спектрофотометриче ское определение суммы флавоноидов	содержание флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 2%
Бруснивер сбор, пачки, фильтр- пакеты	трава череды, плоды шиповника, травы зверобоя, листья брусники.	ФСП 42- 0388242602 ЗАО «Иван-Чай»	УФ-спектр, соотношение D_{283}/D_{315} - не менее 2	перманганатометрич еское определение содержания дубильных веществ (ГФ XI)	содержание дубильных веществ - не менее 9%
Брикет сбора «Бруснивер» круглый	трава череды, плоды шиповника, трава зверобоя, листья брусники.	ВФС 42-2115-92	УФ-спектр, соотношение D_{283}/D_{315} - не менее 2	перманганатометрич еское определение содержания дубильных веществ (ГФ XI)	содержание дубильных веществ – не менее 9%
Брикет сбора «Бруснивер-Т» круглый	травы череды, плоды шиповника, трава зверобоя, листья толокнянки.	ВФС-42-2748-96	УФ-спектр, соотношение D_{283}/D_{315} - не менее 2	перманганатометрич еское определение содержания дубильных веществ (ГФ XI)	содержание дубильных веществ – не менее 9%
Гинджалелинг, капсулы	густой водный экстракт из смеси листьев ортосифона тычиночного, листьев стробиланта курчавого, травы филлантуса Нипури, корневищ императы цилиндрической.	НД 42-12930-03 ПТ.Фиточеминд о Рекса, Индонезия	ТСХ (силикагель), стандартная хроматограмма, СОВС - рутин	спектрофотометриче ское определение суммы флавоноидов	сумма флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 1,5%

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Канефрон Н, раствор для приема внутрь	водно-спиртового экстракт золототысячника травы, любистока лекарственного корней, розмарина листьев	НД 42-11205-06 Бионорика АГ, Германия	- ТСХ (силикагель) - идентификация рутозида в траве золототысячника, СОВС - рутозид R; - ТСХ (силикагель) - идентификация вещества из корней любистока лекарственного, листьев розмарина, СОВС - розмариновое масло	спектрофотометриче ское определение суммы полифенолов	содержание полифенолов в пересчете на пирогаллол – 7,2- 18,0 мг/100 мл
Леспефлан раствор для приема внутрь	леспедецы двухцветной побеги	ФСП 42- 0158264802 ОАО «Дальхимфарм»	- качественная реакция с магнием (флавоноиды), - ТСХ (сорбфил), СОВС – лютеолин-7-глюкозид	спектрофотометриче ское определение флавоноидов	содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин-7- глюкозид – не менее 0,05%
Леспенефрил, раствор для приема внутрь	настойка леспедецы головчатой, эссенция аниса	НД 42-2343-02 ЮСБ Хелскеа, Франция	ВЭЖХ, идентификация ориентина, изориентина	ВЭЖХ определение ориентина, изориентина	содержание ориентина, изориентина 0,012- 0,015%
Сбор мочегонный №2	листья толокнянки, корни солодки, плоды можжевельника обыкновенного	ЛП 001305- 291111 ООО «Лек С+»	-проба на пенообразование (сапонины) -с раствором железа (III) (арбутин)	Йодометрическое титрование (арбутин)	Содержание арбутин – не менее 3%
Урифлорин таблетки	таблетки, полученные из измельченных листьев толокнянки обыкновенной.	ФСП 42- 0068413003 ОАО «Московская фармацевтиче ская фабрика»	- цветные реакции с сульфатом закисного железа (арбутин), с железоаммониевыми квасцами (дубильные вещества); - УФ-спектр, максимум поглощения при 282+2 нм	спектрофотометриче ское определение суммы фенологликозидов, СОВС – арбутин	сумма фенологликозидо в пересчете на арбутин - не менее 0,028 г

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Уролесан	масло пихтовое, масло мяты перечной, масло касторовое, экстракт семян дикой моркови, экстракт шишек хмеля, экстракт травы душицы обыкновенной.	НД 42-7759-97 Галичфарм, Украина	- качественная реакция с раствором ванилина в серной кислоте (ментол); - качественная реакция с разведенной серной кислотой (эфирные масла)	объемное определение эфирного масла по ГФ XI	содержание эфирного масла - не менее 20%
Урологический (мочегонный) сбор, пачки, фильтр-пакеты	листья толокнянки, цветки ноготков, плоды укропа огородного, корневища и корни элеутерококка, листья мяты перечной	ФСП 42-0045-0827-01 ЗАО «Ст.-Медифарм»	- качественная реакция с железоммониевыми квасцами (арбутин); - ТСХ (кизельгель); в качестве стандарта-извлечение из листьев толокнянки.	йодометрическое титрование - определение арбутина (ГФ XI)	содержание арбутина - не менее 3%
Урофлукс, порошок чая для настоя	обезвоженный экстракт коры ивы, листьев березы, листьев толокнянки, травы хвоща, травы золотарника, корня рудбекии, корня лакричника, корня стальника, корневищ злаков	НД 42-5094-95 Рон-Пуленк-Рорер, Германия	-	-	содержание арбутина 1,7-2,2%
Фитолизин, паста для приема внутрь	сгущенный водно-спиртовой экстракт золотарника, хвоща полевого, горца птичьего, корневища пырея, шелухи лука, листьев березы, семян пажитника, корня петрушки, любистока; апельсиновое масло, шалфейное масло, масло мяты перечной, сосновое масло,	НД 42-208-02 Варшавский завод лекарственных растений «Гербаполь»	- ТСХ (силикагель) - идентификация диосгенина в семенах пажитника, СОВС – диосгенин; - ТСХ (силикагель и целлюлоза) – идентификация флавоноидов, гиперозида в листьях березы и траве горца птичьего, кверцетина в траве горца птичьего и шелухе лука, изокверцетина в траве хвоща и золотарника, СОВС – гиперозид, кверцетин, изокверцетин; - газовая хроматография, СОВС: а-пинен, камфора, а-гуйон, лимонен, ментол, ментон.	объемное определение содержания эфирных масел	содержание эфирных масел - не менее 1,4%

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Хофитол, таблетки, покрытые оболочкой	артишока полевого листьев свежих густой водный экстракт	НД 42-4274-06 Лаборатории РОЗА- ФИТОФАРМА, Франция	- цветная реакция с хлоридом железа; - ТСХ – стандартная хроматограмма; - ВЭЖХ, СОВС – хлорогеновая кислота, лютеолин 7 гликозид	ВЭЖХ определение хлорогеновой кислоты	содержание хлорогеновой кислоты – 0,5-5,0 мг (на таблетку)
Цистон, таблетки	сухие экстракты цветков двуплодника стебелькового, стеблей камнеломки язычковой, стеблей марены сердцелистной, корневищ сыти пленчатой, семян соломоцвета шероховатого, надземной части оносомы прицветковой, целого растения Верони пепельной, порошок мумие (очищенный). Обработанный над паром экстракт из смеси следующего растительного сырья: надземной части базилика душистого, семян конских бобов, плодов якорцев стелющихся, семян мимозы стыдливой, целого растения павонии ароматной, целого растения хвоща полевого, семян тикового дерева.	НД 42-624-05 Хималайя драг Ко., Индия	- цветная реакция с раствором железоаммониевых квасцов (дубильные вещества); - ТСХ (силикагель) идентификация галловой кислоты и флавоноидов, СОВС - галловая кислота; - УФ – спектр, максимум поглощения при 270,0±2 нм	перманганатометрич еское определение суммы дубильных веществ; спектрофотометриче ское определение суммы флавоноидов	содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин - не менее 0,0020 г содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 0,00005 г
Сбор «Элекасол»	трава череды, цветки ромашки, корни солодки, листья шалфея, листья эвкалипта прутовидного, цветки ноготков.	ФС 42-3338-96	Уф-спектр, соотношение D ₂₈₂ /D ₂₅₆ - не менее 1,4	определение содержания эфирного масла (ГФ XI)	содержание эфирного масла - не менее 0,25%

Таким образом, при разработке НД на фитопрепараты, особенно многокомпонентные, целесообразно включать для определения подлинности, кроме качественных реакций, УФ-спектр и хроматографию, а количественную оценку проводить по фенольным соединениям в зависимости от основных действующих веществ.

Заключение к главе 1

Обзор литературы по тематике диссертации показал, что актуальность фитотерапии при ЗП высока. Исследованиям растений и разработке фитопрепаратов, применяемых при ЗП, уделяется большое внимание, о чем свидетельствует количество статей, монографий и патентов. Публикации посвящены широкому кругу вопросов и различаются по методикам, предмету исследования и задачам. Большое внимание уделяется в настоящее время не только выявлению определенной фармакологической активности растительных объектов, но и обоснованию связи активности и содержания БАВ.

Фармакологическую активность фитопрепаратов, применяемых при ЗП, связывают с действием различных БАВ, при этом большая роль отводится фенольным соединениям. Определенный интерес проявляется и в отношении содержания в растениях макро- и микроэлементов и их роли в терапии ЗП.

Литературный обзор показал, что сохраняется интерес к многокомпонентным фитопрепаратам, таким как сборы. В этой связи изучение и стандартизация сбора противооксидантного, разработанного на основе ЛР Дальнего Востока, имеет определенное научно-практическое значение.

Изучение литературы, посвященной одному из компонентов сбора – листьям земляники – показало перспективность исследования дальневосточного вида земляники – з. восточной.

Анализ литературы по стандартизации ЛРС, фитопрепаратов и соответствующей нормативной документации показал актуальность разработки современных методов определения подлинности, избирательных методов количественного определения основных БАВ в сырье и фитопрепаратах.

ГЛАВА 2. Фармакогностическое изучение и разработка вопросов стандартизации сбора противооксалатного

2.1. Изучение макро- и микродиагностических признаков сбора

Для подготовки разделов «Внешние признаки» и «Микроскопия» проекта ФС на сбор было проведено определение его макро- и микроскопических признаков. Макро- и микроанализ проводился на опытно-промышленных сериях сбора, в том числе в виде порошка, в соответствии с ГФ XI. Сырье для сбора измельчали на мельнице ножевой РМ-120 с соответствующими ситами. Изучение внешних признаков сбора проводили невооруженным глазом и при помощи лупы (10×) и стереомикроскопа МБС-9 (16×, 18×), описывая макропризнаки каждого сырьевого компонента и выделяя основные диагностические признаки. Для определения размеров частиц использовали метод ситового анализа, средние размеры вычислялись по формуле Козени [178]. Для выяснения максимальных и минимальных размеров частиц сырья использовали штангенциркуль.

Сбор представляет собой смесь неоднородных частиц растительного сырья зеленого, серо-зеленого, коричневого, коричнево-зеленого цвета с вкраплениями красного, желтого и белого цвета, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 5 мм. Средний размер частиц сбора – $1,0 \pm 0,1$ мм. Максимальный размер частиц сбора составляет 2 см, к которым относятся кусочки стеблей горца птичьего. Самые мелкие частицы сбора проходят сквозь сито с диаметром отверстий 0,2 мм. Сбор хорошо перемешивается, однако при хранении и транспортировке наблюдается оседание семян лимонника, орешков шиповника, пылевидных частиц. В связи с этим перед применением сбор следует хорошо перемешивать.

Запах сбора – слабый. Вкус извлечения, приготовленного по статье ГФ XI издания «Настои отвары», горький. Цвет извлечения – светло-коричневый.

При поверхностном рассмотрении невооруженным глазом смеси измельченного сырья легко распознаются цельные семена лимонника – от

желтого до коричневого цвета, блестящие, почковидной формы, плоды шиповника – по наличию целых и раздробленных орешков и трава горца птичьего – по фрагментам серовато-зеленых стеблей с тонкими, белыми раструбами.

Учитывая особенности состава сбора, дальнейший макроанализ проводился с использованием лупы и стереомикроскопа в соответствии с указанием статьи «Сборы» (ГФ XI, вып. 1, стр. 266). В результате проведенного макроанализа нами были выделены диагностические признаки компонентов сбора.

Трава горца птичьего. Кусочки стеблей зеленого, светло-зеленого, серо-зеленого цвета. Встречаются стебли, как целые бороздчатые цилиндрической формы, так и расщепленные вдоль с белой сердцевинкой. Присутствуют фрагменты стеблей с тонким, пленчатым, рассеченным раструбом и фрагменты раструбов, отделившиеся от стеблей. Кусочки листьев серо-зеленого цвета, изредка присутствуют цельные мелкие листики. Жилки с нижней стороны листа выступают.

Листья брусники. Кусочки листьев кожистые, округлые от светло-зеленого до темно-зеленого цвета, с нижней стороны более светлые. Встречаются частицы с коричневыми железками. Изредка встречаются остатки жилок темно-зеленого цвета.

Плоды шиповника. Кусочки гипантия неправильной формы, морщинистые от оранжево-красного до коричнево-красного цвета. Изредка встречаются кусочки гипантия, покрытые жесткими щетинистыми волосками с внутренней стороны. Цельные орешки или кусочки орешков желто-белого или кремового цвета иногда полые.

Плоды калины. Кусочки околоплодника блестящие темно-красного или оранжево-красного цвета. Кусочки скорлупы твердые, плоские желто-коричневые, с наружной стороны мелкобороздчатые.

Листья земляники. Частицы листьев, густо опушенные тонкими, белыми волосками. Верхняя сторона зеленого цвета с редким опушением,

нижняя сторона светло-зеленая с многочисленными волосками. С нижней стороны кусочков листьев выступают жилки, имеющие густое опушение. Фрагменты черешков листьев покрыты многочисленными волосками.

Столбики с рыльцами кукурузы. Кусочки мягких тонких нитей (столбиков) от светло-желтого до коричневого цвета. Частицы в поперечном сечении плоские, утолщенные по краям. Кусочки столбиков продольно морщинистые и часто вдоль перекрученные.

Семена лимонника. Цельные семена лимонника округлопочковидной формы с гладкой блестящей поверхностью от желто-коричневого до коричневого цвета. С вогнутой стороны поперек семени имеется заметный рубчик. Семена хрупкие, ядро отстает от кожуры. Ядро семени содержит жирное масло. В сборе встречаются треснувшие семена и их фрагменты. Вкус семян пряный, горьковато-жгучий, запах специфический.

Таким образом при визуальном осмотре не вызывает затруднений диагностика семян лимонника, травы горца птичьего, плодов шиповника по совокупности отличительных признаков. Листья брусники, земляники и столбики с рыльцами кукурузы определяются при помощи лупы или стереомикроскопа. Измельченная мякоть плодов калины часто не отличается от измельченного гипантия шиповника. Характерная плоская косточка плодов калины в раздробленном виде также плохо идентифицируется среди прочих светлых, твердых кусочков сырья.

Порошок сбора представляет собой смесь измельченных частиц сырья, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм. Средний размер частиц порошка $0,65 \pm 0,05$ мм. Порошок преимущественно однородного коричнево-зеленого цвета.

При просмотре порошка сбора под лупой и стереомикроскопом видны фрагменты сырья разнообразной формы и окраски.

Трава горца птичьего. Фрагменты белой прозрачной лентообразной ткани с продольными разрывами (раструбы). Кусочки листовых пластинок неправильной формы без волосков серо-зеленого цвета. С нижней стороны

жилки выступают. Кусочки стеблей продольнобороздчатые ровные, зеленые, на изломе с белой губчатой сердцевинкой.

Листья брусники. Кожистые плоские кусочки с ровной блестящей поверхностью и губчатым изломом.

Плоды шиповника. Кусочки красного, темно-красного, оранжевого цвета, неправильной формы, с неровной поверхностью. Твердые кусочки орешков от светло-желтого до светло-коричневого цвета с полостью или без.

Плоды калины. Плоские красные или оранжевые кусочки с одной стороны с мелкобороздчатым рельефом. Плоские белые или желтоватые кусочки семенной кожуры и семян.

Листья земляники. Кусочки листьев неправильной формы с одной стороны зеленого цвета с редким опушением с обратной стороны светло-зеленые с многочисленными тонкими длинными волосками. Частицы листьев с густо опушенной выступающей жилкой.

Столбики с рыльцами кукурузы. Прозрачные, плоские, тонкие, короткие кусочки от светло-желтого до светло-коричневого цвета, утолщенные по краям прямые или перекрученные, продольно морщинистые.

Семена лимонника. Светло-коричневые плоские частицы с одной стороны гладкие ровные или округлые, поверхность обратной стороны с неровным рельефом и остатками ткани белого или желтоватого цвета.

Кроме того, в поле зрения встречаются многочисленные отдельные простые одноклеточные волоски и их обломки: прямые толстостенные остроконечные с узкой полостью и косопоперечными порами и слабоизвилистые, тонкостенные с широкой полостью иногда собранные в пучок (щетинистые волоски шиповника); толстостенные слабоизвилистые остроконечные волоски с узкой полостью, расширяющейся к основанию (волоски листьев земляники). В порошке сбора присутствуют слипшиеся в комки частицы коричневого цвета, состоящие из пылевидных частиц и более крупных фрагментов сырья. Предположительно данные конгломераты представляют собой части эндосперма и кожуры семян лимонника, слипшиеся

с мелкими частицами других компонентов сбора. Попадаются относительно крупные и мелкие частицы неправильной формы от белого до светло-коричневого цвета (эндосперм семян шиповника, калины или лимонника).

Установленные признаки сбора включены в раздел «Внешние признаки» проекта ФСП на сбор противооксалатный (приложение 1).

Микродиагностические признаки сбора установлены на основании анатомического исследования его отдельных компонентов. Микроанализ проводился в соответствии со статьей ГФ XI «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» и статьей «Сборы» с использованием микроскопа Olympus СН (40×, 100×). Измерения проводили при помощи микроскопа Micros MC400A (40×, 100×), оснащенный цифровой камерой Color View II. Цифровые фотографии микропрепаратов обрабатывали с помощью анализатора изображений в программе Mecos.

Трава горца птичьего. При рассмотрении фрагмента листа с поверхности видны изодиаметрические многоугольные клетки верхнего и нижнего эпидермиса длиной 30-75 мкм, шириной 17-43 мкм с прямыми или слегка извилистыми утолщенными стенками и нередко с бурым содержимым (рис. 1). По краю листа видна продольно-складчатая кутикула. Устьица длиной 16-27 мкм, шириной 12-24 мкм окружены тремя клетками эпидермиса - анизоцитный тип (рис. 1). В мезофилле листа находятся друзы оксалата кальция 12-50 мкм в диаметре (рис. 2). С верхней и с нижней стороны листа и вдоль края пластинки расположены механические волокна. Край пластинки имеет сосочковидные выросты эпидермиса (рис. 3). Эпидермис стебля представлен квадратными, прямоугольными и многоугольными клетками длиной 19-84 мкм, шириной 9-49 мкм с коричневым содержимым с прямыми утолщенными стенками (рис. 4). Редко по стеблю встречаются устьица. Обрывки раструбов состоят из узких длинных клеток с прямыми тонкими стенками (рис. 5). Эпидермис околоцветника образован клетками разных форм и размеров (длиной 31-88 мкм, шириной 10-29 мкм) от изодиаметрических до

полигональных с прямыми, волнистыми или извилистыми контурами (рис 6). Стенки клеток околоцветника нередко четковидно утолщены, кутикула морщинистая и образует сосочковидные выросты (рис. 7). На околоцветнике встречаются устьица.

Листья земляники. При рассмотрении с поверхности видны фрагменты листовых пластинок с прямостенными изодиаметрическими клетками верхнего эпидермиса (длиной 40-68 мкм, шириной 18-30 мкм) местами с четко-видными утолщениями (рис. 8). Клетки нижнего эпидермиса (длиной 60-76 мкм, шириной 15-26 мкм) с извилистыми стенками. Устьица (длиной 15-25 мкм, шириной 12-22 мкм) многочисленные аномоцитного типа. Волоски (длиной 562-1656 мкм) многочисленные, простые, одноклеточные, толстостенные, с узкой полостью, расширяющейся у основания (рис. 9). Редко встречаются головчатые волоски на 1-4 клеточной ножке с одноклеточной овальной головкой с коричневым содержимым (рис. 10). Вокруг волосков клетки эпидермиса образуют розетку. В мезофилле листа вдоль жилок находятся многочисленные ромбические кристаллы и друзы оксалата кальция (рис. 11).

Листья брусники. При рассмотрении листа с верхней поверхности видны клетки со слабоизвилистыми стенками длиной 23-69 мкм, шириной 20-48 мкм (рис. 12). Клетки нижнего эпидермиса длиной 20-56 мкм, шириной 16-39 мкм. Среди клеток нижнего эпидермиса встречаются пигментные клетки с красно-коричневым содержимым и железки длиной 145-220 мкм, состоящие из многоклеточной ножки и многоклеточной головки с буро-коричневым содержимым (рис. 13). Устьица парацитного типа длиной 25-34 мкм, шириной 18-25 мкм. По жилкам встречаются толстостенные прямые или изогнутые волоски длиной до 417 мкм. В мезофилле наблюдаются редкие кристаллы оксалата кальция.

Плоды шиповника. В микропрепарате виден гипантий, состоящий из многоугольных утолщенных окончатых клеток наружного эпидермиса, длиной 15-50 мкм, шириной 15-28 мкм (рис. 14); внутренний эпидермис гипантия характеризуется наличием волосков или мест их прикрепления; паренхимная

ткань (диаметр клеток 25-83 мкм) содержит каротиноиды в виде оранжево-красных глыбок и друзы оксалата кальция (рис. 15), длинные одноклеточные толстостенные волоски с полостью (рис. 16).

Плоды калины. В препарате плодов калины виден эпидермис, состоящий из многоугольных клеток длиной 25-80 мкм, шириной 15-45 мкм с четковидно-утолщенными стенками, с оранжево-красным содержимым с редкими устьицами, мякоть плода представлена крупными тонкостенными клетками шириной от 55 до 200 мкм (рис. 17). Встречаются склереиды косточки плода (рис. 18).

Семена лимонника измельченные. В микропрепарате семена лимонника представлены частицами механической ткани семенной кожуры, состоящей из слоя крупных радиально вытянутых прямоугольных клеток длиной 65-132 мкм, шириной 32-88 мкм, с утолщенными одревесневшими темно-желтыми оболочками, пронизанными порами. Под ними расположены группы каменистых клеток. Попадаются отдельные каменистые клетки неправильной формы длиной 81-100 мкм, шириной 40-70 мкм (рис. 19). Встречаются очень крупные тонкостенные прямоугольные клетки длиной 45-80 мкм, шириной 35-68 мкм с каплями жирного масла (рис. 20). Обрывки эндосперма семени состоят из округло-многоугольных клеток длиной 19-50 мкм, шириной 20-45 мкм (рис. 21).

Столбики с рыльцами кукурузы. В препарате столбиков с рыльцами кукурузы наблюдаются узкие вытянутые в длину клетки, иногда с простыми тонкостенными многоклеточными волосками. В паренхиме кусочков видны два тонких проводящих пучка, состоящие из двух спиральных сосудов (рис. 22). В измельченном сырье рыльца практически не обнаруживаются.

В микропрепарате порошка сбора его компоненты представляют собой смесь из различных мелких частиц, размером до 1 см (кусочки стеблей горца птичьего).

Трава горца. Обрывки тканей, состоящие из толстостенных квадратных и прямоугольных клеток с коричневым содержимым. Обрывки листа с

изодиаметрическими многоугольными клетками эпидермиса и круглыми друзами в мезофилле. Обрывки эпидермиса с устьицами анизоцитного типа. Редко встречаются обрывки края листовой пластинки с сосочковидными выростами клеток по краю. Обрывки прозрачной пленчатой ткани с продольными разрывами состоящей из узких длинных клеток.

Листья земляники. Обрывки мезофилла с сосудами и кристаллоносной обкладкой, состоящей из кристаллов ромбической формы. Фрагменты эпидермиса листа с прямыми или слабоизвилистыми стенками клеток, с простыми, одноклеточными волосками и устьицами аномоцитного типа.

Листья брусники. Обрывки эпидермиса с клетками со слабоизвилистыми или почти прямыми стенками и с мелкими парацитными устьицами. Обрывки эпидермиса с пигментными клетками, заполненными красно-коричневым содержимым. Обрывки листа с губчатой паренхимой с крупными воздухоносными полостями. Железки, волоски и кристаллы практически не встречаются.

Плоды шиповника. Обрывки эпидермиса гипантия (часто с остатками паренхимы) с неравномерно утолщенными прямыми стенками многоугольных клеток. Обрывки паренхимы гипантия, состоящего из округлых клеток, содержащих включения оранжево-красного цвета, друзы и кристаллы. Обрывки внутреннего эпидермиса гипантия, состоящего из многоугольных клеток, длинных одноклеточных заостренных прямых желтоватых толстостенных волосков с косопоперечными порами и полостью. Обрывки проводящих пучков со спиральными сосудами.

Плоды калины. Обрывки ткани с многоугольными прямостенными клетками эпидермиса, содержащими капли оранжевого масла. Обрывки мякоти плода из очень крупных тонкостенных клеток.

Семена лимонника. Частицы механической ткани семенной кожуры, с утолщенными одревесневшими темно-желтыми оболочками, пронизанными порами. Обрывки эндосперма семени, состоящие из округло-многоугольных

клеток, иногда с каплями жирного масла. Каменистые клетки неправильной формы.

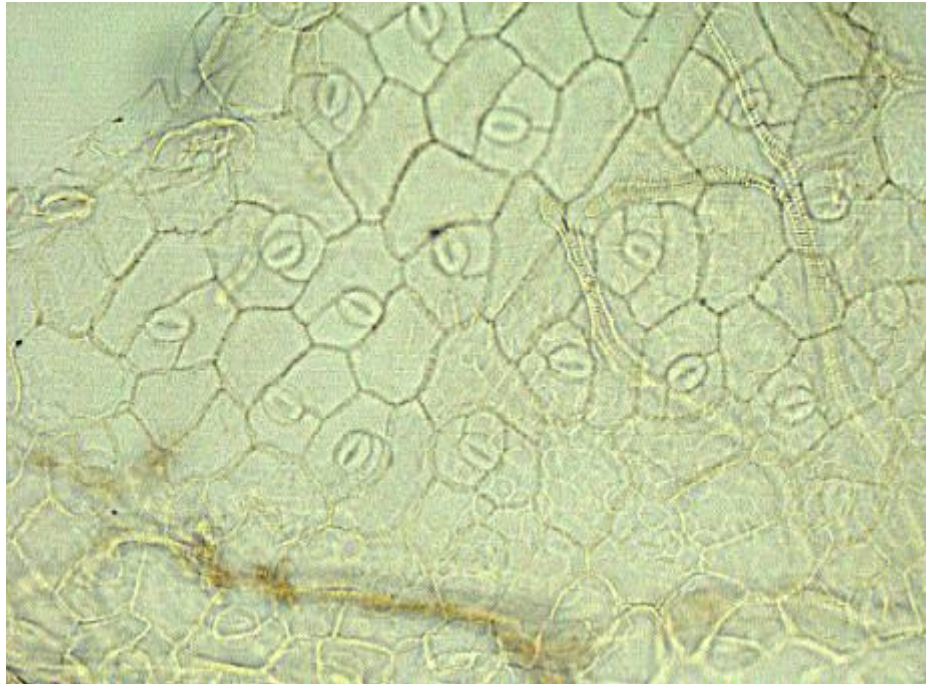


Рисунок 1 – Горца птичьего трава. Фрагмент листа с многоугольными клетками эпидермиса и устьицами анизоцитного типа (увел. 100×)

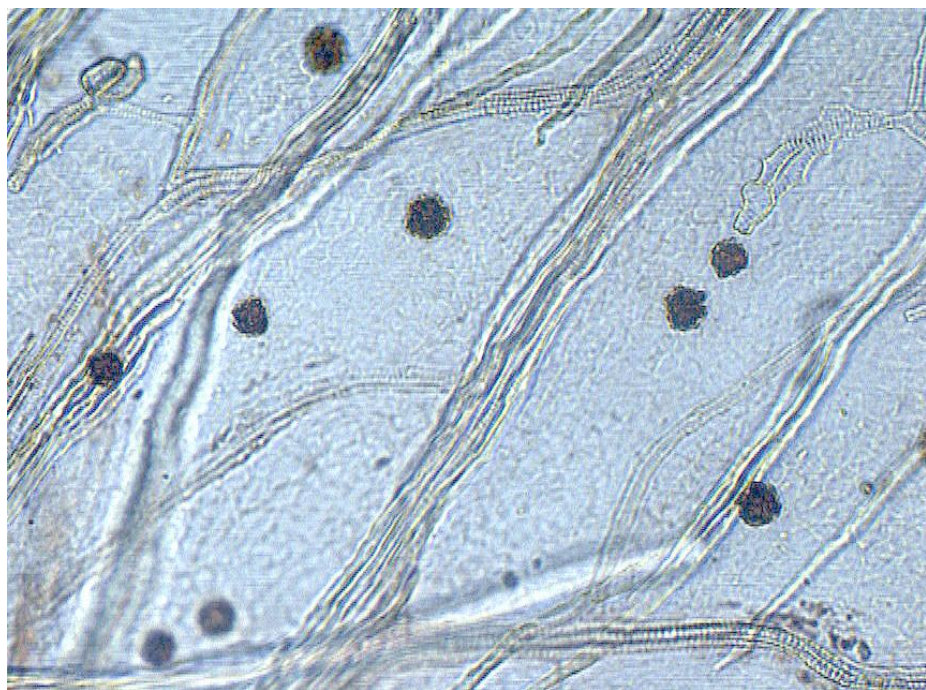


Рисунок 2 – Горца птичьего трава. Фрагмент листа с друзами оксалата кальция (увел. 40×)

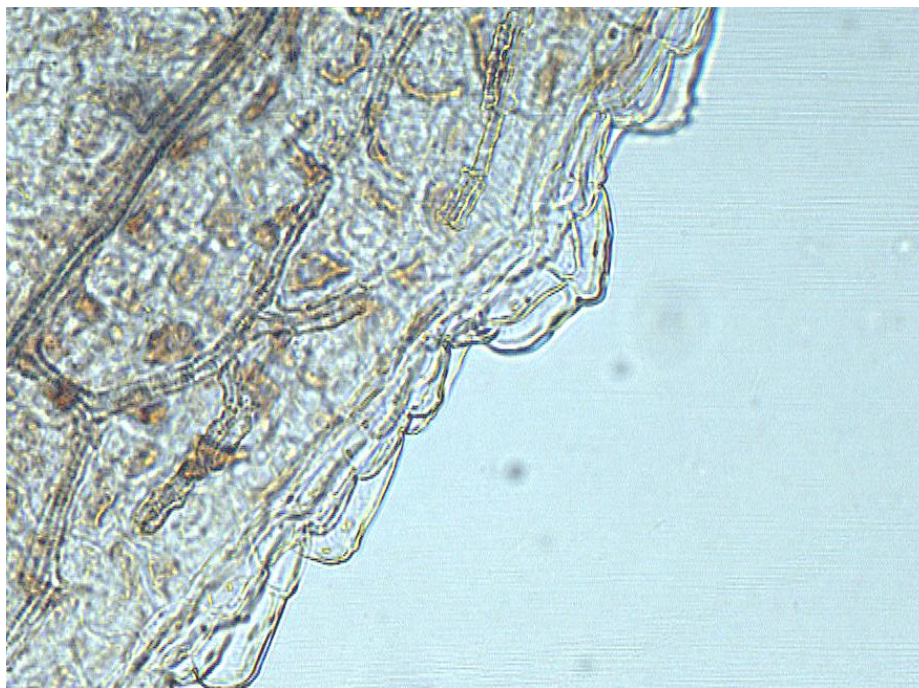


Рисунок 3 – Горца птичьего трава. Фрагмент края листа с клетками эпидермиса вытянутыми в сосочек (увел. 40×)

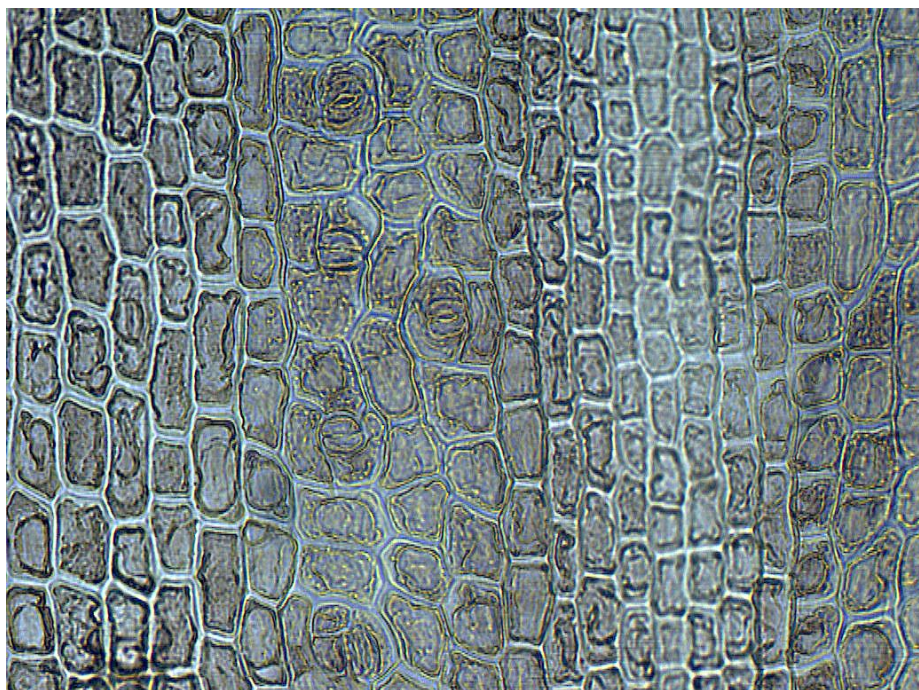


Рисунок 4 – Горца птичьего трава. Фрагмент эпидермиса стебля с прямостенными клетками с коричневым содержимым (увел. 40×)

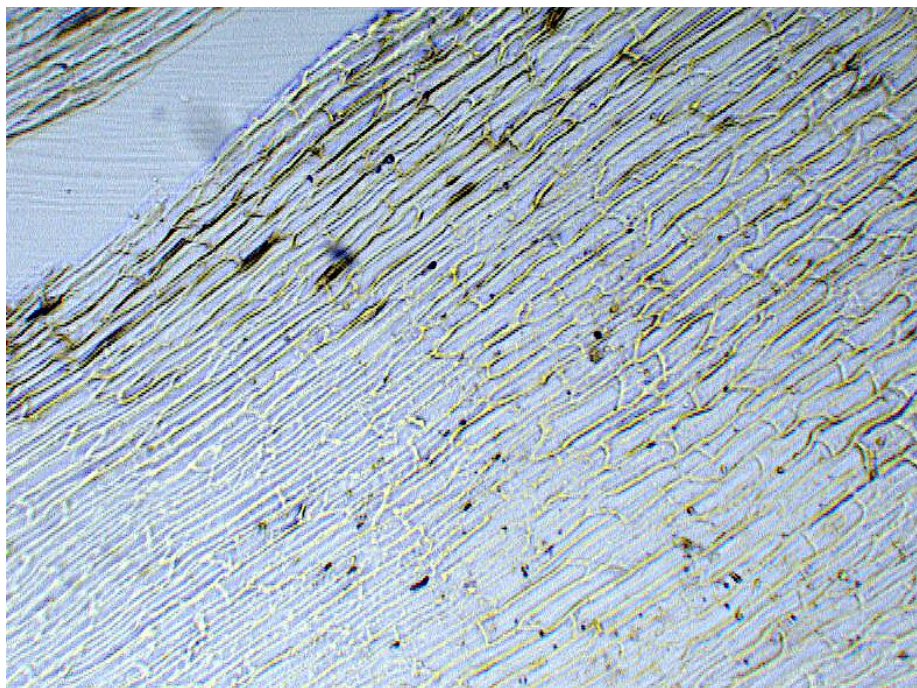


Рисунок 5 – Горца птичьего трава. Фрагмент пленчатого раструба с узкими прямостенными клетками эпидермиса (увел. 100×)

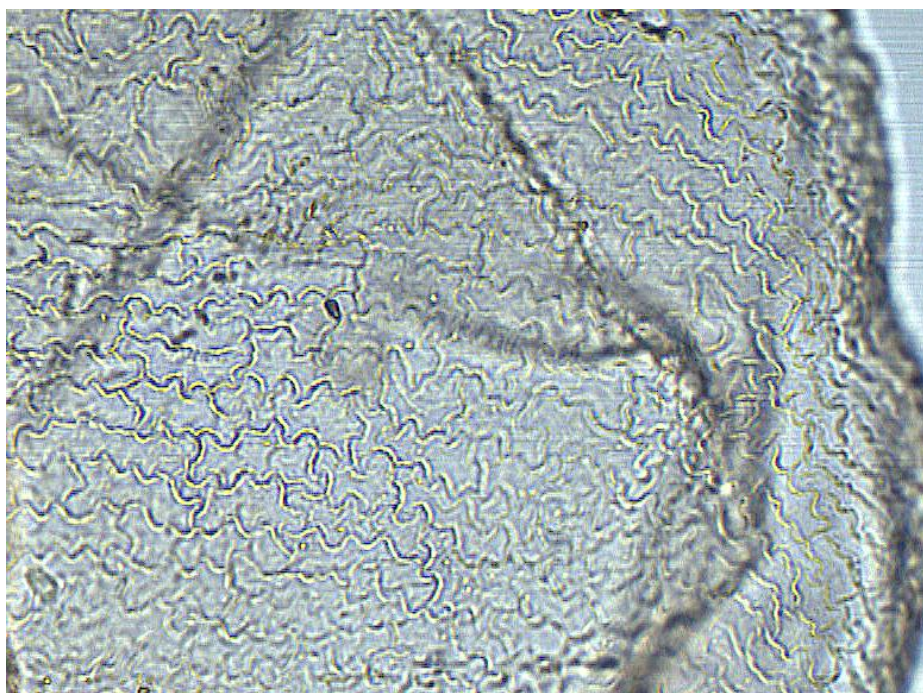


Рисунок 6 – Горца птичьего трава. Фрагмент венчика цветка с извилистыми стенками клеток эпидермиса (увел. 100×)

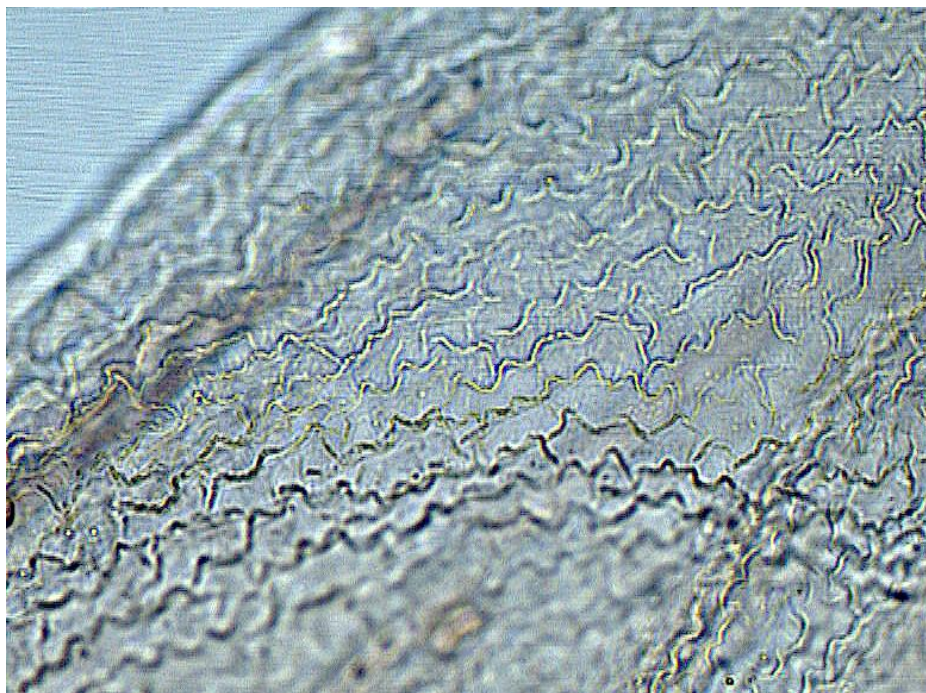


Рисунок 7 – Горца птичьего трава. Фрагмент венчика цветка. Клетки эпидермиса с сильноизвилистыми стенками, сосочковидными выростами и морщинистой кутикулой (увел. 100×)

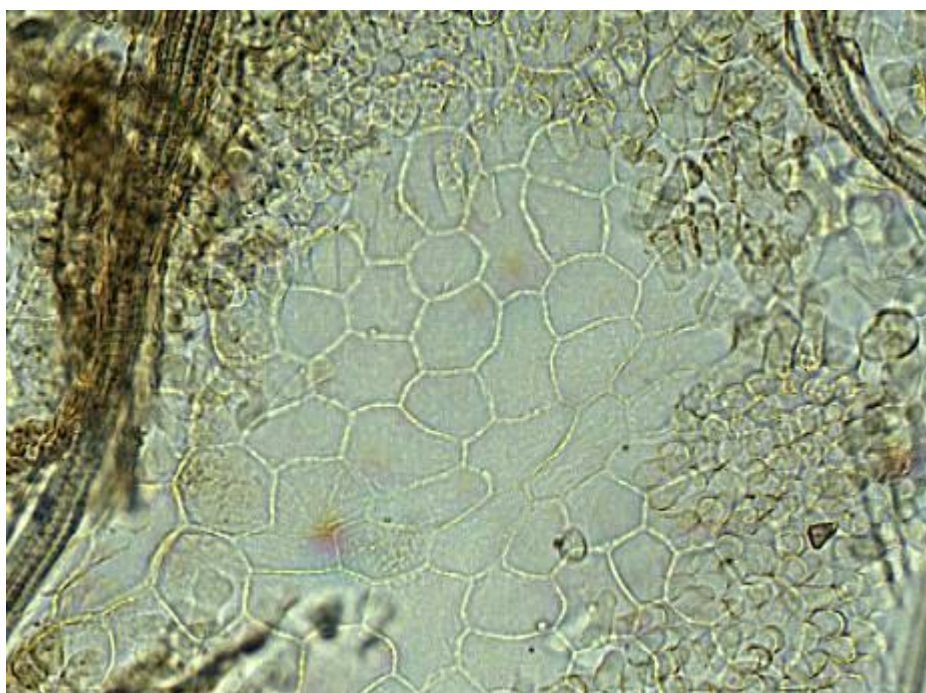


Рисунок 8 – Земляники листья. Фрагмент листа с прямостенными эпидермальными клетками (увел. 100×)



Рисунок 9 – Земляники листья. Фрагмент эпидермиса листа с простыми одноклеточными волосками (увел. 100×)

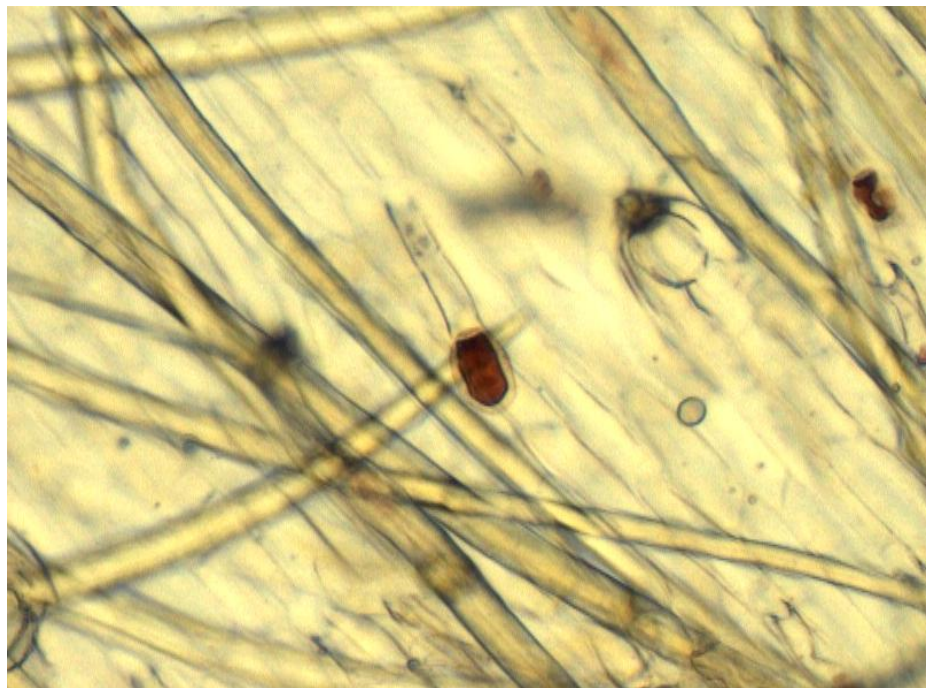


Рисунок 10 – Земляники листья. Фрагмент нижнего эпидермиса листа с головчатыми волосками (увел. 100×)

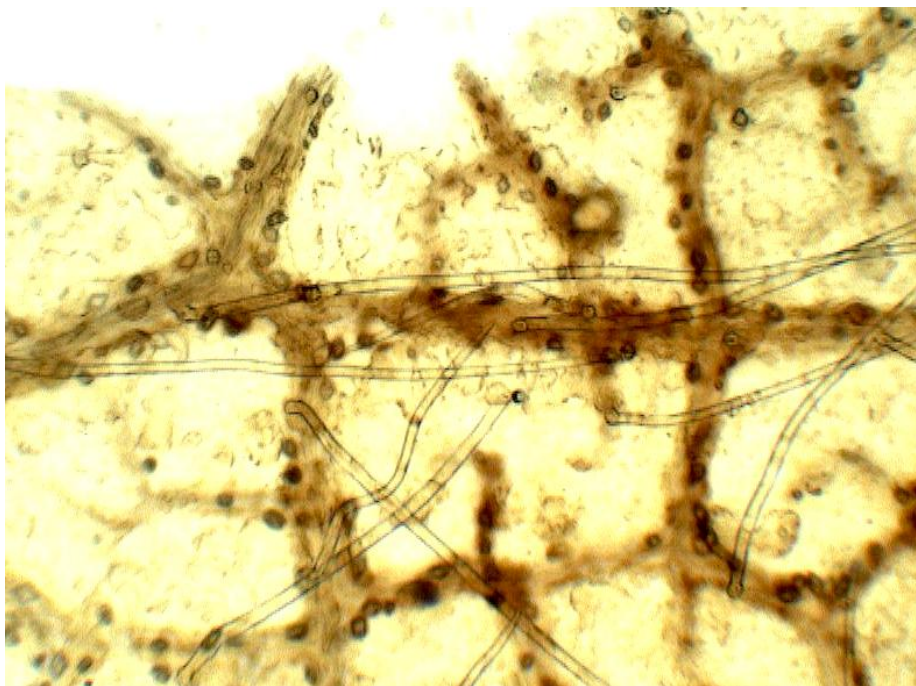


Рисунок 11 – Земляники листьѧ. Фрагмент листа с ромбическими кристаллами оксалата кальция по жилкам (увел. 40×)

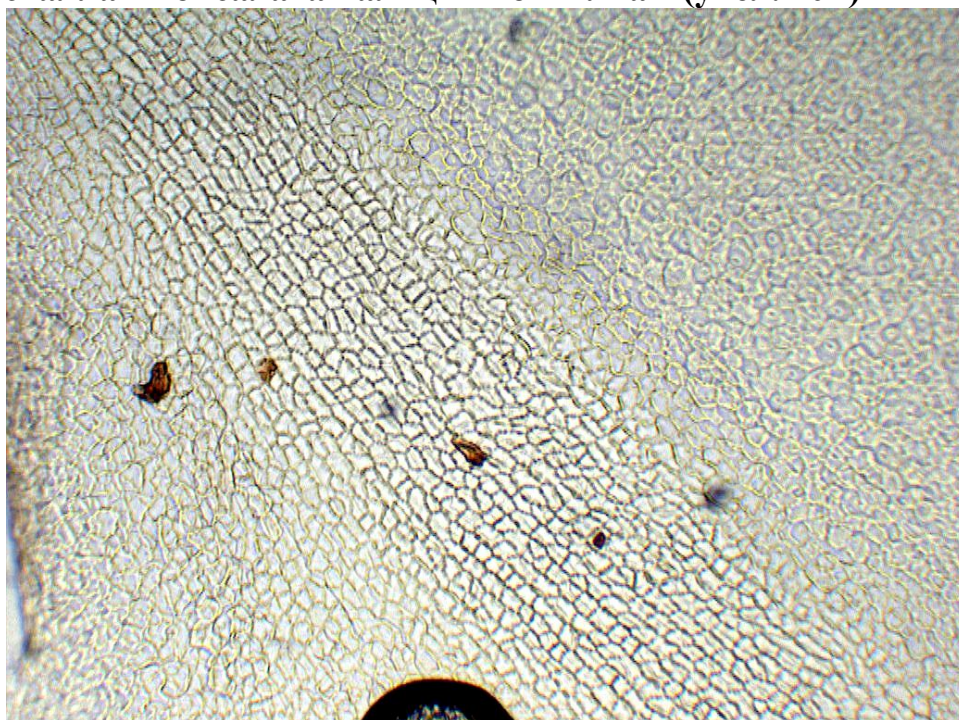


Рисунок 12 – Брусники листьѧ. Фрагмент эпидермиса листа с устьицами и извилистыми клетками (увел. 100×)



Рисунок 13 – Фрагмент листовой пластинки брусники. Железка. (Увел. 100×)

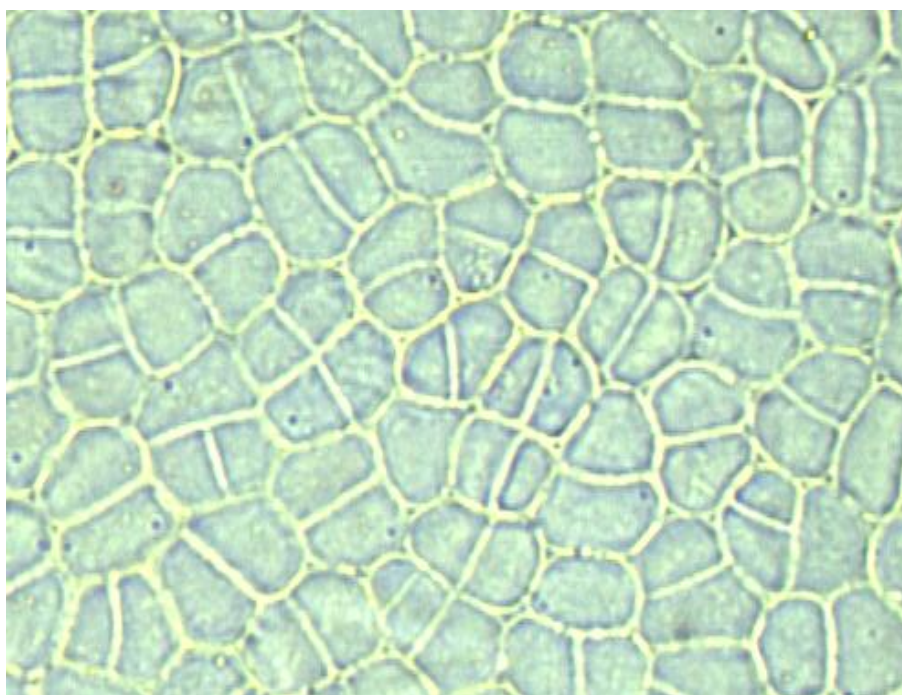


Рисунок 14 – Шиповника плоды. Фрагмент наружного эпидермиса гипантия с окончатыми клетками (увел. 100×)

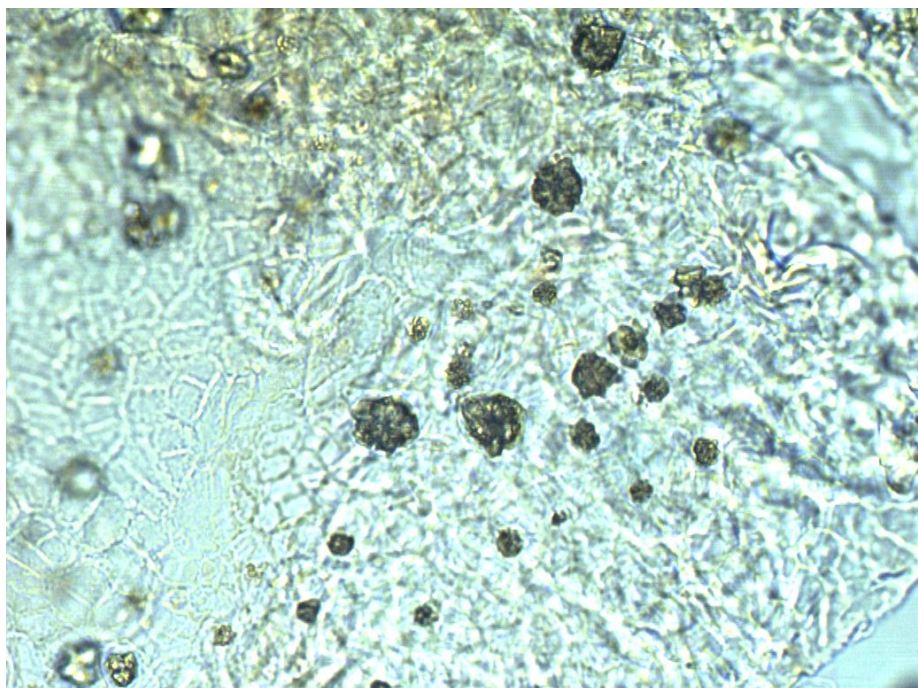


Рисунок 15 – Шиповника плоды. Клетки паренхимы с друзами (увел. 40×)



Рисунок 16 – Шиповника плоды. Простые волоски с полостью (увел. 40×)

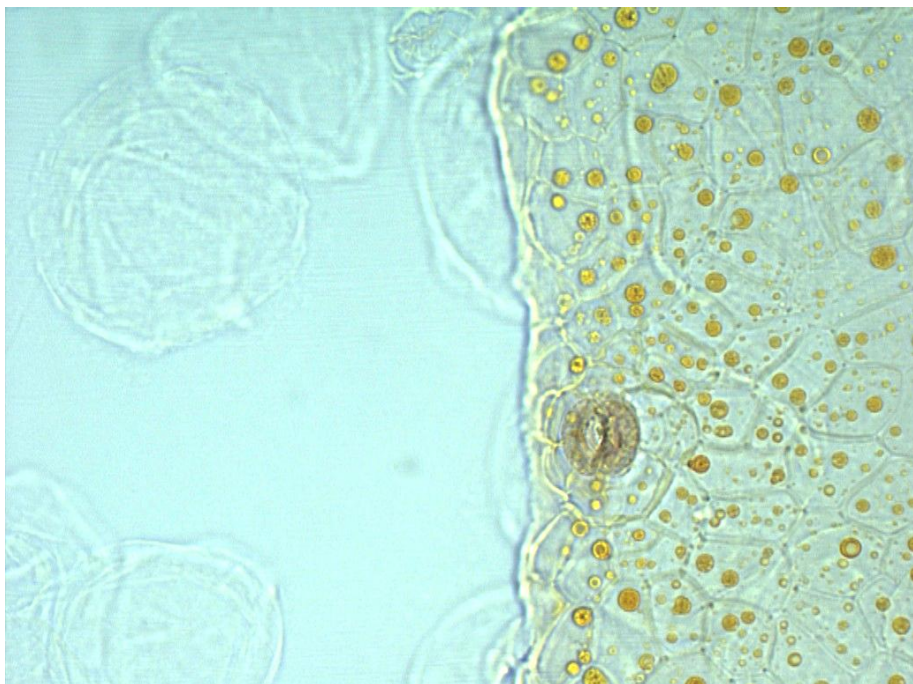


Рисунок 17 – Калины плоды. Клетки эпидермиса с оранжевым содержимым. Клетки мякоти. Устьице (увел. 100×)

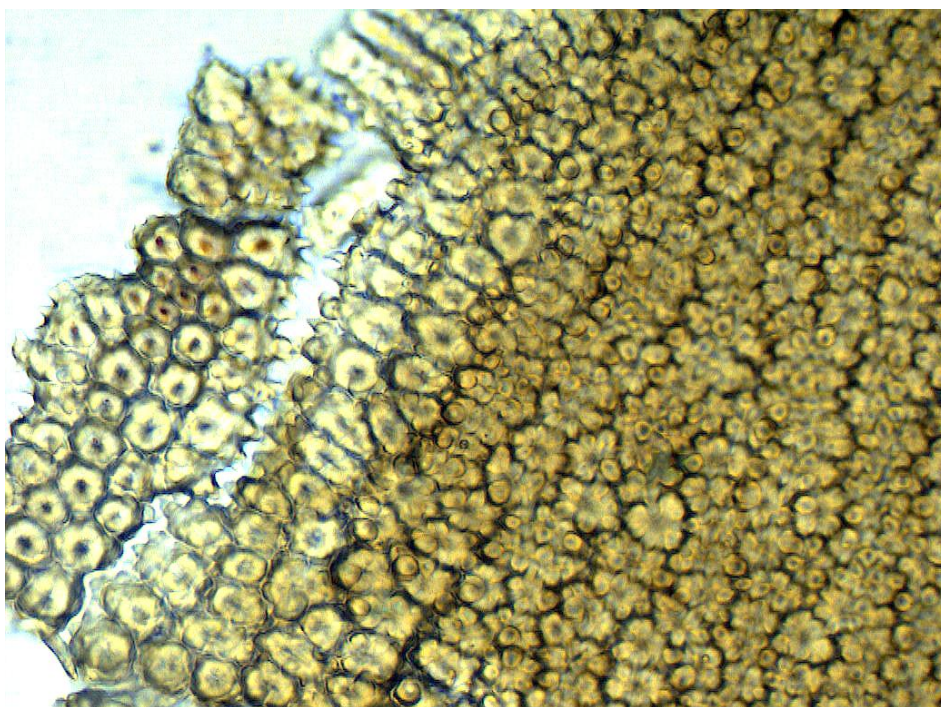


Рисунок 18 – Калины плоды. Склерейды косточки плода (увел. 100×)



Рисунок 19 – Лимонника семена. Одревесневшие клетки семенной кожуры (увел. 100×)



Рисунок 20 – Лимонника семена. Тонкостенные прямоугольные клетки с включениями капель масла (увел. 100×)



Рисунок 21 – Лимонника семена. Клетки эндосперма и одревесневшие клетки механической ткани (увел. 100×)

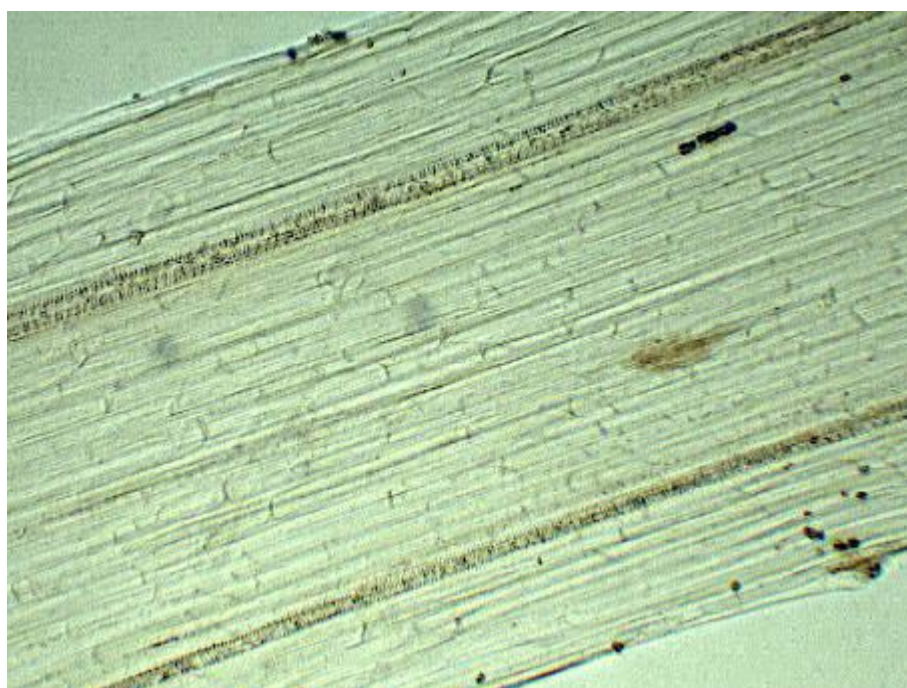


Рисунок 22 – Кукурузы столбики с рыльцами. Клетки эпидермиса. Проводящие пучки (увел. 40×)

Столбики с рыльцами кукурузы. Короткие обрывки столбиков, состоящие из узких длинных клеток эпидермиса. Редко встречаются частицы столбиков с простыми волосками. С обеих сторон частиц проходят спиралевидные сосуды.

Кроме того, в препарате встречаются отдельные волоски шиповника и земляники, каменистые клетки, которые могут быть отнесены к плодам шиповника, калины или семенам лимонника.

Таким образом, к наиболее значимым диагностическим признакам, соответствующим листьям земляники, относятся одноклеточные и головчатые волоски и призматические кристаллы оксалата кальция по жилкам; траве спорыша – многочисленные крупные друзы в мезофилле, изодиаметрические многоугольные клетки эпидермиса с прямыми или извилистыми утолщенными стенками, устьица анизоцитного типа; листьям брусники – слабо извилистые стенки эпидермиса, устьица парацитного типа и многоклеточные железки с коричневым содержимым; плодам шиповника – простые волоски и окончательные клетки наружного эпидермиса гипантия; плодам калины – неравномерно утолщенные прямостенные клетки эпидермиса с каплями оранжевого масла; семенам лимонника – округлые клетки эндосперма с каплями жирного масла и пронизанные порами, одревесневшие, утолщенные прямоугольные клетки механической ткани; столбикам кукурузы – сильно вытянутые узкие клетки и спиральные сосуды, расположенные вдоль края столбика.

Перечисленные выше микроскопические признаки включены в раздел «Микроскопия» проекта ФСП для определения подлинности сбора.

2.2. Качественный анализ БАВ в сборе и разработка физико-химических методик определения подлинности

Содержание БАВ в сборе изучали с учетом литературных данных о химическом составе компонентов.

Для обнаружения основных групп БАВ в сборе были проведены химические реакции с водными и водно-спиртовыми извлечениями. Присутствие флавоноидов обнаруживали по цианидиновой реакции и реакции с алюминия хлоридом. Наличие арбутина в водном извлечении обнаруживали по

реакции с железа (II) сульфатом. Присутствие дубильных веществ и их характер устанавливали по реакциям с железно-аммониевыми квасцами, с реактивом Фолина, растворами калия бихромата, свинца ацетата с уксусной кислотой и формальдегида с концентрированной кислотой хлористоводородной. Результаты реакции пенообразования свидетельствовали о присутствии сапонинов в сборе. Наличие полисахаридов подтвердили по реакции осаждения спиртом этиловым 95%. По совокупности результатов реакций предварительно заключили о наличии в сборе флавоноидов, арбутина, гидролизуемых и конденсируемых дубильных веществ, полисахаридов и сапонинов.

2.2.1. Хроматографическое исследование сбора противооксидантного

Известно, что химические реакции, особенно применительно к водным извлечениям из ЛРС, не являются специфичными, поэтому, следуя современным тенденциям, мы провели хроматографическое исследование сбора. Хроматографирование проводили на пластинках ПТСХ «Sorbfil» и TLC Silica gel 60 F₂₅₄ фирмы Merck. Образцы на пластинки наносили с помощью линомата "Camag". Анализ и обработку хроматограмм проводили с использованием систем для обработки хроматограмм с денситометрами "Camag" и "Sorbfil".

При хроматографическом анализе сбора основной акцент делали на обнаружении фенольных соединений. Для этого 20 граммов сбора экстрагировали на водяной бане спиртом этиловым 70 % трижды по 150 мл. Затем извлечение упаривали под вакуумом до 30 мл, остаток фильтровали (от осадка липофильных веществ) и обрабатывали в делительной воронке равными объемами хлороформа, этилацетата и бутанола в пятикратной повторности. Этилацетатную и бутанольную фракции использовали для обнаружения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, предварительно упарив их и растворив сухой остаток в спирте этиловом 70% (10 мл).

Детектирование фенольных соединений проводили в соответствующих системах растворителей (см. таблицу 2). Для идентификации использовали вещества-свидетели: рутин, кверцетин, гиперозид, авикулярин, изокверцитрин, арбутин, хлорогеновую и кофейную кислоты. Пластинки просматривали в

видимом и УФ свете при 254 нм и 365 нм до и после обработки 10% раствором алюминия хлорида.

Таблица 2– Хроматографические системы для идентификации веществ в сборе

№ п/п	Состав системы	Идентификация БАВ	Rf
1	этилацетат : метанол : вода (100:17:13)	хлорогеновая кислота гиперозид авикулярин	0,16 0,47 0,61
2	этилацетат : муравьиная кислота : вода (80:8:12)	гиперозид изокверцитрин авикулярин	0,41 0,51 0,78
3	толуол : этилацетат : уксусная кислота (70 : 33 : 3)	лигнаны семян лимонника	-

В системе 1 подтверждено присутствие авикулярина ($R_f=0,61$), гиперозида ($R_f=0,47$) и хлорогеновой кислоты ($R_f=0,16$). Кроме того, в данной системе обнаруживаются до 8 веществ флавоноидной природы и 2 соединения с голубой флуоресценцией с различными значениями R_f (табл. 3). Зоны 2, 5, 7, 8, 13 отличаются яркой флуоресценцией и соответствуют веществам, доминирующим в сборе.

Таблица 3 – Результаты детектирования хроматограммы этилацетатной фракции сбора противооксидантного в системе этилацетат : метанол : вода (100:17:13)

№ п/п	Rf	Интенсивность проявления	Окраска в УФ-свете при 365 нм после проявления
1	0,83	+	голубая
2	0,74	+++	голубая
3	0,69	+	желто-зеленая
4	0,64	+	желтая
5	0,61	+++	желто-зеленая (авикулярин)
6	0,58	+	голубая*
7	0,54	+++	желтая
8	0,47	+++	желтая (гиперозид)
9	0,42	+	желтая
10	0,38	++	желто-зеленая
11	0,33	+	желтая
12	0,29	++	желтая
13	0,21	+++	желтая
14	0,16	++	голубая (хлорогеновая кислота)
15	0,12	+	желтая

Примечание. * – флуоресценция пятна до обработки проявляющим реактивом

В системе 2 обнаружено 13 пятен веществ, из них к флавоноидам могут быть отнесены 10 соединений, к фенолкарбоновым кислотам – 3 (табл. 4). В данной системе с веществами - свидетелями идентифицированы авикулярин ($R_f=0,78$), изокверцитрин ($R_f=0,51$), гиперозид ($R_f=0,41$). В треке сбора преобладают 8 веществ (с 4 по 11).

Таблица 4 – Результаты детектирования хроматограммы фракций сбора противооксалатного в системе этилацетат : муравьиная кислота : вода (80:8:12)

№ п/п	R_f	этилацетатная фракция	бутанольная фракция	Окраска в УФ-свете при 365 нм после проявления
1	0,98	+	-	голубая
2	0,94	+	-	синяя
3	0,86	++	-	желто-зеленая
4	0,78	+++	-	желтая (авикулярин)
5	0,70	++	-	желто-зеленая
6	0,60	++	-	желтая
7	0,51	++	+	желтая (изокверцитрин)
8	0,41	++	++	желто-зеленая (гиперозид)
9	0,40	-	+++	голубая
10	0,33	++	++	желтая
11	0,19	+	+	желтая
12	0,16	+	++	желтая
13	0,14	-	+	желто-зеленая

Обнаружение БАВ семян лимонника проводили в системе 3 [221,290]. Образец измельченного сбора и семян лимонника экстрагировали спиртом этиловым 95% в соотношении 1:10 на водяной бане в течении 15 минут. Аналогично готовили образец сбора без семян лимонника. Полученные экстракты после охлаждения фильтровали через бумажный фильтр, затем фильтрат (10 и 20 мкл для семян лимонника и сбора соответственно) наносили на старт хроматографической пластинки TLC Silica gel 60 F₂₅₄ фирмы Merck. После прохождения фронтом растворителей 55 мм пластинку сушили, детектирование пятен осуществляли, просматривая хроматограмму в УФ-свете при $\lambda=254$ нм до обработки и при $\lambda=365$ нм после обработки серноокислым реактивом. В результате было обнаружено совпадение треков семян лимонника

и сбора при просмотре хроматограммы при 254 нм (табл. 5). В треке сбора были обнаружены темные пятна, соответствующие таковым в треке семян лимонника и характеризующиеся значениями $R_f=0,29$; $0,33$; $0,37$; $0,43$; $0,49$; $0,57$; $0,67$; $0,72$. Зоны, соответствующие веществам лимонника в сборе с $R_f=0,37$ и $0,72$, перекрываются другими веществами сбора. По литературным данным и полученным значениям R_f , можно предположить, что пятна соответствующие $R_f=0,29; 0,33; 0,57; 0,67$ могут быть отождествлены с схизандринном, схизандролом В, дезоксисхизандринном, γ -схизандринном соответственно. После проявления хроматограммы серноокислым реактивом в треке сбора обнаруживается перекрывание пятен БАВ лимонника сопутствующими зонами других веществ сбора, в результате чего происходит искажение окраски пятен лигнанов (табл. 5). В частности вещества лимонника с $R_f=0,46$ и $0,49$ перекрываются широкой розовой зоной с $R_f=0,46$, а на зоны с $R_f=0,57$ и $0,89$ накладываются пятна других веществ сбора с соответствующими значениями R_f . Как следствие, часть веществ, соответствующих БАВ лимонника, не идентифицируются после обработки реактивом.

В целом хроматографически в сборе идентифицированы гиперозид, изокверцитрин, авикулярин, арбутин* и хлорогеновая кислота, показано присутствие четырех лигнанов лимонника.

На следующем этапе мы провели сравнение хроматографических профилей сбора с его сырьевыми компонентами. Образцы сбора и сырьевых источников экстрагировали спиртом этиловым 70 % в соотношении 1:10 при нагревании на водяной бане. После охлаждения фильтровали и наносили на хроматографическую пластинку по 10 мкл фильтрата. В системе 1 обнаружили совпадение по большинству зон соответствующих БАВ брусники с $R_f=0,83$, $0,61$, $0,64$, $0,54$, $0,47$, $0,42$, $0,33$, $0,21$, $0,16$. Зоны с $R_f=0,69$ и $0,12$ совпадали с аналогичными в треке земляники, а пятно с $R_f=0,74$ соответствовало таковому в спорыше (рис. 23).

* Арбутин идентифицирован в сборе методом ВЭЖХ (см. раздел 2.5).

Таблица 5 – Результаты детектирования хроматограммы сбора противооксидантного и семян лимонника в системе толуол : этилацетат : уксусная кислота (70:33:3)

№ п/п	Rf	Семена лимонника			Сбор			
		пятна видимые при $\lambda=254$	окраска пятен после проявления сернокислым реактивом		пятна видимые при $\lambda=254$	окраска пятен после проявления сернокислым реактивом		
			при $\lambda=365$	в видимом свете		при $\lambda=365$	в видимом свете	
1	0,11	-	-	-	-	желто- коричневая	серая	
2	0,17	-	-	-	-	желто - коричневая	серая	
3	0,22	-	-	-	-	желто - коричневая	серая	
4	0,29	+	(схизандрин)	темно-серая	серая	+	темно-серая	темно-серая
5	0,33	+	(схизандрол В)	темно-синяя	синяя	+	темно-синяя	темно-синяя
6	0,37	+		коричневая	коричневая	+	коричневая	коричневая
7	0,43	+		серая	коричневая	+	серая	серая
8	0,46	-		желтая	серая	-	розовая	розовая
9	0,49	+		серая	коричневая	+	-	
10	0,57	+	(дезоксисхизандрин)	коричневая	серая	+	желто- коричневая	серо- коричневая
11	0,67	+	(γ -схизандрин)	темно-серая	розовая	+	темно-серая	розовая
12	0,72	+		желтая	серая	+	желтая	серая
13	0,76	-		серая	коричневая	-	серая	коричневая
14	0,89	-		оранжевая	коричневая	-	оранжевая	коричневая

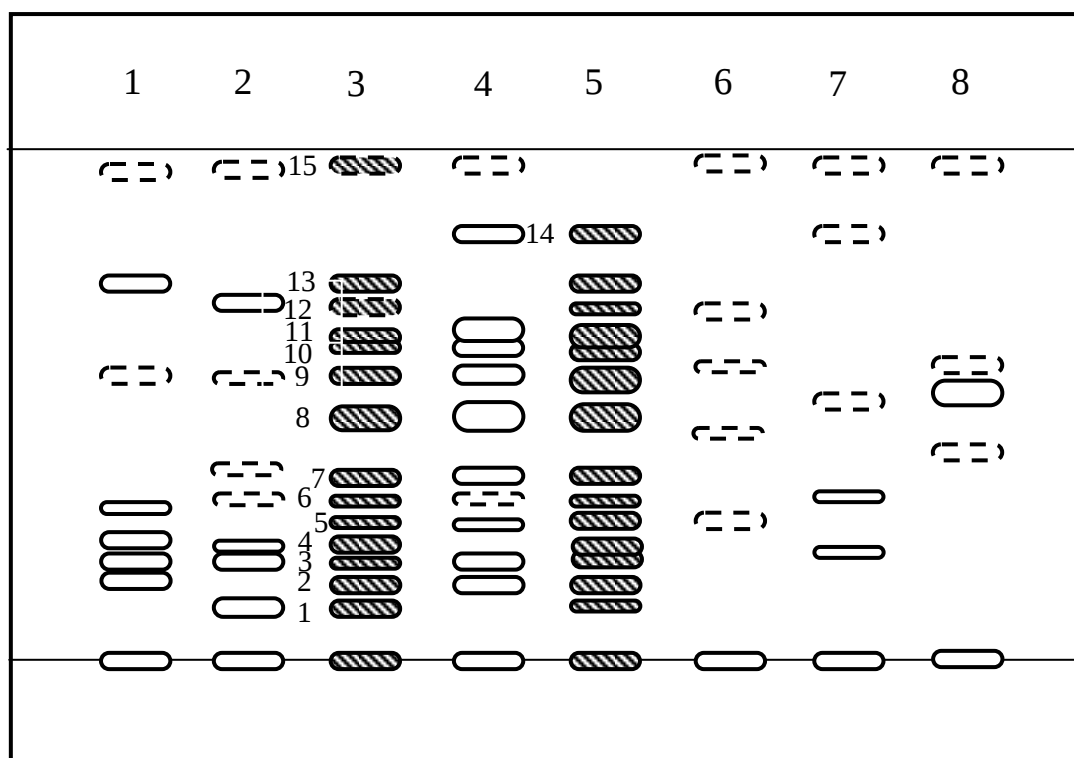


Рисунок 23 – Схема хроматограммы сбора противооксалатного и его сырьевых источников в системе растворителей этилацетат : метанол : вода (100:17:13) после проявления реактивом, в УФ свете при 365 нм: 1 – трава спорыша, 2 – листья земляники, 3 – сбор, 4 – листья брусники, 5 – этилацетатная фракция сбора, 6 – плоды шиповника, 7 – плоды калины, 8 – столбики с рыльцами кукурузы.

Примечание: заштрихованные зоны на хроматограмме соответствуют трекам сбора и его этилацетатной фракции и имеют значения Rf в порядке возрастания: 1-0,12, 2-0,16, 3-0,21, 4-0,29, 5-0,33, 6-0,38, 7-0,42, 8-0,47, 9-0,54, 10-0,61, 11-0,64, 12-0,69, 13-0,74, 14-0,83, 15-0,97.

В системе 2 наблюдали совпадение 6 пятен в треке сбора с пятнами в треке спорыша (с Rf= 0,86, 0,78, 0,70, 0,60, 0,51, 0,40), зоны с Rf=0,86, 0,51, 0,40, 0,33, 0,19 соответствовали веществам в треке земляники. Шесть ярко флуоресцирующих зон в бруснике (с Rf= 0,98, 0,94, 0,78, 0,70, 0,60, 0,41, 0,33) совпадали с таковыми в сборе (рис. 24). Сопоставив и проанализировав интенсивность и окраску флуоресценции зон в треках компонентов с веществами сбора можно заключить, что зона с Rf=0,33 соответствует только листьям земляники, пятно в треке сбора с Rf=0,94 имеет слабую синюю флуоресценцию и совпадает с аналогичными зонами в треке брусники и калины.

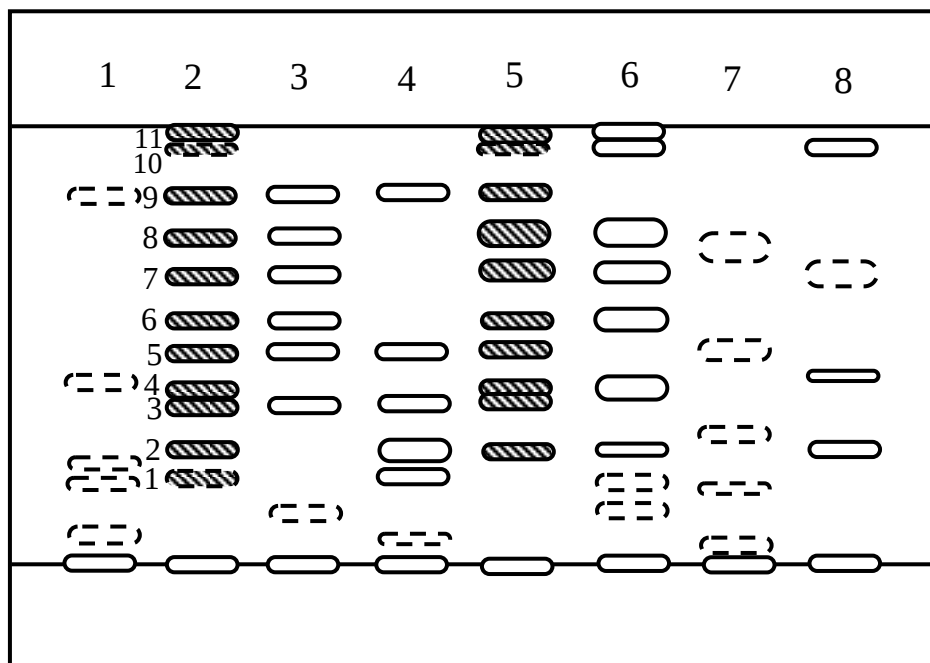


Рисунок 24 – Схема хроматограммы сбора противооксалатного и его сырьевых источников в системе растворителей этилацетат : муравьиная кислота : вода (80:8:12) после проявления в УФ свете при 365 нм: 1 – плоды шиповника, 2 – сбор, 3 – трава спорыша, 4 – листья земляники. 5 – этилацетатная фракция сбора, 6 – листья брусники, 7 – столбики с рыльцами кукурузы, 8 – плоды калины.

Примечание: заштрихованные зоны на хроматограмме соответствуют трекам сбора и его этилацетатной фракции и имеют значения Rf в порядке возрастания: 1-0,19, 2-0,33, 3-0,40, 4-0,41, 5-0,51, 6-0,60, 7-0,70, 8-0,78, 9-0,86, 10-0,94, 11-0,98.

В треках остальных компонентов при хроматографировании в данных системах наблюдались зоны, имеющие слабую флуоресценцию и совпадающие по положению с веществами количественно преобладающими в бруснике, спорыше и землянике.

2.2.2. Хроматографическое определение подлинности сбора

Для определения подлинности сбора и обеспечения гарантий качества, т.е. исключения возможности недовложения отдельных сырьевых компонентов, было предложено включить в проект ФСП методику определения гиперозида в сборе. Гиперозид выбран нами в качестве маркера по следующим причинам: во-первых, он встречается в сырье горца птичьего, брусники, шиповника [56, 133,187]; во-вторых, гиперозид является относительно распространенным и доступным стандартным образцом [59,141]; и в-третьих, хроматограмма,

позволяющая обнаружить гиперозид, может быть использована, как стандартная хроматограмма, так как на ней проявляются вещества, соответствующие основным сырьевым компонентам. проявляются вещества, соответствующие основным сырьевым компонентам.

Исследования, описанные выше, показали, что для определения гиперозида наилучшим образом подходит система этилацетат: муравьиная кислота: вода (80:8:2). Хроматографирование в данной системе мы предлагаем для включения в проект ФСП. С этой целью в стандартных условиях было проведено хроматографирование спиртовых извлечений образца сбора в трех повторностях. Извлечения получали в соотношении 1:10 в спирте этиловом 70 %. В качестве вещества-свидетеля использовали 0,1 % спиртовый раствор ГСО гиперозида. По полученным зонам адсорбции рассчитали значения R_s по гиперозиду ($R_s=1,0$). Для основных зон (табл. 3) средние значения R_s составляют: 1 – 2,11; 2 – 1,90; 3 – 1,71; 4 – 1,47; 5 – 1,24; 6 – 1,00; 7 – 0,48; 8 – 0,34. Относительная ошибка ($S_{\Delta x}$, %) величины R_s составила от 1,4 до 4,6 %. Рассчитанный критерий разрешения между зонами с R_s 1,00 и 1,24 варьирует от 1,03 до 1,89 и в среднем составляет 1,40.

В аналогичных стандартных условиях провели хроматографирование разных серий сбора. В полученных треках проявились основные зоны, несколько различающиеся по степени интенсивности флуоресценции, с соответствующими значениями R_s . Дополнительно на хроматограммах образцов сбора имеется широкая голубая зона от линии старта до $R_s=0,2$ и красная зона на линии фронта. Также могут обнаруживаться пятна со значениями R_s около 0,70 и 0,80, имеющие слабую флуоресценцию желтого цвета и 2,29 с синей флуоресценцией; зона с $R_s=2,39$ в видимом свете, имеющая светло коричневую окраску.

Методика, предложенная для включения в проект ФСП, приведена ниже.

Хроматографическое определение флавоноидов в сборе.
Аналитическую пробу сбора измельчают до размеров частиц сырья, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм.

1 грамм измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 70% спирта этилового и нагревают на кипящей водяной бане

в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытываемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки TLC Silica gel 60 F₂₅₄ фирмы Merck размером 100 x 100 мм наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм 10 мкл испытываемого раствора и параллельно 3 мкл раствора ГСО гиперозида. Пластинку подсушивают на воздухе в течение 10 минут и помещают в камеру со смесью растворителей этилацетат : муравьиная кислота : вода (80:8:12) (предварительно насыщенную системой в течение 20 минут) и хроматографируют восходящим способом.

После прохождения фронтом растворителей 70 мм пластинку вынимают из камеры, высушивают для удаления следов растворителя. Затем пластинку опрыскивают 10% раствором алюминия хлорида, высушивают в сушильном шкафу при 100-105⁰ С в течение 2-3 минут и просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора ГСО гиперозида должна обнаруживаться зона с флюоресценцией желто-зеленого цвета с R_f около 0,4, принятой за R_s=1,0. На хроматограмме испытываемого раствора должна обнаруживаться широкая зона адсорбции на уровне зоны адсорбции ГСО гиперозида желто-зеленого цвета с R_s=1,0 (рис. 25). На хроматограмме испытываемого раствора должны обнаруживаться не менее восьми основных зон: семь зон с желтой флуоресценцией с R_s (по гиперозиду) около 0,3; 0,5; 1,0; 1,2; 1,5; 1,7; 1,9 и зона с желто-зеленой флуоресценцией с R_s около 2,1. Дополнительно на хроматограмме испытываемого раствора кроме основных зон адсорбции допускается наличие дополнительных зон со слабой синей флуоресценцией с R_s около 2,3; с желтой флуоресценцией с R_s около 0,7 и 0,8, допускается широкая зона адсорбции с ярко голубой флуоресценцией от линии старта до значения R_s = 0,2.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

1. Проверка пригодности хроматографической системы.

Рассчитывают критерий разрешения между зонами с R_s около 1,0 и 1,2 по формуле:

$$R = \frac{Z_1 - Z_2}{2 * (\sigma_2 - \sigma_1)} \text{ где,}$$

Z_1 – расстояние от линии старта до середины зоны с Rs около 1,2, мм;

Z_2 – расстояние от линии старта до середины зоны с Rs около 1,0, мм;

σ_1, σ_2 – расстояние между верхней и нижней границами каждой из указанных зон (ширина зон), мм.

Критерий разрешения зон должен быть не менее 1,0.

Относительная ошибка величины Rs рассчитывается по формуле:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S \cdot 100}{\sqrt{n \cdot \bar{x}}} \text{ где,}$$

S – стандартное отклонение;

n – число повторностей, равное 3;

$\bar{x}$ – среднее значение величины Rs, рассчитанное от 3-х повторностей.

Относительная ошибка величины Rs должна быть не более 5%.

2. Приготовление раствора ГСО гиперозида.

Около 0,05 г (точная навеска) ГСО гиперозида, высушенного при температуре 100-105 °С до постоянной массы, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл 95% спирта этилового и нагревают на водяной бане в колбе с обратным холодильником до полного растворения кристаллов. После охлаждения раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 95% спиртом этиловым до метки и перемешивают.

3. Приготовление 10% раствора алюминия хлорида. 18 г алюминия хлорида гексагидрата (ГОСТ 3759-75) растворяют в спирте этиловом 95% в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора этим же растворителем до метки. Срок годности раствора 1 месяц при хранении в хорошо укупоренной таре.

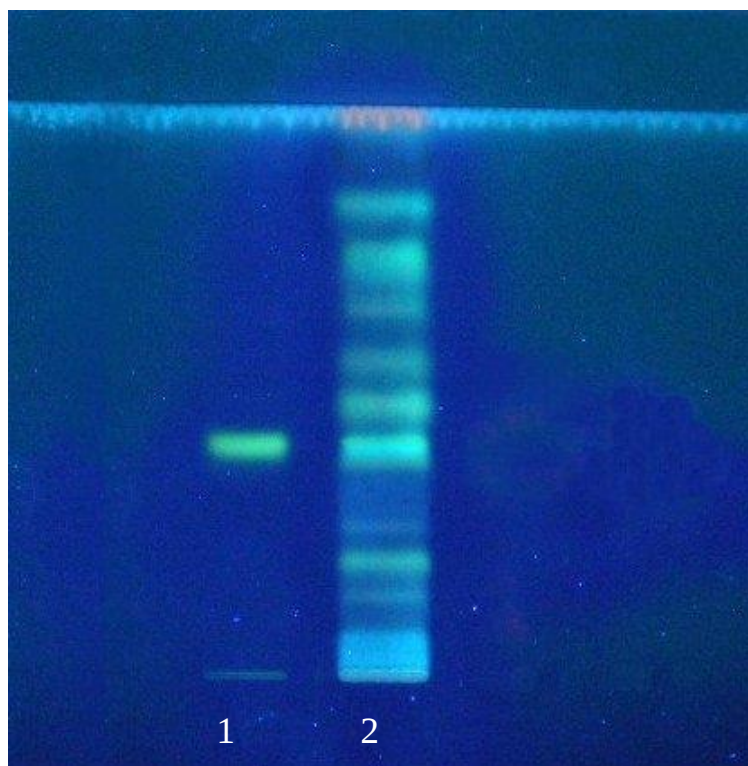


Рисунок 25 – Хроматограмма флавоноидов испытуемого раствора (2) и раствора ГСО гиперозида (1)

Исходя из результатов хроматографического исследования, а также учитывая стоимость сырья и вероятность фальсифицирования состава сбора, дополнительно для его стандартизации можно предложить нижеприведенную методику.

Методика хроматографического определения веществ семян лимонника. Аналитическую пробу сбора измельчают до размеров частиц сырья, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм.

Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 95% спирта этилового и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор). Аналогичным образом готовят извлечение из семян лимонника.

На линию старта хроматографической пластинки TLC Silica gel 60 F254 фирмы Merck размером 100 x 100 мм наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм 20 мкл испытуемого раствора и параллельно 10 мкл извлечения из семян лимонника. Пластинку подсушивают на воздухе в течение

10 минут и помещают в камеру со смесью растворителей толуол : этилацетат : уксусная кислота (70:33:3) (предварительно насыщенную системой в течение 5 минут) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет 55 мм от линии старта пластинку вынимают из камеры, высушивают для удаления следов растворителя и просматривают в УФ свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаружиться не менее 8 темных зон совпадающих с таковыми в треке семян лимонника (рис. 26) с Rf около 0,29; 0,33; 0,37; 0,43; 0,49; 0,57; 0,67; 0,72.

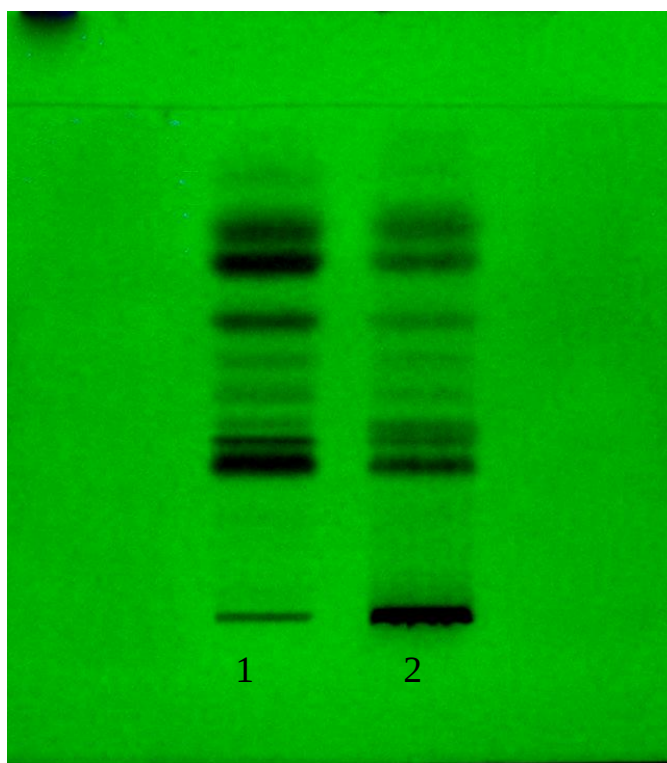


Рисунок 26 – Хроматограмма извлечения из сбора (2) и извлечения из семян лимонника (1) в УФ свете при длине волны 254 нм

Затем хроматограмму проявляют путем погружения в раствор сернокислого реактива на 1 сек. Хроматограмму высушивают в сушильном шкафу при температуре 1500 С в течение 5 мин. После проявления хроматограмму просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм и в видимом свете. На хроматограмме испытуемого раствора должны проявиться дополнительные зоны с серой и оранжевой флуоресценцией с Rf около 0,76, 0,89 на уровне зон адсорбции в семенах лимонника (рис. 27, 28). Допускается наличие дополнительных зон в испытуемом растворе с Rf около 0,11, 0,17, 0,22

с желто-коричневой флуоресценцией и зона имеющая розовую флуоресценцию с R_f около 0,46.

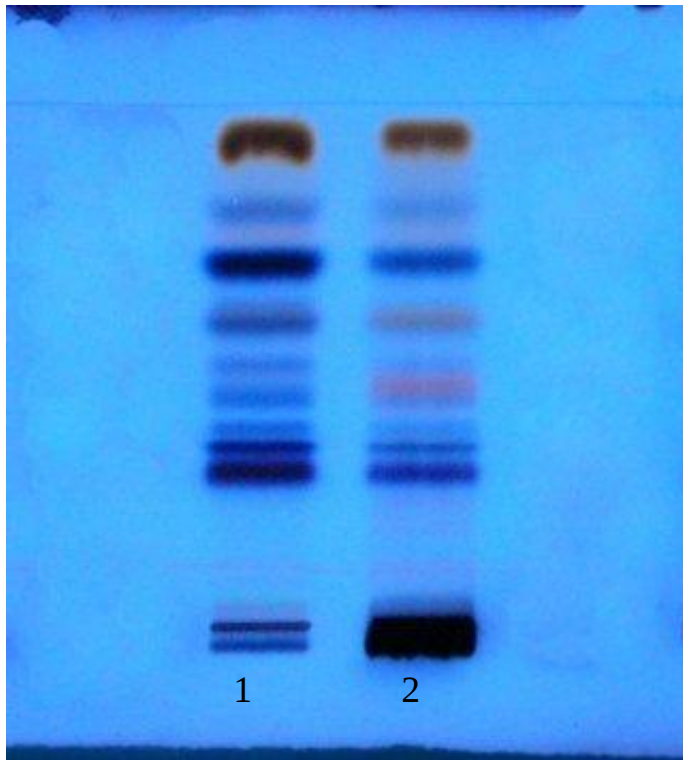


Рисунок 27 – Хроматограмма извлечения из сбора (2) и извлечения из семян лимонника (1) в УФ свете при длине волны 365 нм после проявления

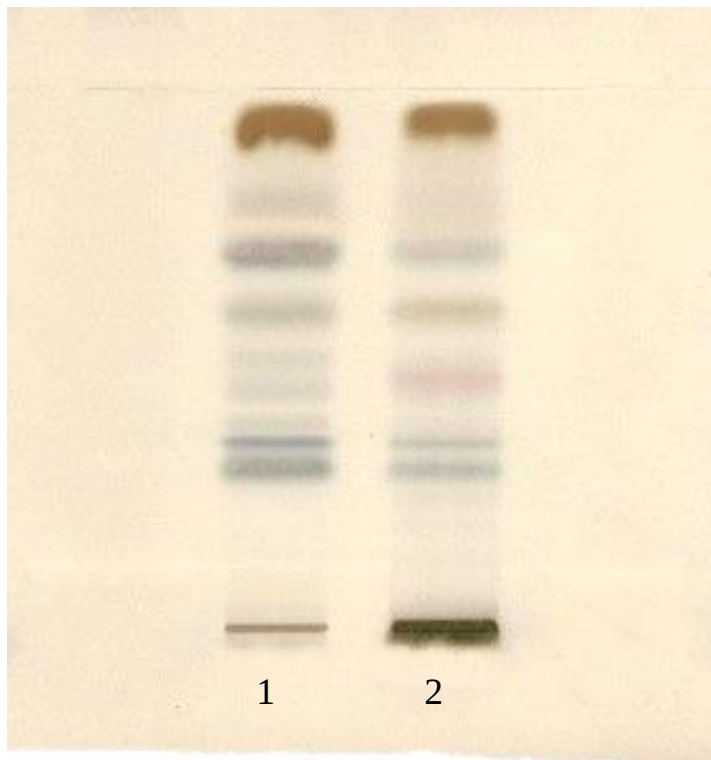


Рисунок 28 – Хроматограмма извлечения из сбора (2) и извлечения из семян лимонника (1) в видимом свете после проявления

При проведении хроматографирования в данных условиях относительная ошибка (S_x) величины R_f обнаруживаемых зон не превышает 5%.

Приготовление сернокислого реактива. К 90 мл холодной воды очищенной осторожно, при помешивании приливают 10 мл серной кислоты концентрированной.

2.2.3. Исследование УФ-спектра сбора

Для разработки дополнительных критериев подлинности мы также определяли спектральные характеристики водно-спиртового извлечения из сбора. Извлечения из 7 образцов сбора готовили на спирте этиловом 70 % в соотношении 1:100. Снимали УФ спектр в разведении 1:25. Данные приведены в таблице 6 и среднестатистический спектр представлен на рисунке 29.

Таблица 6 – Характеристика УФ спектров опытных образцов сбора противооксалатного

№ образца		Характеристики спектра			
		max II полосы		min II полосы	
		λ , нм	D	λ , нм	D
1		279	0,766	258,5	0,613
2		280	0,66	259	0,609
3		279	0,709	259	0,553
4		280	0,703	258	0,722
5		279,5	0,712	259	0,622
6		278,5	0,787	261	0,757
7		274	0,793	260	0,641
Данные статистической обработки для $n = 7$ $P = 0,95$	$\bar{X}$	278,6	0,733	259,2	0,645
	$\Delta\bar{X}$	1,9	0,046	0,9	0,065
	S_x	0,79	0,02	0,38	0,03
	σ	2,09	0,05	0,99	0,07

Как видно по наглядному материалу, в спектре спиртового извлечения сбора присутствует один максимум при 278,6 нм и минимум при 259,2 нм. Отсутствие максимумов в первой полосе поглощения УФ-спектра может быть

обусловлено преобладанием простых фенольных соединений и катехинов относительно оксикоричных кислот и флавоноидов.

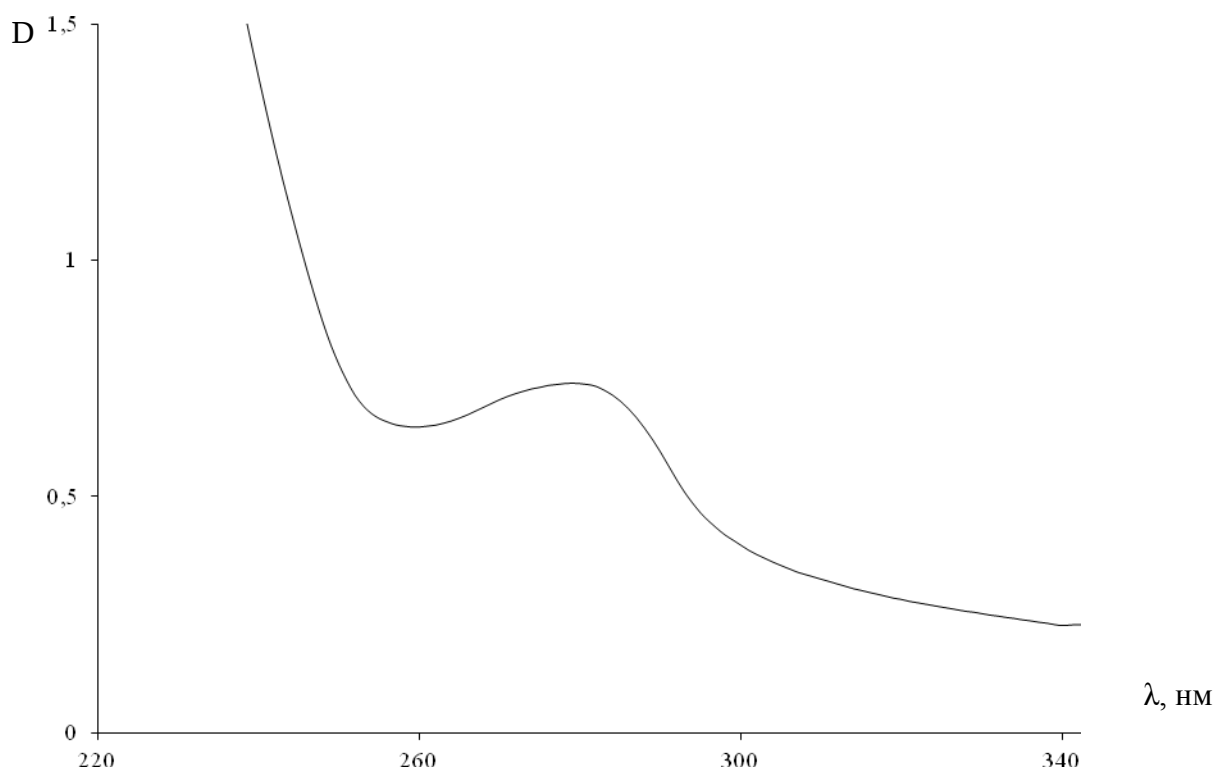


Рисунок 29 – Среднестатистический УФ-спектр поглощения извлечения сбора противояснотного

Расчеты по формуле $\bar{x} \pm 3\sigma$ показали, что в УФ спектре должен наблюдаться максимум II полосы поглощения в интервале 272-285нм и минимум – 256-262 нм.

Методика определения подлинности по УФ-спектру со спектральными характеристиками сбора включена в проект ФСП.

В проект нормативного документа на сбор предлагаем включить хроматографическое определение веществ семян лимонника, как самого дорогого из входящих компонентов, в целях исключения недовложения его в сбор.

2.3. Изучение элементного состава сбора противояснотного

При любой почечной патологии, в частности, при обменных нефропатиях, возрастает роль макро- и микроэлементов в обменных реакциях и

в кристаллообразовании. Магний играет существенную роль, определяя коллоидную стабильность мочи в отношении оксалата кальция. Он также способствует растворению солей, замещая ион кальция при связывании с ионом оксалата, так как вследствие меньшего радиуса и большей энергии ионизации способен образовывать более прочные связи [115]. Кроме того, известно, что любые патологические процессы в канальцах почек усиливают экскрецию магния с мочой [164,299]. Наибольшее количество магния содержат плоды шиповника [180].

При хронически протекающих воспалительных процессах, к которым относится и дисметаболическая нефропатия, наблюдается дефицит цинка и селена вследствие увеличения их потребления для нужд антиоксидантной системы. Известно, что селен действует как компонент антиоксидантной системы организма в синергизме с такими элементами, как кальций, цинк, кобальт, марганец, железо, молибден [277]. В свою очередь следствием развивающейся недостаточности селена, марганца, кобальта, железа и цинка у больных может быть усиление перекисного окисления липидов и формирование своеобразного «порочного круга» [138]. Дефицит перечисленных элементов может обуславливать повреждение клеток и внутриклеточных структур, в том числе и в почках, и поддерживать в них воспалительные и дистрофические изменения. Кроме усиленного расходования указанных элементов в условиях воспалительного процесса и окислительного стресса при нефропатиях, причиной развития дисмикроэлементоза, по-видимому, является усиление процессов выделения эссенциальных макро- и микроэлементов с мочой в результате поражения ткани почек и нарушения процессов реабсорбции. Подтверждением этому является тот факт, что регуляция гомеостаза кобальта, селена, хрома и магния осуществляется преимущественно их экскрецией с мочой. Согласно литературным сведениям источником селена является сырье лимонника, шиповника, калины и брусники, цинк накапливают такие растения как спорыш, кукуруза и брусника.

Повышенное содержание марганца отмечается в сырье брусники, горца птичьего, лимонника [180].

Поскольку минеральные компоненты, обладая высокой биологической активностью, играют существенную роль в фармакологических свойствах препарата [41], был изучен элементный состав сбора. Исследования проводили на базе Института тектоники и геофизики им. Ю. А. Косыгина с помощью масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой ISP-MS Elan DRC II PerkinElmer. Определение свинца и галогенидов проводили в Испытательной лаборатории по агрохимическому обслуживанию сельскохозяйственного производства ФГУ ЦАС «Хабаровский». Свинец и магний оценивали на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-30, йод анализировали роданидно-кинетическим методом на спектрофотометре Spekol 11, фтор определяли потенциометрически, бром - методом ионометрии на Ионере - 130. Анализу подвергали образцы трех опытных серий сбора и водного извлечения из сбора, приготовленного в соответствии с ГФ XI. Результаты определения наличия и уровня содержания макро- и микроэлементов представлены в таблице 7.

Как видно из представленных данных, в сборе обнаруживается 39 элементов. Среднее содержание элементов уменьшается в ряду: K > Ca > P > Mg > Na > Mn > Fe > Al > Ba > Sr > Zn > B > Pb > Ti > Cu > Ni > F > Br > Sn > Cr > Zr > Mo > I > As > Pb > V > Li = Co > W > La > Se > Ga > Y > Cd > Nb = Sb > Sc > Be = Yb. Не были обнаружены Hg, Ag.

Как следует из таблицы 7, содержание отдельных элементов в образцах сбора характеризуется определенной вариабельностью. Наибольшие значения отмечены для Sn, W и As, менее всего изменяется в образцах содержание K, Mn, B, Br, Sr и La. Такое варьирование можно объяснить происхождением сырья из разных географических районов.

Таблица 7 – Элементный состав образцов сбора противооксидантного

Элемент	Содержание, мг/кг				V, %
	1	2	3	$\bar{X}$	
калий	11300	12400	12600	12100	6
кальций	3922	4285	3405	3871	11
магний	2191	2014	1768	1991	11
натрий	303	135	111	183	57
фосфор	3212	32,71	2746	2979	11
алюминий	155,8	114,9	172,3	147,7	20
барий	35,20	28,79	33,59	32,53	10
бериллий	0,004	0,003	0,006	0,004	35
бор	13,48	12,79	12,51	12,93	4
бром	1,17	1,15	1,20	1,2	2
ванадий	0,111	0,071	0,102	0,095	22
вольфрам	0,021	0,030	0,194	0,082	119
галлий	0,057	0,050	0,061	0,056	10
железо	256,6	102,9	142,2	167,3	48
иттербий	0,004	0,003	0,005	0,004	25
иттрий	0,042	0,034	0,047	0,041	16
йод	0,25	0,23	0,30	0,30	14
кадмий	0,021	0,040	0,051	0,037	41
кобальт	0,117	0,058	0,079	0,085	35
лантан	0,085	0,077	0,079	0,080	5
литий	0,064	0,082	0,110	0,085	27
марганец	160,4	178,7	185,9	175,0	8
медь	3,50	3,59	5,71	4,27	29
молибден	0,524	0,298	0,340	0,387	31
мышьяк	0,052	0,051	0,310	0,138	108
никель	3,21	1,01	2,18	2,13	52
ниобий	0,026	0,007	0,010	0,014	71
олово	0,168	2,602	0,119	0,96	147
рубидий	9,83	8,40	5,77	8,00	26
свинец	0,13	0,10	0,15	0,13	20
селен	0,060	0,043	0,076	0,060	28
скандий	0,017	0,009	0,009	0,012	40
стронций	35,02	31,73	30,61	32,50	7
сурьма	0,013	0,016	0,014	0,014	11
титан	7,19	5,16	7,04	6,46	18
фтор	1,3	1,9	1,2	1,5	26
хром	0,81	0,68	0,60	0,70	15
цинк	20,37	27,80	23,61	23,93	16
цирконий	0,754	0,268	0,356	0,459	56

Примечание: коэффициент варьирования (V) рассчитывался согласно [37].

Поскольку сбор предполагается использовать в форме настоя, с одной стороны, а с другой стороны есть сведения о разном переходе минеральных веществ в настой, мы провели оценку содержания макро- и микроэлементов в водных извлечениях из сбора [65]. В таблице 8 представлены данные по абсолютному содержанию элементов в настое и их процентному выходу. Как видно, наибольший выход отмечен для Cd (61 %), наименьший – для Zr (0,3 %), Pb, Sc, I, F, Br и Nb не обнаружены в настое. Отсутствие галогенидов в извлечении объясняется их летучестью. Не превышает 20 % переход в настой V > Mo > Ca > Y > Se=Yb > Sr=Al=La=Cr > Ba > Sn, в интервале от 20 до 40 % извлекаются Li > Fe=Ga > Cu > Be > B > K > Mn > Ti > As=Zn > Co, от 40 до 60 % - Ni > Na=Mg > P > Rb.

Проверка корреляционных связей между содержанием элементов в настое и в сборе показала высокую корреляцию ($r = 0,99$).

Как показывают данные, сбор является источником магния, который будет являться необходимым дополнением к суточному потреблению в связи с повышенной потребностью в этом элементе [50]. Содержание марганца в настое сбора соответствует его суточной потребности. Содержание остальных, важных в фармакологическом отношении, элементов, хотя и не соответствует терапевтически значимым концентрациям, но может служить дополнительным источником микроэлементов. Следует отметить, что микроэлементы в растениях находятся в органически связанной, то есть наиболее доступной форме и более естественно вступают в биохимические процессы [154,180]. Благоприятным является тот факт, что содержание токсичных (As, Cd, Pb) элементов в сборе и настое находится гораздо ниже допустимых пределов [22]. Первоначально в пропись сбора были включены плоды шиповника морщинистого. Это было сделано на основании литературных данных о десятикратном количестве магния в плодах шиповника морщинистого по сравнению с другими видами шиповника. Для исследования этого вопроса мы провели сравнительный анализ на содержание магния

Таблица 8 – Элементный состав сбора противооксалатного и его водного извлечения

Элемент	Содержание в сборе, мг/кг	Содержание в настое, мг/кг	Выход в настое, %
калий	11300	359	32
кальций	3922	38	10
магний	2191	97	44
натрий	303	13	44
фосфор	3212	150	47
алюминий	155,8	2,0	13
барий	35,2	0,6	17
бериллий	0,0040	0,0001	25
бор	13,5	0,4	28
ванадий	0,1110	0,0004	4
галлий	0,057	0,001	23
железо	257	6	23
иттербий	0,00400	0,00005	12
иттрий	0,0420	0,0005	11
кадмий	0,021	0,001	61
кобальт	0,117	0,004	37
лантан	0,085	0,001	13
литий	0,064	0,001	21
марганец	160	5	33
медь	3,50	0,09	24
молибден	0,524	0,002	5
мышьяк	0,052	0,002	36
никель	3,2	0,1	43
олово	0,168	0,003	19
рубидий	9,8	0,6	59
селен	0,060	0,001	12
стронций	35,0	0,4	13
титан	7,2	0,3	35
хром	0,81	0,01	13
цинк	20,3	0,7	36
цирконий	0,7540	0,0002	0,3

четырёх образцов шиповника морщинистого и четырёх образцов шиповника даурского. Анализ проводился двумя методами, указанными выше, в двух

лабораториях. Результаты показали отсутствие значимых различий в содержании этого элемента в обоих видах: в плодах шиповника морщинистого содержание магния находится в пределах 1005 – 1236 мг/кг, в плодах шиповника даурского – 1005-1156 мг/кг. Это значит, что в прописи сбора нецелесообразно выделять сырье шиповника морщинистого.

2.4. Разработка методики количественного определения флавоноидов в сборе противооксалатном

Согласно литературным данным, сбор содержит флавоноиды в терапевтически значимых количествах. Поэтому, мы считаем целесообразным проводить оценку качества сбора противооксалатного по количественному содержанию суммы флавоноидов. Для анализа использовались опытно-промышленные серии сбора противооксалатного.

Наиболее распространенным методом определения флавоноидов, в том числе, пригодным для анализа и стандартизации сборов, является метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом [196].

В качестве стандартного вещества был выбран рутин, который содержится в листьях брусники и земляники [188]. Как видно по рисунку 30, максимум комплекса, образуемый флавоноидами сбора с алюминия хлоридом ($408 \pm 0,5$ нм) имеет значение, близкое к максимуму комплекса рутина с тем же комплексообразователем (410 нм).

Для разработки методики экспериментальным образом было изучено влияние условий экстрагирования сбора на выход флавоноидов и определены спектральные характеристики и условия комплексообразования. Для тотального выхода флавоноидов устанавливались следующие параметры: размер частиц сырья, соотношение сырья и экстрагента, концентрация спирта этилового, продолжительность и кратность экстракции. При исследовании реакции комплексообразования определялись характеристики: оптимальное количество алюминия хлорида, время комплексообразования и устойчивость комплекса. Полученные результаты обрабатывались статистически. С целью

повышения уровня стандартизации и согласно современным требованиям, была проведена валидационная оценка разрабатываемой методики [196].

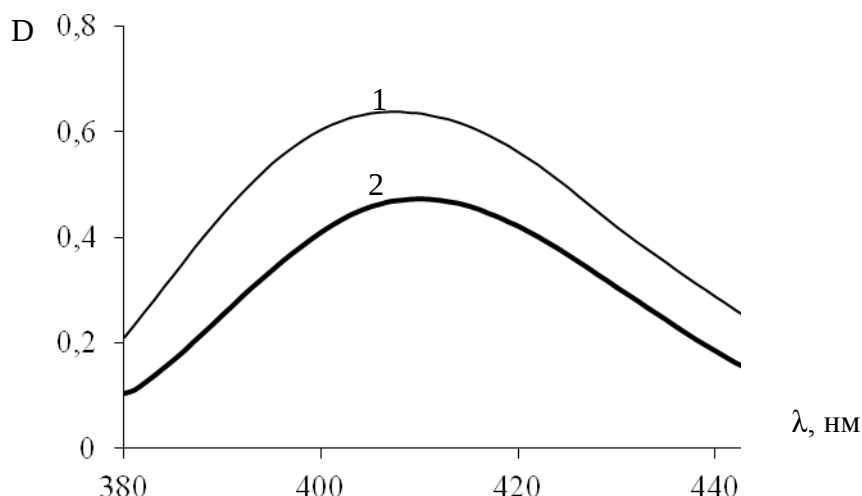


Рисунок 30 – Дифференциальные спектры поглощения комплексов флавоноидов сбора противооксалатного (1) и рутина (2) с алюминия хлоридом

Изучение влияния концентрации спирта этилового, размеров частиц сырья и продолжительности экстрагирования на содержание флавоноидов проводили при соотношении сырья и экстрагента 1 : 100.

Проводили экстрагирование сбора спиртом этиловым разной концентрации (50%, 70%, 95%) в целях изучения влияния экстрагента на выход флавоноидов. Однофакторный дисперсионный анализ показал влияние этого фактора на извлечение флавоноидов ($F_{\text{эксп.}}=79$, $F_{\text{табл.}}=5$). Как видно из данных таблицы 9, наибольшее количество флавоноидов обнаруживается при экстрагировании спиртом этиловым 70%, сравнение результатов эксперимента по критерию Стьюдента подтвердило значимость выбранных параметров ($t_{\text{эксп.}} > t_{\text{кр.}}$).

Результаты влияния размеров частиц сырья представлены в таблице 9. Из данных таблицы и статистического анализа видно, что размер частиц не оказывает влияния на выход флавоноидов в спиртовое извлечение ($F_{\text{эксп.}}=3$, $F_{\text{табл.}}=4$).

Таблица 9 – Влияние условий экстракции на выход флавоноидов из сбора противооксидантного

Условия экстракции	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %	P=95%
концентрация спирта, %: 50 70 96	1,12±0,10 1,25±0,09 0,85±0,03	$F_{\text{эксп.}} > F_{\text{табл.}}$
измельченность сбора, мм*: 1 2 3 5	1,31±0,10 1,35±0,09 1,34±0,09 1,42±0,13	$F_{\text{эксп.}} < F_{\text{табл.}}$
продолжительность экстракции, мин: 15 30 45 60	1,34±0,12 1,34±0,09 1,27±0,13 1,34±0,06	$F_{\text{эксп.}} < F_{\text{табл.}}$

Продолжительность экстрагирования при выбранных параметрах также не оказывает достоверного влияния на выход флавоноидов в экстракт: равновесная концентрация достигается уже через 15 минут ($F_{\text{эксп.}}=2$, $F_{\text{табл.}}=5$).

Так как сбор является в определенной степени неоднородным объектом, мы провели подбор массы навески, которая обеспечивала бы удовлетворительную сходимость результатов анализов при параллельных определениях. Экстракцию навесок (1 и 2 г.) образца сбора, измельченного до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм и 5 мм, проводили в соотношении сырья и экстрагента 1 : 100 в течение 15 мин в трех повторностях. Сравнение данных по критерию Стьюдента показало, что значения статистически не различаются. Как видно из полученных данных (табл. 10), на разброс значений (S) в большей степени влияет масса навески, чем измельчение. В целом соблюдается лучшая воспроизводимость результатов анализа при экстракции 2 г сбора с размерами частиц 2 мм.

**Таблица 10 – Оценка влияния факторов на однородность
результатов анализа**

№ пробы		размер частиц 5 мм*		размер частиц 2 мм	
		масса навески		масса навески	
		1 г	2 г	1 г	2 г
1		1,40	1,41	1,37	1,37
2		1,48	1,33	1,48	1,31
3		1,38	1,38	1,35	1,30
Статистические характеристики	$\bar{x}$	1,42	1,37	1,40	1,33
	S^2	0,003	0,002	0,005	0,001
	S	0,05	0,04	0,07	0,04
	$S^{\bar{x}}$	0,03	0,02	0,04	0,02
	$\Delta\bar{x}$	0,13	0,10	0,17	0,09
	$\bar{e}, \%$	9,3	7,3	12,4	7,1

* При указании измельченности сбора или размера частиц сырья даны диаметры отверстий сит, через которые просеян сбор

Для определения оптимальных условий экстракции мы провели четырехкратную экстракцию в соотношении 1:50. Содержание флавоноидов определялось в каждой порции извлечения. Статистическая обработка данных показала, что флавоноиды переходят в две первые порции извлечений. При дальнейшей экстракции их количество в извлечениях находится на уровне погрешности методики (рис. 31). Кроме того, было обнаружено помутнение раствора последних порций (3 и 4) извлечения. Следовательно, целесообразно проводить не более двух экстракций. В связи с этим, дальше мы определяли оптимальную комбинацию кратности экстракции. В первом варианте была проведена экстракция 2 г сбора 200 мл спирта этилового 70 % однократно и во втором варианте получали извлечение из 2 г сырья дважды по 100 мл экстрагента. Затем сырье экстрагировали 50 мл спирта этилового 70 % для выявления остаточного количества флавоноидов (табл. 11). Как видно из таблицы 11, при двухкратной экстракции достигается большая полнота извлечения флавоноидов, остаточное их содержание различается статистически значимо ($t_{\text{эксп.}}=28,6$; $t_{\text{табл.}}=2,8$). Полученные данные свидетельствуют о преимуществе двухкратной экстракции, поскольку наблюдается более полное извлечение флавоноидов.

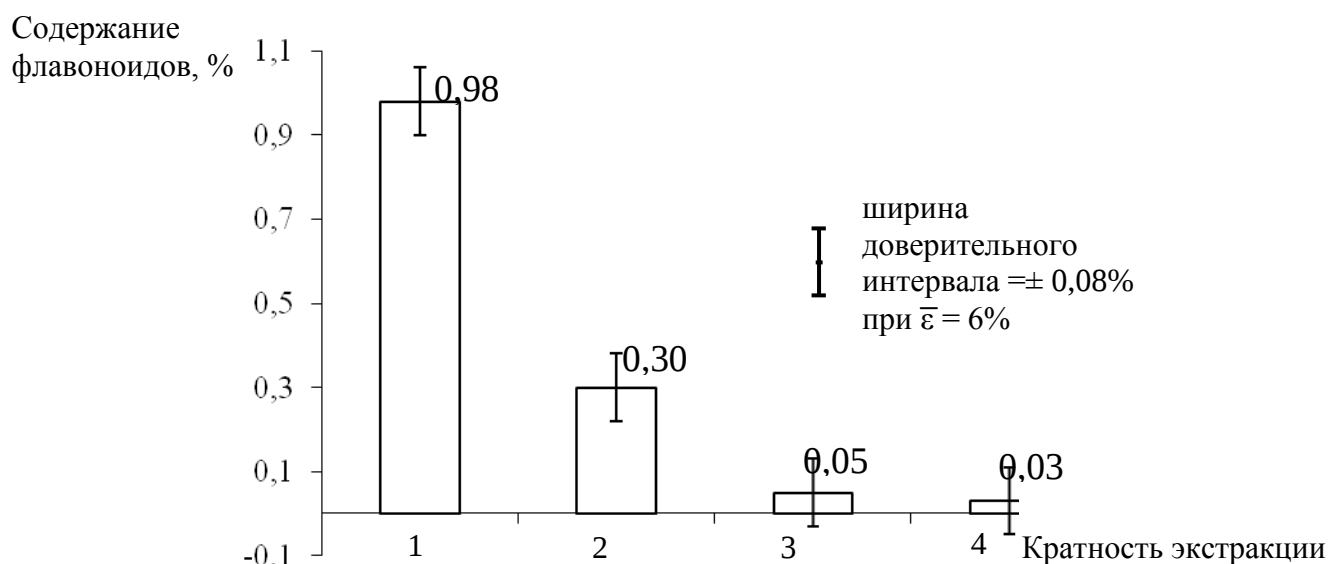


Рисунок 31 – Влияние кратности экстракции на выход флавоноидов

Таблица 11 – Выбор кратности экстракции

Условия экстракции	Содержание флавоноидов, %
однократная экстракция	1,30 $\pm$ 0,08
остаточное количество при однократной экстракции	0,060 $\pm$ 0,004
двухкратная экстракция	1,33 $\pm$ 0,04
остаточное количество при двухкратной экстракции	0,026 $\pm$ 0,003

В ходе отработки условий реакции комплексообразования было определено влияние на оптическую плотность добавляемого количества раствора алюминия хлорида и изучена кинетика реакции. Как видно на рисунке 32, для реакции комплексообразования достаточно 5 мл 10 % раствора алюминия хлорида, последующее увеличение количества комплексообразователя не приводит к возрастанию оптической плотности. Анализ данных с применением критерия Стьюдента подтвердил, что оптимальным для комплексообразования является количество алюминия хлорида, соответствующее 5 мл 10 % раствора. При наблюдении кинетики реакции не было обнаружено фазы абсолютной стабильности оптической плотности. В процессе развития реакции изменяется ее скорость: в течение 40 минут реакция развивается интенсивно и в течение последующих 30 минут

скорость реакции становится постоянной и незначительной. По истечении 70-80 минут ситуация не изменяется. Если величину оптической плотности пересчитать на содержание флавоноидов, то их количество изменяется с 40 минуты до 70 минуты реакции (в течение 30 минут после стабилизации скорости реакции) на 0,07 %, что не превышает допустимую ошибку методики (рис. 33). Исходя из полученных данных, измерения можно проводить через 40 минут от начала реакции в течение получаса.

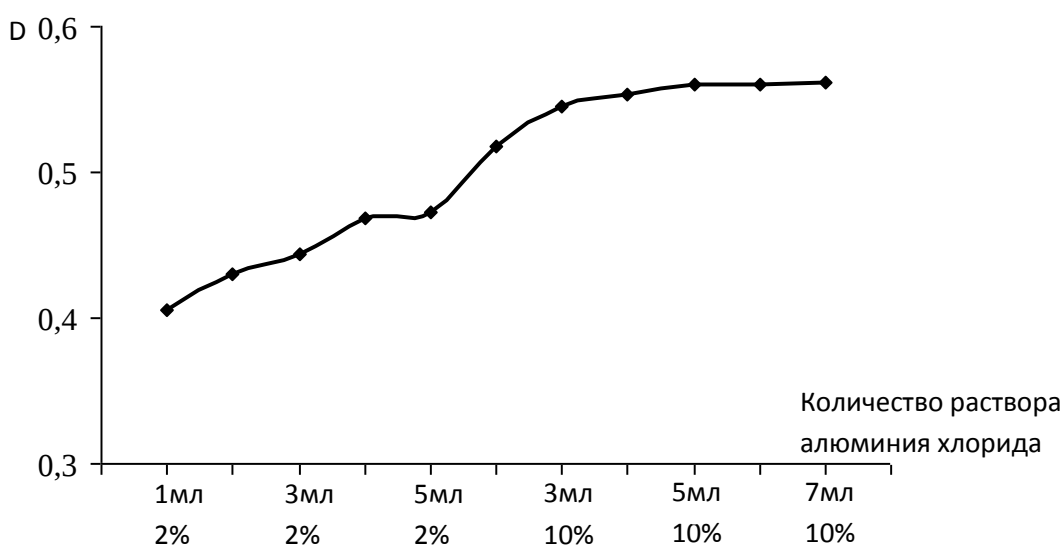


Рисунок 32 – Влияние количества раствора алюминия хлорида (2 и 10 %) на оптическую плотность комплекса флавоноидов сбора

Содержание флавоноидов, %

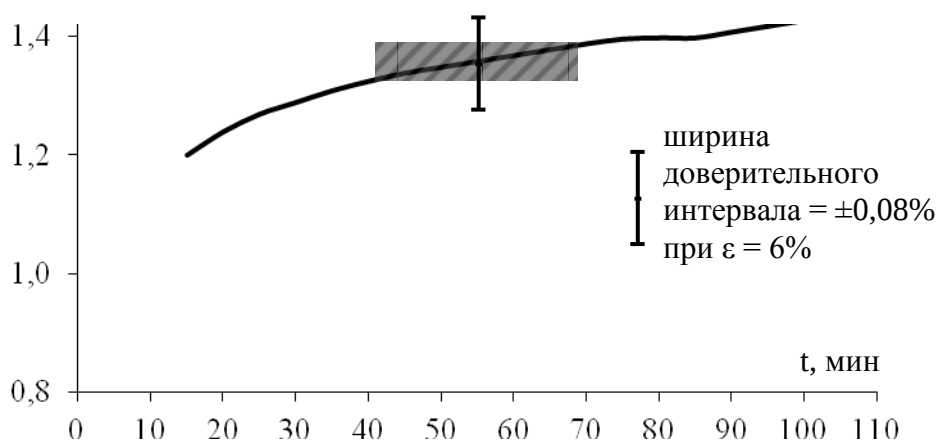


Рисунок 33 – Динамика комплексообразования

Примечание. Заштрихованная область показывает изменения в содержании флавоноидов в течении 30 минут по мере развития реакции

На основании результатов анализа разработана следующая методика количественного определения суммы флавоноидов в сборе противооксалатном.

Методика количественного определения.

Аналитическую пробу измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, около 2 г (точная навеска) измельченного сбора помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом этиловым 70 %, в мерную колбу вместимостью 200 мл, избегая попадания частиц сырья на фильтр. В колбу со шлифом прибавляют 80 мл спирта этилового 70 % и экстракцию повторяют. После охлаждения извлечение фильтруют в ту же мерную колбу. Сырье в колбе дважды промывают 10 мл спирта этилового 70 % и фильтруют в ту же мерную колбу. Доводят объем раствора в мерной колбе спиртом этиловым 70 % до метки тем же растворителем и перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 10 % раствора алюминия хлорида и 0,1 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки и перемешивают. Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 5 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты и спирт этиловый 95 % до 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО рутина: 1 мл раствора ГСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 10 % раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки и перемешивают. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1 мл раствора

ГСО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты и спирт этиловый 95 % до 25 мл. Измерения проводят аналогично испытываемому раствору.

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W) \cdot 100 \cdot 25 \cdot 5},$$

$$X = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 4000}{D_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где D_1 – оптическая плотность испытываемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина; a – масса сырья, в граммах; a_0 – масса ГСО рутина, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Приготовление раствора ГСО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина (ФС 42-2508-87), высушенного при T 130-140°C до постоянной массы, растворяют при нагревании на водяной бане в 80 мл спирта этилового 70% в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора тем же растворителем после охлаждения до метки. Срок годности раствора 1 месяц.

Приготовление 10% раствора алюминия хлорида. 18 г алюминия хлорида гексагидрата (ГОСТ 3759-75) растворяют в спирте этиловом 95% в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора этим же растворителем до метки. Срок годности раствора 1 месяц при хранении в хорошо закупоренной таре.

2.4.1. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе противооксидантом

На следующем этапе разработки методики была проведена ее валидационная оценка по показателям: правильность, линейность, сходимость, воспроизводимость.

Для определения правильности выбран вариант, предлагаемый для биологических образцов, когда невозможно приготовить плацебо. Для оценки близости полученных результатов использован критерий открываемости (R) известного количества вещества, который показывает отсутствие

систематической ошибки, если границы открываемости не выходят за пределы 90-110 % с нормой содержания вещества до 1 %.

По нашим результатам интервал открываемости флавоноидов составляет 95-104 % (табл. 12). Это свидетельствует об удовлетворительной правильности методики.

Таблица 12 – Определение флавоноидов в сборе противоокислительном с добавками стандартного вещества

Содержание флавоноидов, мг	Добавлено рутина, мг	Найдено флавоноидов, мг	Ожидаемое количество флавоноидов, мг	Δ , мг	R, %	ε , %
0,695	0,049	0,732	0,744	0,012	98	1,6
0,695	0,098	0,760	0,793	0,033	95	4,2
0,695	0,147	0,869	0,842	-0,027	104	-3,2
0,695	0,245	0,921	0,940	0,019	97	2,0
0,695	0,490	1,210	1,185	-0,025	104	-2,1

Линейная зависимость методики отражает пропорциональность увеличения оптической плотности анализируемого раствора при возрастании количества аналита в нем. Нахождение линейной зависимости определяет подчиняемость закону Бугера-Ламберта-Бера. При выбранных условиях методики, мы приготовили серию разведений экстракта: брали разные аликвотные объемы, добавляли одно и то же количество комплексообразователя и доводили растворителем объем до 25 мл. Установили, что в области рабочих плотностей 0,2 – 0,8 наблюдается линейная зависимость между количеством испытуемого раствора и величиной оптической плотности (рис. 34), что подтверждается высоким коэффициентом корреляции $r=0,9987$.

Представленный график визуально подтверждает линейную зависимость оптической плотности (D) от количества взятой пробы (мл). Рассчитанное уравнение регрессии имеет вид:

$$Y=0,04+0,11 \times X,$$

где Y – значения оптической плотности;

X – количество пробы, мл.

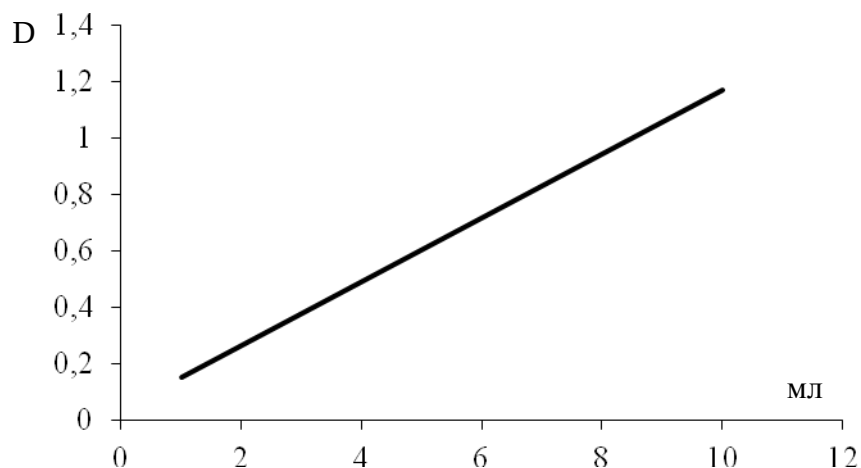


Рисунок 34 – График линейной зависимости оптической плотности (D) от количества исследуемого раствора (мл)

Сходимость устанавливали по результатам анализа одного образца в 6 повторностях. Воспроизводимость подтверждали на 3 образцах одной серии сбора. Анализы выполнялись на трех спектрофотометрах (марки СФ-46, UV–1700 Shimadzu и Spekol 11) тремя аналитиками. Метрологические характеристики трех выборок представлены в таблице 13. Для каждой выборки была проведена проверка однородности в соответствии с ГФ XI. Результаты всех выборок были признаны однородными.

Оценка сходимости проводилась по коэффициенту вариации (V). Как видно по таблице 13, V находится в диапазоне от 1,9 % до 3,5 %. Учитывая, что сбор представляет смесь лекарственного растительного сырья и характеризуется неоднородностью, которая увеличивает разброс значений параллельных определений, мы исходили из критерия, принятого для биологических образцов ($V \leq 15 \%$). Полученный нами коэффициент вариации существенно ниже, что позволяет признать сходимость удовлетворительной.

Воспроизводимость оценивали методами попарных сравнений и однофакторного дисперсионного анализа (по критериям Стьюдента и Фишера). Статистический анализ по критерию Стьюдента показал эквивалентность средних результатов анализов трех выборок ($t_{1,2,3} < t_{\text{крит.}}$). Результаты сравнения дисперсий полученных выборок по Фишеру свидетельствуют о статистической

однородности последних. Это означает удовлетворительную воспроизводимость методики.

Таблица 13 – Метрологическая характеристика методики определения суммы флавоноидов в сборе противооксалатном

Выборки	1	2	3
содержание флавоноидов, %	1,33	1,34	1,25
	1,28	1,37	1,3
	1,31	1,38	1,29
	1,29	1,25	1,28
	1,29	1,34	1,29
	1,26	1,31	1,35
статистические параметры:			
n	6	6	6
$\bar{x}$	1,29	1,33	1,29
S^2	0,001	0,002	0,001
S	0,024	0,047	0,033
S_x	0,099	0,019	0,013
P	95	95	95
$\Delta\bar{x}$	0,03	0,05	0,03
$\bar{\varepsilon}$, %	2,0	3,7	2,7
V	1,9	3,5	2,5

Разработанная методика апробирована на 7 образцах сбора, данные по содержанию флавоноидов приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Содержание флавоноидов в образцах сбора противооксалатного

№ образца	Содержание, %	Статистические параметры
01.09	0,95	$\bar{x} = 1,06$ $x_{\max} = 1,33$ $x_{\min} = 0,93$ $S^2 = 0,021$ $S = 0,15$ $V = 14$
02.09	0,99	
03.09	0,93	
04.09	1,16	
05.09	1,09	
06.09	1,33	
07.09	0,96	

Как видно из сравнительного анализа таблиц 13 и 14, значения дисперсий и коэффициентов вариабельности в методике ($S^2=0,001-0,002$;

$V=1,9-3,5$) и в разных образцах сбора ($S^2=0,02$; $V=14$) существенно различаются, следовательно, методика удовлетворяет аналитическим задачам.

Таким образом, фактическое колебание содержания флавоноидов в сборе находится в пределах 0,93-1,33%. Принимая во внимание минимальное найденное количество флавоноидов в сборе и данные статистического анализа можно установить в качестве норматива содержание флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,60 %.

2.5. Разработка методики количественного определения арбутина в сборе противооксалатном

В предыдущем разделе обоснована и представлена методика определения содержания флавоноидов, пригодная для серийных анализов сбора. Другим важным компонентом сбора, с содержанием которого связано противовоспалительное, антимикробное и мочегонное действие сбора, является арбутин. Известно, что арбутин проявляет положительный фармакологический эффект при мочекаменной болезни, способствуя увеличению диуреза, уменьшению воспалительных процессов, препятствуя образованию мочевых конкрементов [48,85]. Учитывая вышесказанное, а также то, что арбутин содержится в листьях брусники и плодах калины [92], разработка методики количественного определения арбутина в сборе представляет научно-практический интерес.

В литературе встречаются различные методы количественной оценки арбутина в растительном сырье: фармакопейный метод йодометрического титрования [62]; фотоэлектроколориметрический, в основе которого лежит реакция арбутина с диазореактивом [155]; спектрофотометрический, основанный на конденсации арбутина с 4-аминоантипирином в щелочной среде в присутствии окислителя [257]; спектрофотометрический метод, основанный на осаждении сопутствующих арбутину веществ основным ацетатом свинца и спектрофотометрировании фильтрата при длине волны 281 нм [97]; хроматоспектрофотометрический, основанный на применении алюминия оксида для очистки арбутина от сопутствующих примесей [77,257], метод

высокоэффективной тонкослойной хроматографии с денситометрическим детектированием [306], метод ВЭЖХ с УФ и флюориметрическим детектированием [139,198,261].

В указанных методах непосредственному определению арбутина предшествуют различные способы очистки от сопутствующих веществ. Чаще всего применяется осаждение полифенольных соединений свинца ацетатом и колоночная хроматография на алюминия оксиде [27,159,236]. Как показывают литературные источники, на количественное определение арбутина влияет степень очистки от сопутствующих веществ. Осаждение полифенолов свинца ацетатом приводит к потерям арбутина [236], однако не исключено, что и при использовании хроматографической очистки на алюминия оксиде происходит потеря арбутина в колонке [159,257].

Фармакопейная методика определения арбутина имеет ряд недостатков. В первую очередь это низкая специфичность, которая является причиной завышенных результатов, поскольку после осаждения полифенольных соединений раствором свинца ацетата основного в извлечении остаются вещества, способные легко окисляться йодом (гидрохинон, катехины, аскорбиновая кислота и др.). При титровании раствором йода точка эквивалентности устанавливается визуально по изменению окраски индикатора, что может привести к ошибке. Кроме того, фармакопейный метод определения арбутина трудоемкий и длительный.

По литературным данным наиболее объективные результаты достигаются при использовании хроматоспектрофотометрического метода определения арбутина, так как при хроматографировании извлечения на колонке с алюминия оксидом происходит более полная очистка арбутина от сопутствующих фенольных соединений. Метод предполагает получение спиртового извлечения из сырья (40 или 70% спиртом этиловым в зависимости от объекта исследования и методики) и дополнительную хроматографическую очистку арбутина от сопутствующих веществ на алюминия оксиде. Оптическую плотность очищенного элюата измеряют на спектрофотометре при длине волны

(284, 285, 287 нм) в сравнении со стандартом (арбутином или гидрохиноном) [248,257]. Результаты определения арбутина данным методом, представленные в работе [258], показали, что он тоже может давать завышенные результаты вследствие неполной очистки сложной многокомпонентной смеси.

В нашем случае объектом исследования также является многокомпонентная смесь растительного сырья, характеризующаяся сложным химическим составом. Поэтому для оценки арбутина в сборе мы выбрали на сегодняшний день наиболее селективный метод - высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для предварительной оценки содержания арбутина в сборе провели анализ одной из серий сбора по ГФ XI ст. 26 (табл. 16). Как видно по таблице, в сборе содержится достаточно высокое количество арбутина. Хроматографический анализ спиртового извлечения сбора показал наличие пика исследуемого вещества, сходного по времени удерживания с пиком стандарта-арбутина (2,56 мин), что в целом и явилось основанием к разработке методики (рис. 35).

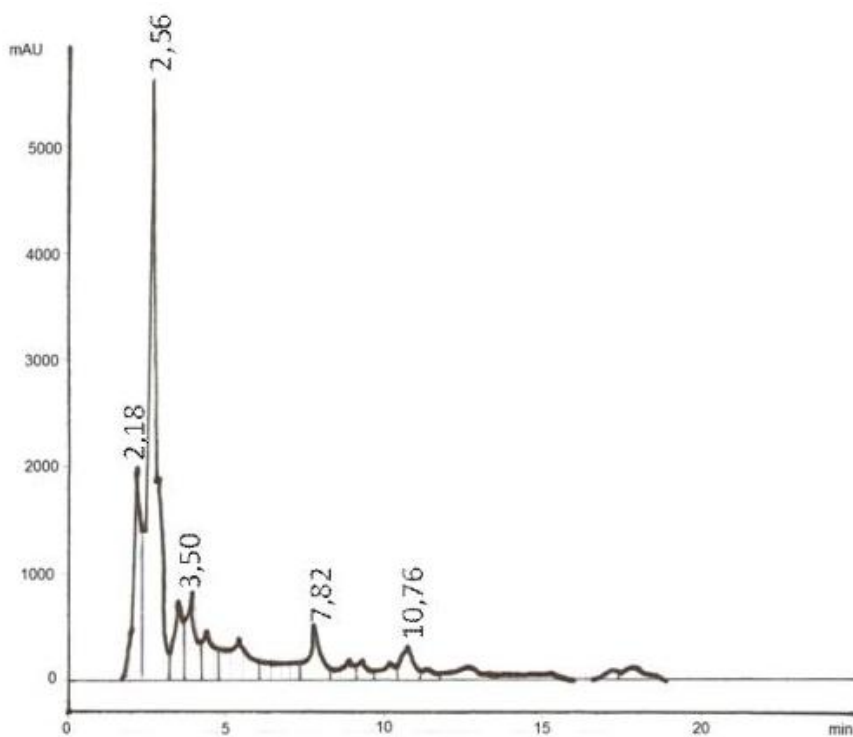


Рисунок 35 – Хроматограмма спиртового извлечения сбора

Хроматографические исследования проводили на хроматографе «Agilent Technologies 1100 Series», снабженном градиентным насосом Agilent 1100, термостатом А 1100, устройством А 1100 для введения образцов и спектрофотометрическим детектором, с использованием колонки Zorbax SB C 18, 4,6×250 мм с размером частиц 5 мкм, скорость подачи элюента 1 мл/мин. Рабочая длина волны 285 нм, объем пробы 20 мкл, температура колонки 25 °С, продолжительность хроматографирования 20 мин, подвижная фаза – вода : ацетонитрил : уксусная кислота (164:36:2). В этих условиях время удерживания арбутина-стандарта составляет $2,56 \pm 0,01$ мин (рис. 36). Эффективность хроматографической колонки по пику арбутина-стандарта составляет не менее 5500 теоретических тарелок.

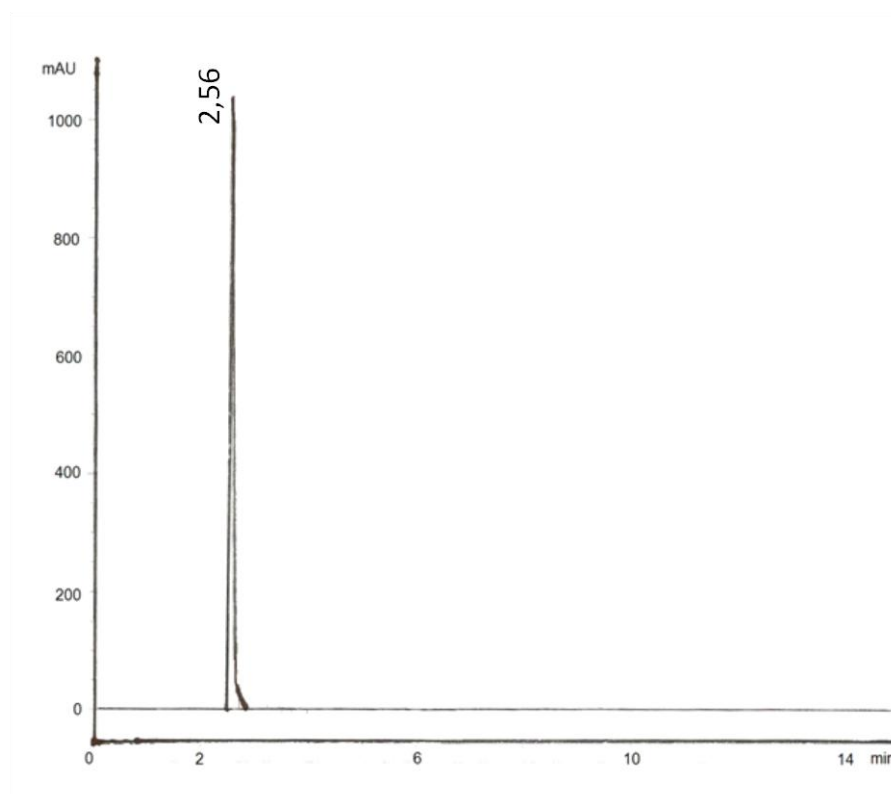


Рисунок 36 – Хроматограмма раствора ГСО арбутина

В фармакопейной методике в качестве экстрагента используется вода, в различных описанных методиках - вода, 40% и 70% спирт этиловый. Поэтому мы опробовали указанные экстрагенты по отношению к нашему объекту. Экстракцию водой осуществляли по фармакопейной методике, аналогичную схему экстракции применили для 40% и 70% спирта этилового. Полученные

извлечения очищали от сопутствующих веществ двумя способами: осаждением раствором свинца ацетата основного и хроматографией на колонке с алюминия оксидом нейтральным. В первом случае после коагуляции осадка извлечение фильтровали, во втором - элюат собирали в колбу. Полученные таким образом фильтрат и элюат упаривали на ротационном испарителе досуха и остаток переносили количественно соответствующим растворителем в мерную колбу на 25 мл. При этом получали мутные растворы, которые подвергали центрифугированию при 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость использовали для количественного измерения. Количество арбутина оценивали методом ВЭЖХ и спектрофотометрически.

Для спектрофотометрии готовили разведение полученных растворов в соотношении 1:50, в качестве раствора сравнения использовали соответствующий растворитель (вода, 40%, 70 % спирт этиловый).

Предварительно получили спектры раствора арбутина-стандарта (0,05%), извлечения из сбора и извлечений, очищенных двумя способами. Как видно на рисунке 37, очисткой достигается значительное уменьшение интенсивности оптической плотности раствора и максимум II полосы поглощения имеет более симметричную форму. При этом, положение максимума извлечения из сбора находится в пределах 279-280 нм, его очищенных извлечений 280-281 нм, максимум раствора арбутина-стандарта приходится на 284 нм. В целом полученная спектральная картина может говорить о неполной очистке арбутина в сборе от сопутствующих веществ при использовании обоих способов.

Оптическую плотность очищенных извлечений измеряли при $\lambda=284$ нм, соответствующей максимуму поглощения арбутина-стандарта, в кювете с толщиной слоя 1 см.

Результаты анализа показали, что экстрагенты обладают примерно одинаковой извлекающей способностью по отношению к арбутину (табл. 15). При этом установлено, что очистка извлечения от сопутствующих веществ свинца ацетатом по сравнению с хроматографической очисткой влечет снижение количества арбутина: при определении методом ВЭЖХ - на 22 %,

спектрофотометрическим методом – на 27 %. Это значит, что очистка с использованием колоночной хроматографии на алюминии оксиде является более рациональной. Следует отметить что, извлечения, полученные с использованием воды и 40 % спирта этилового, представляли собой мутные растворы и медленно проходили через колонку с алюминия оксидом, что объясняет предпочтение, отданное спирту этиловому 70 % в качестве экстрагента.

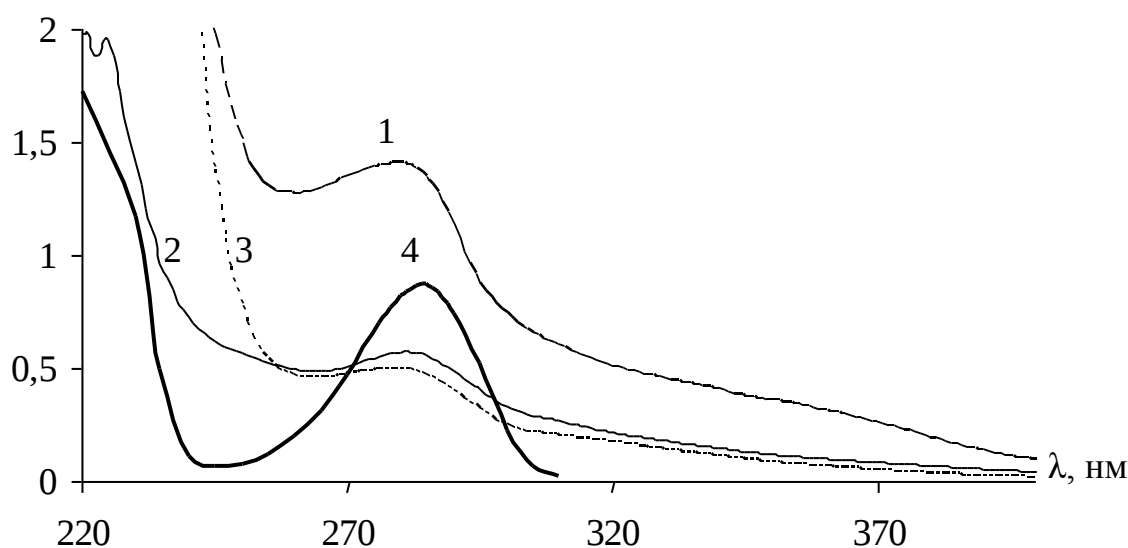


Рисунок 37 – УФ-спектр спиртового извлечения сбора (1), элюата (2), фильтрата (3) и раствора арбутина (4)

Таблица 15– Содержание арбутина в сборе противооксалатном в зависимости от вида экстрагента и способа очистки извлечений от сопутствующих веществ

Экстрагент	Содержание арбутина, %			
	хроматография на алюминия оксиде		осаждение свинца ацетатом	
	ВЭЖХ	СФМ	ВЭЖХ	СФМ
вода очищенная	3,19±0,10	9,61±0,18	2,31±0,05	6,90±0,19
спирт этиловый 40 %	3,04±0,05	9,56±0,20	2,48±0,07	7,01±0,15
спирт этиловый 70 %	3,05±0,08	9,70±0,16	2,42±0,10	6,94±0,16

На следующем этапе было изучено влияние кратности экстракции на выход арбутина. Двухкратную экстракцию проводили порциями по 50 мл и 25 мл 70 % спирта этилового, трехкратную – порциями по 50мл, 25мл и 20мл экстрагента. Извлечения фильтровали в мерную колбу на 100 мл, сырье в колбе

промывали и объединяли извлечения. Сравнение результатов двухкратной ($3,08 \pm 0,13$) и трехкратной экстракции ($2,97 \pm 0,08$) показало отсутствие между ними достоверных различий ($t_{\text{эксп}} = 0,8$, $t_{\text{кр}} = 2,3$). Естественно, что выбор был сделан в пользу двухкратной экстракции. Дополнительно для проверки истощения сырья была проведена третья экстракция 20 мл 70 % спирта этилового. В результате было выявлено, что содержание арбутина в последней порции экстракта составляет 0,005%, что не оказывает значимого влияния на результаты определения арбутина в сборе.

На основании полученных результатов была предложена следующая методика.

Аналитическую пробу сбора измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Точную навеску сбора 2,0 г помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70 %, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают при умеренном кипении на водяной бане в течение 30 мин. Извлечение охлаждают под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляют 25 мл спирта этилового 70 % и экстракцию повторяют в течение 20 мин. После охлаждения извлечение фильтруют в ту же мерную колбу. Сырье в колбе дважды промывают порциями по 10 мл спирта этилового 70 % и фильтруют в ту же колбу. Раствор в колбе доводят до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают (раствор А).

50 мл раствора А пропускают через колонку с алюминия оксидом нейтральным для хроматографии. Элюат собирают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. После полного прохождения раствора А, колонку дважды промывают порциями по 10 мл спирта этилового 70 %, собирая элюат в ту же колбу. Элюат упаривают на ротационном испарителе досуха и количественно переносят спиртом этиловым 70 % в мерную колбу вместимостью 25 мл (раствор Б). Раствор Б используют для хроматографического определения в условиях, описанных выше. Хроматограмма элюата представлена на рисунке 38.

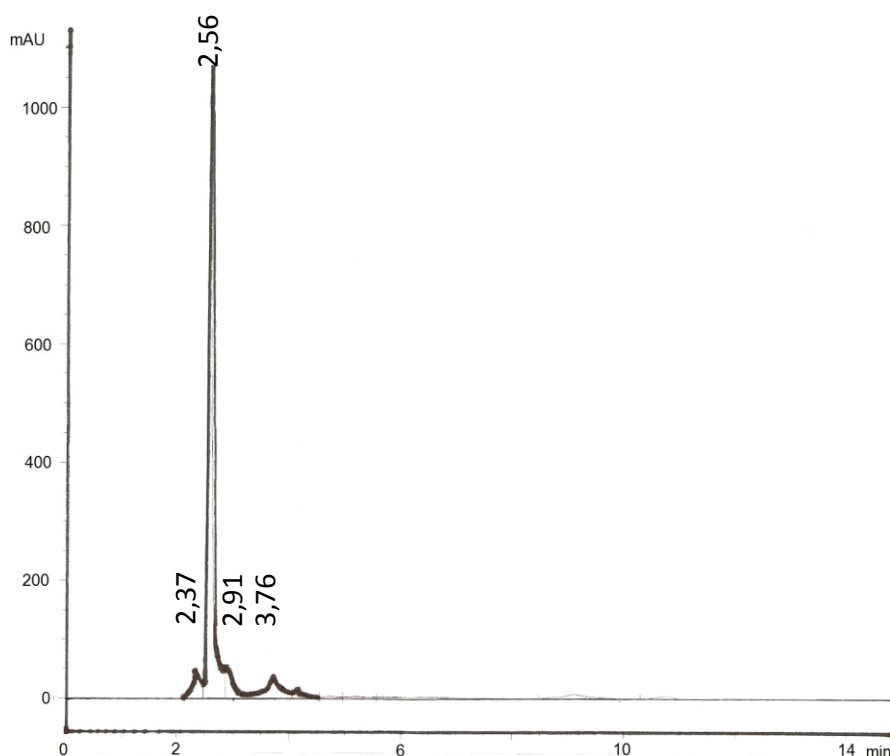


Рисунок 38 – Хроматограмма концентрированного элюата сбора

Содержание арбутина (X) в абсолютно сухом сырье в % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 * m_0 * 100 * 25 * 100 * 100}{S_0 * m_1 * 100 * 50 * (100 - W)},$$

где S_1 – площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора Б; S_0 – площадь пика на хроматограмме раствора ГСО арбутина, m – масса сырья, в граммах; m_0 – масса навески ГСО арбутина, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Приготовление хроматографической колонки. 2,0 г алюминия оксида нейтрального, промытого водой дистиллированной до нейтральной реакции, помещают в стеклянную колонку диаметром 1,5см и высотой 25см, промывают 10 мл воды дистиллированной, затем 10 мл 70% спирта этилового.

Приготовление раствора арбутина. Растворяют 0,05г (точная навеска) ГСО арбутина, высушенного до постоянной массы при температуре $75 \pm 2^\circ\text{C}$, в

мерной колбе вместимостью 100 мл в 70% спирте этиловом, доводят объем раствора до метки 70% спиртом этиловым. Раствор годен в течение 3 суток.

Для проверки воспроизводимости методики определили содержание арбутина в одном и том же образце сбора. Как видно по таблице 16, разработанная методика характеризуется относительно высокой избирательностью и точностью.

Таблица 16 – Содержание арбутина в сборе противооксалатном, найденное разными методами, %

Содержание и статистические характеристики	Метод		
	ВЭЖХ	СФМ	ГФ XI
$\bar{X}$	3,30	9,63	2,50
n	6	6	6
S^2	0,0167	0,2836	0,0099
S	0,1293	0,5326	0,0997
S_x	0,0528	0,2174	0,0407
P, %	95	95	95
$\Delta\bar{X}$	0,14	0,56	0,10
$\varepsilon_1, \%$	9	16	10
$\bar{\varepsilon}, \%$	4,1	5,8	4,2
V, %	4	6	4

Сравнение результатов определения арбутина разными методами показало, что методика спектрофотометрического определения завышает результат определения почти в три раза, методика йодометрического титрования занижает результаты определения на 24 %. В первом случае определению мешают сопутствующие вещества, не задерживающиеся на алюминия оксиде, во втором - причиной, вероятно, является соосаждение арбутина вместе с полигидроксифенольными соединениями свинца ацетатом. Наименьшая величина относительной ошибки отдельного определения (ε_1) соответствует ВЭЖХ методике (9 %), наибольшая – СФМ (16 %). Сравнение воспроизводимости методик по критерию Фишера показало с вероятностью $P=99\%$, что методика ВЭЖХ характеризуется более высокой воспроизводимостью ($F_{\text{эксп}} 16,96$; $F_{\text{табл.}} 8,47$) по сравнению с СФМ методикой и

равна по воспроизводимости фармакопейной методике ($F_{\text{эксп}} 1,68$; $F_{\text{табл.}} 8,47$). Отсутствие корреляции между результатами (табл. 17), полученными по двум методикам ($r=0,16$), свидетельствует о низкой избирательности СФМ методики.

Таблица 17 – Содержание арбутина в образцах сбора противооксалатного

№ образца	Содержание арбутина найденное методом, %		Статистические параметры методик	
	ВЭЖХ	СФМ	ВЭЖХ	СФМ
09.09	2,40	6,54	$\bar{x} = 2,32$ $x_{\text{max}} = 3,30$ $x_{\text{min}} = 1,77$ $S^2 = 0,23$ $V=21$	$\bar{x} = 6,44$ $x_{\text{max}} = 9,63$ $x_{\text{min}} = 5,46$ $S^2 = 2,14$ $V=23$
08.09	2,03	5,65		
06.09	1,77	6,01		
07.09	2,39	5,54		
05.09	2,22	6,23		
03.09	2,16	5,46		
04.09	3,30	9,63		

С помощью разработанной методики определено содержание арбутина в образцах сбора (табл. 17). Содержание арбутина в разных образцах сбора, найденное методом ВЭЖХ, варьирует от 1,77% до 3,30%. Как видно из сравнительного анализа таблиц 16 и 17, значения дисперсий и коэффициентов вариабельности в методике ($S^2=0,0167$; $V=4$) и в разных образцах сбора ($S^2=0,23$; $V=21$) существенно различаются, следовательно, методика удовлетворяет аналитическим задачам.

Учитывая, что основным источником арбутина в сборе являются листья брусники с его содержанием не менее 4,5 % и доля сырья брусники в сборе составляет 15 %, то содержание арбутина, определенного по фармакопейной методике, в сборе должно быть не меньше 0,7 %. Если учесть, что методика йодометрического титрования занижает результаты анализов на 24 %, то нижний предел содержания арбутина (ВЭЖХ) в сборе будет составлять 0,9 %. Полученное значение совпадает с математически вычисленным пределом содержания по формуле $\bar{x} \pm 3S$, которое составляет – 0,88 %. В качестве норматива предлагаем установить содержание арбутина в сборе не менее 0,9 %.

2.6. Определение количественного содержания БАВ и числовых показателей в сборе противооксалатном

Важным этапом фармакогностического изучения сбора является количественная оценка содержания основных групп БАВ. Это необходимо для

научного обоснования фармакологической активности препарата, определения варьирования содержания БАВ в разных промышленных образцах и, наконец, для обоснования стандартизации сбора.

Количественную оценку содержания в сборе проводили для следующих групп БАВ: флавоноидов^{*}, фенольных соединений, экстрактивных и дубильных веществ, а также для арбутина^{**}.

Определение арбутина и суммы флавоноидов проводили по разработанным нами методикам. Содержание фенольных соединений в сборе оценивали по спектрофотометрической методике в пересчете на галловую кислоту. Дубильные и экстрактивные вещества определяли по фармакопейным методикам. Результаты представлены в таблице 18.

Как видно по данным таблицы 18, флавоноиды и дубильные вещества содержатся в сборе в терапевтически значимых количествах. Аналогично и с содержанием арбутина (табл. 17). Это значит, что стандартизацию сбора можно проводить по содержанию любых из перечисленных веществ. Исходя из направления фармакологической активности препарата, наиболее оправдана стандартизация по количественному содержанию флавоноидов и арбутина. Еще одним критерием для выбора группы БАВ, по содержанию которой целесообразно оценивать качество серийного продукта, является вариабельность содержания веществ в препарате [222]. В нашем случае вариабельность дубильных, экстрактивных веществ и фенольных соединений не превышает 10% (таблица 18). Наиболее высокой вариабельностью характеризуется содержание флавоноидов и арбутина. Это значит, что и с точки зрения вариабельности биологически-активных веществ стандартизацию сбора целесообразно проводить по количественному содержанию флавоноидов и арбутина. Так как сбор предназначен для приготовления водных извлечений, дополнительно рекомендуется проводить стандартизацию по содержанию экстрактивных веществ [197]. В целом, оценка

^{*} Содержание флавоноидов в этом разделе дано в расширенном варианте по сравнению с разделом 2.4

^{**} Во избежание повторов в настоящем разделе мы не приводим данные по содержанию арбутина в образцах сбора см. раздел 2.5.

качества сбора противооксалатного по количественному содержанию арбутина, флавоноидов и экстрактивных веществ, по нашему мнению, соответствует современным требованиям стандартизации фитопрепаратов. Однако, исходя из реальной ситуации со стандартизацией сборов, в проект ФСП мы включили определение содержания флавоноидов и экстрактивных веществ.

Для определения дополнительных характеристик доброкачественности нами был проведен товароведческий анализ 6 опытных серий сбора и его порошка. Анализ включал определение, в соответствии с общими фармакопейными статьями золы общей и золы нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, а также показатели измельченности и влажности сборов (табл. 19).

Данные таблицы показывают, что показатели доброкачественности, определяемые для сборов и фасованного моносырья, находятся на принятом уровне: содержание влаги от 7,0 % до 8,9 %; золы общей – от 4,0 % до 5,3 %; золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной – от 0,1 % до 0,3 %; крупных частиц в сборе – от 0,5 % до 1,5 %, в порошке – от 1,4 % до 2,5 %; пылевидных частиц в сборе – до 4 %, в порошке – до 5 %.

Коэффициенты вариабельности, за исключением показателей золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной и измельченности, не- высокие, что свидетельствует об относительной однородности продуктов разных серий. Существенная изменчивость содержания золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной, объясняется различной чистотой исходных сырьевых компонентов. Необходимо заметить, что несмотря на различия в этом показателе все значения существенно ниже принятых для лекарственного растительного сырья и сборов.

Таким образом, по полученным данным предлагаем установить нормативы для следующих числовых показателей: содержание арбутина - не менее 0,9 %; суммы флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 0,6 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой - не менее 25 %; содержание влаги

**Таблица 18 – Количественное содержание экстрактивных и биологически активных веществ
в сборе противооксидантном**

№ образца	Содержание, %			
	экстрактивные вещества	дубильные вещества	флавоноиды	фенольные соединения
01.09	34,7±0,5	6,56±0,25	0,95±0,03	3,9±0,1
02.09	35,3±0,9	6,40±0,13	0,99±0,06	3,8±0,2
03.09	34,8±1,0	6,32±0,06	0,93±0,02	4,0±0,1
04.09	33,2±1,3	6,62±0,25	1,16±0,07	4,2±0,1
05.09	34,9±1,1	7,16±0,32	1,09±0,03	4,0±0,1
06.09	33,7±0,8	6,77±0,20	1,33±0,06	3,8±0,2
07.09	30,3±0,9	7,57±0,35	0,96±0,01	4,5±0,1
08.09	29,5±1,0	5,38±0,15	1,29±0,04	4,9±0,2
09.09	32,9±1,5	6,20±0,17	1,14±0,01	4,7±0,1
n	9	9	9	9
$\bar{x}, \%$	33,3	6,55	1,09	4,2
S^2	4,3	0,38	0,022	0,17
V, %	6	9	14	10

Таблица 19 – Числовые показатели сбора противооксалатного

№ образца	Содержание, %						
	влаги	золы общей	золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной	частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 5 мм	частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,2 мм	в порошке сбора	
						частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм	частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,2 мм
1	7,1±0,2	5,3±0,1	0,17±0,03	0,5±0,03	3,2±0,3	1,7±0,1	4,2±0,3
2	8,9±0,1	4,2±0,1	0,28±0,02	1,0±0,05	3,3±0,1	1,4±0,1	4,4±0,1
3	8,3±0,3	5,3±0,1	0,13±0,01	1,5±0,04	2,3±0,2	1,9±0,1	5,0±0,2
4	7,0±0,5	4,7±0,2	0,10±0,03	0,8±0,01	2,4±0,2	2,5±0,1	4,7±0,4
5	7,4±0,4	4,00±0,1	0,11±0,02	1,1±0,02	3,6±0,1	2,1±0,1	3,8±0,3
6	7,8±0,2	4,4±0,1	0,13±0,03	0,8±0,03	3,8±0,2	1,5±0,1	4,5±0,2
$\bar{x}, \%$	7,7	4,63	0,15	1,0	3,1	1,9	4,4
S^2	0,57	0,30	0,004	0,11	0,38	0,17	0,17
$\Delta \bar{x}$	0,8	0,58	0,07	0,4	0,7	0,4	0,4
V, %	10	12	43	36	20	22	9

– не более 10%; золы общей - не более 10 %; золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной - не более 2 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм - не более 2 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм - не более 5%. Для порошка сбора норма измельченности составляет: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм - не более 3 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм - не более 6%.

2.7. Бактериологические исследования сбора противооксалатного

Бактериологические исследования сбора проводились на базе кафедры микробиологии ДВГМУ. Исследовались водные извлечения сбора противооксалатного: отвар, приготовленный в соответствии со статьей ГФ XI; водное извлечение, приготовленное в соотношении 1:83 путем настаивания в термосе в течение 30 минут («домашний способ»).

Антимикробное действие исследовали методом серийных разведений в жидкой питательной среде - мясо-пептонный бульон (МПБ) с определением минимальной подавляющей рост концентрации (МПК) общепринятым методом.

Готовили ряд пробирок, в которые разливали по 2,0 мл МПБ. В первую пробирку вносили 2,0 мл раствора препарата, из первой такое же количество раствора переносили во вторую, из второй - в третью пробирку и т.д. Одна пробирка не содержала препарата и служила контролем. В таком же бульоне готовили взвесь суточной агаровой культуры исследуемых микроорганизмов. Взвесь микроорганизмов добавляли таким образом, чтобы в каждой пробирке содержалось 10^6 - 10^7 микробных тел в мл. Пробирки инкубировали в термостате при 37°C в течение 18 часов. Наличие роста указывало о нечувствительности к препарату. МПК определяли как наименьшую концентрацию препаратов, которая еще вызывала задержку роста микроорганизмов.

В качестве тест-микроорганизмов использовали *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P из Государственной коллекции

патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Данный набор тест-микроорганизмов был выбран в связи с тем, что по литературным данным в моче больных, страдающих инфекционно-воспалительными заболеваниями почек, до 80% случаев выделяются микроорганизмы, относящиеся к семейству энтеробактерий, до 5% случаев род *Staphylococcus* [38,104,302]. Известно, что первичный пиелонефрит нередко предшествует камнеобразованию. Поэтому в лечении мочекаменной болезни необходимо применять препараты в первую очередь с антибактериальным действием, против энтеробактерий и стафилококков.

В результате исследований антибактериальной активности было установлено, что отвар противооксалатного сбора, приготовленный фармакопейным способом (100 мг/мл) и водное извлечение, приготовленное «домашним» способом (12 мг/мл) обладали бактерицидным действием в отношении *Staphylococcus aureus*. На *Escherichia coli* отвар и водное извлечение в аналогичных концентрациях, обладали бактериостатическим действием.

Таким образом, отвар и водное извлечение сбора противооксалатного обладали антибактериальным действием в отношении условно-патогенных организмов, наиболее часто вызывающих заболевания мочевыводящих путей: бактерицидным - в отношении *Staphylococcus aureus*; бактериостатическим - в отношении *Escherichia coli*.

В настоящее время при контроле качества сборов и лекарственного сырья обязательно проводится определение микробиологической чистоты, что предусматривается соответствующими нормативными документами. При разработке вопросов стандартизации необходимо проведение исследований на микробиологическую чистоту опытных серий изучаемого продукта [197]. При контроле оригинального сбора необходимо быть уверенным, что предварительная пробоподготовка обеспечивает снятие антимикробного действия, которое может повлиять на результаты испытания и привести к ложноотрицательным результатам. Контроль осуществляли методом прямого

посева с использованием неспецифического инактиватора. В качестве инактиватора был выбран твин-80 в концентрации 5%.

Микробиологическая чистота определялась в 6 образцах сбора «ангро» и в 6 образцах сбора, фасованного в фильтр-пакеты по ГФ XII, ч.1. [61]. Результаты исследования представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Микробиологические показатели сбора противооксалатного

№ образца	Общее число аэробных бактерий	Общее число грибов	Escherichia coli
1	$5,7 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^1$	не обнаружена
2	$2,0 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^1$	не обнаружена
3	$5,2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^1$	не обнаружена
4	$1,0 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	не обнаружена
5	$2,0 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	не обнаружена
6	$5,0 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^1$	не обнаружена
7	$3,0 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	не обнаружена
8	$1,0 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	не обнаружена
9	$1,5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^1$	не обнаружена
10	$5,0 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$	не обнаружена
11	$4,0 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$	не обнаружена
12	$5,1 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^1$	не обнаружена

Как следует из таблицы 20, все 12 образцов по микробиологической чистоте соответствовали требованиям, предъявляемым к лекарственным препаратам категории 4А [61].

Таким образом, изученный сбор противооксалатный обладает антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, что обуславливает его возможность применения при инфекционно-воспалительных заболеваниях почек.

В проект фармакопейной статьи в раздел "Микробиологическая чистота" рекомендовано включить оценку препарата на соответствие требованиям по категории 4А.

2.8. Исследование изменчивости содержания биологически активных веществ в сборе противооксалатном в процессе хранения

Настоящий раздел посвящен исследованию стабильности биологически активных веществ (БАВ) сбора противооксалатного в процессе долгосрочного хранения с целью установления его сроков годности.

Исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями и едиными требованиями, регламентирующими порядок проведения работ по установлению сроков годности лекарственного растительного сырья, продукции его переработки, сборов [197]. Анализу подвергали двенадцать серий* сбора: 6 образцов сбора «ангро» и 6 образцов сбора, фасованного в фильтр-пакеты. Для приготовления серий сбора были использованы образцы сырья, со времени заготовки которых прошло не более 3 месяцев. Перед закладкой на опытное долгосрочное хранение, а затем по завершении эксперимента сбор анализировали по всем показателям, разработанным для включения в нормативный документ. Дополнительно в процессе хранения проводился анализ образцов на содержание суммы фенольных и дубильных веществ.

Анализ сбора по выбранным критериям проводили каждые три месяца. Пробы для испытаний отбирали по методике в соответствии с установленными требованиями [158]. Суммарное время хранения образцов сбора составило 5 лет. Результаты эксперимента приведены в таблицах 21 - 25. Для удобства представления информации в таблице 21 приведены данные количественного содержания как средние по 6 образцам сбора и итоговые по годам.

Статистическая обработка результатов методом однофакторного дисперсионного анализа показала значимость влияния времени хранения на содержание дубильных веществ и фенольных соединений ($F_{\text{эксп.}} > F_{\text{табл.}}$) в сборе противооксалатном «ангро», фасованном в пачки и фильтр-пакеты. Количество дубильных веществ постепенно уменьшается, а фенольных соединений увеличивается. Тем не менее, следует отметить, что количественные колебания в содержании этих групп веществ в процессе хранения несущественны. Подтверждением этому служат низкие значения коэффициентов вариации, которые составляют не более 5% и находятся фактически в пределах

* Образцы сбора «ангро» и сбора, фасованного в пачки, готовились одновременно из одного и того же сырья. При анализе этих образцов различий в результатах не было, поэтому в табл. 20-24 приведены средние значения.

погрешности анализов. Если сравнить динамику выявленных изменений по разным формам упаковки, то можно проследить некоторые отличия для группы дубильных веществ. Процессы деградации дубильных веществ в образцах сбора, фасованного в виде порошка в фильтр-пакеты, обнаруживаются через 2,6 года после приготовления, для сбора «ангро» и фасованного в пачки, статистически достоверные изменения (снижение) в содержании этой группы веществ происходят после 3,9 лет хранения. Для флавоноидов и экстрактивных веществ изменения за период исследования недостоверны ($F_{\text{эксп.}} < F_{\text{табл.}}$), то есть период почти пятилетнего хранения не оказывает значимого влияния на содержание этих групп веществ.

Таблица 21 – Изменение содержания биологически активных и экстрактивных веществ в сборе противооксалатном в процессе хранения

Период хранения	Содержание, %			
	флавоноиды	дубильные вещества	фенольные соединения	экстрактивные вещества
сбор противооксалатный «ангро» и фасованный в пачки				
исходное содержание (09.03)	0,99	6,64	3,64	34,4
1 год (09.04)	1,00	6,63	3,58	34,5
2 года (09.05)	1,02	6,63	3,62	34,6
3 года (09.06)	1,02	6,52	3,78	34,6
4 года (09.07)	1,01	6,27	3,94	34,7
5 лет (09.08)	1,00	6,05	4,02	34,4
$F_{\text{эксп.}}^1$	0,3	5,9	18,0	0,3
сбор противооксалатный, фасованный в фильтр-пакеты				
исходное содержание (09.03)	1,23	6,73	3,95	35,0
1 год (09.04)	1,23	6,65	3,99	34,9
2 года (09.05)	1,22	6,64	3,99	35,0
3 года (09.06)	1,22	6,25	4,09	35,2
4 года (09.07)	1,21	6,17	4,22	34,9
5 лет (09.08)	1,21	5,94	4,34	35,0
$F_{\text{эксп.}}$	0,1	18,9	14,7	0,7

¹ – значение $F_{\text{табл.}}$ для всех исследуемых групп БАВ составляет 1,6.

Таблица 22 – Изменение содержания суммы флавоноидов (%) в сборе противооксидантном в процессе хранения

№ образца	Сроки хранения																				
	09.03	12.03	03.04	06.04	09.04	12.04	03.05	06.05	09.05	12.05	03.06	06.06	09.06	12.06	03.07	06.07	09.07	12.07	03.08	06.08	09.08
сбор противооксидантный «ангро» и фасованный в пачки																					
1	0,93	0,98	1,00	0,99	0,91	0,91	0,99	0,92	1,03	0,92	0,96	0,90	0,99	1,02	0,91	1,03	0,92	0,98	1,04	1,03	1,04
2	1,06	1,01	1,03	1,05	0,99	1,05	1,02	1,06	1,01	0,98	1,05	1,03	1,00	0,98	1,03	1,01	0,99	1,02	0,93	0,94	0,94
3	1,05	1,08	1,04	1,07	1,09	1,09	1,10	1,11	1,06	1,04	1,09	1,07	1,04	1,06	1,03	1,10	1,04	1,08	1,12	1,08	1,04
4	0,87	0,88	0,89	0,87	0,93	0,90	0,93	0,91	0,93	0,90	0,92	0,86	0,94	0,90	0,90	0,90	0,90	0,89	0,88	0,91	0,90
5	1,04	1,13	1,18	1,02	1,05	1,06	1,02	1,04	1,04	1,08	1,03	1,09	1,05	1,06	1,01	1,10	1,09	1,11	1,06	1,05	1,09
6	0,98	1,04	1,06	1,15	1,02	1,05	1,03	1,04	1,04	1,02	1,05	1,09	1,09	1,06	1,05	1,03	1,13	1,08	1,09	1,05	1,03
средние значения	0,99	1,02	1,03	1,02	1,00	1,01	1,01	1,01	1,02	0,99	1,01	1,00	1,02	1,01	0,99	1,03	1,01	1,03	1,02	1,01	1,00
сбор противооксидантный, фасованный в фильтр-пакеты																					
1	1,38	1,39	1,36	1,42	1,44	1,40	1,39	1,43	1,39	1,42	1,40	1,37	1,41	1,46	1,38	1,40	1,37	1,40	1,37	1,36	1,31
2	1,36	1,34	1,37	1,33	1,32	1,36	1,34	1,35	1,31	1,36	1,36	1,30	1,36	1,35	1,33	1,37	1,31	1,36	1,29	1,32	1,34
3	1,33	1,30	1,35	1,30	1,27	1,28	1,30	1,34	1,26	1,30	1,33	1,31	1,34	1,27	1,28	1,33	1,31	1,26	1,35	1,32	1,31
4	1,24	1,20	1,29	1,19	1,19	1,23	1,22	1,18	1,23	1,25	1,21	1,20	1,22	1,24	1,25	1,16	1,18	1,23	1,23	1,25	1,28
5	1,12	1,09	1,12	1,17	1,16	1,14	1,16	1,12	1,21	1,16	1,22	1,08	1,08	1,15	1,13	1,07	1,19	1,15	1,15	1,11	1,04
6	0,97	0,92	0,99	0,93	1,01	0,99	1,00	1,00	0,92	1,00	0,93	0,99	0,92	1,02	0,98	1,03	0,94	0,96	0,99	1,00	1,01
средние значения	1,23	1,20	1,24	1,22	1,23	1,23	1,23	1,23	1,22	1,25	1,24	1,20	1,22	1,25	1,22	1,22	1,21	1,23	1,23	1,23	1,21

Таблица 23 – Изменение содержания дубильных веществ (%) в сборе противооксидатном в процессе хранения

№ образца	Сроки хранения																				
	09.03	12.03	03.04	06.04	09.04	12.04	03.05	06.05	09.05	12.05	03.06	06.06	09.06	12.06	03.07	06.07	09.07	12.07	03.08	06.08	09.08
сбор противооксالاتный «ангро» и фасованный в пачки																					
1	6,56	6,54	6,61	6,54	6,60	6,55	6,58	6,55	6,67	6,58	6,52	6,51	6,48	6,40	6,38	6,37	6,32	6,16	6,12	6,00	5,99
2	6,40	6,40	6,46	6,41	6,49	6,43	6,44	6,40	6,42	6,40	6,39	6,38	6,31	6,30	6,28	6,26	6,23	6,18	6,06	6,04	6,03
3	6,32	6,30	6,28	6,34	6,28	6,37	6,38	6,35	6,34	6,28	6,25	6,20	6,18	6,18	6,05	5,92	5,80	5,69	5,70	5,60	5,65
4	6,62	6,60	6,62	6,60	6,61	6,63	6,60	6,63	6,60	6,56	6,57	6,55	6,50	6,41	6,42	6,31	6,27	6,24	6,12	6,00	5,98
5	7,16	7,18	7,05	7,12	7,01	7,07	7,06	7,11	7,02	7,06	7,02	7,08	6,97	6,96	6,90	6,82	6,76	6,75	6,60	6,58	6,53
6	6,77	6,83	6,78	6,81	6,81	6,82	6,77	6,75	6,72	6,68	6,67	6,66	6,67	6,59	6,56	6,48	6,28	6,24	6,04	6,10	6,14
средние значения	6,64	6,64	6,63	6,64	6,63	6,64	6,63	6,63	6,63	6,59	6,57	6,56	6,52	6,47	6,43	6,36	6,27	6,21	6,10	6,05	6,05
сбор противооксالاتный, фасованный в фильтр-пакеты																					
1	6,54	6,65	6,55	6,60	6,44	6,42	6,53	6,60	6,49	6,57	6,42	6,23	6,18	6,22	6,22	6,22	6,20	6,00	5,93	6,00	5,90
2	6,58	6,78	6,70	6,66	6,62	6,50	6,64	6,83	6,87	6,51	6,05	5,91	5,72	5,75	5,72	5,71	5,69	5,65	5,61	6,00	5,59
3	6,97	6,93	6,80	6,65	6,60	6,62	6,53	6,60	6,52	6,71	6,32	6,47	6,24	6,30	6,42	6,20	6,17	6,19	6,22	5,99	5,88
4	6,73	6,70	6,60	6,73	6,76	6,85	6,73	6,79	6,75	6,81	6,72	6,65	6,41	6,35	6,29	6,30	6,14	6,15	6,13	6,10	6,05
5	6,95	7,01	6,68	6,80	6,86	6,78	6,76	6,73	6,62	6,63	6,60	6,51	6,48	6,49	6,46	6,50	6,43	6,37	6,32	6,20	6,11
6	6,65	6,68	6,74	6,66	6,63	6,65	6,67	6,66	6,58	6,58	6,57	6,51	6,50	6,47	6,45	6,40	6,40	6,32	6,21	6,15	6,10
средние значения	6,73	6,79	6,68	6,68	6,65	6,63	6,64	6,70	6,64	6,63	6,45	6,38	6,25	6,26	6,26	6,22	6,17	6,11	6,07	6,07	5,94

**Таблица 25 – Изменение содержания фенольных соединений (%)
в сборе противооксалатном в процессе хранения**

№ образца	Сроки хранения																				
	09.03	12.03	03.04	06.04	09.04	12.04	03.05	06.05	09.05	12.05	03.06	06.06	09.06	12.06	03.07	06.07	09.07	12.07	03.08	06.08	09.08
сбор противооксалатный «ангро» и фасованный в пачки																					
1	3,93	3,95	3,95	3,93	3,97	3,98	3,95	4,00	3,96	3,99	4,02	4,04	4,05	4,10	4,13	4,20	4,21	4,23	4,26	4,25	4,27
2	3,77	3,90	3,88	3,88	3,85	3,82	3,88	3,89	3,87	3,84	3,89	3,92	3,97	3,98	3,98	4,04	4,04	4,13	4,21	4,25	4,29
3	4,04	4,01	4,06	4,04	4,01	3,99	4,03	4,00	3,99	4,05	4,08	4,11	4,17	4,19	4,21	4,24	4,29	4,32	4,37	4,36	4,38
4	4,15	4,14	4,12	4,14	4,18	4,18	4,17	4,18	4,17	4,21	4,24	4,26	4,29	4,30	4,34	4,38	4,41	4,44	4,52	4,53	4,56
5	4,01	4,08	3,97	4,03	4,02	3,99	4,03	4,03	4,04	4,02	4,03	4,07	4,08	4,09	4,10	4,13	4,20	4,22	4,29	4,30	4,29
6	3,81	3,87	3,90	3,93	3,91	3,88	3,92	3,88	3,92	3,94	3,97	3,97	4,01	4,09	4,08	4,16	4,20	4,22	4,28	4,26	4,28
средние значения	3,95	3,99	3,98	3,99	3,99	3,97	3,99	3,99	3,99	4,01	4,04	4,06	4,09	4,12	4,14	4,19	4,22	4,26	4,32	4,33	4,34
сбор противооксалатный, фасованный в фильтр пакеты																					
1	3,68	3,66	3,65	3,71	3,59	3,67	3,56	3,65	3,59	3,67	3,69	3,77	3,86	3,84	3,90	3,90	3,93	3,93	3,93	3,90	3,92
2	3,50	3,44	3,50	3,53	3,46	3,58	3,45	3,47	3,56	3,53	3,58	3,68	3,84	3,86	3,82	3,85	3,87	3,88	3,88	3,87	3,88
3	3,83	3,76	3,88	3,78	3,82	3,84	3,75	3,80	3,84	3,73	3,84	3,90	3,93	4,05	4,13	4,06	4,18	4,18	4,19	4,21	4,25
4	3,53	3,47	3,40	3,47	3,48	3,47	3,56	3,54	3,47	3,55	3,60	3,57	3,68	3,69	3,70	3,73	3,79	3,86	3,92	3,95	3,96
5	3,66	3,58	3,63	3,59	3,59	3,57	3,62	3,63	3,61	3,62	3,60	3,68	3,71	3,78	3,88	3,89	3,99	3,97	4,00	4,05	4,04
6	3,67	3,50	3,65	3,51	3,56	3,69	3,60	3,61	3,68	3,69	3,51	3,66	3,68	3,73	3,80	3,88	3,92	4,00	4,06	4,07	4,07
средние значения	3,64	3,57	3,62	3,60	3,58	3,63	3,59	3,62	3,62	3,63	3,63	3,71	3,78	3,82	3,87	3,88	3,94	3,97	3,99	4,01	4,02

Параллельно с определением содержания БАВ в образцах сбора проводился анализ на микробиологическую чистоту* и, естественно, на содержание влаги. В течение всего периода наблюдений показатели влажности и микробиологической чистоты соответствовали нормативам проекта ФСП.

На основании полученных данных и с учетом установленных сроков годности отдельных видов сырья, входящего в состав сбора, предлагаем установить срок годности для сбора «ангро» и фасованного в пачки – 3 года, для сбора, фасованного в фильтр-пакеты – 2 года.

Заключение к главе 2

Таким образом, проведено макро- и микроскопическое исследование сбора противооксалатного. Определены диагностические макро- и микропризнаки, по которым устанавливается присутствие всех сырьевых компонентов сбора.

Проведено изучение химического состава сбора: подтверждено присутствие флавоноидов, дубильных веществ, фенолкарбоновых кислот, простых фенольных соединений, полисахаридов, сапонинов. Хроматографически в сборе идентифицированы гиперозид, изокверцитрин, авикулярин, арбутин и хлорогеновая кислота; показано присутствие четырех лигнанов лимонника.

Изучен элементный состав: в сборе обнаружены 39 элементов. Установлены показатели вариабельности содержания макро- и микроэлементов в сборе и выход минеральных веществ в настои. Показано, что содержание марганца в сборе соответствует его суточной потребности, а содержание магния и других эссенциальных элементов будет являться необходимым дополнением к их суточному потреблению.

Исследован УФ спектр сбора. Показано, что в УФ спектре должен находиться максимум в коротковолновой области в интервале длин волн 272-285 нм и минимум в интервале 256-262 нм.

* Определение микробиологической чистоты 12 образцов сбора проводилось в лаборатории ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае".

Разработан метод определения подлинности сбора, включающий макро- и микроанализ, УФ спектр и хроматографию. Соответствующие диагностические характеристики включены в проект ФСП, в том числе в нормативный документ предложено включить ВЭТСХ методику, позволяющую определять подлинность сбора по стандартной хроматограмме и в сравнении с СОВС гиперозида.

Для количественной оценки основных действующих веществ в сборе разработаны соответствующие методики: для определения флавоноидов - спектрофотометрическая методика, для арбутина - хроматографическая методика. Методики апробированы, даны их статистические параметры и оценки.

Определено количественное содержание основных БАВ сбора. Показано, что среднее содержание в сборе дубильных веществ составляет 6,6 %, фенольных соединений - 4,2 %, экстрактивных веществ - 33,3 %, флавоноидов - 1,1 %, арбутина - 2,3 %.

Обоснованы и предложены для включения в проект ФСП нормативные показатели доброкачественности сбора: содержание арбутина - не менее 0,9 %; суммы флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 0,6 %; экстрактивных веществ, извлекаемых водой - не менее 25 %; содержание влаги - не более 10 %; золы общей - не более 10 %; золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной - не более 2 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм - не более 2 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм - не более 5%.

Для порошка сбора норма измельченности составляет: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм - не более 3 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм - не более 6%.

Бактериологические исследования показали, что сбор противооксалатный обладает антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. В проект фармакопейной статьи в раздел "Микробиологическая чистота" рекомендовано включить оценку препарата на соответствие требованиям по категории 4А.

При изучении изменчивости БАВ в сборе в процессе хранения установлено, что на протяжении 5 лет не происходит статистически достоверного снижения флавоноидов и экстрактивных веществ в сборе, на содержание дубильных и фенольных веществ выбранный интервал хранения оказывает значимое влияние. Также определено, что скорость изменения содержания дубильных и фенольных веществ при хранении образцов сбора «ангро» и фасованного в пачки и фильтр-пакеты, различается – достоверные изменения в содержании фенольных соединений в сборе «ангро» и фасованном в пачки, наблюдаются через 3,9 лет хранения, в фильтр-пакеты – через 2,6 года. Сроки годности, рекомендованные для сбора «ангро» и фасованного в пачки – 3 года, для сбора, фасованного в фильтр-пакеты – 2 года.

ГЛАВА 3. Изучение выхода БАВ в настои сбора противооксалатного

В настоящее время уделяется большое внимание изучению технологии водных извлечений из сырья и вопросам их стандартизации [66,199,215,249,252]. В публикациях, посвященных этому вопросу, приводятся технологические режимы получения водных извлечений с учетом химического состава, гистологической структуры, измельченности сырья и формы выпуска препарата. В ряде работ наряду с фармакопейными режимами изучаются различные бытовые способы получения водных извлечений, которые зачастую не уступают официальным [173,213].

Особое внимание уделяют исследователи относительно новой форме выпуска фитопрепаратов – фильтр-пакеты. Фильтр-пакеты являются весьма удобными для пациентов. Фасовка многокомпонентных смесей лекарственного сырья в фильтр-пакеты обеспечивает однородность смешивания и дозированность. В ряде случаев качество настоев, приготовленных из сборов в фильтр-пакетах, выше таковых из пачек, что объясняется большей дисперсностью сырья. Положительное влияние на органолептические свойства полученных таким образом настоев связано с фильтрующей способностью материала и, как правило, большим соотношением сырья и воды [101,214]. К недостаткам данной формы относится присутствие в бумаге для производства фильтр-пакетов соединений, извлекаемых водой [21].

Ранее проведенные исследования сбора противооксалатного позволили выбрать измельченность сырьевых компонентов сбора и установить коэффициент водопоглощения для приготовления настоя, который равен 1,88 [223].

Исходя из вышеописанного, интерес представляла разработка оптимальной технологии водного извлечения из сбора противооксалатного. Оригинальный сбор состоит из семи компонентов, относящихся к различным морфологическим группам сырья (плоды, листья, трава и др.) и характеризующихся различной гистологической структурой и химическим

составом. В связи с этим мы определили содержание БАВ в сырьевых источниках сбора.

Во всех объектах определяли содержание экстрактивных и дубильных веществ по общепринятым методикам. Содержание флавоноидов определяли по методике, разработанной для сбора. Количество флавоноидов оценивали во всех объектах, кроме семян лимонника.

Результаты определения БАВ в сырье (табл. 26) показали, что изученные объекты содержат различное их количество. Содержание экстрактивных веществ в зависимости от вида сырья колеблется от 7,5 до 63,6 %, дубильных веществ – 0,1–19 %, флавоноидов – 0,2 –4,1 %.

Таблица 26 – Содержание экстрактивных веществ и БАВ в сырье

№ п/п	Вид сырья	Экстрактивн ые вещества, %	Дубильные вещества, %	Флавоноиды, %
1	трава горца птичьего	25,9	1,6	2,1
2	листья земляники	29,1	15,4	4,1
3	листья брусники	39,3	19,0	2,6
4	столбики с рыльцами кукурузы	33,6	1,9	2,2
5	плоды шиповника	44,3	5,8	0,2
6	плоды калины	63,6	8,8	0,3
7	семена лимонника	7,5	0,1	-

Как видно из таблицы, плоды характеризуются высоким содержанием экстрактивных веществ (калины – 63,6 %, шиповника – до 44,3 %) и низким содержанием флавоноидов (0,3 % и 0,2 % соответственно). Низкое содержание экстрактивных (7,5 %) и дубильных веществ (0,1 %) обнаружено в семенах лимонника. Листья земляники и брусники характеризуются высоким

содержанием дубильных веществ (15,4 % и 19,0 %) и флавоноидов (4,1 % и 2,6%). В остальных объектах содержание дубильных веществ находится в диапазоне от 1,6 до 8,8% и флавоноидов – около 2 %.

Таким образом, исследованное сырье различается по количественному содержанию изученных групп БАВ: наибольшее количество экстрактивных веществ приходится на плоды, флавоноидов – на листья земляники и дубильных веществ – на листья брусники.

Исходя из количественного соотношения компонентов сбора, можно предположить, что основными источниками экстрактивных веществ в сборе являются трава горца птичьего, листья брусники и плоды, дубильных веществ – листья брусники и земляники, флавоноидов – трава горца птичьего, листья брусники и земляники.

Сбор противооксалатный разработан в двух формах выпуска: фасованный в пачки и фильтр-пакеты. Для разработки инструкции по применению необходимо выбрать оптимальный способ приготовления водного извлечения. Извлечения из сборов рекомендуется готовить согласно фармакопейной статье «Настои и отвары». Однако, исследования, проведенные ранее, показали, что «домашний» способ приготовления настоя из сбора противооксалатного оказался эффективнее по выходу действующих веществ, чем фармакопейный [223]. В связи с этим мы провели ряд дополнительных экспериментов с разными режимами настаивания, в том числе встречающимися в быту.

Режим настаивания для сбора, фасованного в фильтр-пакеты, ранее не изучался, в то время, как это представляет практическое значение [20]. Настои сбора противооксалатного готовили, заливая один фильтр-пакет, содержащий 3 г сырья, стаканом горячей воды (250 мл) с последующим настаиванием в течение определенного времени (2, 5, 10, 15, 30, 45 мин). По прошествии указанного времени фильтр-пакет отжимали, полученное извлечение после охлаждения

доводили в мерной колбе на 250 мл до метки, перемешивали и количественно оценивали содержание экстрактивных, дубильных веществ и флавоноидов.

Как видно по данным таблицы 27, продолжительность настаивания достоверно влияет на выход БАВ в настои из фильтр-пакетов. Метод попарных сравнений показал, что к тридцатой минуте настаивания выход веществ в водное извлечение достигает максимума и дальнейшее настаивание нерационально. В ходе проведенного эксперимента было установлено, что необходимая продолжительность настаивания составляет 30 минут.

Для определения влияния способа приготовления настоя на количественное содержания БАВ, мы выбрали 5 разных способов, в том числе, применяемых в быту:

- по фармакопейной методике приготовления настоев (способ 1);
- по фармакопейной методике приготовления отваров (способ 2);
- кипячение на плитке (способ 3).
- настаивание в термосе (способ 4);
- настаивание в микроволновой печи (способ 5);

Первые два способа выполнялись в соответствии с ГФ XI. Извлечения, полученные «домашними» способами (способы 3-5), готовили в соотношении, приведенном выше. По третьему варианту сырье, залитое водой, доводили до кипения на электроплите с последующим настаиванием 30 минут. По четвертому способу сырье заливалось горячей водой в термосе и настаивалось 30 минут. И пятый способ заключался в доведении смеси до кипения в микроволновой печи при мощности 900 Вт с последующим настаиванием также в течение 30 минут. По истечении времени настаивания извлечение фильтровали в мерную колбу соответствующего объема, после охлаждения доводили водой до метки и перемешивали. Каждый анализ выполнялся в трех повторностях, начиная с приготовления настоя.

Результаты представлены в таблице 28.

**Таблица 27 – Содержание экстрактивных и биологически активных веществ в настое сбора
противооксидатного, фасованного в фильтр-пакеты**

Группа веществ	Продолжительность настаивания, мин						Статистическая оценка $F_{\text{эксп.}}$
	2	5	10	15	30	45	
экстрактивные вещества, %	0,29±0,03	0,32±0,01	0,31±0,02	0,31±0,03	0,34±0,02	0,35±0,01	8,3
дубильные вещества, %	0,041±0,004	0,046±0,003	0,047±0,003	0,046±0,003	0,050±0,003	0,051±0,002	4,8
флавоноиды, мг/1г	0,080±0,008	0,085±0,008	0,084±0,004	0,086±0,005	0,093±0,004	0,098±0,005	9,7

Примечание. $F_{\text{табл.}} = 3,1$

Таблица 28 – Содержание БАВ в водных извлечениях сбора, приготовленных разными способами

Обозначение способа	Экстрактивные вещества, %	Дубильные вещества, %	Флавоноиды, %
1	2,3±0,1	0,43±0,01	0,067±0,003
2	2,4±0,1	0,43±0,01	0,070±0,001
3	0,32±0,02	0,053±0,001	0,012±0,001
4	0,34±0,01	0,056±0,004	0,012±0,001
5	0,32±0,01	0,051±0,003	0,011±0,001

Как видно из таблицы, извлечения, полученные фармакопейными способами, характеризуются более высоким содержанием веществ. Это обстоятельство объясняется стандартным соотношением сырья и экстрагента – 1:10 и, как следствие, получением более концентрированных настоев. Анализ результатов проводили отдельно для двух групп данных: I – способы 1 и 2, II – способы 3-5. При сравнении данных для настоев и отваров по критерию Стьюдента, достоверные различия обнаружены только в содержании флавоноидов. В отваре содержится флавоноидов на 4 % больше, чем в настой.

Однофакторный дисперсионный анализ данных (способы 3-5) показал, что способ настаивания оказывает статистически достоверное влияние на содержание дубильных, экстрактивных веществ и не влияет на содержание флавоноидов. Как видно из таблицы, результаты анализов по содержанию БАВ в настоях, полученных «домашними» способами, очень близки. И хотя настой, приготовленный в термосе, отличается достоверно более высоким содержанием дубильных и экстрактивных веществ, однако отличия эти минимальны.

Эффективность извлечения веществ определялась по их процентному выходу из сырья. Как видно из таблицы 29, способ получения извлечения оказывает существенное влияние на выход флавоноидов (38-57 %) и экстрактивных веществ (64-78 %) и в меньшей степени на выход дубильных веществ (61-68 %). В ходе исследования было выявлено, что фармакопейные способы несколько уступают «домашним» в эффективности экстракции

веществ: выход экстрактивных веществ ниже в среднем на 10 %, флавоноидов - на 16 %. Очевидно, это связано с соотношением сырья и экстрагента, которое составляет 1:10 при официальных способах извлечения и 1:83 при «домашних». В зависимости от способа приготовления дубильные вещества переходят в настой в пределах 61–68 %.

Таблица 29 – Выход БАВ в водные извлечения сбора, приготовленные разными способами

Показатель	Содержание в сборе, %	Выход веществ в извлечение (%), полученное способом					
		1	2	3	4	5	из фильтр-пакета
экстрактивные вещества	32,9	64	66	73	77	73	78
дубильные вещества	6,2	62	62	65	68	62	61
флавоноиды	1,6	38	39	53	57	55	44

Наибольший выход анализируемых веществ наблюдается при приготовлении извлечения в термосе. Эффективность экстракции веществ из фильтр-пакетов находится примерно в тех же пределах, что и экстракция сбора, фасованного в пачки. В данном случае наблюдается самый высокий показатель извлечения экстрактивных веществ (78 %), что может быть связано, как с большей дисперсностью сырья, так и с переходом в раствор различных химических веществ из бумаги. В то же время обнаружен несколько сниженный выход дубильных веществ и более существенное снижение извлечения флавоноидов в сравнении с «домашними» способами. Полученные результаты можно объяснить воздействием температурного фактора: фильтр-пакет заливают горячей водой, которая в течение 30 минут остывает, и скорость экстракции снижается. С другой стороны, семена лимонника включены в сбор в измельченном виде и жирное масло, пропитывающее фильтр-пакет и другие компоненты сбора, может препятствовать экстракции водорастворимых дубильных веществ и флавоноидных гликозидов.

В целом экспериментальные исследования показали некоторые преимущества «домашних» способов настаивания перед официальными в эффективности экстракции. Кроме того, фармакопейные настои и отвары отличаются горьким вкусом и повышенной мутностью, что снижает их органолептические показатели. Следует отметить, что при оксалатной нефропатии показано потребление достаточного количества жидкости для уменьшения риска кристаллообразования. По результатам проведенных исследований можно заключить что «домашние» способы сопоставимы между собой по полноте экстракции с некоторым преимуществом способа 4.

Заключение к главе 3

В настоящей главе было изучено влияние способов приготовления водных извлечений на содержание основных БАВ. Показано, что наибольшее влияние способ получения оказывает на выход в водные извлечения флавоноидов, экстрактивных веществ и самое незначительное – на выход дубильных веществ. Установлено, что оптимальная продолжительность настаивания извлечений из фильтр-пакетов составляет 30 минут. В ходе исследований было выявлено преимущество «домашних» способов перед официальными по степени извлечения БАВ. В то же время различия в содержании БАВ в настоях, полученных с использованием бытовых вариантов, незначительны. Выход БАВ в настои из фильтр-пакетов находится на уровне показателей сбора, фасованного в пачки.

ГЛАВА 4. Сравнительное изучение основных биологически активных веществ листьев земляники восточной и земляники лесной

Как было показано в предыдущих главах, в пропись сбора противооксалатного входит сырье земляники. Официальным видом является земляника лесная. На Дальнем Востоке произрастает земляника восточная (*Fragaria orientalis* Losinsk.). Изучение и введение в медицинскую практику близкородственных видов лекарственных растений, произрастающих на Дальнем Востоке, является одним из направлений работы кафедры фармакогнозии и ботаники ДВГМУ. Для обоснования данного вопроса на кафедре был разработан статистико-фармакогностический метод сравнительного изучения лекарственного растительного сырья [222]. Метод позволяет при отсутствии различий в использовании изучаемых видов лекарственного растительного сырья, тождественности их химического состава, соответствии внешних признаков, числовых и других показателей судить о фармацевтической равноценности сырья нескольких видов производящих растений.

Земляника восточная является широко распространенным восточноазиатским видом и практически не изучена официальной медициной. Ареал вида охватывает некоторые районы Восточной Сибири, Республики Саха (Якутия) и Дальнего Востока. В Сибири вид широко представлен в Забайкалье и южной части Прибайкалья. На территории Якутии земляника восточная встречается в Алданском, Центрально-Якутском, Верхне-Ленском районах. На Дальнем Востоке распространена в Приморье и Приамурье [14,52,187,216,260]. Ареалы земляники восточной и официального вида - земляники лесной перекрываются в Восточной Сибири, и именно с этого географического района происходит замещение официального вида восточным викариантом. Таким образом, ареалы земляники восточной и официального вида – земляники

лесной вполне сопоставимы, что свидетельствует о перспективности изучения дальневосточного вида как дополнительного источника фармакопейного сырья.

В литературе, посвященной землянике восточной, обычно прогнозируется возможность использования сырья этого вида аналогично сырью земляники лесной [127,241,266]. Специалисты по лекарственной флоре Дальнего Востока делают предположения об идентичности фармакологических свойств обоих видов, основанные на местном применении дальневосточного варианта. Таким образом, на основании вышеизложенного представляется перспективным дальнейшее изучение листьев земляники восточной как потенциального сырьевого аналога официального вида, в том числе и для производства сбора противооксидантного. При проведении фармакогностических исследований качественные и количественные показатели биологически активных веществ в листьях земляники восточной сравнивали с данными, полученными для сырья земляники лесной.

4.1. Сравнительный анализ качественного состава листьев земляники восточной и земляники лесной

Как показал анализ литературы, химический состав листьев земляники лесной изучен достаточно подробно и отличается большим разнообразием и вариабельностью (раздел 1.2.2.). Данные по химическому составу листьев земляники восточной носят фрагментарный характер, что свидетельствует об отсутствии комплексных исследований этого растения.

Фармакологическая активность растительного сырья определяется комплексом различных БАВ. Степень выраженности потенциальной биологической активности сырья земляники восточной можно оценить по качественному и количественному содержанию БАВ, поэтому на первом этапе исследования с помощью известных в фитохимии цветных реакций мы провели обнаружение основных групп БАВ в листьях земляники восточной. Качественные реакции выполняли в сравнении с листьями земляники лесной. Результаты исследования представлены в таблице 30.

По результатам качественного фитохимического анализа в листьях земляники восточной обнаружены флавоноиды, полисахариды, дубильные вещества преимущественно гидролизуемой природы. Как видно из таблицы, результаты реакций совпадают для листьев земляники восточной и земляники лесной, что указывает на присутствие одинаковых групп биологически активных веществ.

На следующем этапе было проведено сравнение УФ-спектров спиртовых извлечений из сырья обоих видов. Спектры снимали в диапазоне длин волн от 240 до 380 нм. Для спектрального анализа использовали извлечения, полученные при количественном анализе флавоноидов и фенольных соединений.

Необходимо отметить, что характер спектральных кривых образцов земляники восточной из разных мест заготовки не имеет различий, касающихся формы кривой и интенсивности поглощения (рис. 39). При сравнении среднестатистических УФ спектров экстрактов листьев земляники восточной и земляники лесной принципиальных различий также не обнаружено, что свидетельствует о межвидовом постоянстве соотношения различных групп биологически активных веществ (флавоноидов, оксикоричных кислот, простых фенолов и др.) Спектры характеризуются отсутствием ярко выраженных экстремумов. В области длин волн от 220 нм до 255 нм наблюдается понижение оптической плотности, в области от 255 нм до 275 нм – плато, в области от 275 нм наблюдается равномерное понижение оптической плотности. Далее методом хроматографии в тонком слое сорбента было проведено сравнение флавоноидного комплекса обсуждаемых видов. Для сравнения хроматографических профилей земляники лесной и земляники восточной использовали этилацетатную фракцию. Для хроматографирования брали по 5 образцов каждого вида земляники. Подготовку проб проводили нижеописанным способом.

**Таблица 30 – Результаты исследования химического состава листьев
земляники лесной и земляники восточной**

Реактив, название реакции	Результаты реакций		Отнесение результатов к группе БАВ
	земляника лесная	земляника восточная	
1% раствор желатина	муть, исчезающая при добавлении избытка желатина	муть, исчезающая при добавлении избытка желатина	дубильные вещества
1% раствор хинина хлорида	аморфный осадок	аморфный осадок	дубильные вещества
раствор железоммониевых квасцов	черно-синее окрашивание	черно-синее окрашивание	гидролизуемые дубильные вещества
5% раствор калия бихромата	потемнение раствора и коричневый осадок	потемнение раствора и коричневый осадок	дубильные вещества
раствор натрия гидроксида	ярко-желтое окрашивание	ярко-желтое окрашивание	флавоноиды
раствор хлорного железа	зеленое окрашивание	зеленое окрашивание	фенольные соединения с орто-дигидрокси фенольными группами
проба с минеральными кислотами	оранжевое окрашивание	оранжевое окрашивание	флавоноиды
конц. хлористоводородная к-та и металлический магний	красное окрашивание	красное окрашивание	флавоноиды
аммиачная проба	желтое окрашивание	желтое окрашивание	флавоноиды
1% раствор ванилина, конц. хлористоводородная кислота	красно-малиновое окрашивание	красно-малиновое окрашивание	флавоноиды (катехины)
раствор свинца уксуснокислого основного	светло-желтое окрашивание и желтый осадок	светло-желтое окрашивание и желтый осадок	флавоноиды, дубильные вещества
лактонная проба	отсутствие осадка	отсутствие осадка	кумарины
реактив Фолина-Дениса	синее окрашивание	синее окрашивание	фенольные соединения
дiazореактив	коричнево-красное окрашивание	коричнево-красное окрашивание	фенольные соединения
пенообразование	отсутствие пены	отсутствие пены	сапонины
95% спирт этиловый	хлопьевидный осадок	хлопьевидный осадок	полисахариды

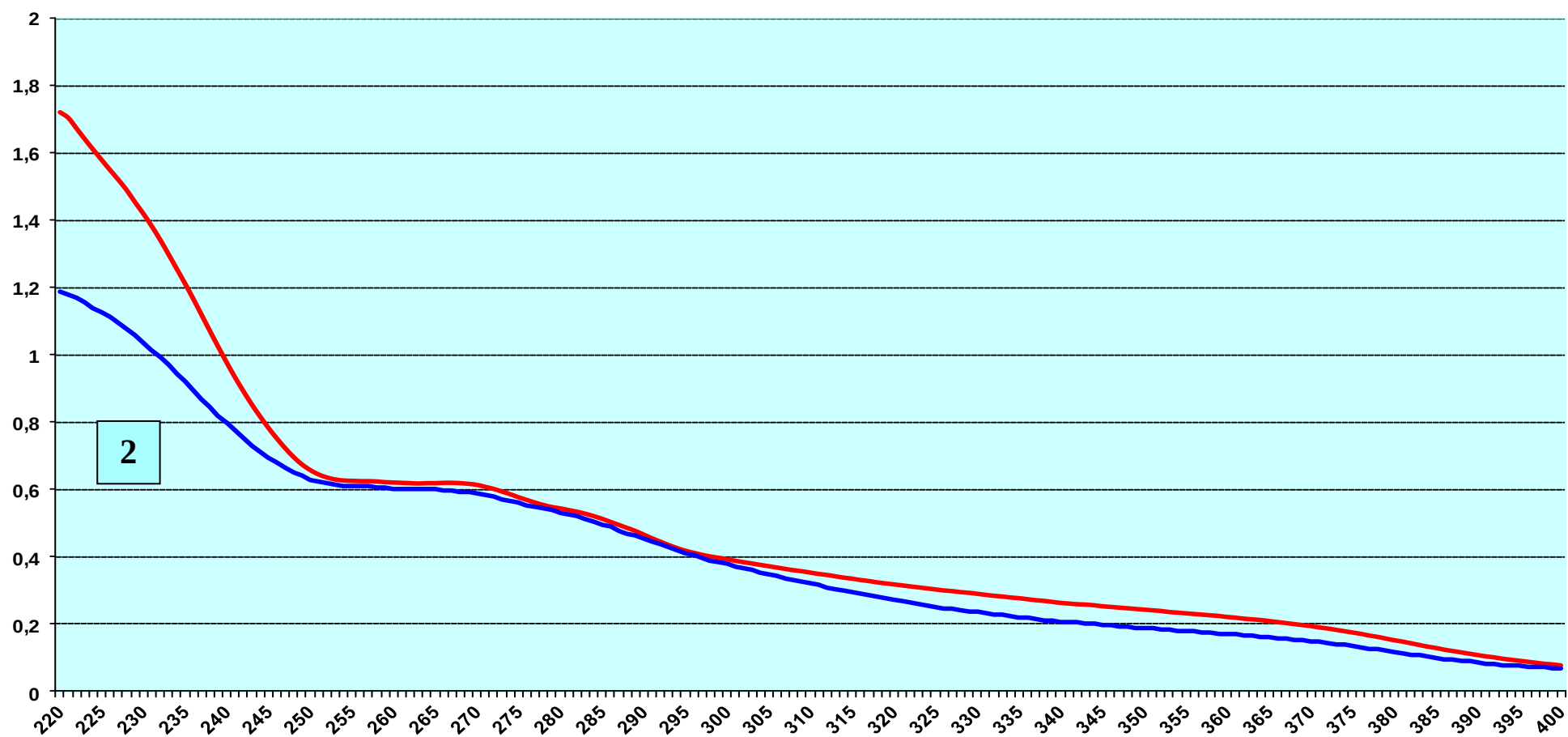


Рисунок 39 – Среднестатистические УФ – спектры экстрактов: 1 - листьев земляники восточной, 2 -листьев земляники лесной

Около 5 г измельченного сырья земляники экстрагировали 4 раза 50 мл 70 % спирта этилового на водяной бане. Полученные спиртовые экстракты фильтровали через бумажный фильтр, объединяли, упаривали под вакуумом до водного остатка. Выпавший при этом осадок хлорофилла и смол отфильтровывали. Для очистки от других липофильных веществ сгущенный водный экстракт промывали последовательно гексаном (3 раза по 10 мл) и хлороформом (5 раз по 10 мл). Затем водный остаток обрабатывали пятикратно этилацетатом по 20 мл. Полученную фракцию упаривали до объема 10 мл и использовали для хроматографического анализа. На пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия) наносили 5 мкл этилацетатной фракции и хроматографировали в системе растворителей этилацетат:спирт метиловый: вода: кислота муравьиная (50:2:3:6). Фронт пробега растворителей составлял 8 см. Пластинки просматривали в фильтрованном УФ свете при длине волны 365 нм до и после обработки 5% спиртовым раствором алюминия хлорида.

Средние результаты хроматографирования представлены на рисунке 40 и в таблице 31.

После проявления хроматограмм и просмотре в УФ-свете обнаруживается 12 зон адсорбций для земляники лесной и 11 для земляники восточной. В треке земляники лесной до обработки хроматограмм два пятна имеют голубое свечение ($R_f=0,82$; $0,74$), одно пятно желтую флюоресценцию ($R_f=0,93$), остальные пятна имеют темно-коричневую окраску ($R_f=0,77$; $0,57$; $0,50$; $0,47$; $0,35$; $0,29$; $0,23$; $0,20$; $0,13$). На хроматограмме земляники восточной аналогично официальному виду до обработки наблюдается также одна зона адсорбции с желтой флюоресценцией ($R_f=0,93$) и девять зон адсорбции с темно-коричневой окраской ($R_f=0,77$; $0,57$; $0,50$; $0,47$; $0,35$; $0,29$; $0,23$; $0,20$; $0,13$). Для земляники восточной в отличие от земляники лесной обнаружена только одна зона адсорбции, имеющая голубое свечение ($R_f=0,82$).

Таблица 31 – Результаты детектирования хроматограммы этилацетатной фракции образцов земляники восточной и земляники лесной в системе этилацетат:спирт метиловый:вода:кислота муравьиная (50:2:3:6)

№ п/п	Земляника восточная		Земляника лесная		Окраска в УФ-свете при 365 до проявления AlCl_3	Окраска в УФ-свете при 365нм после проявления AlCl_3
	Rf	интенсивность проявления	Rf	интенсивность проявления		
1	0,13	+	0,13	+	темно-коричневая	желтая
2	0,20	+	0,20	+	темно-коричневая	желтая
3	0,23	+	0,23	+	темно-коричневая	желтая
4	0,29	+	0,29	+	темно-коричневая	желтая
5	0,35	+++	0,35	+++	темно-коричневая	желтая
6	0,47	+	0,47	+	темно-коричневая	желтая
7	0,50	+	0,50	+	темно-коричневая	желтая
8	0,57	+	0,57	+	темно-коричневая	желтая
9	-	-	0,74	+++	голубая	голубая
10	0,77	+++	0,77	+++	темно-коричневая	желтая
11	0,82	+	0,82	+	голубая	голубая
12	0,93	+	0,93	+	желтая	желто-зеленая

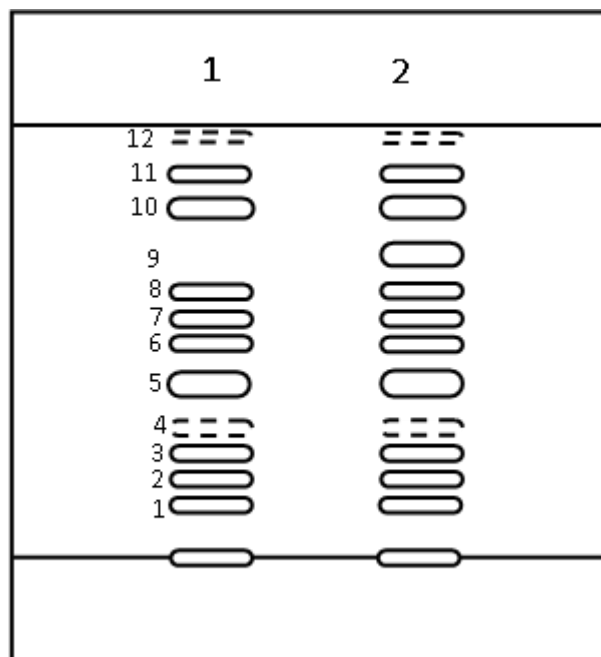


Рисунок 40 – Схема хроматограммы : 1 – этилацетатная фракция земляники восточной, 2 – этилацетатная фракция земляники лесной

После проявления хроматограммы и просмотре в УФ-свете при длине волны 365 нм у темно-коричневых пятен в треках обоих видов появляется желтая флюоресценция, что свидетельствует о флавоноидной природе веществ.

Таким образом, как видно из представленных результатов, совпадение треков земляники лесной и земляники восточной наблюдается по всем 10 зонам адсорбции, соответствующим флавоноидам ($R_f=0,93$; $0,77$; $0,57$; $0,50$; $0,47$; $0,35$; $0,29$; $0,23$; $0,20$; $0,13$). Кроме того, детектируемые пятна практически не различаются интенсивностью свечения и шириной зон в треках исследуемых видов земляники. Установлено, что доминирующими компонентами для образцов земляники являются вещества с $R_f=0,35$ и $0,77$, так как они имеют интенсивное свечение и достаточно широкие четкие зоны адсорбции. Зоны с $R_f=0,29$ и $0,93$ в образцах земляники лесной и земляники восточной отнесены к минорным компонентам, так как обнаруживаются в виде слабо светящихся пятен. Все остальные пятна имеют свечение средней интенсивности.

Таким образом, на основании проведения хроматографических исследований установлено, что земляника лесная и земляника восточная

имеют сходство по основным доминирующим соединениям флавоноидной композиции. Различие между видами, установленные в ходе проведенного эксперимента (отсутствие зоны голубой флюоресценции с $R_f=0,74$ в треке земляники восточной), имеют больше теоретическое значение, например, при решении вопросов систематики.

4.2. Сравнительный количественный анализ биологически активных веществ листьев земляники восточной и земляники лесной

Как следует из литературного обзора, основной группой, обеспечивающей фармакотерапевтический эффект листьев официального вида земляники является сумма фенольных соединений. Естественно предположить ведущую роль фенолов в обеспечении фармакотерапевтического действия и для сырья дальневосточного вида. Поэтому, параллельно с проведением сравнительного изучения качественного состава фенольного комплекса листьев земляники восточной и земляники лесной представляется не менее важным и вопрос его сравнительной количественной оценки в обоих видах.

Исходя из литературных сведений по химическому составу земляники лесной и полученных нами данных по химическому составу сырья земляники восточной, приоритетными для проведения сравнительной оценки являются следующие группы: флавоноиды, дубильные вещества и сумма фенольных соединений.

Для решения поставленных задач нами были разработаны методики количественного определения флавоноидов и фенольных соединений в листьях земляники восточной. Для целей сравнительного анализа мы использовали одни и те же методики для исследования химических комплексов обоих видов.

4.2.1. Разработка методики количественного определения флавоноидов в листьях земляники

Флавоноиды представлены в листьях земляники восточной различными структурными группами, поэтому при выборе стандартного вещества и аналитической длины волны для количественного определения был изучен дифференциальный спектр поглощения комплексов алюминия хлорида и

флавоноидов спиртового извлечения из листьев земляники. При регистрации спектра установлено, что дифференциальная кривая имеет максимум поглощения при 410 ± 2 нм, который совпадает с максимумом поглощения комплекса рутина с тем же комплексообразователем (рис. 41). Таким образом, в качестве стандартного образца был выбран рутин.

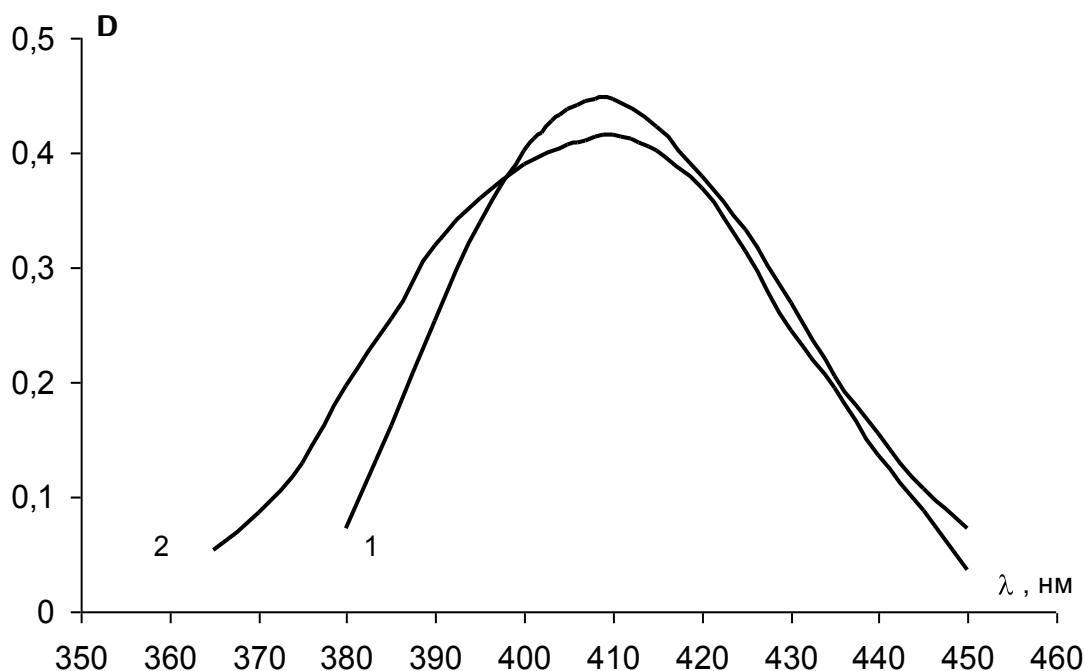


Рисунок 41 – Дифференциальные спектры поглощения комплексов раствора рутина (1) и флавоноидов экстракта листьев земляники восточной (2) с 10% раствором алюминия хлорида

На этапе предварительных исследований были установлены оптимальные параметры реакции комплексообразования – количество добавляемого алюминия хлорида и кислоты уксусной, время образования и устойчивость комплекса. Как видно из рис. 42, минимальное количество 10% раствора алюминия хлорида составляет 3 мл, оптимальное – 5 мл [37]. Реакция образования хелатных комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом развивается в течение 30 минут и следующие 60 минут комплекс сохраняет стабильность. Для получения оптимального значения рН и воспроизводимых результатов в аналитическую пробу необходимо добавлять 0,2 мл кислоты уксусной.

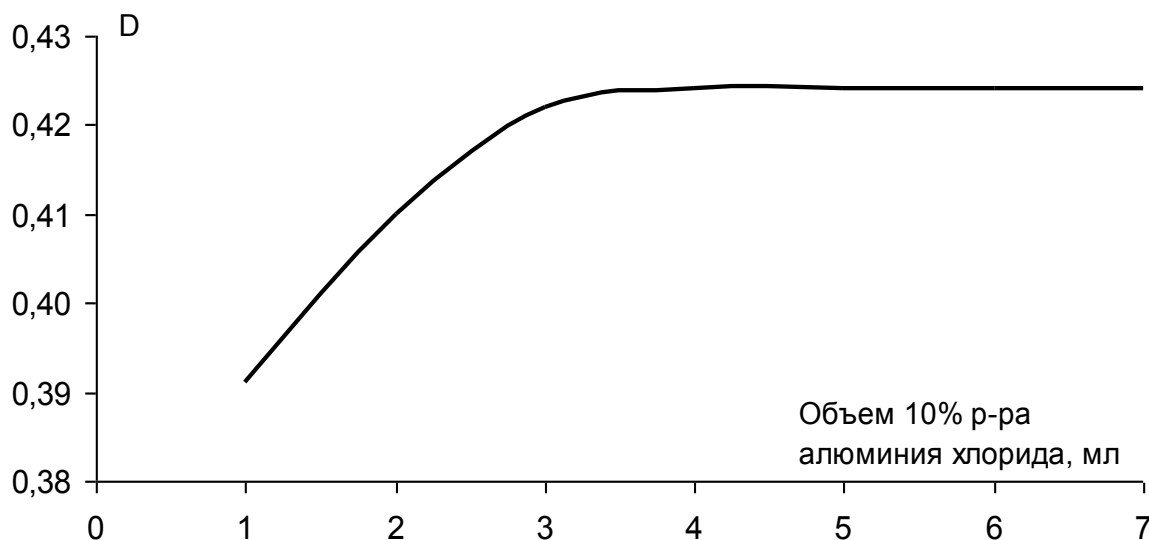


Рисунок 42 – Зависимость оптической плотности от количества добавленного раствора алюминия хлорида

В ходе разработки методики экспериментально с последующей статистической обработкой результатов было изучено влияние измельченности сырья, продолжительности экстракции, соотношение сырья и экстрагента, концентрации спирта на выход флавоноидов. Для выбора оптимальных условий экстракции проводили анализ извлечений, полученных однократной экстракцией на одном образце сырья. Результаты приведены в таблице 32.

Однофакторный дисперсионный анализ показал влияние концентрации этилового спирта на выход флавоноидов из листьев земляники ($F_{\text{эксп}}=406,9$; $F_{\text{кр}}=9,5$). Для выбора оптимальной концентрации спирта проведено сравнение данных по критерию Стьюдента, которое показало достоверность различий между выходом флавоноидов в извлечения на спирте этиловом 95, 70 и 50 %. Экстракция флавоноидов происходит достоверно полнее при использовании спирта этилового 70 %, который и был выбран в качестве экстрагента.

**Таблица 32 – Влияние условий экстракции на выход флавоноидов
из листьев земляники**

Условия экстракции	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Концентрация спирта, %	
50	2,66 (раствор мутный)
70	2,80
95	1,56
Измельченность сырья, мм	
1	2,82
2	2,80
3	2,81
5	2,74
Продолжительность экстракции, мин	
15	2,62
30	2,85
45	2,81
60	2,84
Соотношение сырья и экстрагента	
1:50	2,43
1:100	2,80
1:150	3,24
1:200	3,23
Номер извлечения	
1(1:150)	3,24
2 (1:50)	0,12
3 (1:50)	0,04

Аналогичным образом установлено, что оптимальным является соотношение сырья и экстрагента 1:150. Выход флавоноидов из сырья, измельченного до размеров частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1-3 мм, достоверно не различается, при 5 мм выход несколько ниже. Время достижения равновесной концентрации при экстрагировании флавоноидов из сырья при нагревании на кипящей водяной бане составляет 30 мин. Исследование влияния кратности экстракции показало, что достаточно двукратной экстракции, при этом второе извлечение целесообразно проводить при соотношении сырья и экстрагента 1:50.

Метрологические характеристики разработанной методики представлены в табл. 33. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют, что относительная ошибка определения с доверительной вероятностью 95 % составляет 2,00 %, ошибка отдельной варианты – 4,90%. Опыты с добавками стандартного образца рутина к извлечению показали отсутствие систематической ошибки предлагаемой методики (табл. 34).

Таблица 33 – Метрологическая характеристика методики определения суммы флавоноидов в листьях земляники

n	f	$\bar{x}$, %	$\Delta \bar{x}$	S^2	$S_{\bar{x}}$	P, %	ϵ_1 , %	$\bar{\epsilon}$, %
6	5	3,28	0,0656	0,0039	0,0255	95	4,90	2,00

Таблица 34 – Определение флавоноидов с добавками стандартного вещества

Определено флавоноидов, мг/мл	Добавлено рутина, мг/мл	Рассчитано флавоноидов, мг/мл	Найдено флавоноидов, мг/мл	Относительная ошибка, %
0,0175	0,0050	0,0225	0,0223	- 0,89
0,0175	0,0101	0,0276	0,0279	+ 1,09
0,0175	0,0201	0,0376	0,0381	+ 1,33

По результатам проведенных экспериментов была предложена нижеописанная методика спектрофотометрического количественного определения суммы флавоноидов в листьях земляники.

Методика спектрофотометрического количественного определения суммы флавоноидов в листьях земляники.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и

добавляют 150 мл спирта этилового 70%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут с момента закипания экстрагента, периодически встряхивая колбу для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом этиловым 70 %, в мерную колбу вместимостью 200 мл. Фильтр помещают в колбу для экстрагирования и экстракцию повторяют еще раз, в течение 30 минут, используя 50 мл спирта этилового 70%. Извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в ту же мерную колбу. Объем извлечения доводят до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивают.

3 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 10% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95%, 0,2 мл кислоты уксусной, доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки и перемешивают. Через 30 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 3 мл экстракта, 0,2 мл кислоты уксусной и доведенный спиртом этиловым 95 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора РСО рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 200 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 3 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 20000}{D_0 \cdot m \cdot 3 \cdot (100 - W)};$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора РСО рутина; m – масса сырья в граммах; m₀ – масса РСО рутина в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Приготовление раствора рутина стандартного образца. Около 0,05 г (точная навеска) РСО рутина, высушенного при температуре 130-135°C в течение 3 часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют

85 мл спирта этилового 70 % и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем раствор охлаждают, доводят его объем до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 10 % раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95 %, 0,2 мл кислоты уксусной, доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки, перемешивают и оставляют на 30 минут (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Срок хранения раствора А 3 месяца. Раствор Б должен быть свежеприготовленным. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл исходного раствора, 0,2 мл кислоты уксусной и доведенный спиртом этиловым 95 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Приготовление 10% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 95 %. 18 г алюминия хлорида 6-водного (ГОСТ 3759-75, ч.д.а.) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 70 мл спирта этилового 95%, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают.

4.2.2. Разработка методики количественного определения фенольных соединений в листьях земляники

В литературе описано достаточно много методов определения суммы фенольных соединений в растениях. Наиболее простым в исполнении является метод прямой спектрофотометрии. Однако отсутствие выраженного максимума поглощения в УФ-спектре спирто-водного извлечения из листьев земляники затрудняет использование этого метода для данного объекта. Наиболее приемлемыми в этом случае являются методы, основанные на измерении оптической плотности окрашенных продуктов реакции, полученных в результате окисления фенольных соединений различными окислителями. Среди существующих аналитических методов определения фенолов на основе реакции окисления-восстановления следует выделить метод Фолина-Дениса (ФД) с использованием галловой кислоты в качестве стандарта [110]. Метод ФД основан на образовании голубых продуктов окисления фенольных

соединений вольфрамовой кислотой в щелочной среде, создаваемой насыщенным раствором натрия карбоната. На наш взгляд, все описанные в литературе методики количественной оценки фенольного комплекса в растительных объектах с использованием реактива ФД имеют, существенный недостаток. Дело в том, что при использовании рекомендуемых в методиках соотношений компонентов реакции в реакционной среде выпадает осадок, что приводит к получению заниженных результатов. Кроме того, в вышеуказанных методиках предусмотрено построение калибровочного графика, что создает дополнительные трудности при проведении анализа.

На этапе предварительных исследований были изучены оптимальные условия образования продуктов окисления-восстановления и определены оптические характеристики полученных растворов. С этой целью исследовали влияние pH, количество реагента ФД, времени и температуры на светопоглощение раствора.

При регистрации видимых спектров поглощения продуктов окисления суммы фенольных соединений в экстракте из листьев земляники установлено, что спектр имеет максимум при длинах волн 765 ± 5 нм. Аналогичные результаты получены и для раствора стандартного образца галловой кислоты (рис.43). В качестве аналитической выбрана длина волны 765 нм.

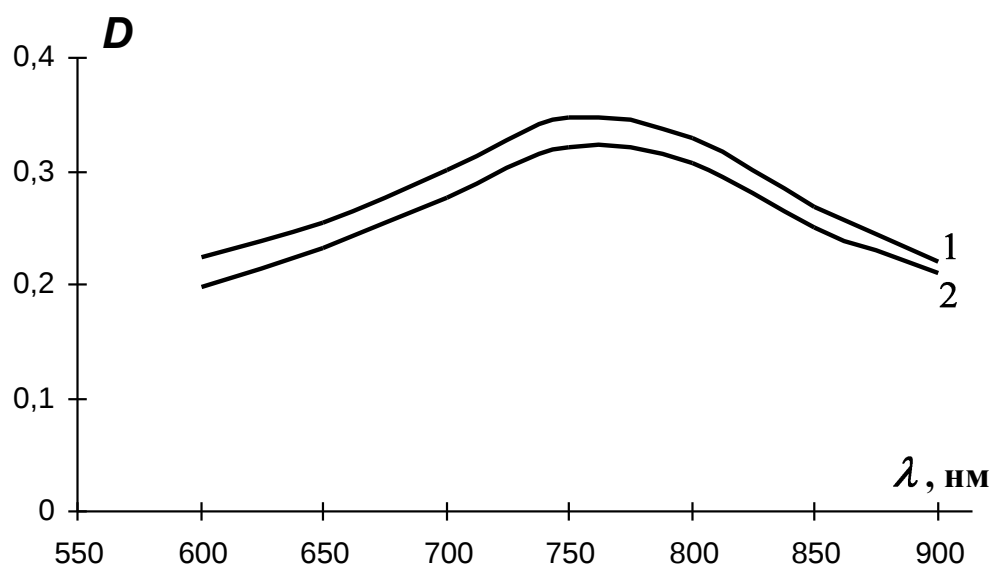


Рисунок 43 – Видимые спектры поглощения продуктов реакции окисления суммы фенольных соединений в экстракте из листьев земляники (1) и растворе стандартного образца галловой кислоты (2)

Предварительный эксперимент показал, что существенное влияние на окислительно-восстановительный процесс имеет рН среды, что в свою очередь зависит от количества насыщенного раствора натрия карбоната, добавленного в реакционную смесь. Как видно из рис. 44, процесс окисления-восстановления начинает протекать при $\text{pH} = 6,0$. При значениях pH от 6,0 до 7,0 оптическая плотность растворов не имеет максимального значения, что объясняется неполнотой протекания реакции. При $\text{pH} \geq 8,0$ в реакционной смеси выпадает осадок. Оптимальным значением pH среды следует считать область от 7,0 до 8,0, где наблюдается максимальное значение оптической плотности. Установленный оптимальный интервал pH для проведения реакции окисления обеспечивается при соотношении реактива ФД и раствора натрия карбоната 2:1 соответственно.

Одним из основных факторов, влияющих на точность спектрофотометрического определения, является стабильность окраски раствора.

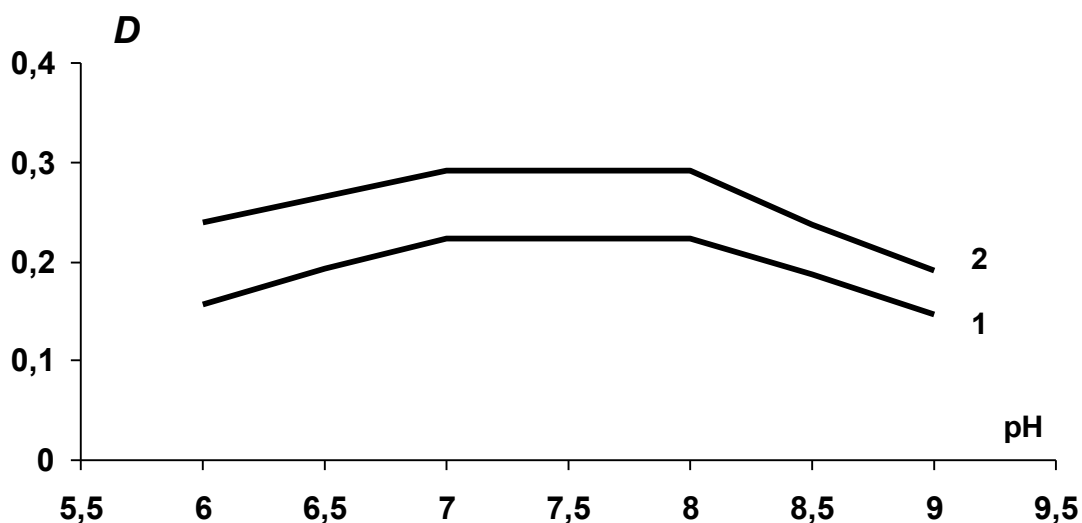


Рисунок 44 – Влияние pH на образование продуктов реакции в экстракте из листьев земляники (1) и в растворе стандартного образца галловой кислоты (2).

Экспериментально было установлено, что из-за малой скорости реакции образования окрашенных соединений в оптимальной области pH при комнатной температуре интенсивность окраски развивается постепенно и лишь

по истечении 24 ч достигает своего максимального и постоянного значения. Для ускорения протекания процессов окисления-восстановления использовали нагревание на водяной бане при температуре 80°C в течение 30 минут, что оказалось достаточным для развития реакции. С целью изучения стабильности продуктов реакции во времени готовили пробы и измеряли оптическую плотность исследуемого окрашенного раствора с интервалом 10 мин в течение часа и далее через каждые 30 мин. Установлено, что, как минимум, в течение 10 часов оптическая плотность остается постоянной.

Требуемое количество реагента ФД определяли по максимальному значению оптической плотности. «Точка насыщения» – минимальное количество реактива ФД, необходимое для максимального выхода продуктов реакции, составила 12 мл (рис.45). С учетом того, что оптимальное количество реагента при проведении спектрофотометрических определений должно превышать стехеометрическое на 30-50%, в методике рекомендуется использовать 20 мл окислителя [37].

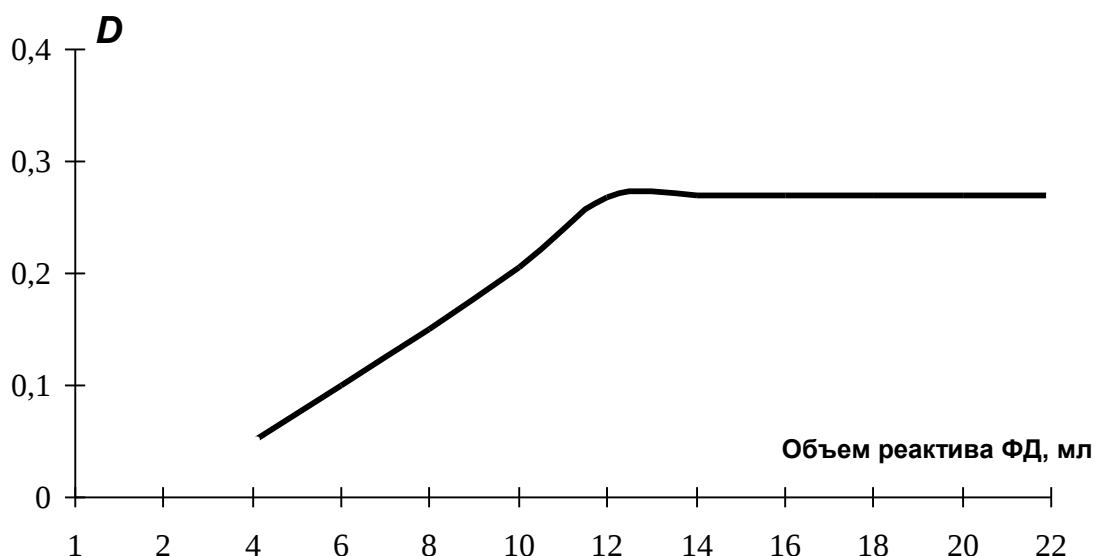


Рисунок 45 – Зависимость оптической плотности продуктов реакции окисления суммы фенольных соединений в экстракте из листьев земляники от количества реактива ФД

Установлено, что в области рабочих концентраций поглощение растворов подчиняется основному закону Бугера-Ламберта-Бера.

В ходе разработки методики экспериментально с последующей статистической обработкой результатов было изучено влияние измельченности сырья, продолжительности экстракции, соотношения сырья и экстрагента, концентрации спирта на выход фенольных соединений. Для выбора оптимальных условий экстракции проводили анализ извлечений, полученных однократной экстракцией на одном образце сырья. Результаты приведены в таблице 35.

Таблица 35 –Влияние условий экстракции на выход фенольных соединений из листьев земляники

Условия экстракции	Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту, %
Концентрация спирта, % 50 70 95	(раствор мутный) 13,8 12,3
Измельченность сырья, мм 1 2 3	13,6 13,6 12,1
Продолжительность экстракции, мин 15 30 45 60	11,3 13,6 13,5 13,7
Соотношение сырья и экстрагента 1:50 1:100 1:150	11,9 13,6 13,7
Номер извлечения 1 (1:100) 2 (1:50) 3 (1:50) 4 (1:50)	13,5 1,0 0,3 0,1

Дисперсионный анализ показал влияние исследуемых факторов на выход фенольных соединений из листьев земляники. Выбор оптимальных параметров пробоподготовки проводили, сравнивая данные по критерию Стьюдента.

Установлено, что оптимальным является соотношение сырья и экстрагента 1:100. Выход фенольных соединений из сырья, измельченного до размера частиц 1-2 мм не различается, при 3 мм выход достоверно ниже.

Время достижения равновесной концентрации при экстрагировании фенольных соединений из сырья на кипящей водяной бане составляет 30 мин. Исследование влияния кратности экстракции показало, что достаточно проведение двух экстракций, при этом второе извлечение целесообразно проводить при соотношении сырья и экстрагента 1:50 в течение 15 мин.

Проведенная метрологическая оценка разработанной методики (табл. 36) свидетельствует, что средняя относительная ошибка определения с доверительной вероятностью 95 % составляет 3,77 %. Опыты с добавками стандартного образца галловой кислоты к извлечению показали отсутствие систематической ошибки предлагаемой методики (табл. 37).

Таблица 36 – Метрологическая характеристика методики определения суммы фенольных соединений в листьях земляники

n	f	$\bar{x}$, %	$\Delta \bar{x}$	S^2	$S_{\bar{x}}$	P, %	ϵ_1 , %	$\bar{\epsilon}$, %
6	5	14,6	0,5484	0,2731	0,2133	95	9,23	3,77

Таблица 37 – Определение фенольных соединений с добавками стандартного вещества

Определено фенольных соединений, мкг/мл	Добавлено галловой кислоты, мкг/мл	Рассчитано фенольных соединений, мкг/мл	Найдено фенольных соединений, мкг/мл	ϵ , %
1,491	0,231	1,722	1,690	– 1,9
1,491	0,116	1,607	1,586	– 1,3
1,491	0,058	1,549	1,562	+ 0,8

Итак, нами разработана следующая методика количественного определения в листьях земляники лесной и земляники восточной.

Методика спектрофотометрического количественного определения суммы фенольных соединений в листьях земляники.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл спирта этилового 70%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут с момента закипания экстрагента, периодически встряхивая колбу для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом этиловым 70%, в мерную колбу вместимостью 200 мл. Фильтр помещают в колбу для экстрагирования и экстракцию повторяют еще раз в течение 15 минут, используя 50 мл спирта этилового 70%. Извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в ту же мерную колбу. Затем сырье и фильтр промывают 50 мл спирта этилового 70%, присоединяют его к общему извлечению, при необходимости доводят объем извлечения до метки этим же растворителем и перемешивают.

0,1 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл реактива Фолина-Дениса и 10 мл 20% раствора натрия карбоната, тщательно взбалтывают в течение 3-5 минут до прекращения выделения пузырьков газа, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Колбу закрывают и выдерживают на водяной бане при температуре 80°C в течение 30 минут. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 765 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 20 мл реактива Фолина-Дениса, 10 мл 20% раствора натрия карбоната, и доведенного водой до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора РСО галловой кислоты, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

Содержание суммы фенольных соединений в процентах (X) в пересчете на галловую кислоту и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 200 \cdot 50 \cdot 0,5 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 0,1 \cdot 250 \cdot 50 \cdot (100 - W)} = \frac{D \cdot m_0 \cdot 40000}{D_0 \cdot m \cdot (100 - W)};$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность РСО галловой кислоты; m – масса сырья в граммах; m_0 – масса РСО галловой кислоты в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Приготовление раствора галловой кислоты стандартного образца.

Около 0,05 г (точная навеска) РСО галловой кислоты (ФС 42-794-79), высушенного при температуре 115°C до постоянной массы, растворяют в мерной колбе вместимостью 250 мл в небольшом количестве спирта этилового 70 %, доводят объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают (раствор А).

0,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл реактива Фолина-Дениса и 10 мл 20% раствора натрия карбоната, тщательно взбалтывают в течение 3-5 минут до прекращения выделения пузырьков газа, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Колбу закрывают и выдерживают на водяной бане при температуре 80°C в течение 30 минут. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 765 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Срок хранения раствора А – 1 месяц. Раствор Б должен быть свежеприготовленным. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 20 мл реактива Фолина-Дениса, 10 мл 20% раствора натрия карбоната, и доведенный водой до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл.

Приготовление реактива Фолина-Дениса. 100,0 г натрия вольфрамвокислого 2-водного (ГОСТ 18289-78), 20,0 г кислоты фосфорномолибденовой (ТУ 6-09-3540-78), 50 мл кислоты ортофосфорной

концентрированной (ТУ 2612-014-00203677-97) и 750 мл воды помещают в колбу со шлифом вместимостью 1 л. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят в течение 2 часов с момента закипания смеси. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Затем полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности реактива Фолина-Дениса не более 5 суток при условии хранения в темном месте в хорошо укупоренной посуде.

Приготовление 20% раствора натрия карбоната. 20,0 г натрия карбоната безводного (ГОСТ 83-79) растворяют в 80 мл воды. Затем полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр, смоченный водой, в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности 20% раствора натрия карбоната 1 месяц.

Таким образом, разработана методика количественного спектрофотометрического определения полифенольного комплекса в листьях земляники. Определены оптимальные условия проведения реакции Фолина-Дениса. Предлагаемая методика апробирована на образцах земляники восточной.

4.2.3. Сравнительный анализ количественного содержания флавоноидов, дубильных веществ и фенольных соединений в листьях земляники восточной и земляники лесной

Количественное определение флавоноидов проводили по методике, описанной в разделе 4.2.1. Результаты количественного определения флавоноидов в образцах земляники восточной и земляники лесной представлены в таблице 38.

Как видно из таблицы, среднее содержание флавоноидов в листьях земляники восточной варьирует от 2,17 до 5,58 %, среднее значение составляет 3,57%. Максимальные и минимальные количества флавоноидов внутри вида различаются в 2,6 раза. Проведенные исследования листьев земляники лесной показали, что количество флавоноидов варьирует от 2,36 до 4,38 %, средний показатель равен 3,25%. Максимальное содержание флавоноидов превышает

минимальное содержание этой группы веществ в образцах земляники лесной почти в 2 раза. Коэффициент вариации количества флавоноидов в земляники восточной и земляники лесной находятся на одном уровне и составляют 24% и 23 % соответственно. Сравнение данных по критерию Стьюдента выявило недостоверные различия в количественном содержании флавоноидов между видами ($t_{\text{эксп.}} = 1,0$; $t_{\text{табл.}} = 2,1$).

Количественное определение дубильных веществ проводили по методике ГФ Х1. Результаты количественного определения дубильных веществ в образцах земляники восточной и земляники лесной представлены в таблице 39.

Как видно из таблицы, среднее содержание дубильных веществ в листьях земляники восточной составляет 16,9 %. Содержание дубильных веществ в образцах этого вида различается в два раза. Колебания в максимальном и минимальном содержании дубильных веществ в образцах земляники лесной составляют от 13,9% до 19,8% при среднем значении 15,6 %. Коэффициент вариации у земляники восточной равен 22 % и земляники лесной – 15 %. Сравнение данных по критерию Стьюдента не выявило достоверных различий между видами в содержании дубильных веществ ($t_{\text{эксп.}} = 1,0$; $t_{\text{табл.}} = 2,1$).

Количественное определение фенольных соединений проводили по методике, описанной в разделе 5.2.2. Результаты количественного определения фенольных соединений в образцах земляники восточной и земляники лесной представлены в таблице 40.

Как видно из таблицы, среднее содержание фенольных соединений в листьях земляники восточной составляет 14,6 %. Содержание фенольных соединений в образцах различается в два раза. Во столько же раз варьирует содержание фенольных соединений в листьях земляники лесной. Причем среднее содержание фенольных соединений в образцах земляники лесной меньше – 12,2 %. Коэффициенты вариации этой группы веществ у обоих видов составляют 18 %. Между тем, сравнение данных по критерию Стьюдента выявило достоверные различия в содержании фенольных соединений в пользу дальневосточного вида ($t_{\text{эксп.}} = 2,5$; $t_{\text{табл.}} = 2,1$).

Таблица 38 –Содержание флавоноидов в листьях земляники восточной и земляники лесной

Земляника восточная			Земляника лесная		
№ образца	место сбора	содержание флавоноидов, %	№ образца	место сбора	содержание флавоноидов, %
1	2	3	4	5	6
1	Хабаровский край, Хехцир, 19км	3,23	16	Московская обл., окр. п.Купавна	2,91
2	Амурская обл, Октябрьский р-н, окр. с.Панино	5,58	17	Иркутская обл., ст.Олха	4,38
3	Приморский край, Кавалеровский р-н, окр. п.Кавалерово	4,19	18	Ставропольский край	4,02
4	Хабаровский край, р-н им.Лазо, окр. п. Корфовский	3,92	19	Алтайский край, окр. г.Барнаул	3,32
5	Забайкальский край, окр. г.Чита	3,38	20	Архангельская обл.	4,10
6	Хабаровский край, Хехцир, 25 км.	3,65	21	Пермский край, окр. г.Пермь	4,20
7	Приморский край, Партизанский р-н, окр. п.Углекаменск	2,48	22	Краснодарский край, Анапский р-н, ст.Гайгодзор	2,39
8	Амурская обл., Белогорский р-н, окр. г.Белогорск	2,25	23	Тульская обл., окр. г.Алексин	2,83
9	Забайкальский край, Магочинский р-н, окр. с.Сбега	3,78	24	Карельская АССР, окр. г.Петрозаводск	2,36

Продолжение таблицы 38

1	2	3	4	5	6
10	Республика Саха (Якутия), Амгинский улус, окр. с.Амга	3,13	25	Башкортостан, Бурзянский р-н, с.Шигрыш	2,82
11	Хабаровский край, Хехцир, 25 км.	3,98	26	Башкортостан, Иглинский р-н	2,59
12	Приморский край, Дальнегорский р-н, окр. г.Дальнегорск	3,76	27	Омская обл., окр. г.Омск	3,13
13	Забайкальский край, Карымский р-н, окр. п.Карымский	2,17			
14	Приморский край, Партизанский р-н, окр. с.Казанка	4,24			
15	Приморский край, окр. п.Силинский	3,87			
Результаты стат. обработки	n=15 $\bar{X}$ =3,57 S^2 =0,76 $\Delta \bar{X}$ =0,87 V=24		n=12 $\bar{X}$ =3,25 S^2 =0,54 $\Delta \bar{X}$ =0,74 V=23		
Сравнение средних по критерию Стьюдента $t_{\text{табл.}}$ =2,1 $t_{\text{эксп.}}$ =1,0					

Таблица 39 – Содержание дубильных веществ в листьях земляники восточной и земляники лесной

Земляника восточная			Земляника лесная		
№ образца	место сбора	содержание дубильных веществ, %	№ образца	место сбора	содержание дубильных веществ, %
1	2	3	4	5	6
1	Хабаровский край, Хехцир, 19км	19,3	16	Московская обл., окр. п.Купавна	19,8
2	Амурская обл, Октябрьский р-н, окр. с.Панино	13,2	17	Иркутская обл., ст.Олха	15,0
3	Приморский край, Кавалеровский р-н, окр. п.Кавалерово	22,3	18	Ставропольский край	14,3
4	Хабаровский край, р-н им.Лазо, окр. п. Корфовский	21,7	19	Алтайский край, окр. г.Барнаул	15,5
5	Забайкальский край, окр. г.Чита	14,5	20	Архангельская обл.	13,9
6	Хабаровский край, Хехцир, 25 км.	18,2	21	Пермский край, окр. г.Пермь	14,1
7	Приморский край, Партизанский р-н, окр. п. Углекаменск	14,7	22	Краснодарский край, Анапский р-н, ст.Гайгодзор	19,1
8	Амурская обл., Белогорский р-н, окр. г.Белогорск	13,6	23	Тульская обл., окр. г.Алексин	14,6

Продолжение таблицы 39

1	2	3	4	5	6
9	Забайкальский край, Магочинский р-н, окр. с.Сбега	13,8	24	Карельская АССР, окр. г.Петрозаводск	13,9
10	Республика Саха (Якутия), Амгинский улус, окр. с.Амга	11,3	25	Башкортостан, Бурзянский р-н, с.Шигрыш	12,9
11	Хабаровский край, Хехцир, 25 км.	18,6	26	Башкортостан, Иглинский р-н	15,4
12	Приморский край, Дальнегорский р-н, окр. г.Дальнегорск	16,3	27	Омская обл., окр. г.Омск	19,2
13	Забайкальский край, Карымский р-н, окр. п.Карымский	13,2			
14	Приморский край, Партизанский р-н, окр. с.Казанка	19,3			
15	Приморский край, окр. п.Силинский	23,6			
Результаты статистической обработки	$n=15 \quad \bar{X}=16,9 \quad S^2=14,5 \quad \Delta \bar{X}=3,81 \quad V=22$		$n=12 \quad \bar{X}=15,6 \quad S^2=5,57 \quad \Delta \bar{X}=2,36 \quad V=15$		
Сравнение средних по критерию Стьюдента $t_{\text{табл.}}=2,1 \quad t_{\text{эмп.}}=1,0$					

Таблица 40 – Содержание фенольных соединений в листьях земляники восточной и земляники лесной

Земляника восточная			Земляника лесная		
№ образца	место сбора	содержание фенольных соединений, %	№ образца	место сбора	содержание фенольных соединений, %
1	2	3	4	5	6
1	Хабаровский край, Хехцир, 19км	14,5	16	Московская обл., окр. п.Купавна	13,3
2	Амурская обл, Октябрьский р-н, окр. с.Панино	14,0	17	Иркутская обл., ст.Олха	11,5
3	Приморский край, Кавалеровский р-н, окр. п.Кавалерово	17,2	18	Ставропольский край, окр. п. Даут	10,9
4	Хабаровский край, р-н им.Лазо, окр. п. Корфовский	17,4	19	Алтайский край, окр. г.Барнаул	13,3
5	Забайкальский край, окр. г.Чита	11,5	20	Архангельская обл., окр. г.Архангельск	12,1
6	Хабаровский край, Хехцир, 25 км.	16,4	21	Пермский край, окр. г.Пермь	12,9
7	Приморский край, Партизанский р-н, окр. п.Углекаменск	12,3	22	Краснодарский край, Анапский р-н, ст.Гайгодзор	15,1
8	Амурская обл., Белогорский р-н, окр. г.Белогорск	12,4	23	Тульская обл., окр. г.Алексин	10,8

Продолжение таблицы 40

1	2	3	4	5	6
9	Забайкальский край, Магочинский р-н, окр. с.Сбега	13,1	24	Карельская АССР, окр. г.Петрозаводск	10,0
10	Республика Саха (Якутия), Амгинский улус, окр. с.Амга	9,6	25	Башкортостан, Бурзянский р-н, с.Шигрыш	8,6
11	Хабаровский край, Хехцир, 25 км.	17,2	26	Башкортостан, Иглинский р-н	11,0
12	Приморский край, Дальнегорский р-н, окр. г.Дальнегорск	15,3	27	Омская обл., окр. г.Омск	16,6
13	Забайкальский край, Карымский р-н, окр. п.Карымский	12,5			
14	Приморский край, Партизанский р-н, окр. с.Казанка	17,1			
15	Приморский край, окр. п.Силинский	18,3			
Результаты статистической обработки	$n=15 \quad \bar{X}=14,6 \quad S^2=6,89 \quad \Delta \bar{X}=2,62 \quad V=18$		$n=12 \quad \bar{X}=12,2 \quad S^2=14,5 \quad \Delta \bar{X}=2,22 \quad V=18$		
Сравнение средних по критерию Стьюдента $t_{\text{табл.}}=2,1 \quad t_{\text{эксп}}=2,5$					

Заключение к главе 4

В результате исследования химического состава листьев земляники восточной качественными реакциями подтверждено присутствие фенольных соединений, флавоноидов, полисахаридов и дубильных веществ, преимущественно гидролизуемой природы.

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях земляники, основой которой является дифференциальная спектрофотометрия.

Разработана методика количественного определения полифенольного комплекса в листьях земляники методом спектрофотометрии в видимой области спектра. В основе определения лежит реакция окисления фенольных соединений реактивом Фолина-Дениса.

Впервые определено количественное содержание основных групп фенольного комплекса в 15 образцах земляники восточной. Установлено среднее содержание флавоноидов в листьях земляники восточной - 3,57%, дубильных веществ - 16,9 %, фенольных соединений - 14,6 %.

Проведено сравнение качественного и количественного состава биологически активных веществ фенольного комплекса листьев земляники восточной и земляники лесной. Установлено, что в образцах обоих видов присутствуют одинаковые группы биологически активных веществ. Результаты изучения УФ-спектров и хроматографических исследований обоих видов земляники свидетельствуют о тождественности химического состава листьев земляники восточной и официального вида. При сравнительном исследовании выборок образцов земляники восточной (15) и земляники лесной (12) не обнаружено статистически достоверных различий в содержании флавоноидов и дубильных веществ в исследованных выборках образцов. Показано, что по среднему содержанию фенольных соединений земляника восточная незначительно превосходит землянику лесную (соответственно 14,6% и 12,2%).

В целом, проведенное сравнительное изучение биологически активных комплексов земляники восточной и земляники лесной свидетельствует о

сходстве родственных видов и перспективности использования дальневосточного вида в фармацевтической практике в качестве дополнительного источника сырья.

ГЛАВА 5. Разработка маркетинговой стратегии продвижения сбора противооксалатного на фармацевтический рынок

Для обеспечения успешного вывода на федеральный или региональный фармацевтический рынок нового препарата необходимо предварительно разработать соответствующую маркетинговую стратегию.

В целом, по мнению исследователей, маркетинговая стратегия вывода нового лекарственного препарата (ЛП) на фармацевтический рынок должна включать четыре основных этапа [209]:

- анализ фармацевтического рынка и распространенности заболеваний изучаемой группы;
- проведение комплекса маркетинговых исследований для изучаемого препарата, в том числе сегментирование рынка, анализ конкурентной среды, определение оптимальной розничной цены и емкости рынка;
- выявление оптимальных способов продвижения и составление плана и бюджета продвижения;
- оценка эффективности вывода на рынок нового препарата.

При разработке маркетинговой стратегии вывода на фармацевтической рынок Хабаровского края сбора противооксалатного в качестве основы были использованы вышеприведенные последовательные этапы.

В период с 1994 по 2013 гг. нами исследовался уровень заболеваемости болезнями мочеполовой системы в регионе. На следующем этапе проводился анализ регионального рынка ЛП и БАД, воздействующих на мочеполовую систему. К основным задачам этого этапа были отнесены определение основного конкурентного окружения сбора противооксалатного, сегментирование ассортимента по цене, форме выпуска, составу и прочим характеристикам. В дальнейшем была определена оптимальная розничная цена и форма выпуска сбора, разрабатывался скорректированный план продвижения и проводилось бюджетирование вывода на рынок сбора противооксалатного.

5.1. Оценка уровня заболеваемости населения региона заболеваниями мочеполовой системы

Заболевания мочеполовой системы довольно распространены и разнообразны. Они могут быть вызваны как различными вирусами и бактериями, так и врожденными аномалиями развития, функциональными нарушениями и патологией обмена веществ. Отдельно исследователи выделяют мочекаменную болезнь, как одну из самых распространенных (до 40% от общего числа) среди всех урологических заболеваний [69,205]. По материалам годовых статистических отчетов лечебно-профилактических учреждений Хабаровского края за двадцатилетний период нами была проведена оценка динамики заболеваемости населения болезнями мочеполовой системы.

Согласно статистическим данным, в последние три года (с 2011 по 2013 гг.) уровень заболеваемости взрослого населения Хабаровского края болезнями мочеполовой системы составляет в год 80 на 1000 человек [157]. В период с 1994 по 2008 год происходило постоянное увеличение доли больных от общего числа заболевших, причем это касается как всех больных с диагнозом заболеваний мочеполовой системы, так и заболевших с диагнозом, выявленным впервые (рис. 46). Как видно из рисунка 46, в 2008 году доля больных заболеваниями мочеполовой системы составила около 8,5% от общего числа заболевших. Доля больных с диагнозом, выявленным впервые, в 2010 году находилась на уровне 8,6% от общего числа больных. В период с 2009 по 2011 гг. наметилась тенденция к снижению этого показателя, однако данные 2012 и 2013 гг. свидетельствуют о небольшом росте числа заболевших этим классом болезней, что можно рассматривать как «благоприятный» фактор для вывода на региональный рынок нового препарата.

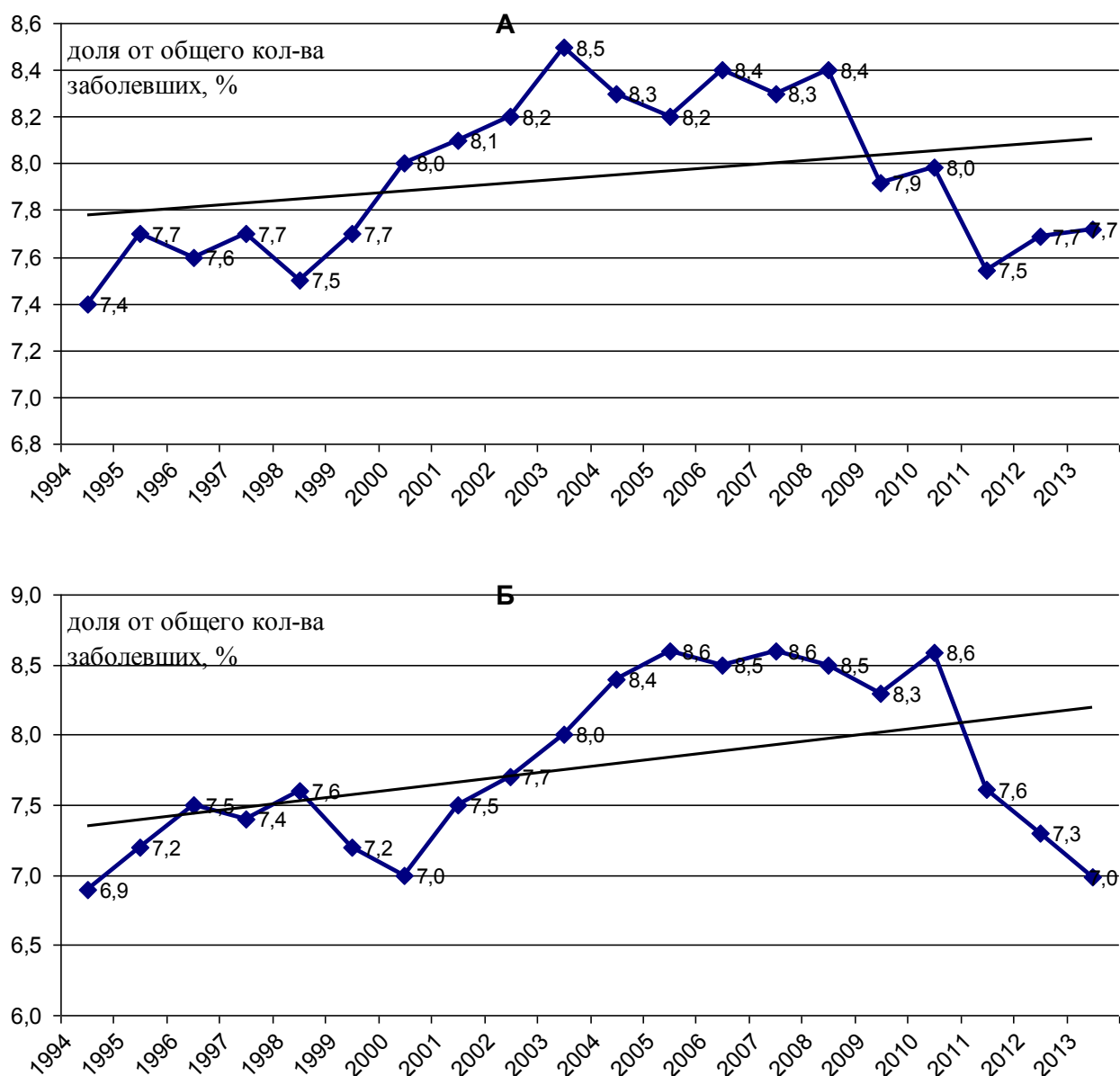


Рисунок 46 – Доля заболевших болезнями мочеполовой системы от общего кол-ва больных в Хабаровском крае в 1994-2013 гг.: А – все больные, Б – больные с диагнозом, выявленным впервые в жизни

5.2. Анализ регионального рынка ЛП и БАД, воздействующих на мочеполовую систему

В комплексной терапии заболеваний мочеполовой сферы наряду с синтетическими ЛП широко используется ЛРС, а также разнообразные сборы и фиточаи [69]. Применение таких фитопрепаратов оправдано как с точки зрения доступности всем слоям населения за счет относительно невысокой стоимости, так и с точки зрения эффективности и отсутствия побочных эффектов.

Аналитические исследования регионального рынка ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы проводились нами в период с 2004 по 2013 гг. На первом этапе для более полного представления о структуре соответствующего рынка ЛП анализировались официальные данные о зарегистрированных ЛП. Так, общее число зарегистрированных торговых наименований (ТН) в рассматриваемой группе составило 334 ТН (62 МНН). Как видно из таблицы 41, основным фармакологическим действием группы ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы, которым обладает более 60% всех ТН категории, является диуретический эффект.

Таблица 41 – Общее число зарегистрированных ТН с определенным фармакологическим действием*

№	Фармакологическое действие	Число зарегистрированных ТН
1	диуретическое	217
2	диуретик петлевой	39
3	БМКК селективный	25
4	альдостерона антагонист	16
5	тиазид	11
6	ощелачивающее мочу	9
7	нефролтиаза средство лечения	9
8	камни почек выводящее	8
9	растворяющее камни	6
10	осмодиуретик	6
11	нефрита средство лечения	5
12	закисляющее мочу	4
13	уратов средство лечения снижающее	3

В дальнейшем изучалось соотношение ЛП отечественного и зарубежного производства в исследуемой группе. Было установлено, что доля российских ЛП, зарегистрированных за последние десять лет, составила 68% (52 ТН), доля импортных препаратов – 32% (25 ТН).

На следующем этапе проводилось сегментирование регионального рынка ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы в соответствии с формой

* Одно ТН может обладать более чем одним фармакологическим действием; классификация составлена согласно Гос. Реестру ЛС

выпуска. Как видно из рисунка 47, в 2013 г. практически 80% от общего числа наименований в категории представляли таблетированные лекарственные формы и препараты на основе ЛРС. Доли ТН, являющихся жидкими и капсулированными лекарственными формами, составляли, соответственно, 7,3% и 6,6%.

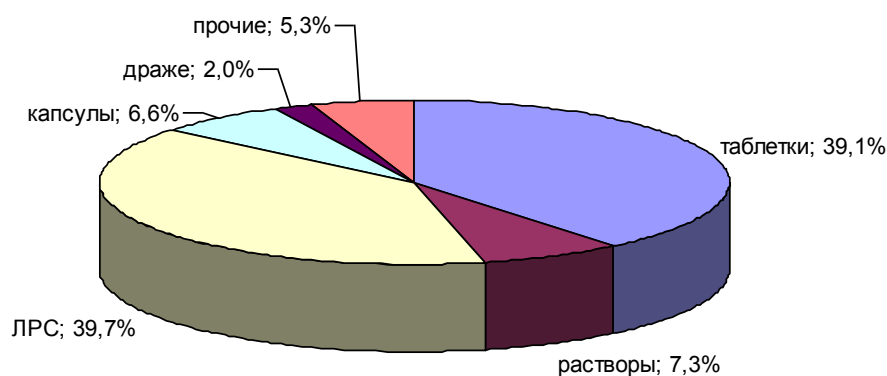


Рисунок 47 – Относительное число ТН разных лекарственных форм среди всех ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы в 2013 году.

Вместе с тем, общая реализация препаратов в таблетированной форме на региональном рынке в 2013 г. находилась на уровне 58% емкости рынка ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы, в то время как соответствующий показатель для препаратов на основе ЛРС не превышал 12% (рис. 48). Связано это, в первую очередь, с существенно более низкой средней стоимостью упаковки ЛРС. С другой стороны, в 2008 году относительная доля реализации фасованного ЛРС на региональном фармацевтическом рынке ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы составляла более 28%.

Макроконтур ассортимента имеет следующие характеристики: это в основном отечественные ЛП – 68,0% ассортимента; ЛП, обладающие диуретическим эффектом – 60,7%; представляют группу ЛРС – 39,7%; являются монокомпонентными препаратами – 70,6%; упакованы в пачки – 20,2% (рис. 49).

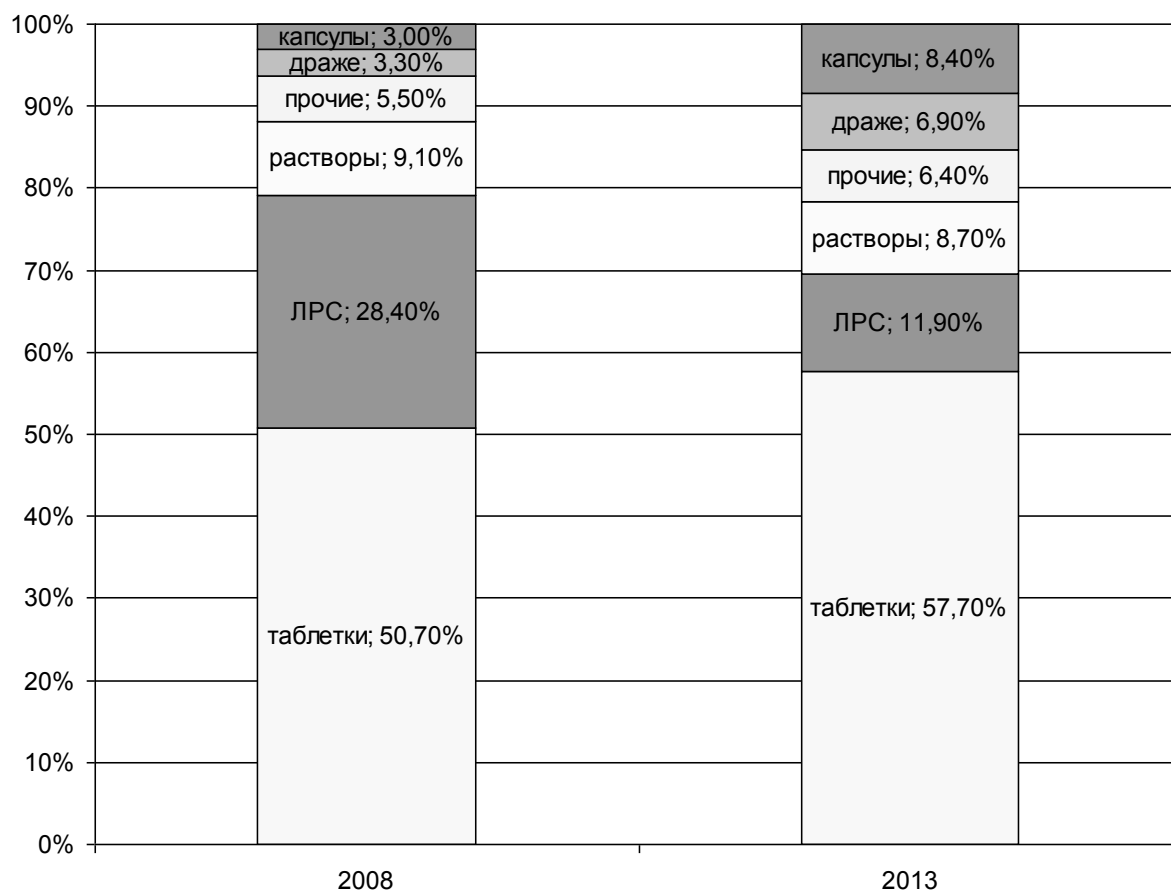


Рисунок 48 – Относительная реализация разных лекарственных форм среди всех ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы в 2008 и 2013 гг., %

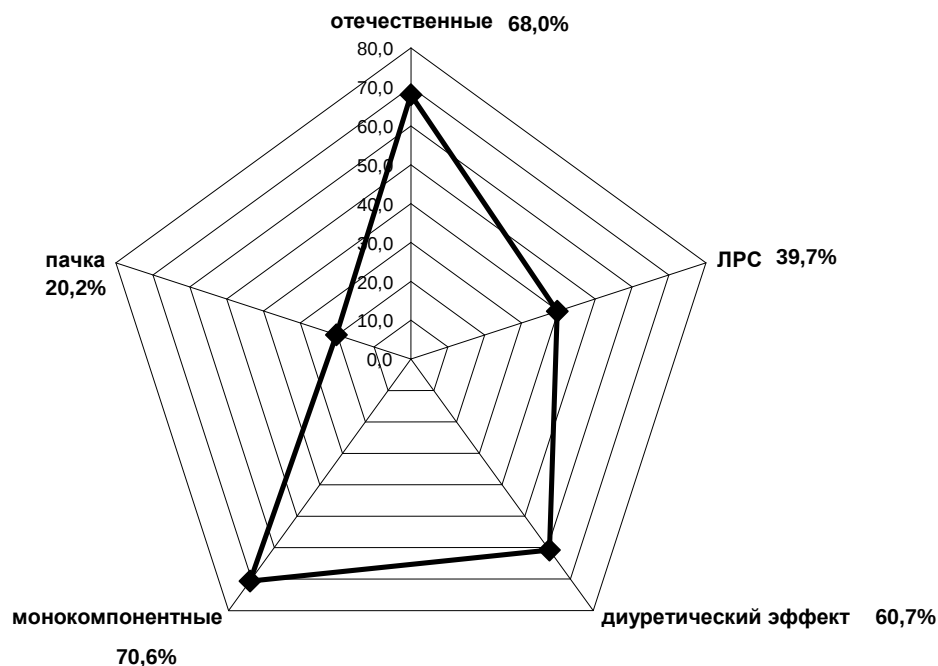


Рисунок 49 – Макроконтур целевого сегмента регионального фармацевтического рынка – ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы

В таблице 42 представлен перечень ТН группы ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы, относящихся к ЛРС. Все ТН зарегистрированы до 2000 г., в последнее время не отмечено новых зарегистрированных наименований.

**Таблица 42 – ТН диуретических препаратов
(зарегистрированных как ЛП) на основе ЛРС**

N	Торговое наименование	N	Торговое наименование	N	Торговое наименование
1	Березы листья	12	Горца птичьего (Спорыша) трава	23	Толокнянки побеги
2	Березы почки	13	Земляники лист	24	Укропа пахучего плоды
3	Березы экстракт сухой	14	Лопуха корней брикет	25	Урологический (мочегонный) сбор
4	Бруснивер	15	Лопуха корни	26	Фасоли обыкновенной плодов створки
5	Бруснивер-Т	16	Марены красильной корневище и корень	27	Фенхеля плоды
6	Брусники листа брикет	17	Можжевельника плоды	28	Фитонефрол (мочегонный сбор)
7	Брусники листья	18	Мочегонный сбор №2	29	Хвоща полевого трава
8	Брусники побеги	19	Ортосифона тычиночного (Почечного чая) листья	30	Хвоща полевого травы брикет
9	Василька синего цветки	20	Ортосифона тычиночного листьев (Почечного чая) брикет	31	Череды трава
10	Гербафоль-сбор мочегонный	21	Толокнянки листья	32	Череды травы брикет
11	Горца почечуйного трава	22	Толокнянки обыкновенной листа брикет	33	Эрвы шерстистой трава

В 2013 г. в аптечных организациях Хабаровского края продавались 15 ТН группы ЛП для лечения заболеваний мочеполовой системы, относящиеся к

ЛРС, из числа зарегистрированных. Необходимо заметить, что представленный перечень не учитывал ассортимент БАД.

При позиционировании сбора противооксалатного не только как средства при оксалатных нефропатиях, но и как препарата, улучшающего функцию мочевыводящей системы с диуретическим эффектом, в качестве конкурентного окружения нового продукта нами рассматривались ЛП и БАД на основе ЛРС, относящиеся к группам препаратов с диуретическим эффектом и БАД, улучшающие функцию мочевыводящей системы и с мягким мочегонным эффектом*[63,235]. В настоящее время в аптечных организациях Хабаровского края общее количество таких ТН с учетом дозировки и формы выпуска составило более 50 наименований.

Общая емкость регионального рынка растительных препаратов диуретического действия в оптовых ценах представлена на рисунке 48. Как видно, емкость рынка в период с 2004 по 2008 гг. увеличилась более чем в два раза и составила в 2008 г. 14,1 млн. руб. В период с 2008 по 2013 гг. общие продажи растительных диуретиков на региональном фармацевтическом рынке несколько снизились и только в 2013 г. превысили показатель 2008 г.

Темпы роста рынка растительных препаратов в 2005-2008 гг. в среднем превосходили общий рост регионального фармацевтического рынка, в 2009-2010 гг. было отмечено снижение емкости рынка, однако, начиная с 2011 г. изменения на рынке вновь приобрели положительную динамику (рис. 50). Так, годовые темпы роста в 2011 г. составили 4,4%, в 2012 г. – 14,8%, в 2013 г. – 15,3%. В дальнейшем было установлено, что региональному рынку диуретических препаратов также свойственны сезонные изменения. На рисунке 50 представлена квартальная динамика изменения регионального рынка в период с 2008 по 2013 год.

Как видно из рисунка 51, наиболее высокий уровень объема продаж наблюдается в 1-м квартале, наиболее низкий – в 3-м квартале.

* В дальнейшем обе группы будем называть растительные препараты диуретического действия

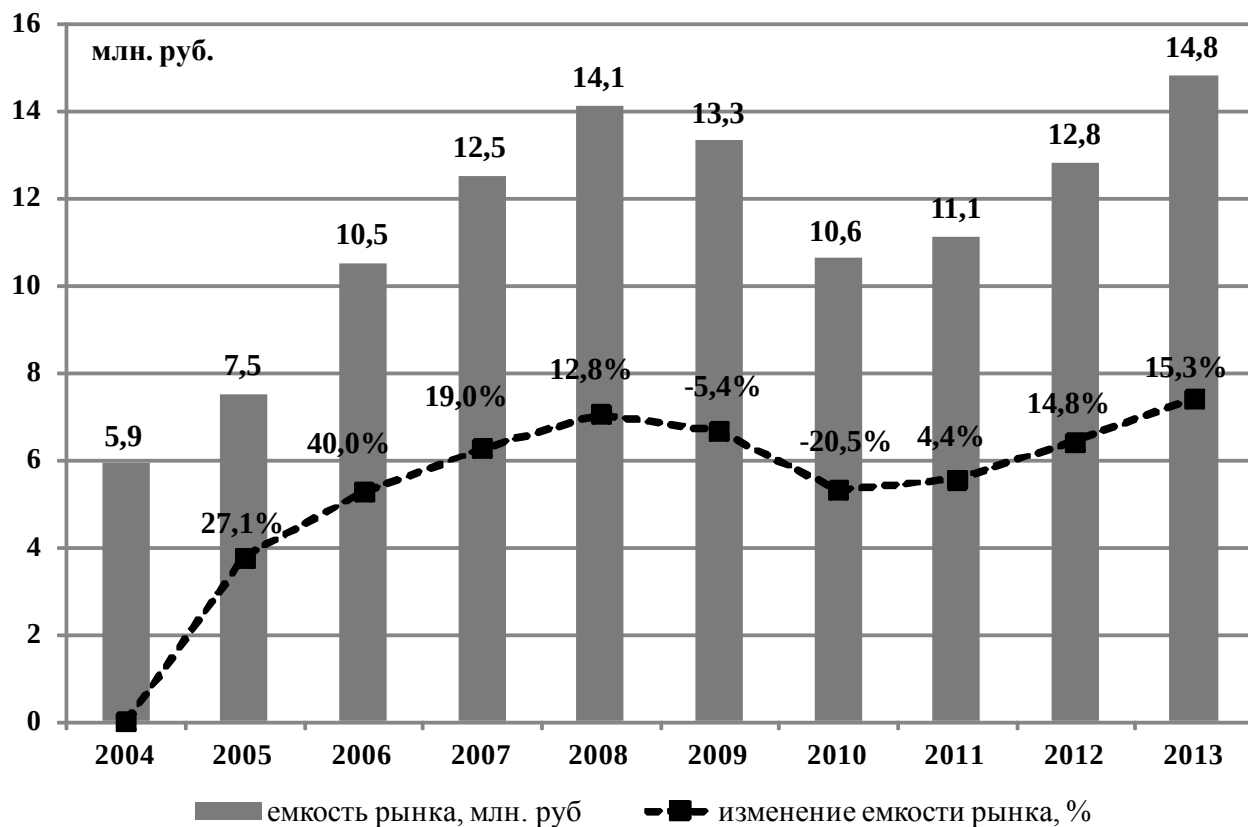


Рисунок 50 – Емкость регионального рынка растительных препаратов диуретического действия в 2004-2013 гг.

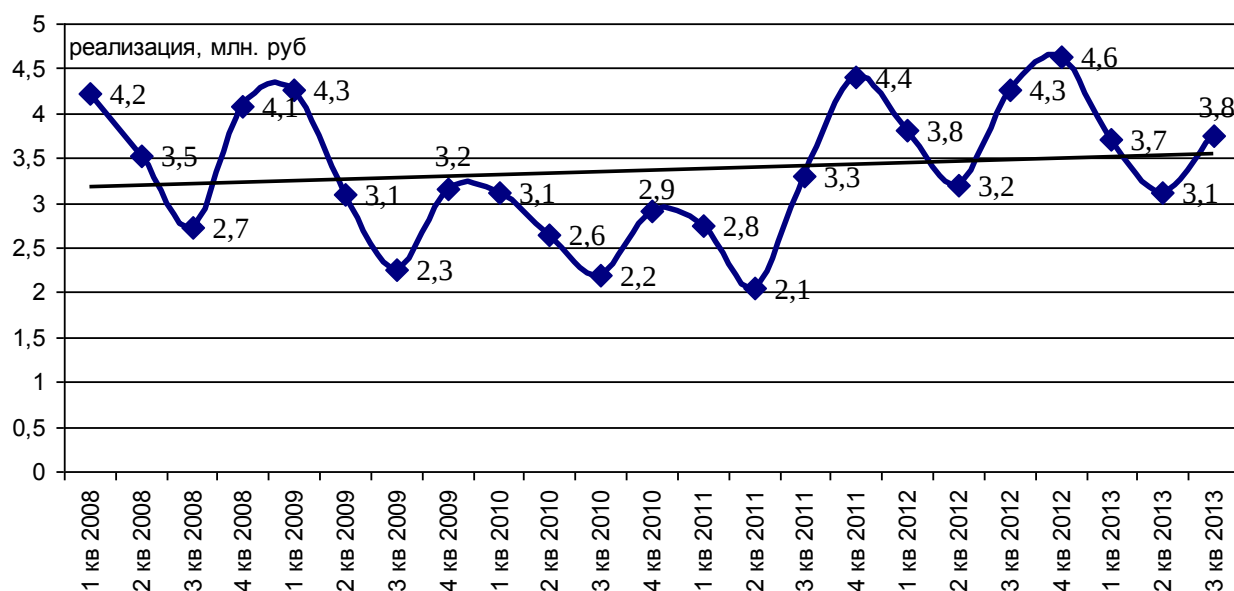


Рисунок 51 – Квартальная динамика изменения объема рынка растительных препаратов диуретического действия в период с 2008 по 2013г.

Для оценки временных изменений среди ТН, являющихся лидерами продаж на региональном рынке, нами были выделены ТОП-10 ТН в период с 2004 по 2006 гг. и в период с 2011 по 2013 гг.

В таблицах 43-45 представлены ТОП-10 ТН рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в Хабаровском крае в период с 2004 по 2006 годы.

Таблица 43 – Рейтинг десяти лидеров регионального рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в оптовых ценах за 2004 год

	Название препарата	Реализация, тыс. руб	Удельный вес, %	Нарастающий итог, %
1	Череды трава пачка 75г	799,4	13,8	13,8
2	Березы почки пачка 50г	649,8	11,2	25,0
3	Брусники лист пачка 50г	642,9	11,1	36,0
4	Чай фитолюкс-9 (почечный) 2г № 20	574,2	9,9	45,9
5	Почечного чая листья 1,5г № 20	421,1	7,2	53,2
6	Березы почки пачка 100г	284,1	4,9	58,0
7	Укропа плоды пачка 50г	279,8	4,8	62,9
8	Сбор бруснивер ф/п 2г №20	267,6	4,6	67,5
9	Листья почечного чая 50 г	191,9	3,3	70,8
10	Толокнянки листья ф/п 1,5г № 20	149,0	2,6	73,3

Таблица 44 – Рейтинг десяти лидеров регионального рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в оптовых ценах за 2005 год

	Название препарата	Реализация, тыс. руб	Удельный вес, %	Нарастающий итог, %
1	Череды трава пачка 75г	1008,8	15,0	15,0
2	Березы почки пачка 50г	959,2	14,3	29,3
3	Брусники лист пачка 50г	603,7	9,0	38,2
4	Чай фитолюкс-9 (почечный) 2г № 20	600,3	8,9	47,2
5	Почечного чая листья 1,5г № 20	481,2	7,2	54,3
6	Сбор бруснивер ф/п 2г №20	478,2	7,1	61,4
7	Укропа плоды пачка 50г	373,7	5,6	67,0
8	Листья почечного чая 50 г	267,2	4,0	71,0
9	Сбор мочегонный № 2 пачка 75 г	224,2	3,3	74,3
10	Толокнянки листья ф/п 1,5г № 20	170,0	2,5	76,8

Таблица 45 – Рейтинг десяти лидеров регионального рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в оптовых ценах за 2006 год

	Название препарата	Реализация, тыс. руб	Удельный вес, %	Нарастающий итог, %
1	Сбор урологический ф/п 2г №20	1478,6	14,3	14,3
2	Череды трава пачка 75г	1417,4	13,7	28,0
3	Березы почки пачка 50г	915,1	8,8	36,8
4	Брусники лист пачка 50г	712,2	6,9	43,7
5	Сбор бруснивер ф/п 2г №20	627,8	6,1	49,8
6	Чай фитолукс-9 (почечный) 2г № 20	580,2	5,6	55,4
7	Укропа плоды пачка 50г	570,1	5,5	60,9
8	Почечного чая листья 1,5г № 20	494,9	4,8	65,7
9	Череды трава ф/п 1.5г №20	447,9	4,3	70,0
10	Чайн.напиток алтайский №12 мочегонный ф/п 2г №20	374,0	3,6	73,7

Как видно из таблиц, в период 2004-2006 гг. состав ТОП-10 торговых наименований практически не менялся. Так, из участников ТОП-10 2006 года 7 были представлены в ТОП-10 2005 года, ТОП-10 2004 и 2005 года различался двумя ТН. Наиболее впечатляющий подъем в рейтинговом списке был зафиксирован для ЛП «Сбор урологический»: с 22 места в 2005 году с долей рынка менее 1% до первого места в 2006 году с долей рынка 15%.

Доля стоимостного объема продаж списка ТОП-10 от общего объема продаж регионального рынка составляла 73-78%. В принципе, состав участников ТОП-10 оказался практически идентичен списку группы А, полученной по результатам ABC-анализа: так, количество товаров, вошедших в группу А, составило в 2004 году 13 наименований, в 2005 – 13, в 2006 – 12.

В таблицах 46-48 представлены ТОП-10 ТН рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в Хабаровском крае в период с 2011 по 2013 гг.

Таблица 46 – Рейтинг десяти лидеров регионального рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в оптовых ценах за 2011 год

	Название препарата	Реализация, тыс. руб	Удельный вес, %	Нарастающий итог, %
1	Сбор урологический ф/п 2г №20	1097,5	9,7	9,7
2	Укропа плоды пачка 50г	911,9	8,1	17,8
3	Череды трава пачка 75г	829,8	7,4	25,2
4	Чайн.напиток алтайский №2 почечный ф/п 2г №20	760,3	6,8	32,0
5	Череды трава ф/п 1.5г №20	680,9	6,0	38,0
6	Березы почки пачка 50г	639,0	5,7	43,7
7	Чайн.напиток алтайский №12 мочегонный ф/п 2г №20	602,8	5,4	49,0
8	Сбор бруснивер ф/п 2г №20	462,9	4,1	53,1
9	Брусники лист пачка 50г	432,8	3,8	57,0
10	Брусники лист ф/п 2г №20	381,6	3,4	60,4

Таблица 47 – Рейтинг десяти лидеров регионального рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в оптовых ценах за 2012 год

	Название препарата	Реализация, тыс. руб	Удельный вес, %	Нарастающий итог, %
1	Сбор урологический ф/п 2г №20	1847,7	11,5	11,5
2	Укропа плоды пачка 50г	1299,4	8,1	19,7
3	Череды трава пачка 75г	1025,8	6,4	26,1
4	березы почки пачка 50г	879,5	5,5	31,6
5	Сбор бруснивер ф/п 2г №20	872,1	5,5	37,0
6	Чайн.напиток алтайский №2 почечный ф/п 2г №20	795,5	5,0	42,0
7	Череды трава пачка 75г	751,5	4,7	46,7
8	Чайн.напиток алтайский №12 мочегонный ф/п 2г №20	640,1	4,0	50,7
9	Почечного чая лист ф/п 1.5г №20	523,9	3,3	54,0
10	Чабреца трава ф/п 1.5г №20	490,7	3,1	57,0

Как видно, в списке ТОП 10 за десятилетний период практически не произошло изменений. Так, из перечня ТОП-10 2013 года 9 были представлены в ТОП-10 2006 года, однако, при этом уменьшился вес категории ТОП-10 в общей емкости рынка: доля стоимостного объема продаж списка ТОП-10 от общего объема продаж регионального рынка составляла 57-60%.

При этом количество ТН, вошедших в группу А, составило в 2011 году 18 наименований, в 2012 – 19, в 2013 – 19.

Таблица 48 –Рейтинг десяти лидеров регионального рынка растительных препаратов диуретического действия по объему аптечных продаж в оптовых ценах за 2013 год

	Название препарата	Реализация, тыс. руб	Удельный вес, %	Нарастающий итог, %
1	Сбор урологический ф/п 2г №20	1732,2	11,1	11,1
2	Череды трава ф/п 1.5г №20	1172,0	7,5	18,7
3	Укропа плоды пачка 50г	1166,7	7,5	26,2
4	Сбор бруснивер ф/п 2г №20	881,7	5,7	31,8
5	Березы почки пачка 50г	854,3	5,5	37,3
6	Чайн.напиток алтайский №2 почечный ф/п 2г №20	817,2	5,3	42,6
7	Чайн.напиток алтайский №12 мочегонный ф/п 2г №20	628,1	4,0	46,6
8	Череды трава пачка 75г	586,2	3,8	50,4
9	Брусники лист ф/п 1.5г №20	579,3	3,7	54,1
10	Почечного чая лист ф/п 1.5г №20	516,0	3,3	57,4

Далее изучались маркетинговые характеристики товаров исследуемой группы: формы выпуска и состав продукта.

На рисунке 52 приведено изменение доли стоимостного объема продаж препаратов в фильтр-пакетах и пачках. Как видно, доля продаж ТН в лекарственной форме фильтр-пакет повышалась достаточно быстрыми темпами с 2005 г. по 2010 г. – с 27,8% в 2005 г. до 51,3% в 2010. В последние 4 года доля реализованных ТН в фильтр-пакетах устойчиво превышает 50% от общей емкости рынка растительных диуретиков.

Далее рассматривалось соотношение объемов реализации ТН в виде сборов и моносырья на региональном рынке. Как видно из рисунка 53, доля реализованных ЛП в форме сбора на фармацевтическом рынке в период с 2010 по 2013 гг. находится в диапазоне от 30 до 31% общей емкости рынка.

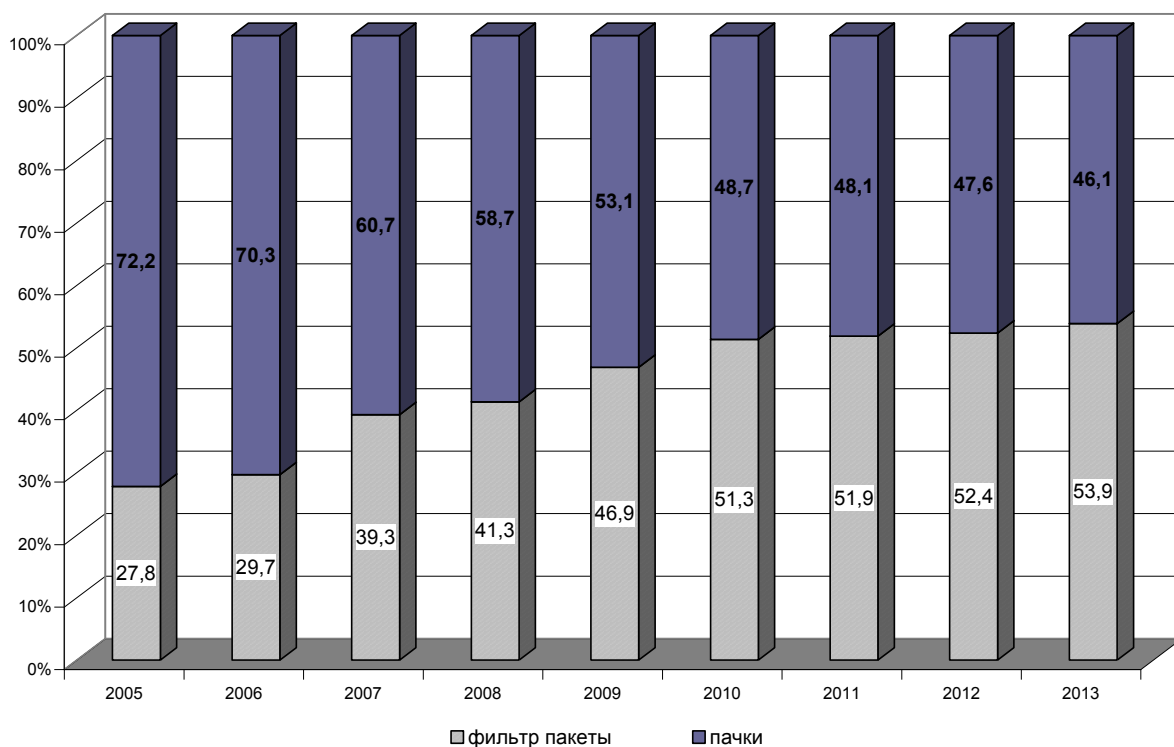


Рисунок 52 – Изменение относительного объема продаж ТН на региональном рынке растительных препаратов диуретического действия в зависимости от формы выпуска в период 2005-2013 гг.

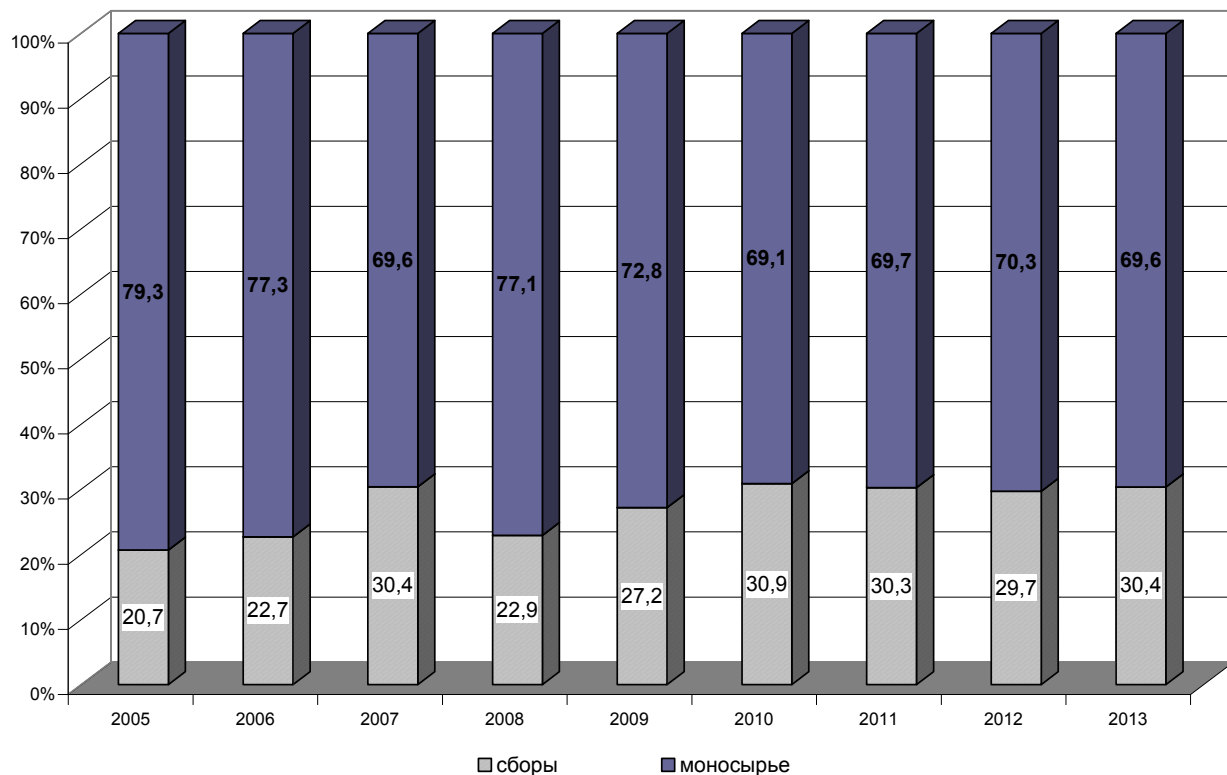


Рисунок 53 – Изменение относительного объема продаж ТН на региональном рынке растительных препаратов диуретического действия в зависимости от компонентного состава в период 2005-2013 гг.

Для того, чтобы соотнести результаты маркетинговых исследований уровня заболеваемости и изменений в сегменте растительных диуретиков, проводился анализ динамики развития всего регионального рынка диуретических препаратов. Как видно из рисунка 54, средние темпы роста продаж в 2011-2013 гг. всей группы существенно выше, чем динамика потребления сборов и моносырья. Так, прирост продаж растительных препаратов в 2013 г. относительно 2012 г. составил около 11,5%, в то время как соответствующий прирост по всей группе диуретических ЛП превысил 21%.

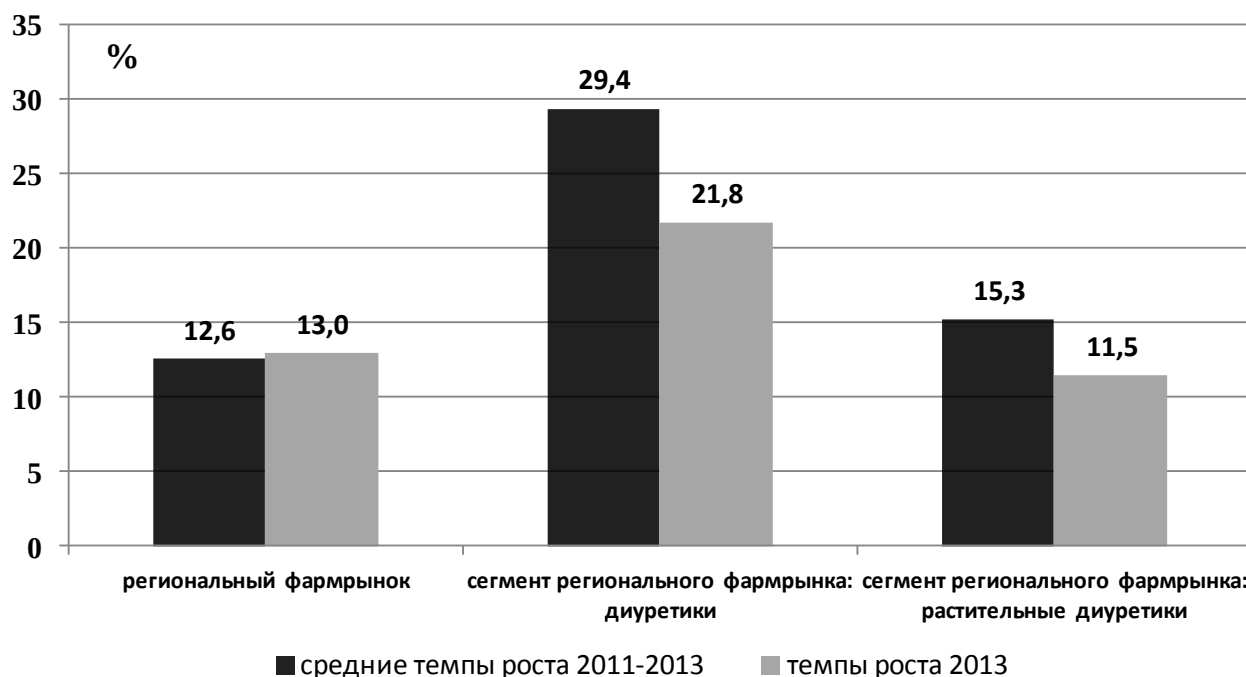


Рисунок 54 – Темпы роста емкости сегментов диуретических средств и растительных диуретиков регионального фармацевтического рынка в период 2011-2013 гг.

Как видно из таблицы 49, относительная емкость группы растительных диуретиков на региональном фармацевтическом рынке в последнее время находится на фиксированном уровне (около 0,4%).

Таблица 49 – Изменение относительной емкости рынка растительных диуретиков в 2010-2013гг

Годы наблюдений	2010	2011	2012	2013
Доля сегмента «растительные диуретики» на региональном фармацевтическом рынке, %	0,42	0,40	0,39	0,39

5.3. Определение маркетинговых показателей при организации производства сбора противооксидантного

На следующем этапе рассчитывалась предполагаемая розничная цена сбора. Для определения конечной стоимости продукта, с одной стороны, проводился ценовой анализ конкурентов, с другой стороны, осуществлялось моделирование окончательной цены затратным способом (метод полных издержек).

Первый способ был основан на анализе данных оптовых продаж в регионе за 2013 год. На основе имеющихся статистических данных проводилось ценовое сегментирование регионального рынка растительных препаратов диуретического действия. На рисунке 55 отражена зависимость изменения объемов продаж от оптовой цены.

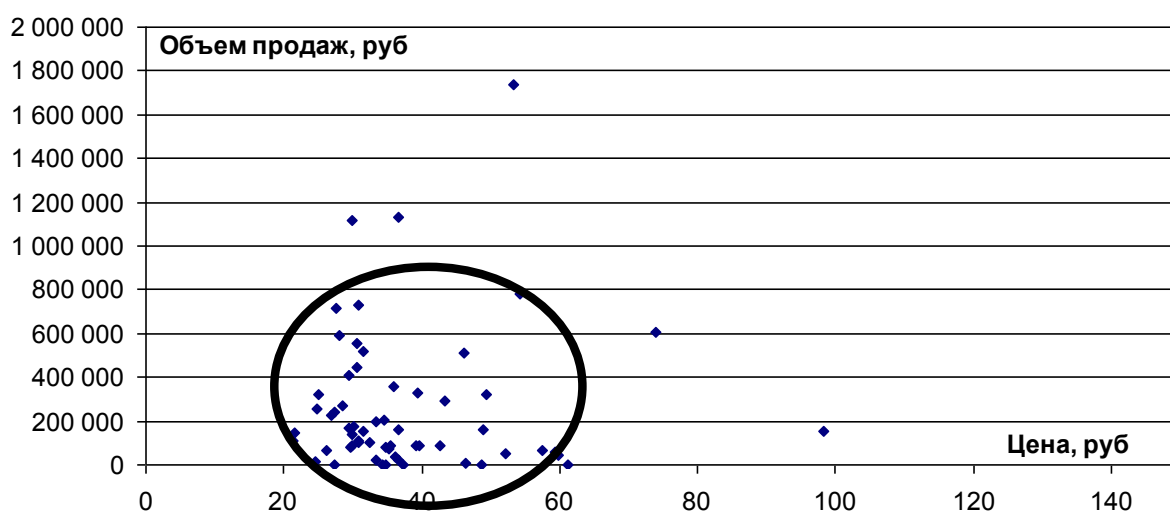


Рисунок 55 – Ценовое сегментирование регионального рынка растительных препаратов диуретического действия

Как видно из рисунка, распределение цен на препараты в диапазоне от 20 до 60 рублей имеет однородный характер; увеличение цены не приводит к

уменьшению объема продаж. Соответственно, верхняя планка розничной цены на продукт не должна превышать 80 рублей.

Конкурентный уровень в этом сегменте можно оценить как умеренный, так как более 60% емкости сегмента занято второстепенными конкурентами (занимающими каждый менее 10% сегмента) со слабо раскручиваемым брендом.

Для определения возможных затрат при производстве сбора рассматривалось два варианта: на предприятии, специализирующемся на выпуске сборов и фиточаев, и производство в аптечной организации. Более низкой розничной цены можно добиться при производстве в аптечной организации, однако при этом не обеспечивается широкий охват конечного потребителя (табл. 50). Способ производства на малом предприятии имеет явные маркетинговые преимущества, за исключением ценового. Однако, 50 рублей – это верхняя граница оптимальной розничной цены на региональном рынке растительных диуретиков, поэтому первый способ соответствует и ценовым ожиданиям потребителей.

Таблица 50 – Сравнительный анализ маркетинговых показателей организации производства сбора разными способами

Производство на фабрике	Производство в аптечной организации
1. Более низкий уровень полных издержек (себестоимость 32 руб)	1. Более высокий уровень издержек (себестоимость 40 руб)
2. Современная лекарственная форма (фильтр-пакеты)	2. Несовершенная лекарственная форма (пачки)
3. Реализация через дистрибьютора	3. Реализация напрямую через аптечную организацию
4. Широкий охват конечного потребителя	4. Узкий охват конечного потребителя
5. Высокая розничная цена (60-80 руб)	5. Низкая розничная цена (50-60 руб)

На рисунке 51 приведено сравнительное изменение темпов роста средней стоимости упаковки в сегменте и темпов роста закупочной стоимости ЛРС, необходимого для приготовления одной пачки сбора. Как видно из рисунка 56, в последний год скорость роста стоимости упаковки опережает скорость роста

стоимости сырья, что создает возможность для повышения наценки и увеличения сметы на маркетинговые мероприятия.



Рисунок 56 – Сравнительное изменение темпов роста средней стоимости упаковки и закупочной стоимости ЛРС в 2011-2013 гг.

Далее определялась годовая потребность регионального рынка в сборе противооксалатном. Потребность в упаковках может быть рассчитана по следующей формуле

$$N = \frac{V_{\text{рынка}} * K}{100 * P}, \text{ где}$$

N – годовая потребность в препарате, упаковок,

$V_{\text{рынка}}$ - годовая емкость рынка в розничных ценах, руб,

K – планируемая доля товара на рынке, %,

P – ожидаемая розничная цена, руб.

На основании анализа ТОП-10, можно предположить, что планируемая доля нового товара на рынке при адекватных маркетинговых действиях будет находиться в пределах 5-10%. Годовая емкость рынка условно принимается равной 17,8 млн. рублей (показатель 2013 года в розничных ценах), средняя

розничная цена – 60 рублей, тогда годовая потребность в препарате находится на уровне 15000 – 30000 упаковок.

Количество потенциальных потребителей препарата можно рассчитать по нижеприведенной формуле

$$X = \frac{N * m_{\text{упак}}}{m_{\text{курс}} * R}, \text{ где}$$

N – годовая потребность в препарате, упаковок,

$m_{\text{упак}}$ – масса одной упаковки сбора, грамм,

$m_{\text{курс}}$ – средний расход препарата на курс, грамм,

R – количество курсов в год.

Средний расход на курс лечения одного больного рассчитан в количестве 270 грамм, масса одной пачки составляет 50 грамм, рекомендуемое количество курсов – 2 раза в год. Тогда рассчитанное количество заболевших, принимающих сбор противооксалатный, составит 1400-2800 человек, или 12-25% от общего числа заболевших болезнями мочеполовой системы. Более реалистичным видится использование нижнего края диапазона, и отождествление годовой потребности регионального рынка в препарате с уровнем 15000 упаковок в год.

Заключение к главе 5

Проведенные маркетинговые исследования регионального рынка препаратов диуретического действия позволили отметить положительную динамику роста на рынке в 2011-2013 гг., причем динамические изменения в принципе соответствовали общей тенденции фармацевтического рынка. В этот же временной период отмечен рост заболеваемости населения Хабаровского края болезнями мочеполовой системы: установлено, что доля числа заболевших этим классом болезней от общего количества больных увеличилась с 7,5% в 2011 до 7,7% в 2013 г.

В результате проведенного маркетингового анализа регионального рынка ЛП и БАД для заболеваний мочеполовой системы были определены основные

сегменты рынка в период с 2004 по 2013 г и построен макроконтур целевого сегмента. Макроконтур ассортимента имеет следующие характеристики: это в основном отечественные ЛП – 68,0% ассортимента; ЛП, обладающие диуретическим эффектом – 60,7%; представляют группу ЛРС – 39,7%; являются монокомпонентными препаратами – 70,6%; упакованы в пачки – 20,2%. Также были установлены сезонные изменения объема продаж в целевом сегменте: максимальных рост реализации ЛП отмечается в первом и четвертом кварталах, минимумом – в третьем. Уровень оптовых цен на региональном рынке ЛП диуретического действия соответствует диапазону 20-60 рублей, причем цена товара напрямую не коррелирует с объемом годовой реализации ТН. Проведенное сегментирование рынка диуретических препаратов позволило установить относительное увеличение продаж ЛРС в форме фильтр-пакетов. Пропорции в реализации ЛП в виде сборов и моносырья находились в соотношении 30/70%.

Таким образом, по результатам наших исследований можно дать следующие рекомендации при разработке оптимального плана и бюджета продвижения сбора противооксалатного:

- обеспечить вывод продукта на рынок в 4 квартале (во-первых, 4 квартал наряду с 1 кварталом является периодом максимального роста оптовых продаж диуретических ЛП, во-вторых, в это время возможно закупить ЛРС по наиболее выгодной стоимости);

- в качестве формы выпуска сбора использовать фильтр-пакеты;

- обеспечить ежегодный закуп сырья в годовом объеме и производство товара в размере годовой потребности (около 15000 упаковок);

- разработать систему маркетинговых мероприятий для целевого информирования врачей, отделов маркетинга дистрибьюторских компаний и конечных потребителей с целью создания образа уникального продукта, обеспечивающего новый подход в эффективной и безопасной терапии мочекаменной болезни.

Общие выводы

1. В результате фармакогностического изучения подтверждено присутствие в сборе противооксидантных основных групп БАВ, идентифицировано 5 индивидуальных веществ, установлен элементный состав. Показано, что среднее содержание дубильных веществ составляет - 6,6%, фенольных – 4,2%, экстрактивных -33,3%, флавоноидов – 1,1%, арбутина – 2,3%.

2. Установлены показатели подлинности сбора: выявлены диагностические макро- и микропризнаки, определены характеристики УФ-спектра и стандартной хроматограммы.

3. Разработана спектрофотометрическая методика определения флавоноидов в сборе, дана ее валидационная оценка. Обоснован норматив содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,6%.

4. Разработана ВЭЖХ методика определения арбутина в сборе, определены ее статистические параметры. Обоснован норматив содержания арбутина в сборе – не менее 0,9%.

5. Установлены показатели доброкачественности сбора: содержание влаги, золы, нормы измельченности. Обоснованы сроки годности сбора: «ангро» и фасованного в пачки – 3 года, фасованного в фильтр-пакеты – 2 года.

6. Разработан проект ФСП на сбор «ангро», сбор фасованный в пачки и фильтр-пакеты.

7. Изучен выход БАВ в настои, полученные разными способами. Обоснован способ применения сбора, фасованного в пачки и фильтр-пакеты.

8. Разработаны спектрофотометрические методики количественного определения флавоноидов и фенольных соединений в листьях земляники, определены их статистические параметры.

9. Проведено сравнительное изучение БАВ листьев земляники лесной и земляники восточной. Определено количественное содержание флавоноидов в листьях земляники восточной – 3,57%, дубильных веществ – 16,9%, фенольных соединений 14,6%. Показана тождественность химического состава листьев

земляники лесной и земляники восточной.

10. Проведены маркетинговые исследования регионального рынка препаратов диуретического действия: определен макроконтур целевого сегмента, установлено, что емкость сегмента растительных диуретиков в 2010-2014 гг. составляла 0,4% общей емкости регионального фармрынка, при этом среднегодовые темпы роста сегмента превышали 15%. Разработана маркетинговая стратегия продвижения сбора противооксидантного, в том числе установлено, что оптимальным условием является производство сбора на специализированном предприятии.

Список литературы

1. Абрамова, Я. И. Разработка методики количественного определения фенольных соединений в желчегонном сборе № 2 [Текст] / Я. И. Абрамова, Г. И. Калинкина, В. С. Чучалин // Химия растительного сырья. - 2011. - № 4. - С. 265 - 268.
2. Аверьянова, Н. И. Оксалатная кристаллурия у детей [Текст] / Н. И. Аверьянова, Л. Г. Балыева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012 - № 5. – С. 25 – 27.
3. Аксиненко, С. Г. Противовоспалительная активность экстракта надземной части земляники лесной [Текст] / С. Г. Аксиненко, С. С. Кравцова // Проблемы современной науки. - 2012. - Т. 1., № 5-1. - С. 123 - 130.
4. Аксиненко, С. Г. Цитопротективные эффекты настойки надземной части *Fragaria vesca* L. в условиях интоксикации циклофосфаном [Текст] / С. Г. Аксиненко, Д. А. Климентова, В. Г. Пашинский // Раст. ресурсы. - 2003. - Т. 39, Вып. 4. - С. 130 - 134.
5. Актуальные проблемы и перспективы развития фитофармакологии и фитотерапии [Текст] / В. А. Куркин, Е. В. Авдеева, Г. Н. Суворова [и др.] // Самарский медицинский журнал. – 2008.- Вып. 41, № 1. – С. 49 - 53.
6. Аль Дахир Таллал Разработка и фитохимическое изучение растительной композиции для профилактики и лечения заболеваний мочевыделительной системы [Текст] / Аль Дахир Таллал, А. А. Маркарян // Медицинский вестник Башкортостана. – 2008. - № 3. – С. 53 - 56.
7. Аляев, Ю. Г. Обмен кальция, витамина D и мочекаменная болезнь [Текст] / Ю. Г. Аляев, А. З. Винаров, Ю. Л. Демидко // Клиницист.- 2006.- № 4. – С. 74 - 76.
8. Амброс, Е. В. Перспективы использования межродовых гибридов *fragaria ananassa* x *potentilla nepalensis* в интродукции и селекции [Текст] / Е. В. Амброс, Т. И. Новикова // Вестник Иркутской государственной сельскохозяйственной академии.- 2011. -№ 44-4. -С. 7 - 13.
9. Анохин, С. И. Сравнительный анализ структур почки при почечной недостаточности в условиях фитокоррекции и без нее [Текст] / С. И. Анохин, В. Н. Горчаков // Фундаментальные исследования. – 2011.- № 11-3. – С. 472 - 476.
10. Антиоксидантная активность как атрибут противовоспалительного действия некоторых сборов лекарственных растений (поиск зависимости от химического состава) [Текст] : Юбилейный сборник научных статей / Е. А. Вичкуткина, С. В. Замятина, В. М. Брюханов [и др.]. - Барнаул, 2005. – С. 41 - 54.
11. Антиоксидантная активность лекарственных субстанций и биологически активных веществ [Текст] / Аззам Нисрин, О. А. Горошко, В. П. Пахомов [и др.] // Традиционная медицина. – 2009. - № 16. – С. 35 - 38.
12. Антиоксидантное действие «нефрофита» в экспериментах *in vitro* [Текст] / А. А. Торонова, Д. Н. Олейников., А. Г. Мондодоев [и др.] //

Бюллетень восточно-сибирского научного центра СО РАМН. – 2008. - № 3 – С. 146.

13. Антиоксидантный и прооксидантный эффекты арбутина и гидрохинона в экспериментах *in vitro* [Текст] / Н. Л. Волобой, Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов [и др.] / Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10, № 5. - С. 41 - 44.

14. Ареалы лекарственных и родственных им растений СССР [Текст]: атлас / Под ред. В.М. Шмидта. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1983. – 208 с.

15. Барабой, В. А. Растительные фенолы и здоровье человека [Текст] / В. А. Барабой. – М.: Наука, 1984. – 160 с.

16. Башелханов, И. С. Фармакотерапевтическая эффективность экстракта горца птичьего при экспериментальном простатите [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / И. С. Башелханов; Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН. - Улан-Удэ, 2006.- 21 с.

17. Белбородов, В. Л. Разделение и идентификация компонентов комплексного фитопрепарата «Простанорм» методом ВЭЖХ [Текст] / В. Л. Белбородов, Н. Г. Захарова, А. М. Савватеев // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – № 9. – С. 19 - 22.

18. Белевцова, В. И. Использование *Fragaria Orientalis* для создания адаптированного сортимента земляники в Центральной Якутии [Текст] / В. И. Белевцова Е. П. Васильева, В. Н. Сорокопудов // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. - 2010.- № 7. – С 35 – 38.

19. Белевцова, В. И. Селекционная оценка якутских популяций *Fragaria Orientalis* по комплексу биологических и хозяйственных признаков [Текст] // Нетрадиционные и редкие растения, природные соединения и перспективы их использования Т. 2 : мат. VII Междунар. симп. / В. И. Белевцова, В. Н. Сорокопудов, А. И. Харитоновна.- Белгород, 2006. – С.174 – 179.

20. Беседина, Н. А. Исследования по стандартизации измельченного лекарственного растительного сырья и его водных извлечений [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Н. А. Беседина. – М., 2007. – 24 с.

21. Беседина, Н. А. Фильтр-пакеты: дисперсность сырья и качество водных извлечений [Текст] / Н. А. Беседина, А. А. Сорокина // Фармация. – 2005. - № 6. – С. 27 - 30.

22. Биологически активные добавки к пище и лекарственные средства растительного происхождения. Оценка безопасности и стандартизация [Текст] / В. А. Тутельян, Б. П. Суханов, К. И. Эллер [и др.] // Вопросы питания. 2008 – Т. 73, № 5. – С. 32 - 37.

23. Блинова, О. А. Разработка технологии биорастворимых лекарственных пленок с экстрактом земляники [Текст] / О. А. Блинова, О. В. Петухова, Д. М. Андреева // Тезисы докладов XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2005. - С. 643.

24. Бобкова, Н. В. Установление подлинности природного сырья в многокомпонентном препарате «Вентеро-Нова» [Текст] / Н. В. Бобкова, В. А. Ермакова, И. А. Самылина // Фармация. – 2011. - № 2. – С.19 - 23.
25. Борисов, В. В. Мультицентровое исследование эффективности БАД Пролит в комплексном лечении нефролитиаза [Текст] / В. В. Борисов // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2006. - С. 619.
26. Борисов, В.В. Консервативная литокинетическая терапия камней почек и мочеточников [Текст] : Руководство для практикующего врача / В. В. Борисов, Н. К. Дзеранов // М.: Оверлей, 2006. - 55 с.: ил.
27. Браиловская, В. А. Фотоколориметрическое определение арбутина в листьях толокнянки [Текст] / В. А. Браиловская, Г. И. Лукьянчикова // Фармация. - 1972. - № 3. - С. 31 – 32.
28. Брюханов, В. М. Влияние препаратов из листьев бадана на функцию почек в эксперименте [Текст] / В. М. Брюханов, Л. М. Федосеева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1993. – № 1. – С. 39 - 41.
29. Брюханов, В. М. Побочные эффекты современных диуретиков: метаболические и токсико-аллергические аспекты [Текст] / В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев // Новосибирск: ЦЭРИС, 2003. – 224 с.
30. Брюханов, В. М. Пятилетний опыт изучения влияния лекарственной флоры Алтая на функцию почек в эксперименте [Текст] / В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев // Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов: Мат. конф., посвященной 15-летию НИИ фармакологии. – Томск, 1999. – С. 205 - 207.
31. Бубенчикова, В. Н. Разработка показателей качества листьев земляники [Текст] / В. Н. Бубенчикова, И. П. Дроздова // Фармация. – 2002. – № 6. – С. 16 - 18.
32. Бубенчикова, В. Н. Разработка состава и технологии гранул на основе сухого экстракта из листьев земляники лесной [Текст] / В. Н. Бубенчикова, И. Л. Дроздова // Тез. докл. XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2005. - С. 646.
33. Бубенчикова, В. Н. Сравнительное изучение диуретической активности экстракта сухого и настоя из листьев земляники лесной (*Fragaria vesca* L.) [Текст] / В. Н. Бубенчикова, И. Л. Дроздова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2005. – Вып. 60. - С. 304 - 305.
34. Бубенчикова, В. Н. Фенольные соединения и полисахариды листьев *fragaria vesca* L. [Текст] / В. Н. Бубенчикова, И. Л. Дроздова // Растительные ресурсы. - 2003. - Т. 39, № 4. - С. 94 - 98.
35. Бубенчикова, В.Н. Изучение флавоноидов травы иссопа лекарственного методом ВЭЖХ [Текст] / В. Н. Бубенчикова, Т. В. Сень, Н. Ф. Гончаров // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2006.- Вып. 61.- С.7 - 8.

36. Бубенчикова, В. Н. Оценка антиоксидантной активности сухого экстракта из листьев земляники лесной методом хемилюминесценции [Текст] / В. Н. Бубенчикова, И. Л. Дроздова // Тез. докл. XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2004.- С. 768.

37. Булатов, И. П. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа [Текст] / М. И. Булатов, И. П. Калинин. – Л.: Химия, 1976. – 376 с.

38. Бутуханова, И. С. Фармакотерапевтическая эффективность растительного средства "фитолисан" при экспериментальном уролитиазе [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / И. С. Бутуханова; Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН. - Улан-Удэ, 2005. - 26 с.: ил.

39. Валидация методики количественного определения гидроксикоричных кислот в желчегонном сборе №2 [Текст] / Я. И. Абрамова, В. С. Чучалин, Г. И. Калинин, Н. Э. Коломиец // Химия растительного сырья. – 2012.- № 3.- С. 157 – 161.

40. Вдовенко-Мартынова, Н. Н. Особенности строения листа земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch) [Текст] / Н. Н. Вдовенко-Мартынова, Ф. К. Серебряная, Е. В. Емец // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. трудов – Пятигорск, 2007. - Вып. 62. - С. 25 - 27.

41. Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии [Текст] / под ред. В. А. Тутельяна. – М.: Палей-М, 2001. – 560 с.

42. Вичкуткина, Е. А. Создание фитосбора «Нефролен» с использованием рационального химико-фармакологического подхода: экспериментальное исследование [Текст] : дис. ... канд. фарм. наук / Е. А. Вичкуткина. – Пермь, 2007. – 173 с.: 15 ил.

43. Влияние некоторых сборов из лекарственных растений Алтайского края на процессы свободно-радикального окисления в эксперименте [Текст] : Юбилейный сб. науч. статей / С. В. Замятина, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев [и др.]. – Барнаул, 2005. – С. 80 - 88.

44. Влияние солей магния и их сочетаний с витамином В6 на кристаллургию оксалатов, возникшую в условиях алиментарного дефицита пиридоксина [Текст] / А. А. Спасов, И. Н. Иежица, М. В. Харитонова [и др.] // Урология. – 2009. - № 3. – С. 22 - 25.

45. Влияние суммы флавоноидов из листьев можжевельника красного на функцию почек [Текст] / Б. А. Самура, Ю. Б. Керимов, А. В. Таран [и др.] // Тез. докл. IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2002. - С. 691.

46. Влияние экстракта из надземной части *fragaria vesca* (rosaceae) на течение тканевой гипоксии [Текст] / С. Г. Аксиненко, Н. И. Сулов, Д. А. Щетинина, С. С. Кравцова // Растительные ресурсы.- 2013. -Т. 49, № 1. - С. 125 - 131.

47. Вознесенская, Т. С. Фитотерапия в лечении инфекции мочевой системы у детей [Текст] / Т. С. Вознесенская, Е. К. Кутафина // Педиатрическая фармакология. - 2007. – Т. 4, № 5. - С. 38 - 40.
48. Волобой, Н. Л. Изучение антимикробного действия арбутина и гидрохинона в отношении некоторых представителей грамотрицательной флоры [Текст] / Н. Л. Волобой, Л. Ю. Бутакова, И. В. Смирнов // Химия растительного сырья. - 2013.- № 1.- С. 179 - 182.
49. Воронина, Н. В. Оксалатная нефропатия у взрослых: итоги 20-летних проспективных исследований [Текст] / Н. В. Воронина // Дальневосточный медицинский журнал. – 2005.- № 3. – С.20 - 25.
50. Воронина, Н. В. Оксалатно-кальциевая нефропатия у взрослых [Текст] / Н. В. Воронина // Терапевтический архив. – 2007. - № 6. – С. 82 - 85.
51. Воротынцева, Н. И. Фармакогностическое изучение растений рода земляника [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Н. И. Воротынцева. – Курск, 2002. – 23 с.
52. Ворошилов, В. Н. Определитель растений советского Дальнего Востока [Текст] / В. Н. Ворошилов. – М.: Наука, 1982. – 672 с.
53. ВФС 42-2115-92 Брикет сбора «Бруснивер» круглый.
54. ВФС 42-2486-95 Брикет сбора Бекворин круглый.
55. ВФС-42-2748-96 Брикет сбора «Бруснивер-Т» круглый.
56. Высочина, Г. И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных [Текст] / Г. И. Высочина.– Новосибирск: Наука, 2004. – 240 с.
57. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений [Текст] / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комисаренко, С. Е. Дмитрук. - Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. – 333 с.
58. Гильмутдинов, Б. Р. Применение фитосбора «Верес» в восстановительном лечении больных с мочекаменной болезнью после литотрипсии [Текст] / Б. Р. Гильмутдинов, А. Р. Гильмутдинов, И. Р. Мусин // Традиционная медицина. - 2011. - № 24. - С. 42 - 44.
59. Гиперозид – как стандарт для контроля качества лекарственных средств и средств медицинского микроанализа [Текст] / И. Г. Левашова, В. П. Комиссаренко, В. П. Жданова [и др.] // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств.- М., 1991. -Т.2, Ч.2.- С.37 – 38.
60. Гомбоева, Н. Б. Применение фиточая почечного «Байкальский-6» в лечении инфекций мочевыводящих путей в детском возрасте» [Текст] / Н. Б. Гомбоева, С. М. Николаев // Тез. докл. XV Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2008. - С.610 - 611.
61. Государственная Фармакопея Российской Федерации [Текст] : Ч. 1. – 12-е изд. - М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.: ил.
62. Государственная Фармакопея СССР [Текст] : Вып. 1, 2. – 11-е изд. - М.: Медицина, 1991. – 360 с.: ил.

63. Государственный Реестр лекарственных средств [Текст]. – Москва, 2002. – 1300 с.
64. Гравель, И. В. Микроэлементный состав спазмолитического сбора и его компонентов [Текст] / И. В. Гравель, Н. В. Иващенко, И. А. Самылина // Фармация. – 2011. - № 1. – С. 9 - 11.
65. Гравель, И. В. Содержание микроэлементов в БАД и водных извлечениях из них [Текст] / И. В. Гравель // Фармация. – 2005. - № 3. – С. 43-44.
66. Гребнева, Н. Ю. Исследования по стандартизации измельченного лекарственного растительного сырья и его водных извлечений [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Н. Ю. Гребнева. – М., 2007. – 24 с.
67. Дзеранов, Н. К. Влияние биологически активной добавки «Пролит» на клиническую симптоматику у пациентов с мочекаменной болезнью [Текст] / Н. К. Дзеранов, О. В. Константинова // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2006. - С. 120.
68. Дисметаболические нефропатии у детей [Текст] / В. В. Длин, М. С. Игнатова, С. Л. Морозов [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2012. - № 5. – С. 36 - 44.
69. Дремова, Н. В. Фармацевтический рынок средств для лечения мочекаменной болезни [Текст] / Н. В. Дремова, А. И Овод // Экономический вестник фармации. – 2002. - № 8. - С. 45 - 54.
70. Дроздова, И. Л. Анальгезирующая активность сухого экстракта из листьев земляники лесной (фрагар веска Л) [Текст] / И. Л. Дроздова, В. Н. Бубенчикова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2005. - № 3 - 4. – С. 32 - 34.
71. Дроздова, И. Л. Антиоксидантная активность полифенольных комплексов *Viola odorata* L. и *Fragaria Vesca* L. [Текст] / И. Л. Дроздова, Р. А. Бубенчиков // Растительные ресурсы. – 2004. – Вып. 2. - С. 92 - 97.
72. Дроздова, И. Л. Исследование растительных источников полисахаридов и фенольных соединений и перспективы их практического использования в фармации : автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / И. Л. Дроздова. – Пятигорск, 2006. – 47 с.
73. Евдокимова, О. В. Препараты растительного происхождения и инфекционные заболевания мочеполовой системы [Текст] / О. В. Евдокимова // Новая аптека. – 2008. - № 3. – С. 36 - 37.
74. Евдокимова, О. В. Разработка и валидация методики оценки подлинности сбора желчегонного №3 [Текст] / О. В. Евдокимова // Традиционная медицина. - 2010. - № 20. - С. 55 - 58.
75. Евдокимова, О. В. Тсх-анализ как способ оценки подлинности лекарственных растительных сборов [Текст] / О. В. Евдокимова // Традиционная медицина. - 2011. - № 25. - С. 58 - 61.
76. Елецкая, О. А. Разработка и стандартизация многокомпонентного сбора мочегонного действия [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / О. А. Елецкая. – Рязань, 2004. – 24 с.

77. Жаворонкова, М. Е. Содержание арбутина в листьях некоторых видов рода рододендрон [Текст] / М. Е. Жаворонкова, М. В. Белоусов, Н. С. Фурса // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. - 2008.-№ 2.- С. 91 – 94.

78. Замятина, С. В. Влияние растительных сборов с противовоспалительной активностью на процессы свободно-радикального окисления (экспериментальное исследование) [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / С. В. Замятина. - Томск. – 2006. - 30 с.

79. Иванов, В. В. Фитотерапия при остром пиелонефрите [Текст] / В. В. Иванов, В. Е. Хитрихеев // Вестник Бурятского государственного университета. – 2010 - № 12. – С. 68 – 71.

80. Иващенко, Н. В. Антимикробная активность лекарственного сбора «Уросан» [Текст] / Н. В. Иващенко, И. А. Самылина // Фармация. – 2013. – № 2 – С. 39 – 40.

81. Изучение биологически активных веществ в растениях семейства грушанковых: ортилия однобокая (*Orthilia secunda* (L.) House) и грушанка круглолистная (*Pyrola rotundifolia* L.), собранных в различных регионах Сибири [Текст] / Н. Е. Ким, Н. О. Ким, М. А. Ханина [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2007. – Вып. 62. - С. 65 - 67.

82. Изучение диуретической активности экстрактов травы иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и змееголовника молдавского (*Dracoscephalum moldavica* L.) [Текст] / А. С. Никитина, С. А. Кулешова, О. И. Попова [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2007. – Вып. 62. - С. 520 - 522.

83. Изучение диуретической и салуретической активности экстрактов альфредии поникшей [Текст] / О. Л. Кулагин, И. В. Шилова, Н. С. Додонова [и др.] // Новые достижения в создании лекарственных средств растительного происхождения: Мат. Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Л.Н. Березнеговской, 11-12 сент. 2006 г. – Томск, 2006. – С. 202 - 204.

84. Изучение противовоспалительной активности некоторых представителей семейства норичниковые и губоцветные [Текст] / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Кондратова, Т. В. Сень [и др.] // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2006. - С. 620 - 621.

85. Изучение фармакологического действия биологически активных веществ природного и синтетического происхождения [Текст] / А. В. Арльт, А. М. Куянцева, С. А. Кулешова [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов. - Пятигорск, 2008. – Вып. 63. - С. 376 - 377.

86. Изучение эффективности применения препарата «Урокам» при экспериментальном токсическом поражении почек [Текст] / Е. Г. Доркина, М.

В. Гаврилин, С. Ю. Бокарева [и др.] // Токсикологический вестник. – 2006. - № 1. - С. 16 - 20.

87. Исаченко, Н. М. Определение урожайности сырья земляники лесной *fragaria vesca* L. в районе оз. Холодное Саратовской области [Текст] / Н. М. Исаченко, Е. А. Игонина // Бюллетень медицинских интернет-конференций. - 2013. - Т. 3, № 2. - С. 371.

88. Исследование антибактериальной активности полифенольных комплексов растений рода Вероника [Текст] / О. Д. Печенин, В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Кондратова [и др.] // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2006. - С. 678.

89. Исследование противовоспалительной активности экстрактов, полученных из растений Сибири [Текст] / Ю. В. Нестерова, Т. Н. Поветьева, С. Г. Аксиненко [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2009. - № 11. - С. 30 - 35.

90. Исследования по валидации методик определения компонентов комплекса «Дигидрокверцетин» и экстракта семян льна [Текст] / Е. Н. Зеня, А. М. Савватеев, Н. А. Тюкавкина [и др.] // Фармация. – 2012. - № 3. – С. 14 - 17.

91. К рациональному использованию листьев земляники и цветков ноготков [Текст] / Г. И. Олешко, О. В. Петухова, И. В. Крапивина [и др.] // Тез. докл. X Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2003. - С. 643.

92. Каминская, А. В. Фармакогностическое изучение калины Саржента [Текст]: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. / А. В. Каминская. - М., 1995. - 22 с.

93. Киреева, Т. Б. Особенности динамики накопления аскорбиновой кислоты и дубильных веществ у земляники лесной в условиях Удмуртии [Текст] / Т. Б. Киреева // Международная научная конференция «Лекарственное растениеводство», посвященная 75-летию ВНИИ лекарственных и ароматических растений: Сб. науч. трудов. – М.: Вилар, 2006. - С. 73 - 76.

94. Кириллова, Е. С. Фитотерапия заболеваний мочевыводящего тракта [Текст] / Е. С. Кириллова, Б. И. Хамаев // Практическая фитотерапия. – 1999. - № 3. – С. 67 - 68.

95. Киселева, Т.Л. Кинетический синергизм в фитотерапии: традиционные препараты с точки зрения современных научных представлений [Текст] / Т. Л. Киселева // Традиционная медицина. – 2011. - № 25. – С. 50 – 57.

96. Кисельникова, О. В. Возможности фитотерапии в лечении рецидивирующего пиелонефрита у детей [Текст] / О. В. Кисельникова, Т. Г. Пухова // Педиатрическая фармакология. – 2007. – Том 4, № 3. – С. 94 - 97.

97. Китанов, Г. Содержание арбутина в *Arctostaphylos uva ursi* из разных районов НРБ [Текст] / Г. Китанов // Растительные ресурсы. - 1986. - № 3. - С. 425 – 428.

98. Климентова, Д. А. Фармакологические свойства комплексных извлечений из земляники лесной: Экспериментальное исследование [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Д. А. Климентова. – Томск, 2005. – 24 с.

99. Клиническое значение фармакокинетического взаимодействия лекарственных средств и фитопрепаратов [Текст] / Д. А. Сычев, В. Г. Кукес, Е. В. Ших [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2006. - Т. 69, № 2. - С. 75 – 79.
100. Ковалева, Т. Ю. Требования отечественной и зарубежных фармакопей по стандартизации листьев толокнянки обыкновенной [Текст] / Т. Ю. Ковалева // Фармация. – 2011. - № 5. – С. 53 - 56.
101. Коваль, И. А. Изучение полноты экстракции биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья в фильтр-пакетах [Текст] / И. А. Коваль, М. В. Кашникова, Е. В. Яковлева // Шестой международный съезд "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения" (Санкт-Петербург, 4-6 июля 2002 г) : Материалы съезда. - СПб., 2002. – С. 79 – 81.
102. Кодакова, М. Н. Влияние препаратов осины на экскреторную функцию почек [Текст] / М. Н. Кодакова, А. В. Дубищев // Тез. докл. XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2004. - С. 797.
103. Кодакова, М. Н. Сравнительная оценка фармакологического эффекта растительных препаратов семейства ивовых [Текст] / М. Н. Кодакова, А. В. Дубищев // Медицинский вестник Башкортостана. - 2009. - № 2. - С. 193 - 195.
104. Козлова, В. В. Изучение антибактериального действия препарата Канефрон Н на культуры микроорганизмов *in vitro* [Текст] / В. В. Козлова // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2006.- С. 669 - 670.
105. Количественное определение флавоноидов в многокомпонентных фитопрепаратах [Текст] / Т. В. Полуэктова, Н. Э. Коломиец, Е. А. Лукша [и др.] // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сборник научных трудов. – Пятигорск, 2008. – Вып. 63. - С. 319 - 320.
106. Коломиец, Н. Э. Антибактериальные свойства хвощей [Текст] / Н. Э. Коломиец, Г. И. Калинкина // Фармация. – 2007. - № 5. - С. 38 - 39.
107. Компонентный состав фенольных соединений и эфирного масла растительного сбора «Бронхофит» [Текст] / В. М. Минович, Т. А. Коненкина, Г. М. Федосеева [и др.] // Химия растительного сырья. - 2012.- № 4. - С. 125 - 129.
108. Коноплева, М. М. Изучение диуретического действия фенольных соединений земляники лесной [Текст] / М. М. Коноплева, В. К. Садикова // Недостаточность кровообращения: Сб. науч. трудов. – Л., 1986. – С. 175 – 177.
109. Коноплева, М. М. Количественное определение суммы фенольных соединений в листьях земляники лесной [Текст] / М. М. Коноплева // Вестник фармации. – 2008. - N 3. – С. 34 - 37.
110. Коноплева, М. М. Методика количественного определения фенольных соединений в листьях земляники лесной [Текст] / М. М. Коноплева, В. И. Сенчило, А. В. Гаевский // Современные аспекты теории и практики фармации. – Л.: 1-й ЛМИ, 1988. – С. 59 – 62.

111. Коротков, И. В. Оптимизация методов стандартизации сырья полыни горькой [Текст] / И. В. Коротков, В. Д. Белоногова, Е. О. Абызова // Медицинский альманах. - 2012. - № 1. - С. 220 - 222.
112. Коррекция магниевого дефицита у больных оксалурией, оксалатным нефролитиазом [Текст] / П. А. Бакумов, А. М. Лялюев, О. Н. Барканова [и др.] // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2006. - С. 361.
113. Кривова, О. Ш. Фармакологическая активность сборов лекарственных растений из флоры Алтая и их влияние на функцию почек [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / О. Ш. Кривова. – Барнаул, 2001. – 26 с.
114. Кругляк, Л. Г. Камни в почках, нефрит, цистит: травы и сборы [Текст] / Л. Г. Кругляк // Б.м.: ЗАО «Весь», 1999. – 134 с.
115. Кузнецова Е. Г. Показатели макро- и микроэлементного состояния у детей с хроническим пиелонефритом и дизметаболической нефропатией [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е. Г. Кузнецова. – Иваново, 2007. – 23 с.
116. Кузьменко, А. Н. Изучение компонентного состава растительного лекарственного сбора [Текст] / Кузьменко А. Н. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. - 2009. - № 3. - С. 212 - 216.
117. Кузьменко, А. Н. Стандартизация лекарственного растительного сырья и растительных сборов методами ионо-эксклюзионной и газожидкостной хроматографии : дис ... канд. фарм. наук [Текст] / А. Н. Кузьменко. - Москва, 2013.- 24 с.
118. Кумышева, Л. А. Растительные нефропротекторы в коррекции побочного действия аминогликозидов [Текст] / Л. А. Кумышева, С. А. Коростелев, С. Д. Марченко // Фармация. 2009. - № 2. – С. 39 - 41.
119. Куркин, В. А. Рациональные основы применения лекарственных растений в современной медицине [Текст] / В. А. Куркин // Новые медицинские технологии. Новое медицинское оборудование. - 2008. - № 6. – С. 62 - 67.
120. Куркина, А. В. Новые подходы к стандартизации цветков боярышника [Текст] / А. В. Куркина // Химия растительного сырья. – 2013. - № 2.- С. 171 – 176.
121. Куянцева, А. М. Изучение диуретической активности листьев земляники ананасной [Текст] / А. М. Куянцева, Н. Н. Вдовенко-Мартынова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2005. - Вып 61. - С. 370 - 371.
122. Лебедев, А. А. Фармакология почек. Очерки к 50-летию исследования проблемы [Текст] / А. А. Лебедев // Самара, 2002. - 103 с.
123. Лесиовская, Е. Е. Витамины и микроэлементы природного происхождения – средства оздоровления или лечения? [Текст] / Е. Е. Лесиовская, С. М. Бахтина, Г. Датукишвили // Российские аптеки. – 2004. - № 1 - 2. – С. 72 - 78.

124. Лечение болезней почек и мочевыводящих путей [Текст] / Б. Н. Гажев, Т. А. Виноградова, В. К. Мартынов [и др.] // СПб.: АОЗТ «Аспект»; ИКФ «МиМ-Экспресс». – 1996. – 256 с.
125. Лошаков, Л. А. Лекарственные растения – основной источник эффективных природных антиоксидантов [Текст] / Л. А. Лошаков, В. П. Пахомов // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2006. - С. 25.
126. Лукша, Е. А. Изучение противовоспалительных свойств многокомпонентного фитопрепарата [Текст] / Е. А. Лукша, Г. И. Калинин // Тезисы докладов XV Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека».- 2008. - С. 660.
127. Макаров, А. А. Лекарственные растения Якутии [Текст] / А. А. Макаров. – Якутск: Бичик, 2001. – 128 с.
128. Макарова, О. Г. Валидация методики определения фенологликозидов в сухом экстракте коры осины [Текст] / О. Г. Макарова / Фармация. – 2012. - № 6. – С. 15 – 17.
129. Мальцев, С. В. Лечение пиелонефрита у детей [Текст] / С. В. Мальцев, А. И. Сафина // Практическая медицина.- 2007. -№ 24. - С. 20 - 24.
130. Маркарян, А. А. Изучение состава фенольных соединений растительной композиции «Байкальский-6» [Текст] / А. А. Маркарян // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Том 38, № 11. – С. 27 - 28.
131. Маркарян, А. А. Новый метод быстрого анализа состава фракции флавоноидов растительного экстракта "Нефрофит" в прогнозировании его антиоксидантных свойств [Текст] / А. А. Маркарян // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2006. – Т. 141, N 6, С. 715 - 717.
132. Маркарян, А. А. Теоретическое и экспериментальное обоснование разработки профилактических средств, рекомендуемых при заболеваниях мочеполовой системы, и их стандартизация [Текст] : автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / А. А. Маркарян. – М., 2005. – 48 с.
133. Марсов, Н. Г. Фитохимическое изучение и биологическая активность брусники, клюквы и черники [Текст]: дис... канд. фарм. наук / Н. Г. Марсов. – Пермь, 2006. – 227 с.
134. Матющенко, Н. В. Стандартизация препарата «Элима» и его сырьевых источников, плодов рябины и листьев крапивы по содержанию флавоноидов [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Н. В. Матющенко. – Пермь, 2005. – 24 с.
135. Мацкевич, А. А. Биологическая характеристика селена, серебра, стронция, хрома и цинка / А. А. Мацкевич [Текст] // Аспирант и соискатель. – 2006 - № 2. – С. 204 – 205.
136. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*orthilia secunda* (L.) house) [Текст] / С. С. Ломбоева, Л. М. Танхаева, Д. Н. Олейников // Химия растительного сырья.- 2008. - № 2. - С. 65 - 68.

137. Мечикова, Г. Я. Влияние способов сушки листьев земляники восточной (*FRAGARIA ORIENTALIS* LOSINSK.) на содержание биологически активных веществ [Текст] / Г. Я. Мечикова, Т. А. Степанова, Н. В. Матющенко // Химия растительного сырья. – 2013 - № 2. – С. 183 - 187.
138. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / [Текст] А. П. Авцын, А. А. Жаворонков, М. А. Риш [и др.]; АМН СССР. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
139. Моисеев, Д. В. Определение арбутина в листьях брусники обыкновенной методом ВЭЖХ [Текст] / Д. В. Моисеев // Вестник фармации. – 2011. - № 1 (51). – С.40 - 45.
140. Морохина, С. Л. Изучение седативных эффектов успокоительных сборов [Текст] / С. Л. Морохина, Р. Н. Аляутдин, А. А. Сорокина // Фармация. – 2010. - № 6. – С. 39 - 41.
141. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация [Текст] / под ред. проф. В. Л. Багировой, проф. В. А. Северцева. - Спб.: СпецЛит, 2001. – 223 с.
142. Насыбуллина, Н. М. Фитотерапия мочекаменной болезни [Текст] / Н. М. Насыбуллина // Медицинская сестра. - 2009. - № 1. - С. 45 - 48.
143. НД 42-11205-06 Канефрон Н, раствор для приема внутрь.
144. НД 42-12930-03 Гинджалелинг, капсулы.
145. НД 42-208-02 Фитолизин, паста для приема внутрь.
146. НД 42-2343-02 Леспенефрил, раствор для приема внутрь.
147. НД 42-4274-06 Хофитол, таблетки, покрытые оболочкой.
148. НД 42-5094-95 Урофлукс, порошок чая для настоя.
149. НД 42-624-05 Цистон, таблетки.
150. НД 42-7759-97 Уролесан.
151. Неймарк, А. И. Комплексное лечение больных нефролитиазом с использованием Канефрона Н [Текст] / А. И. Неймарк, И. В. Каблова // Урология. – 2008. - № 6. – С. 11 - 14.
152. Некоторые аспекты изучения биологически активных веществ и фармакологических свойств лекарственных растений [Текст] / В. Д. Белоногова, Н. С. Корепанова, Г. И. Олешко [и др.] // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2003. - № 4. – С. 16 – 20.
153. Нуралиев, Ю. Н. Гипоуремическое действие травы душицы мелкоцветковой [Текст] / Ю. Н. Нуралиев, Т. М. Зубайдова // Практическая фитотерапия. – 2008. - № 1. - С. 8 - 10.
154. О возможности использования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов и патологических состояний [Текст] / М. Я. Ловкова, Г. Н. Бузук, С. М. Соколова [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2005. – Т. 6, № 4. – С. 3 - 10.
155. Онегин, С.В. Разработка методики фотоэлектроколориметрического определения арбутина [Текст] // С. В. Онегин; под ред. Л. М. Огородовой, Л. В. Капилевича // Сборник статей молодых ученых и специалистов.– Томск : СГМУ, 2003.- 268 с.

156. Опыт применения растительных препаратов в комплексном лечении хронической инфекции верхних мочевыводящих путей у пациентов, перенесших дистанционную ударно-волновую литотрипсию [Текст] / В. А. Максимов, Л. А. Ходырева, А. А. Дударева, А. А. Сердюк // Урология. - 2011. - № 3. - С. 6 - 9.

157. Основные показатели здоровья населения и деятельность учреждений здравоохранения Хабаровского края в 2013 году [Текст] : Сборник статистических материалов. – Хабаровск, 2014. - 130 с.

158. ОФС 42-0013-03 Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб.

159. Охрименко, Л. П. Сравнительное исследование толокнянки, брусники и близких к ним видов, произрастающих в Республике Саха (Якутия) [Текст] / Л. П. Охрименко, Г. И. Калинкина, С. Е. Дмитрук // Химия растительного сырья. - 2005. - № 1. - С. 31 – 35.

160. Оценка лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе по показателю горькости [Текст] / Н. В. Молчан, И. П. Рудакова, А. А. Сорокина [и др.] // Фармация. – 2013 – № 2. – С. 3 - 4.

161. Панин, В. П. Анализ эффективности фитопрепаратов при острой почечной недостаточности по критерию NO-экскреторной активности [Текст] / В. П. Панин, А. В. Дубищев, В. А. Куркин // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов / Под ред. М. В. Гаврилина. – Пенза: ПГФА, 2009. – Вып. 64. – С. 483 - 485.

162. Панин, В. П. К механизму влияния фитопрепаратов ивы остролистной на клубочково-канальцевый аппарат почек [Текст] / В. П. Панин // Аспирантский вестник Поволжья. – 2011. - № 1 - 2. – С. 204 - 209.

163. Панин, В. П. Нитроксидэргические механизмы фармакологической коррекции функции почек при экспериментальной почечной недостаточности [Текст] / В. П. Панин, А. В. Дубищев, М. И. Панина // Медицинский вестник Башкортостана. - 2009. - № 2. - С. 196 - 199.

164. Панченко, Л. Ф. Клиническая биохимия микроэлементов [Текст] : Монография / Л. Ф. Панченко. – М.: Изд-во ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004. – 126 с.

165. Пат. 2063765 Российская Федерация, МПК А61К35/78. Сбор для лечения оксалатных нефропатий [Текст] / Т. А. Степанова, Н. В. Воронина; заявитель и патентообладатель Т. А. Степанова, Н. В. Воронина, Т. В. Картолапова. № 9402360114; заявл. 22.06.1994, опубл. 20.07.1996, Бюл. № 20.

166. Пат. 2270687 Российская Федерация, МПК А61К 36/28, МПК А61К 36/31. Фитосбор для лечения хронического пиелонефрита, цистита и недержания мочи – «Уровал» [Текст] / Л. М. Базлова; заявитель и патентообладатель Л.М. Базлова. № 2004103220; заявл. 20.01.04, опубл. 27.02.2006.

167. Пат. 2317096 Российская Федерация, МПК А61К036/73, А61К036/53, А61К036/233, А61Р013/00. Сбор лекарственных растений для профилактики и лечения воспалительных заболеваний почек [Текст] / Е. А. Вичуткина, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев, В. В. Лампатов; заявитель и

патентообладатель ГОУ ВПО АГМУ РосЗдрава. № 2006117461/15; заявл. 22.05.2006, опубл. 20.02.2008.

168. Пат. 2342945 Российская Федерация, МПК А61К 36/73, А61Р 13/00, А61Р 29/00. Способ получения средства, обладающего диуретической и противовоспалительной активностью [Текст] / Г. И. Олешко, О.В. Петухова, В. В. Юшков, О. А. Блинова, С.Д. Марченко; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ПГФА Росздрава. № 2007129743/15 заявл. 02.08.2007, опубл. 10.01.2009. Бюл. № 1.

169. Пат. 2442598 Российская Федерация, МПК А61К 36/185, А61К 36/42, А61К 36/534. Мочегонное средство [Текст] / Б. И Кантемирова, Х. М. Галимзянов, О. В. Рубальский; заявитель и патентообладатель Б. И Кантемирова, Х. М. Галимзянов, О. В. Рубальский; заявл. 23.12.2010, опубл. 20.02.2012.

170. Пат. 2445970 Российская Федерация, МПК А61К 36/185, А61К 36/28, МПК А61К 36/45, А61К 36/53, А61К 36/534. Фитосредство для лечения и профилактики мочекаменной болезни [Текст] / Г. Е.Пронченко, Т. Д.Рендюк, Е.В. Булыкин; заявитель и патентообладатель Г.Е. Пронченко, Т.Д. Рендюк; заявл. 11.03.2011, опубл. 27.03.2012.

171. Пат. 2453326 Российская Федерация, МПК А61К 36/14, А61К 36/28, А61К 36/53, А61К 36/84. Препарат для улучшения функционального состояния мочевыводящей системы и способ его получения [Текст] / Л.Е. Ныrkова; заявитель и патентообладатель ООО «ФИТОГАЛЕНИКА»; заявл. 22.06.2011, опубл. 20.06.2012.

172. Пат. 2456011 Российская Федерация, МПК А61К 36/481, А61К 31/194, А61Р 13/00. Средство "фларосукцин" для лечения и профилактики заболеваний почек и мочевыводящей системы [Текст] / И.И. Новик, Н.Ф. Маслова, Т.Н. Носальская, Т.В. Бомко, А.И. Деркач, А.Г.Котов, Л.В. Безпалько, В.И. Кобылинская, А.В. Мицук, А.А. Добровольный, Е.А. Сова, А.С. Шаламай, Т.И. Ермоленко; заявитель и патентообладатель ЗАО Научно-производственный центр «Борщаговский химико-фармацевтический завод». № 2010152709/15; заявл. 22.12.2010, опубл. 20.07.2012, Бюл. № 20.

173. Пат. 2473356 Российская Федерация, МПК А61К 36/00, МПК В01Д 11/02. Способ получения водных экстрактов из растительного сырья с повышенным содержанием извлекаемых активных веществ [Текст] / Б.В. Саргин, Г.В. Бобков, С.А. Павлов; заявитель и патентообладатель ООО «Компания Клевер». № 2011149734/15; заявл. 07.12.2011, опубл. 27.01.2013.

174. Пахомов, В. П. Антиоксидантный потенциал лекарственных растений и фитопрепаратов [Текст] / В. П. Пахомов, В. Н. Бакланов // Тез. докл. IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство»; Общероссийский общественный фонд «Здоровье человека», 2002. - С. 676.

175. Пензина, Т. Н. Перспективы использования отваров листьев ортилии, грушанки и зимолубки при воспалительных заболеваниях почек. Лекарственные растения Алтая: от эксперимента к клиническому применению / Т. Н. Пензина, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев [Текст] // Сб. мат. науч.- прак.

конф. АГМУ и Фармацевтической компании «Эвалар».- Барнаул, 2004.- Вып. 1.- С. 53 - 64.

176. Петухова, О. В. Динамика накопления флавоноидов в листьях земляники садовой [Текст] / О. В. Петухова, Г. А. Иванова, Т. В. Фефилов / Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2007. - № 2. - С. 274 - 276.

177. Петухова, О. В. Фармакогностическое изучение листьев земляники лесной и садовой региона Урала [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 15.00.02 / О. В. Петухова – Пермь: ПГФА, 2003. – 24 с.

178. Пономарев, В. Д. Экстракция лекарственного сырья [Текст] / В. Д. Пономарев. – М.: Медицина, 1976. – 202 с.

179. Потанина, О. Г. Совершенствование требований к разработке общих фармакопейных методов анализа лекарственного растительного сырья [Текст] / О. Г. Потанина, И. А. Самылина // Фармация. – 2011. - № 3. – С. 46 - 47

180. Почему растения лечат [Текст] / М. Я. Ловкова, А. М. Рабинович, С. М. Пономарев [и др.]. - М.: Наука, 1989. - 256 с.

181. Применение метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии в фармакокинетическом исследовании тритерпеноидов экстракта босвеллии (*boswellia serrata* oxb.) / С. А. Иванова, В. Г. Макаров, О. Н. Пожарицкая [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2008.-№ 6.-С.59 - 63.

182. Применение растительного препарата Канефрон Н у больных с хроническим циститом и мочекаменной болезнью [Текст] / Ю. Г. Аляев, А. В. Амосов, В. А. Григорян [и др.] // Урология. – 2005. - № 4. – С. 29 - 33.

183. Пронченко, Г. Е. Исследования по разработке методов контроля качества сбора для лечения пиелонефрита [Текст] / Г. Е. Пронченко, Т. Д. Рендюк // Традиционная медицина. – 2010 - № 21. – С. 54 - 56.

184. Пухова, Т. Г. Клинико-эпидемиологическая характеристика заболеваний органов мочевой системы у детей, проживающих в промышленном городе [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Т. Г. Пухова. – Иванова, 2012. – 26 с.

185. Разживин, Р. В. Определение веществ-маркеров при исследовании комплексных препаратов из лекарственного растительного сырья : автореф. дис... канд. фарм. наук [Текст] / Р. В. Разживин. – М., 2008. – 24 с.

186. Разживин, Р. В. Поиск веществ-маркеров лекарственного растительного сырья [Текст] / Р. В. Разживин, В. Ю. Решетняк, В. А. Попков // Фармация. – 2008. – № 6. – С. 25 - 28.

187. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейства Hydrangeaceae [Текст]. – Л.: Наука, 1987. – 326 с.

188. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae [Текст] / отв. ред. А. Л. Буданцев. – СПб.- М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2009.- 513 с.

189. Резник, М. И. Секреты урологии [Текст] / М. И. Резник, Э. К. Новик; Пер. с англ. - М.: «Издательство Бином»; СПб.: Невский Диалект, 2000. - 352 с.: ил.
190. Решетник, Л. А. Микроэлементный состав волос у детей с оксалатной нефропатией [Текст] / Л. А. Решетник, О. В. Прокопьева // Микроэлементы в медицине. - 2008. - Т. 9, № 3 - 4. - С 45 - 48.
191. Решетова, В.О. Идентификация фенольных соединений в сборе витаминном методом тонкослойной хроматографии [Текст] / В. О. Решетова, Я. В.Пешкова, А. А. Маркарян // Естественные и технические науки. - 2012. - № 1. - С. 145 - 148.
192. Решетько, О. В. Современное состояние проблемы использования лекарственных средств растительного происхождения [Текст] / О. В. Решетько, Н. В. Горшкова, К. А. Луцевич // Фарматека. - 2008. - № 6. - С. 66 - 69.
193. Роль канефрона Н при лечении хронического пиелонефрита и профилактике его осложнений [Текст] / С. Н. Калинина, О. Л. Тиктинский, В. А. Семенов [и др.] // Урология. - 2006, № 1. - С. 22 - 25.
194. Роль микроэлементов в развитии пиелонефрита у детей [Текст] / Т. П. Макарова, С. В. Мальцев, Е. В. Агафонова [и др.] / Российский педиатрический журнал. - 2002. - № 2. - С. 24 - 28.
195. Роль фитотерапии в пред- и послеоперационном периоде у больных уролитиазом [Текст] / Т. А. Конькова, Д. А. Бешлиев, Н. К. Дзеранов [и др.]. - Урология. - 2005. - № 2. - С. 18 - 20.
196. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2(R1) [Текст] // Фармация. - 2008. - № 4. - С. 3 - 10.
197. Руководство по стандартизации лекарственных средств [Текст] / под ред. Р. У. Хабриева, В. Л. Багировой, В. Б. Герасимова. - М.: Медицина, 2006. - 352 с.
198. Рылина, Е. В. Определение индикаторных фенольных соединений нефлавоноидной природы в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ [Текст]: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. / Е. В. Рылина.- М., 2010. - 24 с.
199. Саканян, Е. И. Разработка составов, технологии и методов анализа лекарственных препаратов из растительного сырья : автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / Е. И. Саканян. - СПб., 1996. - 48 с.
200. Самылина, И. А. Лекарственные растительные сборы [Текст] / И. А. Самылина, А. А. Сорокина, Н. В. Пятигорская // Фарматека. - 2010. - № 10. - С. 80 - 82.
201. Санаров, Е. М. Сборы лекарственных растений в лечении экспериментальной патологии почек [Текст] / Е. М. Санаров, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев // Нефрология и диализ.- 2003.- № 3. - С. 241.
202. Санаров, Е. М. Фармакогностическая характеристика и фармакологическая активность сборов из лекарственных растений флоры Алтая [Текст] / Е. М. Санаров, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев // Лекарственные растения Алтая: от эксперимента к клиническому применению : Сб. мат. науч.-

практ. конф. АГМУ и фармацевтической компании «Эвалар». – Барнаул, 2004.- Вып. 1.- С. 83 - 97.

203. Сапронова, Н. Н. Диуретические средства растительного происхождения [Текст] / Н. Н. Сапронова // Новая аптека. Аптечный ассортимент. - 2008. - № 12. - С. 26 - 31.

204. Селезнев, Г. Н. Определение арбутина в урологическом сборе [Текст] / Г. Н. Селезнев, Д. М. Попов, Н. Г. Селезнев // Фармация. – 2011. - № 4. – С. 18 – 20.

205. Сепп, А.Н. Маркетинговые исследования рынка лекарственных средств, применяемых для лечения мочекаменной болезни (уролитиаза) в Ставропольском крае [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук. / А. Н. Сепп. - Пятигорск, 2008. - 24 с.

206. Сивак, К. В. Фармакологическое изучение ряда растительных нефропротекторов : экспериментальное исследование [Текст]: дис ... канд. биол. наук : 14.00.25 / К. В. Сивак - Санкт-Петербург, 2007.- 151 с.: ил.

207. Сивова, Ю. С. Фармакогностическое изучение и стандартизация сборов, перспективных для лечения микробных заболеваний органов мочевыводящей системы [Текст] : дис. ... канд. фарм. наук / Ю. С. Сивова. – Пермь, 2008. – 157 с.

208. Скляревская, Н. В. Стандартизация травы лапчатки серебристой [Текст] / Н. В. Скляревская, К. В. Попова // Фармация. – 2013. - № 5. – С. 12 - 14.

209. Славич-Приступа, А. С. Маркетинговый анализ в разработке производителей лекарственных средств и БАД / А. С. Славич-Приступа / Ремедиум. - 2004. - № 4. - С. 28 - 33.

210. Современные аспекты диагностики и лечения мочекаменной болезни [Текст] / Ю. Г. Аляев, В. И. Руденко, С. А. Газимиев [и др.] // Урология. – 2006. - № 2. – С. 6 - 12.

211. Содержание фенольных соединений в водных и спиртовых извлечениях из листьев растений семейства Грушанковых [Текст] / Е. А. Вичкуткина, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев [и др.] // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : Мат. II Всерос. конф. – Барнаул, 2005.- С.41 – 54.

212. Сопоставительное изучение химического состава фитопрепарата и его растительных источников как основа стандартизации жидких спиртосодержащих лекарственных форм : материалы съезда [Текст] / Н. А. Тюкавкина, Ю. А. Колесник, И. А. Селиванова [и др.] // III Международный Съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». Санкт-Петербург – Пушкин, 29 июня – 1 июля 1999 год. – СПб., 1999. – С. 159 - 170.

213. Сорокина, А. А. Изучение водных извлечений из витаминсодержащих растений [Текст] / А. А. Сорокина // Российские аптеки. – 2004. - № 1-2. – С. 85 - 87.

214. Сорокина, А. А. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев, отваров и сухих экстрактов из лекарственного

растительного сырья [Текст] : автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / А. А. Сорокина. – М., 2002. – 46 с.

215. Сорокина, А. А. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев, отваров и сухих экстрактов из лекарственного растительного сырья [Текст] / А. А. Сорокина / Фармация. - 2003. - № 5. - С. 35.

216. Сосудистые растения советского Дальнего Востока [Текст] / Отв. ред. С. С. Харкевич. – Л.: Наука, 1988. – Т. 3 – 421с.

217. Сочетание двух хроматографических методов для изучения химического состава лекарственных растений [Текст] / А. Н. Кузьменко, В. Ю. Решетняк, В. А. Попков, Е. Б. Пашкова, А. В. Пирогов // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. -2011. -Т. 52, № 5. - С. 394 - 399.

218. Сравнительная оценка влияния фитокомплексов клеточных культур марены сердцелистной и воробейника краснокорневого на функцию почек у крыс [Текст] / О. В. Азарова, В. М. Брюханов, В. П. Булгаков [и др.] // «Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства»: Мат. международной науч.-практ. конф. – Шымкент: Казастан, 2009. – Т. 2. – С. 263-265.

219. Сравнительное изучение диуретической активности водных извлечений лекарственных растений, содержащих флавоноиды [Текст] / Е. Н. Зайцева, А. В. Куркина, В. А. Куркин [и др.] // Фармация. – 2013. - № 7. – С. 33 - 35.

220. Стандартизация спиртосодержащих жидких лекарственных форм фитопрепаратов. 4 Исследование химического состава лекарственного препарата «Эликсир Кедровит» [Текст] / В. Г. Макаров, К. А. Краснов, В. А. Утсаль [и др.] // Фармация. – 1998. – № 4. – С. 44 - 46.

221. Степанов, А. С. Стандартизация сырья и препаратов элеутерококка колючего и лимонника китайского [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / А. С. Степанов. – Пермь, 2004. – 23 с.

222. Степанова, Т. А. Виды флоры Дальнего Востока России, викарные к официальным. Сообщение 1. Анализ проблем и перспектив использования викариантов [Текст] / Т. А. Степанова // Раст. Ресурсы. – 1997.- Т. 33, Вып. 3. – С. 12 - 31.

223. Степанова, Т. А. К вопросу технологии и стандартизации противооксалатного сбора [Текст] / Т. А. Степанова, С. В. Степанов, Н. А. Волкова // Дальневосточный медицинский журнал. – 1997. - № 2. – С. 18 - 25.

224. Степанова, Т. А. Фармакогностическое изучение викарных видов лекарственных растений Дальнего Востока : автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / Т. А. Степанова. – М., 1998. - 49 с.

225. Ткачук, В. Н. Возможности фитотерапии в лечении больных с камнями мочеточников [Текст] / В. Н. Ткачук, И. Н. Ткачук, В. Я. Дубинский // Урология. – 2009. - № 3. – С. 13 - 15.

226. Товчига, О. В. Влияние лекарственных растений на выделительную функцию почек [Текст] / О. В. Товчига, С. Ю. Штрыголь // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009.- Том 72, № 3. – С. 50 - 59.

227. Товчига, О. В. Лекарственные растения и выделительная функция почек [Текст] / О. В. Товчига, С. Ю. Штрыголь, О. О. Койро // Буковинський медичний вісник .- 2012.- Т. 16, № 3 (63) ч.2.- С. 29 – 31.
228. Тонкослойная хроматография в анализе флавоноидов растительных объектов [Текст] / А. А. Мальцева, О. В. Тринеева, А. С. Чистякова [и др.] // Фармация. – 2013. - № 1. – С. 13-16.
229. Турищев С. Фитотерапия пиелонефрита [Текст] // Врач. – 2005. - N 6. – С. 60 - 61.
230. Уфимский, А. А. Биохимия флавоноидов и их значение в медицине [Текст] / А. А. Уфимский, Б. Х. Хавстеен, В. Ф. Баканева. - Пушкино: ООО «Фотон-век», 2007. – 264 с.
231. Фармакологическая активность почечного фитосбора, созданного с помощью оригинального методологического подхода [Текст] / Е. А. Вичкуткина, В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев [и др.] // Нефрология. - 2006. – Т. 10, № 3. - С. 68 - 73.
232. Фармакологические свойства фитопрепарата хрена обыкновенного [Текст] / В. В. Юшков, Т. А. Юшкова, А. В. Кулаков [и др.] // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2008. - № 1. – С. 12 - 15.
233. Фармакологическое действие многокомпонентного фитопрепарата / Е. В. Кравченко, И. В. Понтелеева, О. А. Казючиц [и др.] // Фармация. – 2011. - № 5. – С. 41 – 43.
234. Фармакотерапевтическая активность сухого экстракта сабельника болотного и нефрофита при экспериментальном гломерулонефрите [Текст] / Г. А. Бикмулина, А. Г. Мондодоев, Ю. А. Бидагаев [и др.] // Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии: Тезисы Всероссийской конференции с международным участием, Улан-Удэ, 5-10 сентября, 2006.- С. - 87.
235. Федеральный реестр биологически активных добавок к пище [Текст]. – СПб., 2005. - 544 с.
236. Федосеева, Л. М. Анализ арбутина подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае [Текст] / Л. М. Федосеева // Химия растительного сырья. - 2003. - №1. - С. 73 – 77.
237. Федосеева, Л. М. Оптимизация процесса экстракции биологически активных веществ из сбора для лечения заболеваний почек [Текст] / Л. М. Федосеева, М. В. Бабаева // Химия растительного сырья. - 2010. - № 1.- С. 155 - 160.
238. Филиппенко, Т. А. Антиоксидантное действие экстрактов лекарственных растений и фракций их фенольных соединений [Текст] / Т. А. Филиппенко, Н. Ю. Грибова // Химия растительного сырья. – 2012. - № 1. - С. 77 – 81.
239. Фитотерапия мочекаменной болезни [Текст] / Е. С. Кириллова, Б. И. Хамаев, И. П. Леднева [и др.] // Практическая фитотерапия. – 2000. - № 1. – С. 85 – 89.

240. Флавоноиды листьев земляники лесной и садовых сортов региона Урала [Текст] / О. В. Петухова, Г. А. Иванова, Г. И. Олешко [и др.] // Фармация. – 2003. – № 5. – С. 19 - 20.
241. Фруентов, Н. К. Лекарственные растения Дальнего Востока [Текст] / Н. К. Фруентов. – Хабаровск: Хабаровское книжное издательство, 1972. – С. 83 - 85.
242. ФС 42-1028-91 Сбор мочегонный №2.
243. ФС 42-3338-96 Сбор «Элекасол».
244. ФСП 42-0045-0827-01 Урологический (мочегонный).
245. ФСП 42-0068413003 Урифлорин таблетки.
246. ФСП 42-0158264802 Леспефлан, раствор для приема внутрь.
247. ФСП 42-0388242602 Бруснивер сбор, пачки, фильтр-пакеты.
248. Фурса, Н. С. Содержание арбутина в траве вереска обыкновенного [Текст] / Н. С. Фурса, С. В. Онегин // Фармация. – 2007. – № 6. – С. 12 - 14.
249. Хазиев, Р. Ш. Влияние технологических факторов на изготовление настоев из цветков ромашки [Текст] / Р. Ш. Хазиев, Ю. В. Бусыгина, Р. А. Юсупов // Фармация. – 2005. – № 5. – С. 26 - 28.
250. Хазиев, Р. Ш. Влияние технологических факторов на экстрагируемость флавоноидов из листьев земляники в водные настои [Текст] / Р. Ш. Хазиев, А. А. Тынчерова // Новые достижения в создании лекарственных средств растительного происхождения : Мат. Всероссийской науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения профессора Л. Н. Березнеговской, 11-12 сент. 2006 г. / Казанский ГМУ. – Томск, 2006. – С. 349 – 352.
251. Хазиев, Р. Ш. Стандартизация земляники листьев по содержанию водорастворимых флавоноидов [Текст] / Р. Ш. Хазиев, А. А. Тынчерова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2013.- Вып 68.- С.119 - 120.
252. Хазиев, Р. Ш. Экстрагируемость флавоноидов травы зверобоя в настой [Текст] / Р. Ш. Хазиев, А. А. Тынчерова // Фармация. – 2006. – № 6. – С. 32 - 34.
253. Хайдер Мусхен, Роль фитотерапии в комплексном лечении и метафилактике мочекаменной болезни [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Мусхен Хайдер. – М., 2007. – 22 с.
254. Хворов, В. В. Некоторые вопросы консервативного лечения уролитиаза [Текст] : Обзор зарубежной литературы / В. В. Хворов // Русский медицинский журнал. – 2007. – Т. 15, № 29. – С. 2260 - 2264.
255. Химико-фармакологические закономерности в действии растений семейства грушанковых [Текст] / В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев, Е. М. Санаров [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – Т. 61, № 6. – С. 58 - 61.
256. Химический состав и антиоксидантная активность гепатопротекторного сбора [Текст] / П. Б. Лубсандоржиева, Н. Б. Болданова, Ж. Б. Дашинамжилов [и др.]. // Фармация. – 2013. – № 3. – С. 28 - 30.

257. Хроматоспектрофотометрическое определение арбутина в листьях *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch [Текст] / П. Б. Лубсандоржиева, Б. С. Жигжитов, Т. Д. Даргаева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – Т. 34, № 5. – С. 38 - 40.

258. Цимбалист Н. А. Фармакогностическое изучение и стандартизация сбора противодиабетического. Фармакогностическое изучение побегов голубики [Текст] : автореф. дис. ... канд. фарм. наук. / Н. А. Цимбалист; Пермская государственная фармацевтическая академия. – 2008. – 24 с.: ил.

259. Цомая, И. В. Определение подлинности многокомпонентного фитопрепарата хроматографическим методом [Текст] / И. В. Цомая // Фармация. – 2011. - № 2. – С. 23-25.

260. Черепанов, С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) [Текст] / С. К. Черепанов // СПб.: Мир и семья, 1995. – 990 с.

261. Чукарина, Е. В. Определение арбутина и гидрохинона в листьях толокнянки, брусники и фитопрепаратах, приготовленных на их основе [Текст] / Е. В. Чукарина, А. М. Власов, К. И. Эллер // Вопросы питания. – 2007.- Т. 76, № 3. – С.82 – 87.

262. Шагалиева, Н. Р. Стандартизация комплексного фитопрепарата для стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [Текст] / Н. Р. Шагалиева, Е. В. Авдеева, В. А. Куркин // Фармация. – 2012 - № 1. – С.9 - 12.

263. Шатохина, О. В. Фитотерапия при инфекции органов мочевой системы у детей [Текст] / О. В. Шатохина // Вестник педиатрической фармакологии и нутрициологии. – 2006. – Т. 3, № 4. – С. 43 - 46.

264. Шилова, И. В. Стандартизация травы лабазника вязолистного [Текст] / И. В. Шилова, И. А. Самылина, Н. И. Суслов // Фармация. – 2012. - № 2. – С. 19 – 22.

265. Ших, Е. В. Клинико-фармакологические аспекты применения фитопрепаратов в лечении заболеваний мочевыводящих путей у детей [Текст] / Е. В. Ших // Педиатрия. Прил. к журналу Consilium Medicum.- 2013.- № 2. - С. 60 - 63.

266. Шретер, А. И. Лекарственная флора Советского Дальнего Востока [Текст] / А. И. Шретер. – М.: Медицина, 1975. – 323с.

267. Эрдынеев, Ю. Б. Фармакотерапевтическая эффективность сухого экстракта "ортэкс" при экспериментальной нефропатии [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук // Ю. Б. Эрдынеев; Ин-т общей и экспериментальной биологии СО РАН. - Улан-Удэ, 2005. - 24 с.: ил.

268. Эффективность нефрофита при лекарственных нефропатиях (морфологические исследования) [Текст] Лоншакова К. С., Абгалдаева Е. А., Мондодоев А. Г., Убашеев И. О. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. - 2009. - № 2. - С. 113 - 115.

269. Югдунова, Е. Д. Фармакогностическое изучение комплексного растительного средства, рекомендуемого для профилактики заболеваний мочевыделительной системы [Текст]: автореф. дис... канд. фарм. наук / Е. Д. Югдунова. – Улан-Удэ, 2004. – 21 с.

270. Яшин, Я. И. Аналитическая хроматография. Методы, аппаратура, применение [Текст] / Я. И. Яшин, А. Я. Яшин // Успехи химии. - 2006. - Т. 75, № 4. - С. 366 - 379.

271. Al-Windi, A. The relationship between age, gender, well-being and symptoms, and the use of pharmaceuticals, herbal medicines and self-care products in a Swedish municipality [Text] / A. Al-Windi, D. Elmfeldt, K. Swardsudd // Eur J Clin Pharmacol. - 2000. - № 56. - P. 311 - 317.

272. An anti-aldosterone diuretic component (drain dampness) in *Polyporus sclerotium* [Text] / D. Yuan, J. Mori, K. I. Komatsu [et al] // Biol. Pharm. Bull. - 2004. - Vol. 27, № 6. - P. 867 - 870.

273. Antilithiatic effect of *Melia azedarach* on ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats [Text] / A. J. M. Christina, N.A. Haja Najumadeen, S. Vimal Kumar [et al] // Pharm. Biol. - 2006. - Vol. 44, № 6. - P. 480 - 485.

274. Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry, and raspberry leaves [Text] / L. Buřičová, A. Čermáková, Z. Réblová [et al.]. / Czech Journal of Food Sciences. - 2011. Vol. 29, № 2. - C. 181 - 189.

275. Anti-urolithiatic effect of petroleum ether extract stem bark of *Crataeva adansonii* in rats [Text] / Pankaj Gupta, Naimesh Patel, Lokesh Bhatt [et al] // Pharm. Biol. - 2006. - Vol. 44, № 3. - P. 160 - 165.

276. Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria 'ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems [Text] / Dolores Hernanz, Angeles F. Recamales, Antonio J. Melendez-Martinez J. [et al] // Agr. and Food Chem. - 2007. - Vol. 55, N 5. - P. 1846 - 1852.

277. Baraboř, V. A. Selenium: the biological role and antioxidant activity [Text] / V. A. Baraboř, E. N Shestakova // Ukr. Biokhim. Zh. - 2004. - Jan.-Feb. - Vol. 76, № 1. - P. 23 - 32.

278. Bast Aalt Flavonoids: Antioxidants with pharmacological activity and toxicological properties [Text] / Bast Aalt // Thesis 41 Meeting of the Polish Biochemical Society, Bialystok, 12-15 Sept., 2006. - Vol. 55, № 1. - P. 113.

279. Blanke, M. Eintritt für Selbstpflücke, ein Kontinent ohne Frigopflanzen und 'Elsanta' Erdbeeranbau in Australien [Text] / M. Blanke, K. Olbricht // Erwerbs-Obstbau. - 2005. - Vol. 47, N 2 - 3. - P. 54 - 60.

280. Cranberry juice fails to prevent recurrent urinary tract infection: results from a randomized placebo controlled trial [Text] / C. Barbosa-Cesnik, M. B. Brown, M. Buxton [et al] // Clin Infect Dis. - 2011. - № 52. - P. 23 - 30.

281. Cyboran, S., Kleszczyńska, H., Oszmiański, J. Interaction Between Plant Polyphenols And The Erythrocyte Membrane / S. Cyboran, H. Kleszczyńska, J. Oszmiański [Text] / Cellular And Molecular Biology Letters. - 2012. - Vol. 17, № 1. - P. 77 - 88.

282. Daily cranberry juice for the prevention of asymptomatic bacteriuria in pregnancy: a randomized, controlled pilot study [Text] / D. A. Wing, P. J. Rumney, C. W. Preslicka [et al] // J. Urol. - 2008. - № 180. - P. 1367 - 1372.

283. Dearing, M. D. Plant secondary compounds as diuretics: An overlooked consequence [Text] / M. D Dearing, A. M. Mangione, W. H. Karasov // Am. Zoo. - 2001. - Vol. 41. - P. 890 - 901.

284. Demographic and health-related correlates of herbal and specialty supplement use [Text] / S. Gunther, R. E. Patterson, A. R. Kristal [et al] // J Am Diet Assoc.- 2004.- № 104.- P. 27 - 34.
285. Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey [Text] / A. I. Serteser, M. Kargioğlu, V. Gök [et al.] // Intern. J. of Food Sciences and Nutrition.- 2008.- Vol. 59, № 7-8. - P. 643 - 651.
286. Diuretic activity of *Lophophytum leandri* [Text] / A. Bracci, A. G. Amat, F. Maione, C. Cicala [et al] // Nat Prod Commun – 2012.- Jan, 7(1).- P. 33 – 34.
287. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis [Text] / M. E. Barros, R. Lima, L. P. Mercuri, J. R. Matos [et al] // Urol Res. - 2006.- № 34.- P. 351 - 357.
288. Ethnic differences in use of complementary and alternative medicine at midlife: Logitudinal result from SWAN participants [Text] / Y. A. Bair, E. B. Gold, G. A. Greendale [et al] // Am J Public Health.- 2002.- № 92.- P. 1832-1840.
289. Evaluation of cranberry supplement for reduction of urinary tract infections in individuals with neurogenic bladders secondary to spinal cord injury. A prospective, double-blind, placebo-controlled, crossover study [Text] / T. A. Linsenmeyer, B. Harrison, A. Oakley [et al] // J Spinal Cord Med. 2004 - № 27. - P. 29 – 34.
290. F-23 F-24A - HPTLC Fingerprint of Wuweizi berries (*Schisandra chinensis*) - [Electronic resource] / Mode of access: http://www.camag.com/media/2WG85642/CAMAG_Application_Notes_Herbals.pdf.
291. Fitoterapia en Urologia. Evidencia científica actual de su aplicación en urolitiasis, dolor pélvico crónico, disfunción eréctil infecciones urinarias [Text] // E. Moran, A. Budia, E. Broseta, F. Boronat // Actas Urológicas Españolas. – 2012. – Acuro. – 467. - P. 7.
292. Gawęda, Maria, Ben, Jan Zmiany zawartości mikroelementów w roslinach truskawki (*Fragaria ananassa* Duch.) w zależności od czasu uprawy [Text] / Maria Gawęda, Jan Ben // Folia Univ. agr. Stetin. Agr. – 2004. - N 96. - P. 55 - 58.
293. Ghedira, K Les flavonoïdes: Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique [Text] / K. Ghedira // Phytothérapie. - 2005. – Vol. 3, № 4. – P. 162 - 169.
294. Grover, P. Effect of urine fractionations on attachment of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells: implications for studying renal calculogenesis [Text] / P. Grover, L. Thurgood // Am. J. Physiol. Renal Physiol. - 2007. - № 292. - P. 1396 - 1403.
295. Gürocaklı, S. Consumption of historical and current phytotherapeutic agents for urolithiasis: a critical review [Text] / S. Gürocaklı, B. Kupeli // J. Urol. 2006.- № 167.- P. 450 - 455.
296. Hummer, K. E. Strawberry species of Iturup and Sakhalin islands [Text] / K. E. Hummer, A. Sabitov // Hortscience. 2008. - Vol. 43, № 5. - P. 1623 - 1625.
297. Jepson, R. G. Cranberries for preventing urinary tract infections [Text] / R. G. Jepson, J. C. Craig // Cochrane Database Syst Rev.- 2008. -№ 2.-P.1 - 24.

298. Krivoy, N. Ethnic differences in population approach and experience regarding complementary-alternative medicine [Text] / N. Krivoy, M. Habib, Z. C. Azzam // *Pharmacoepidemiol Drug Safe* 2006.- № 15.- P. 348 – 353.
299. Marumo, F. Renal disease and trace elements [Text] / F. Marumo, J. P. Li // *Nippon Rinsho*. – 1996. – Jan. – Vol. 54, № 1. – P. 93 - 98.
300. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. Extracts and its main component isoquercitrin [Text] / Gasparotto Junior A, T. B.Prando, S. Leme Tdos, F. M. Gasparotto [et al] // *J. Ethnopharmacol.* - 2012. – May, 7.- № 141(1).- P. 501 - 509.
301. Metabolite profiling reveals novel multi-level cold responses in the diploid model *fragaria vesca* (woodland strawberry)[Text] / J. Rohloff, P. Winge, A. M. Bones [et al.]. // *Phytochemistry*. -2012. -Vol. 77. - P. 99 - 109.
302. Microbiologia de las infecciones urinarias en pacientes ambulatorios. Opciones terapeuticas en tiempos de alta resistencia a los antibioticos [Text] / Virginia Arreguin, Margasrita Cebada, Jesus I., Simon [et al] // *Rev. invest. clin.* – 2007. – Vol. 59, № 4. – P. 239 - 245.
303. Olajire, A., Azeez, L. Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables [Text] / A. Olajire, L. Azeez, / *African Journal of Food Science and Technology*.- 2011.- Vol. 2, № 2. - P. 22 - 29.
304. Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of asteraceae and rosaceae families: chemical characterization and blood anticoagulant activity [Text] / I. Pawlaczyk, R. Gancarz, L. Czerchawski, W. Pilecki, E. Lamer-Zarawska // *Carbohydrate Polymers*. -2009. - Vol.77, № 3. - P. 568 - 575.
305. Polyphenols, dietary sources and bioavailability [Text] / Massimo D'Archivio, Carmela Filesì, Roberta Benedetto [et al] // *Ann. Ist. super. sanita.* - 2007. – Vol. 43, N 4. - P. 348 - 361.
306. Pyka, A. Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*vaccinium vitis idaeae*) [Text] / A. Pyka, K. Bober, A. Stolarczyk // *Acta poloniae pharmaceutica - drug research*. - 2007. - Vol. 63, № 5. - P. 395 - 400.
307. Quispe, C. Phenolic constituents of the Chilean herbal tea *Fabiana imbricata* R. et P. [Text] / C. Quispe, E. Viveros-Valdez, G. Schmeda-Hirschmann // *Plant Foods Hum Nutr*.- 2012. – Sep. 67 (3).- P. 242 – 246.
308. Ruyter, N. De Primaire hyperoxalurie bij het kind: Huidige diagnostische en therapeutische mogelijkheden [Text] / N. De Ruyter, J. Herman, J. J. Braeckman // *Tijdschr.geneesk.* – 2005. – Vol. 61, № 19. – P. 1348 - 1357.
309. Safety and efficacy of cranberry (*vaccinium macrocarpon*) during pregnancy and lactation [Text] / J. J. Dugoua, D. Seely, D. Perri [et al] // *Can J Clin Pharmacol*. – 2008.- № 15.- P. 80 - 86.
310. Samylina, I. A. The systemic method to standardization of herbal medicines [Text] / Irina A.Samylina // 11 International Congress Phytopharm, Leiden, The Netherlands. -2007.- June, 27-30.- 2007.- P 26.
311. Stothers, L. A randomised trial to evaluate effectiveness and costeffectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women [Text] / L. Stothers // *Can J Urol*. -2002.-№ 9.- P. 1558 - 1562.

312. The strawberry fruit fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis [Text] / C. Muñoz, N. M. Escobar, M. A. Botella [et al.] // *Molecular Plant.* - 2010. - Vol. 3, № 1. - P. 113 - 124.

313. Trends in use of complementary and alternative medicine by US adults: 1997-2002 [Text] / H. A. Tindle, R.B. Davis, R.S. Phillips [et al] // *Altern Ther Health Med.* - 2005.-№ 11.- P.42 - 49.

314. Use of rare earth compounds for the prevention of kidney stone disease [Text] / Abrams Michael J., Bridger Gary J., Fricker Simon P. [et al] // *Shire International Licensing B. V.* - № 10/ 128783; Stated. 22.04.02; Published. 20.03.07.

315. Yurdugul, S. An evaluation of the retention of quality characteristics in fresh and freeze-dried alpine strawberries [Text] / S. Yurdugul // *International Journal of Food Science & Technology.* - 2008. – Vol. 43, N 5. – P. 865 - 870.

316. Літична та літогенна активність лектинів деяких лікарських рослин [Text] / Г. П. Мегалінська, Н. І Желтовська, С. С. Волинська [et al] // Матеріали Міжнародної наукової конференції «Лікарських рослини: традиції та перспективи досліджень», присвяченої 90-річчю Дослідної станції лікарських рослин УААН, с. Березоточа (Полтав. обл.) 12-14 лип., 2006. – Київ, 2006. – С. 304 - 307.

317. Товчига, О. В. Дослідження сечогінної, нефропротекторної, гіпоурикемічної дії яглиці звичайної (*Aegorodium podagraria* L.) як основа для створення лікарських засобів [Text]: дис. на здобуття наук. ступ. канд. фарм. наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / О. В. Товчига. – Харків, 2009. – 205 с.

Приложение 1

Проект ФСП Сбор противооксалатный

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации « _____ » _____ 20__

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

Сбор противооксалатный

ФСП 42 –

измельченный, порошок – «ангро»,

измельченный – пачки,

порошок – фильтр-пакеты

Вводится впервые

Срок введения установлен

с « _____ » _____ г.

Срок действия

до « _____ » _____ г.

Настоящая Фармакопейная статья предприятия распространяется на сбор противооксалатный, упакованный «ангро», расфасованный в пачки и фильтр-пакеты, используемый в качестве лекарственного средства.

[illegible]

Спектр поглощения	Спектроскопия в ультрафиолетовой области	УФ спектр спиртового извлечения сбора в области от 220 нм до 320 нм имеет максимум поглощения в интервале 272-285 нм и минимум поглощения 256-262 нм
Числовые показатели: <i>1. Измельченное сырье</i> -содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, -содержание экстрактивных веществ, - влажность - золы общей - золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм - частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм - органической примеси - минеральной примеси	Спектрофотометрия ГФ XI ГФ XI ГФ XI ГФ XI ГФ XI ГФ XI ГФ XI ГФ XI	не менее 0,6 % не менее 25 % не более 10 % не более 10 % не более 2 % не более 2 % не более 5 % не более 2 % не более 2 %
<i>2. Порошок</i> -содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин -содержание экстрактивных веществ, - влажность, - золы общей, - золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной - частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм	Спектрофотометрия ГФ XI ГФ XI ГФ XI ГФ XI	не менее 0,6 % не менее 25 % не более 10 % не более 10 % не более 2 % не более 3 %

- частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм	ГФ XI	не более 6 %
Микробиологическая чистота	ГФ XII, ч.1	категория 4А
Масса содержимого упаковки	ОСТ 64-492-85 ОФС 42-0013-03	Соответствует требованиям ОСТ, ОФС
Количественное определение: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, -содержание экстрактивных веществ	Спектрофотометрия ГФ XI	См. раздел «Числовые показатели»
Упаковка		«Ангро». Измельченное сырье, порошок фасуют по 10 кг и 15 кг в мешки бумажные многослойные <i>Пачки.</i> Измельченное сырье фасуют по 50 г, 100 г в пачки картонные с внутренним пакетом бумажным <i>Фильтр-пакеты.</i> Порошок фасуют по 3 г, в фильтр-пакеты из бумаги термосвариваемой пористой неразмокаемой с последующим вложением 20 фильтр- пакетов в пачки картонные
Маркировка		Соответствует ФСП
Транспортирование		Соответствует ФСП
Условия хранения		В сухом, защищенном от света месте
Срок годности		Измельченное сырье – 3 года. Порошок – 2 года.

Состав.

Травы горца птичьего (ГФ XI изд., вып. 2, с. 56)	- 22 %
Листьев брусники (ГФ XI изд., вып. 2, с. 27)	- 14 %
Листьев земляники (ФС 42-134-72)	- 7 %
Плодов шиповника (ГФ XI изд., вып. 2, с. 38)	- 29 %
Плодов калины (ГФ XI изд., вып. 2, с. 40)	- 7 %
Столбиков с рыльцами кукурузы (ГФ XI изд., вып. 2, с. 82)	- 7 %
Семян лимонника (ГФ XI изд., вып. 2, с. 80)	- 14 %

Внешние признаки. Сырье исследуют невооруженным глазом с помощью лупы 10×, в стереомикроскоп 10× в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья», статья «Сборы» (ГФ XI, вып. 1, с. 266)

Измельченное сырье. Смесь неоднородных частиц различных видов растительного сырья. Фрагменты сырья зеленого, серо-зеленого, коричневого, коричнево-зеленого цвета с вкраплениями красного, желтого и белого цвета, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 5 мм., в которой хорошо различимы цельные семена лимонника (от желтого до коричневого цвета, блестящие, почковидной формы), трава горца птичьего (фрагменты серовато-зеленых стеблей с тонкими, белыми раструбами), плоды шиповника (цельные или частично измельченные орешки от белого до светло-коричневого цвета, часто с полостью).

При просмотре сбора под стереомикроскопом или лупой видны: -кусочки стеблей целые бороздчатые цилиндрической формы зеленого, светло-зеленого, серо-зеленого цвета и расщепленные вдоль с белой сердцевинкой, фрагменты стеблей с тонким, пленчатым, рассеченным раструбом и фрагменты раструбов, отделившиеся от стеблей. Кусочки листьев серо-зеленого цвета и

цельные мелкие листики. Жилки с нижней стороны листа выступают (травя горца птичьего);

- кусочки кожистых листьев от светло-зеленого до темно-зеленого цвета с коричневыми вкраплениями, поверхность частиц гладкая, блестящая (листья брусники);

- частицы листьев, густо опушенные тонкими, белыми волосками. Верхняя сторона листовой пластинки зеленого цвета с редким опушением, нижняя сторона светло-зеленая с многочисленными волосками и выступающими жилками. Фрагменты черешков листьев покрыты многочисленными волосками (листья земляники);

- кусочки твердого околоплодника от оранжево-красного до коричнево-красного цвета с одной стороны ровные или морщинистые, блестящие или матовые, цельные или частично разрушенные орешки желто-белого или светло-коричневого цвета иногда полые изнутри, многочисленные, тонкие, щетинистые, длинные волоски (плоды шиповника);

- кусочки мякоти темно-красного или оранжево-красного цвета блестящие, морщинистые, остатки косточки плоские, твердые, от светло-коричневого до белого цвета, наружная сторона кусочков косточки и сторона мякоти, прилегающая к косточке, имеет мелкобороздчатый рельеф (плоды калины).

- кусочки мягких тонких нитей (столбиков) от светло-желтого до коричневого цвета, продольно морщинистые. Частицы в поперечном сечении плоские, утолщенные по краям (столбики с рыльцами кукурузы);

- семена округлопочковидной формы с гладкой блестящей поверхностью от желто-коричневого до коричневого цвета. С вогнутой стороны поперек семени имеется заметный рубчик. Семена хрупкие, ядро отстает от кожуры, ядро семени содержит жирное масло. Вкус семян пряный, горьковато-жгучий, запах специфический (семена лимонника).

Запах слабый, вкус водного извлечения горький.

Порошок. Смесь неоднородных частиц растительного сырья коричнево-зеленого цвета, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм.

Запах слабый, вкус водного извлечения горький.

Микроскопия. *Измельченное сырье, порошок.* Анализ проводят в соответствии с указаниями статей «Сборы» (ГФ XI, вып. 1, с. 266) и «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» по методике приготовления микропрепаратов измельченного сырья (трава, листья, плоды, семена, цветки) (ГФ XI, вып. 1, с. 278, 279)

При рассмотрении микропрепаратов видны:

- частицы листа с изодиаметрическими многоугольными клетками верхнего и нижнего эпидермиса (длиной 30-75 мкм, шириной 17-43 мкм) с прямыми или слегка извилистыми утолщенными стенками и нередко с бурым содержимым. Кутикула по краю листа и над крупными жилками продольно-складчатая. Устьица (длиной 16-27 мкм, шириной 12-24 мкм) окружены тремя клетками эпидермиса - анизоцитный тип. В мезофилле листа много друз оксалата кальция 12-50 мкм в диаметре. Механические волокна, расположенные над жилками с обеих сторон листа, имеют извилистый контур и толстые оболочки. По краю листа клетки эпидермиса имеют сосочковидные выросты. Эпидермис стебля представлен квадратными, прямоугольными и многоугольными клетками (длиной 19-84 мкм, шириной 9-49 мкм) с коричневым содержимым с прямыми утолщенными стенками, редко по стеблю встречаются устьица анизоцитного типа. Обрывки раструбов состоят из узких длинных клеток с прямыми тонкими стенками. Эпидермис околоцветника образован клетками разных форм и размеров (длиной 31-88 мкм, шириной 10-29 мкм) от изодиаметрических до полигональных с прямыми, волнистыми или извилистыми контурами, кутикула морщинистая и образует сосочковидные выросты (трава горца птичьего);



Рисунок П1 – Горец птичий. Фрагмент листа с многоугольными клетками эпидермиса и устьицами анизацитного типа (Увел. 100×)

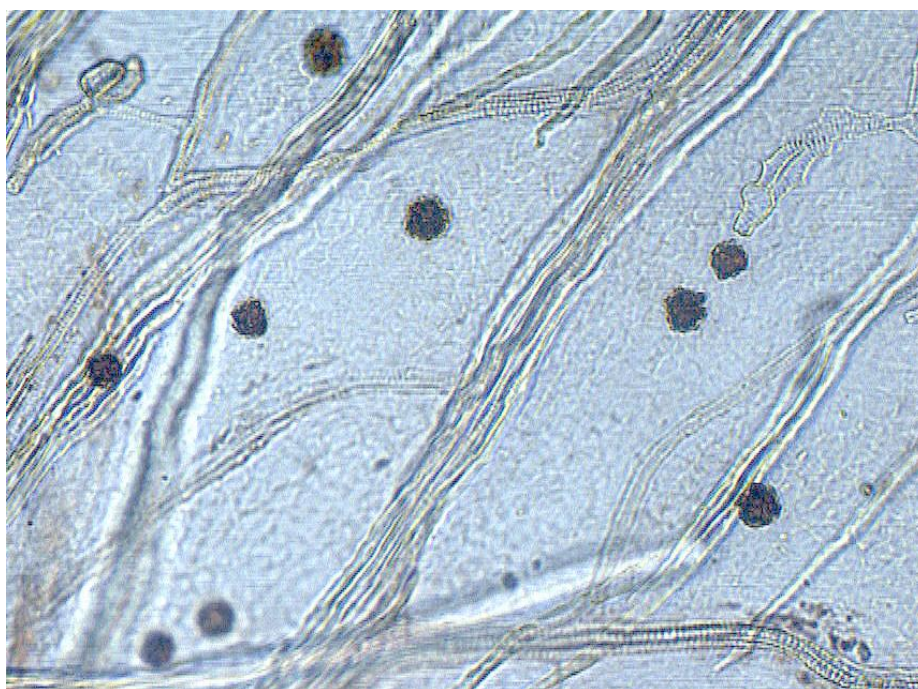


Рисунок П2 – Горец птичий. Фрагмент листа с друзами оксалата кальция (Увел. 40×)

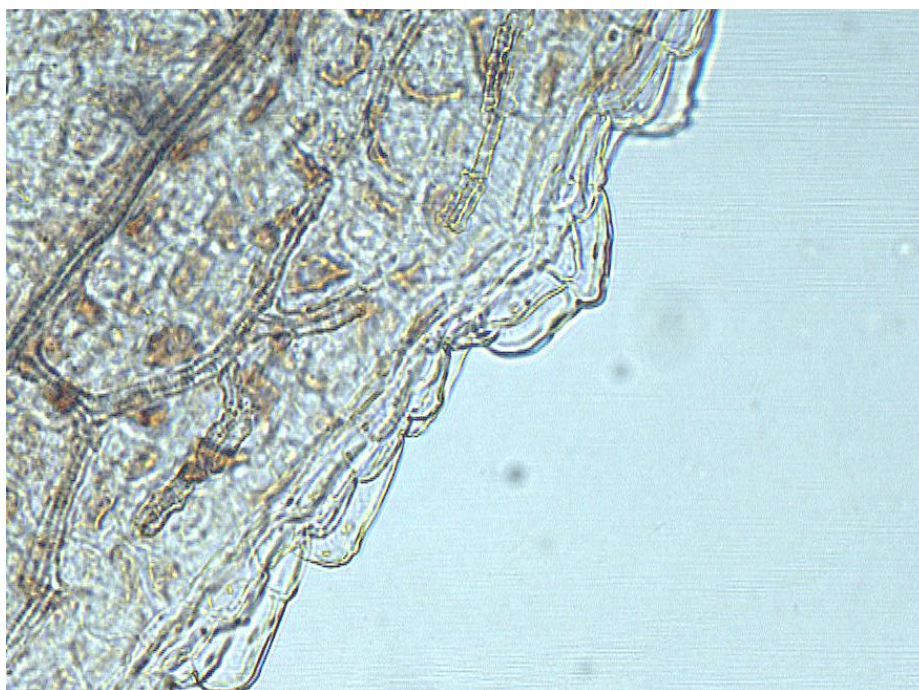


Рисунок ПЗ – Горец птичий. Фрагмент края листа с клетками эпидермиса вытянутыми в сосочек (Увел. 40×)

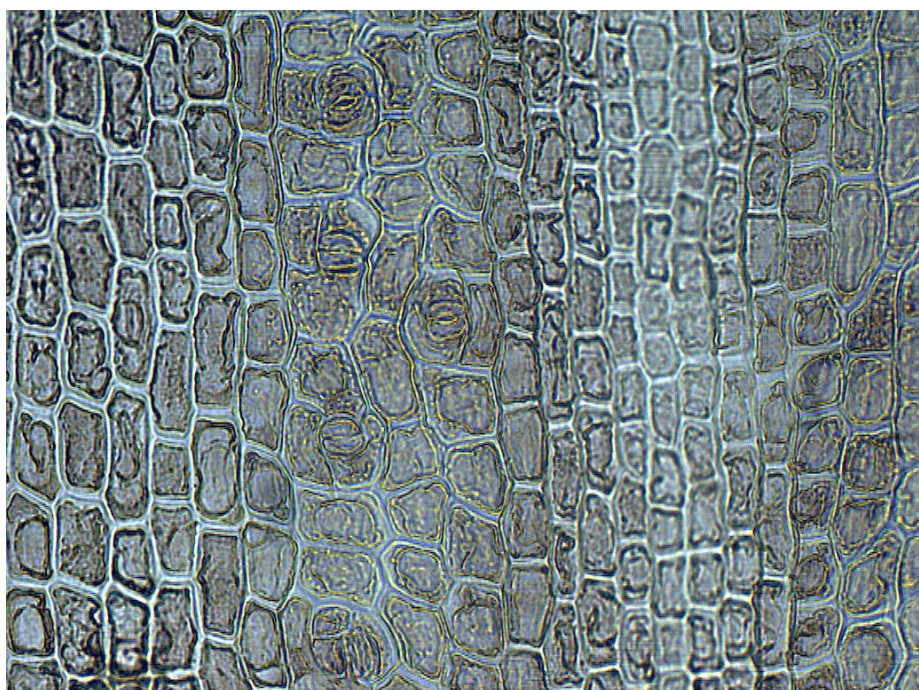


Рисунок П4 – Горец птичий. Фрагмент эпидермиса стебля с прямоугольными клетками с коричневым содержимым и устьичным аппаратом (Увел. 40×)

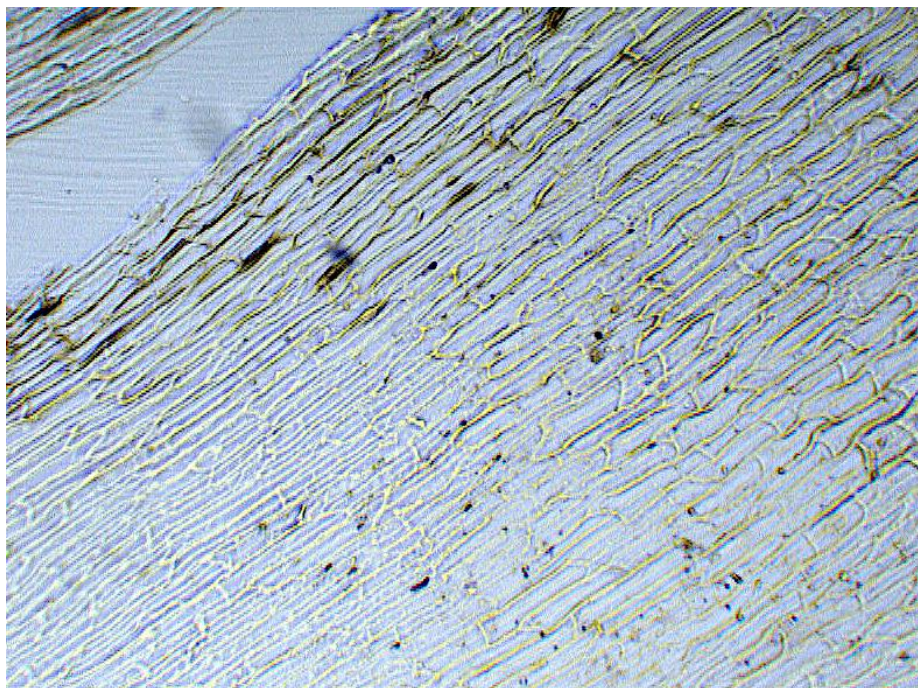


Рисунок П5 – Горец птичий. Фрагмент пленчатого раструба с узкими прямостенными клетками эпидермиса (Увел. 100×)

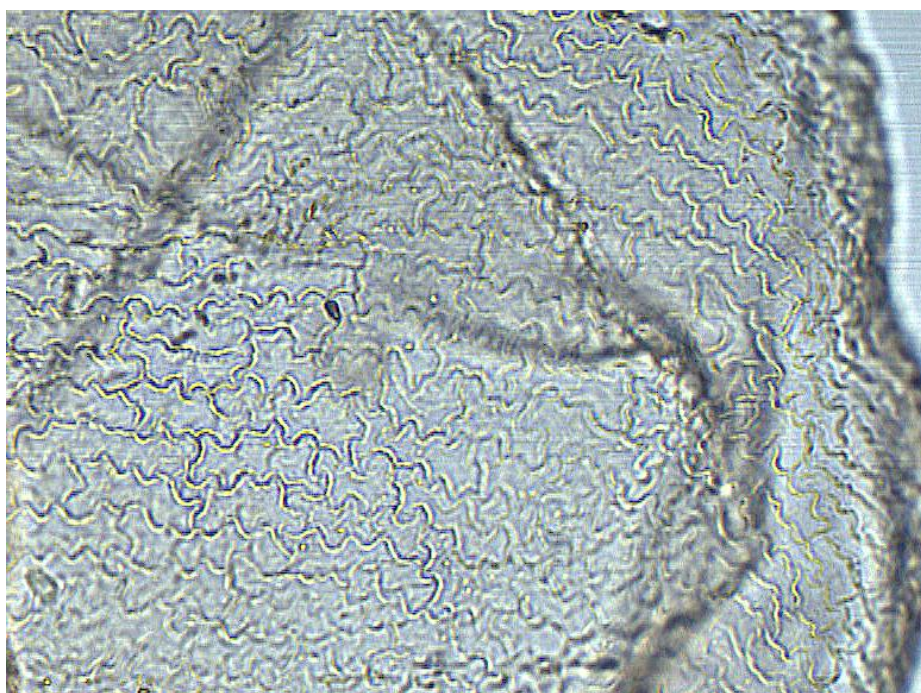


Рисунок П6 – Горец птичий. Фрагмент венчика цветка с извилистыми стенками клеток эпидермиса и складчатой кутикулой (Увел. 100×)

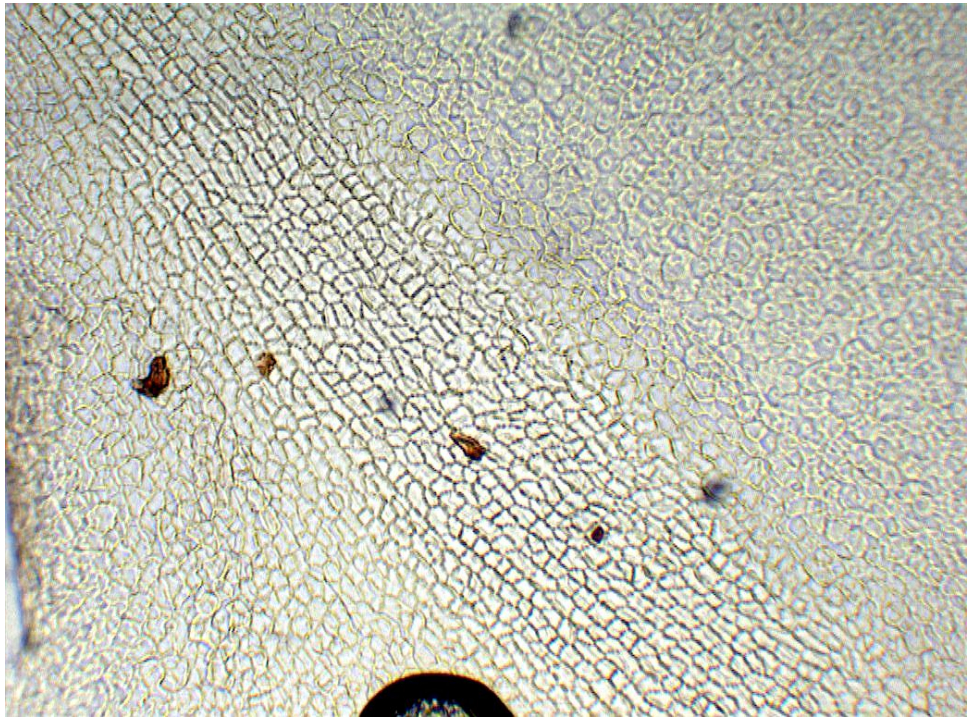


Рисунок П7 – Брусника обыкновенная. Фрагмент эпидермиса листа с устьицами и извилистыми клетками эпидермиса (Увел. 100×)



Рисунок П8 – Брусника обыкновенная. Фрагмент листа с железкой (Увел. 100×)

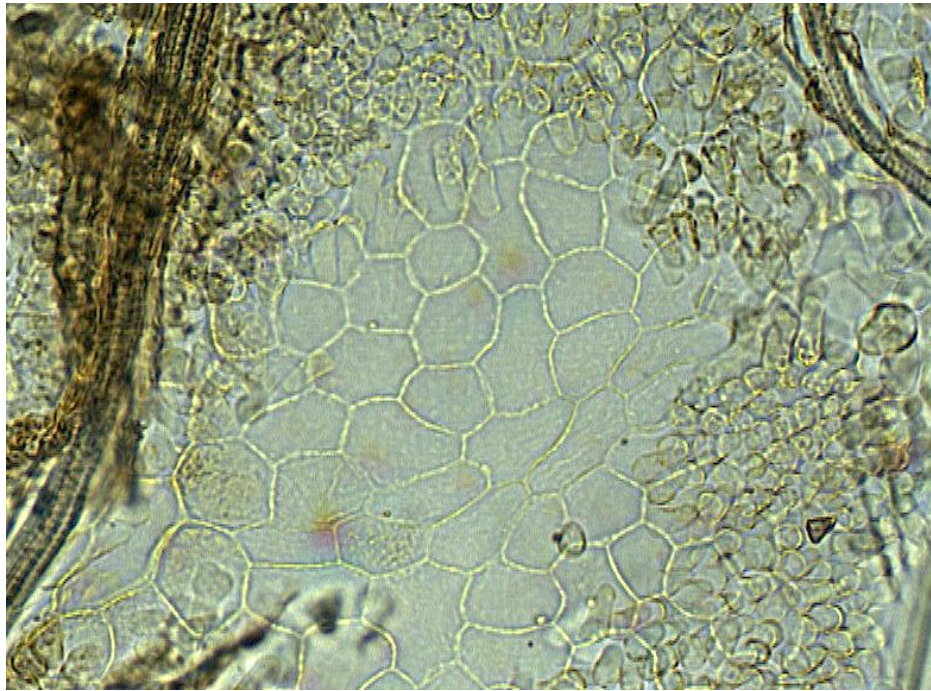


Рисунок П9 – Земляника лесная. Фрагмент листа с прямостенными эпидермальными клетками (Увел. 100×)



Рисунок П10 – Земляника лесная. Фрагмент листа с простыми одноклеточными волосками (Увел. 100×)

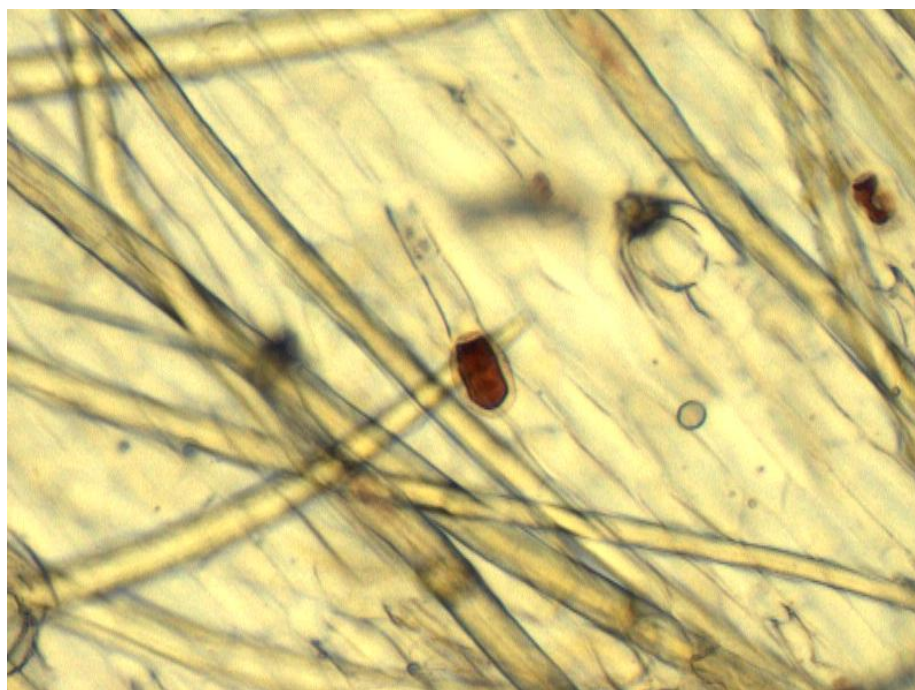


Рисунок П11 – Земляника лесная. Фрагмент листа с головчатым волоском (Увел. 100×)



Рисунок П12 – Земляника лесная. Фрагмент листа с ромбическими кристаллами оксалата кальция по жилкам (Увел. 40×)

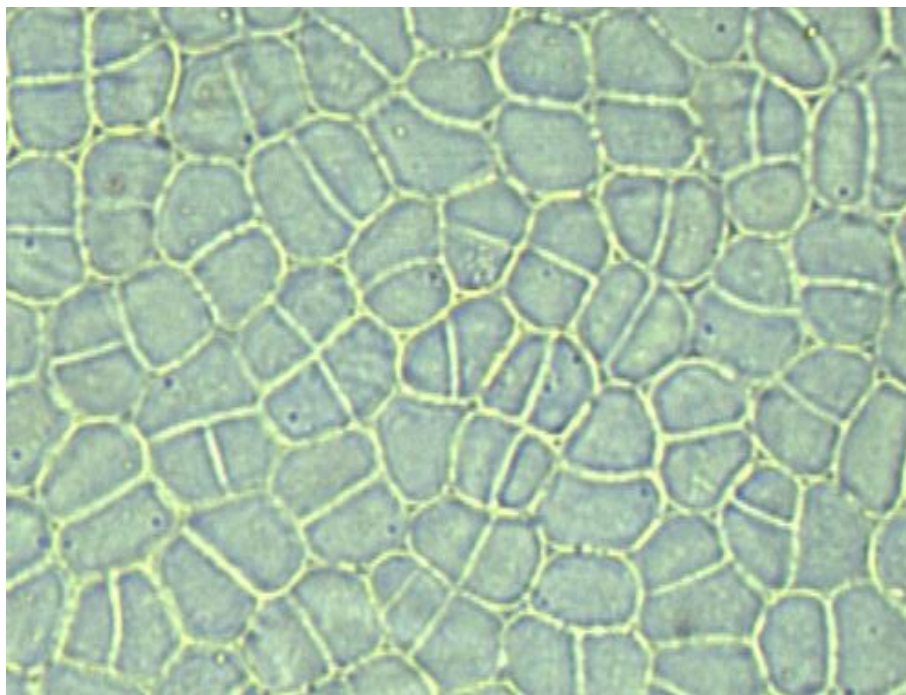


Рисунок П13 – Шиповник. Фрагмент наружного эпидермиса гипантия с окончатými клетками (Увел. 100×)

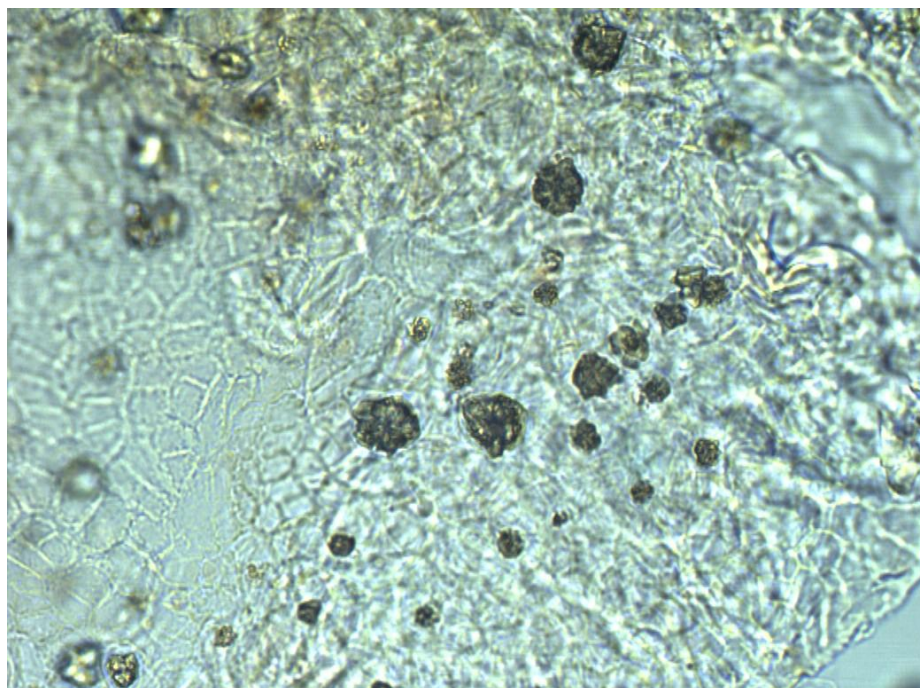


Рисунок П14 – Шиповник. Клетки паренхимы с друзами (Увел. 40×)



Рисунок П15 – Шиповник. Простые волоски с полостью (Увел. 40×)

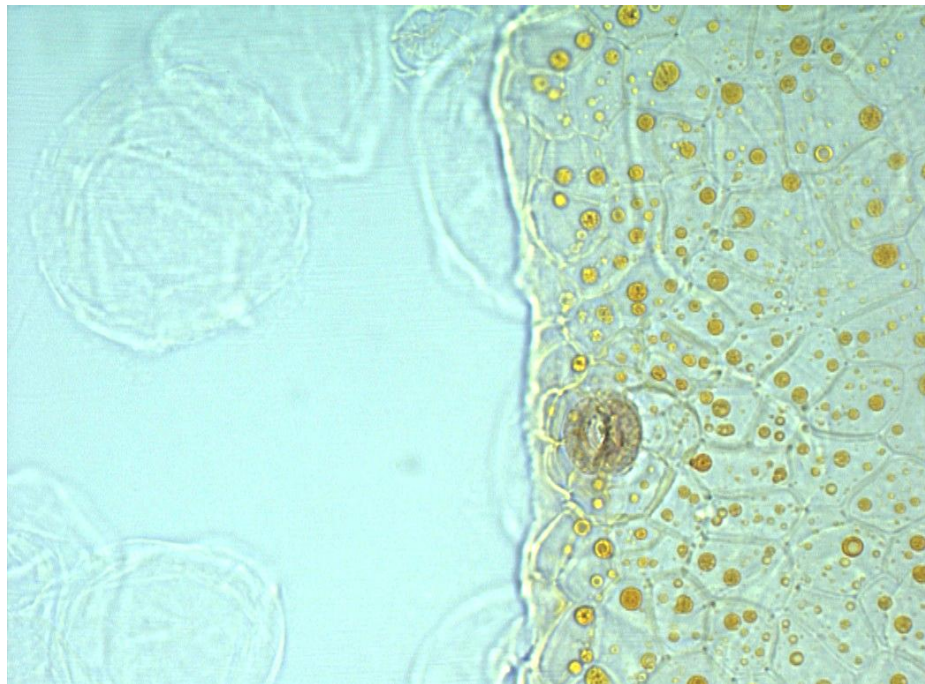


Рисунок П16 – Калина обыкновенная. Клетки эпидермиса с оранжевым содержимым, клетки мякоти. Устьице (Увел. 100×)

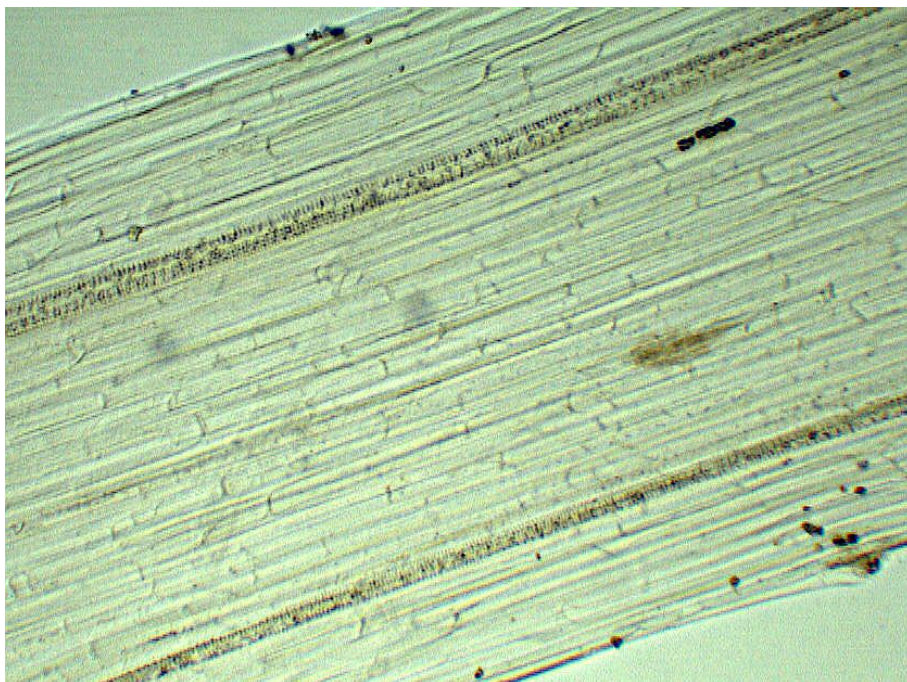


Рисунок П17 – Кукуруза. Клетки эпидермиса столбика кукурузы, проводящие пучки (Увел. 40×)



Рисунок П18 – Семена лимонника. Одревесневшие клетки семенной кожуры (Увел. 100×)



Рисунок П19 – Семена лимонника. Тонкостенные прямоугольные клетки с включениями капель масла (Увел. 100×)



Рисунок П20 – Семена лимонника. Клетки эндосперма и одревесневшие клетки механической ткани (Увел. 100×)

- слабоизвилистые стенки клеток верхнего (длиной 23-69 мкм, шириной 20-48 мкм) и нижнего эпидермиса частиц листовой пластинки (длиной 20-56 мкм, шириной 16-39 мкм). Устьица (длиной 25-34 мкм, шириной 18-25 мкм), окружены двумя околоустьичными клетками, расположенными параллельно устьичной щели (парацитный тип). На нижней стороне листа имеются железки длиной 145-220 мкм состоящие из многоклеточной ножки, постепенно переходящей в овальную многоклеточную головку с коричневым содержимым (листья брусники);
- фрагменты листовых пластинок с прямостенными изодиаметрическими клетками верхнего эпидермиса (длиной 40-68 мкм, шириной 18-30 мкм) местами с четко-видными утолщениями. Клетки нижнего эпидермиса (длиной 60-76 мкм, шириной 15-26 мкм) с извилистыми стенками. Устьица (длиной 15-25 мкм, шириной 12-22 мкм) аномоцитного типа. Волоски (длиной 562-1656 мкм) многочисленные, простые, одноклеточные, толстостенные, с узкой полостью, расширяющейся у основания. Головчатые волоски на 1-4 клеточной ножке с одноклеточной овальной головкой с коричневым содержимым. В местах прикрепления волосков клетки эпидермиса образуют розетку. В мезофилле листа вдоль жилок находятся многочисленные ромбические кристаллы и друзы оксалата кальция (листья земляники);
- обрывки наружного эпидермиса гипантия, состоящие из многоугольных неравномерно утолщенных клеток (длиной 15-52 мкм, шириной 13-30 мкм), обрывки тонкостенной паренхимной ткани (длиной 15-52 мкм, шириной 13-30 мкм), клетки которой содержат оранжево-красные глыбки каротиноидов и друзы, на поверхности внутреннего эпидермиса гипантия встречаются волоски или чаще места их прикрепления, многочисленные одноклеточные волоски с полостью (плоды шиповника);
- обрывки эпидермиса плода (длиной 24-80 мкм, шириной 18-50 мкм) с многоугольными четковидно-утолщенными стенками клеток с обильным красно-оранжевым содержимым, обрывки мякоти плода из очень крупных

тонкостенных клеток (диаметром до 200 мкм), устьица, окруженные кольцом нескольких околоустьичных клеток (плоды калины);

- обрывки столбиков с удлинёнными узкими клетками эпидермиса с прямыми стенками. На эпидермисе расположены редкие простые волоски двух типов: продольно-спаянные многоклеточные волоски с заостренной или конической верхушкой, состоящие из 2 – 3 ярусов клеток в длину, и многоклеточные тонкостенные, изогнутые. В паренхиме двух узких сторон столбиков и рылец проходят два параллельных проводящих пучка с хорошо заметными спиральными сосудами (столбики с рыльцами кукурузы);

- частицы механической ткани семенной кожуры, состоящей из слоя крупных радиально вытянутых прямоугольных клеток (длиной 65-132 мкм, шириной 32-88 мкм), с утолщенными одревесневшими темно-желтыми оболочками, пронизанными порами. Под ними расположены в несколько слоев сильно одревесневшие многоугольные каменистые клетки. Отдельные каменистые клетки неправильной формы (длиной 81-100 мкм, шириной 40-70 мкм). Очень крупные тонкостенные прямоугольные клетки (длиной 45-80 мкм, шириной 35-68 мкм), содержащие маслянистые включения в виде капель лимонно-желтого цвета. Обрывки эндосперма семени состоят из небольших многоугольных округлых клеток (длиной 19-50 мкм, шириной 20-45 мкм), содержащих капли жирного масла и мелкие алейроновые зерна (семена лимонника).

Хроматография.

1. Аналитическую пробу сбора измельчают до размеров частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм.

Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 95% спирта этилового и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытываемый раствор). Аналогичным образом готовят извлечение из семян лимонника.

На линию старта хроматографической пластинки TLC Silica gel 60 F₂₅₄ фирмы Merck размером 100 x 100 мм наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм 20 мкл испытуемого раствора и параллельно 10 мкл извлечения из семян лимонника. Пластинку подсушивают на воздухе в течение 10 минут и помещают в камеру со смесью растворителей толуол : этилацетат : уксусная кислота (70:33:3) (предварительно насыщенную системой в течение 5 минут) и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет 55 мм от линии старта пластинку вынимают из камеры, высушивают для удаления следов растворителя и просматривают в УФ свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаружиться не менее 8 темных зон совпадающих с таковыми в треке семян лимонника (рис. П21) с Rf около 0,29; 0,33; 0,37; 0,43; 0,49; 0,57; 0,67; 0,72.

Затем хроматограмму проявляют путем погружения в раствор сернокислого реактива на 1 сек. Хроматограмму высушивают в сушильном шкафу при температуре 150⁰ С в течение 5 мин. После проявления хроматограмму просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм и в видимом свете. На хроматограмме испытуемого раствора должны проявиться дополнительные зоны с серой и оранжевой флуоресценцией с Rf около 0,76, 0,89 на уровне зон адсорбции в семенах лимонника (рис. П22, П23). Допускается наличие дополнительных зон в испытуемом растворе с Rf около 0,11, 0,17, 0,22 с желто-коричневой флуоресценцией и зона имеющая розовую флуоресценцию с Rf около 0,46.

Результаты анализа считаются достоверными, если относительная ошибка (S) величины Rf обнаруживаемых зон не превышает 5%.

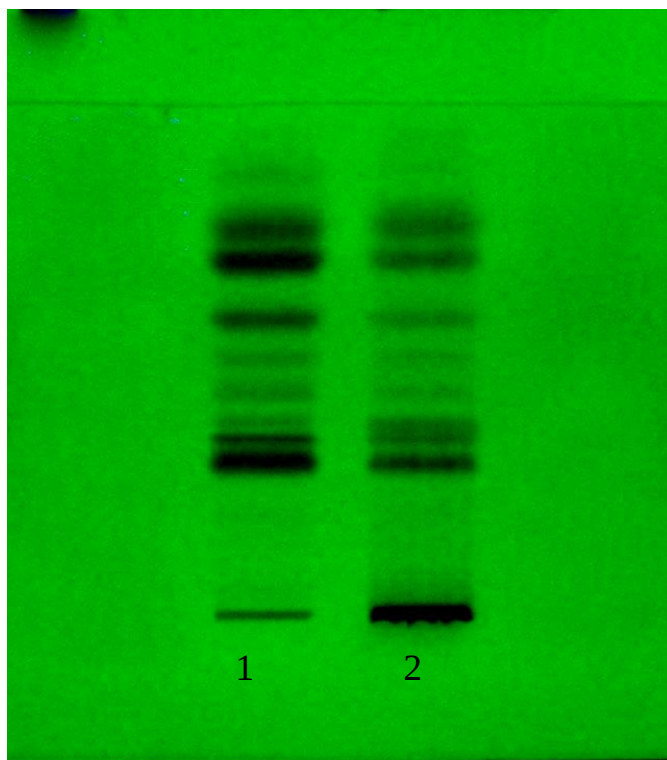


Рисунок П21 – Хроматограмма испытуемого раствора (2) и извлечения из семян лимонника (1) в УФ свете при длине волны 254 нм

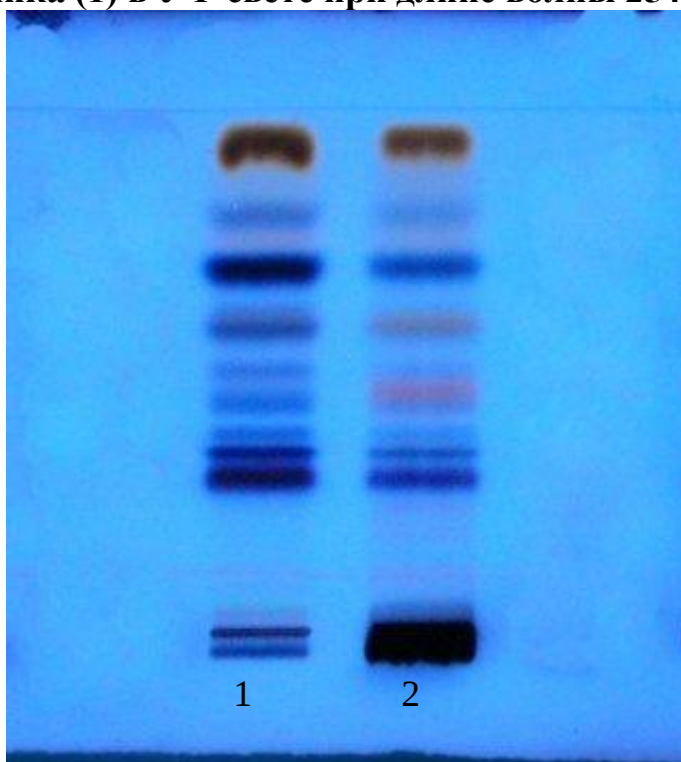


Рисунок П22 – Хроматограмма испытуемого раствора (2) и извлечения из семян лимонника (1) в УФ свете при длине волны 365 нм после проявления

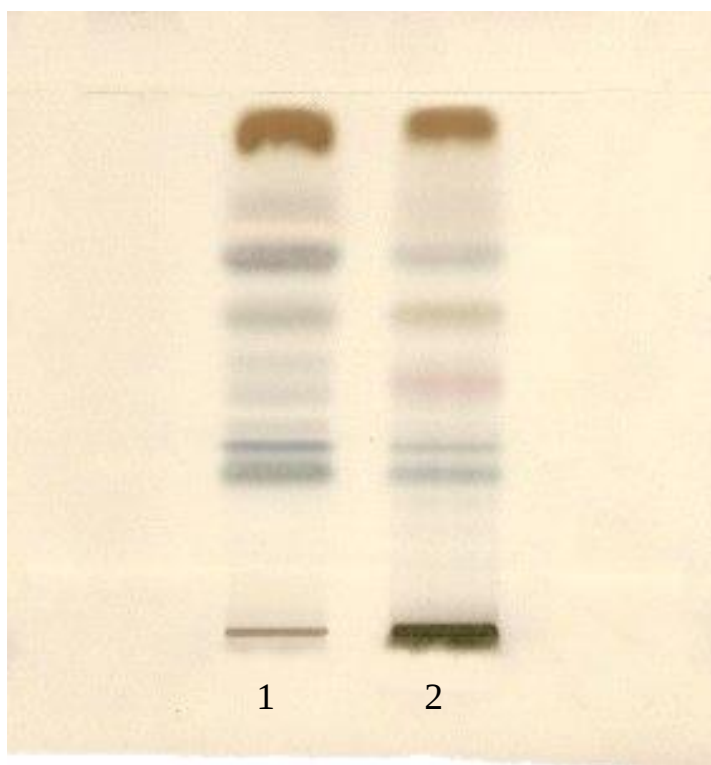


Рисунок П23 – Хроматограмма испытуемого раствора (2) и извлечения из семян лимонника (1) в видимом свете после проявления

2. Аналитическую пробу сбора измельчают до размеров частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм.

1 грамм измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 70% спирта этилового и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки TLC Silica gel 60 F₂₅₄ фирмы Merck размером 100 x 100 мм наносят в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм 10 мкл испытуемого раствора и параллельно 3 мкл раствора ГСО гиперозида. Пластинку подсушивают на воздухе в течение 10 минут и помещают в камеру со смесью растворителей этилацетат : муравьиная кислота : вода (80:8:12) (предварительно насыщенную системой в течение 20 минут) и хроматографируют восходящим способом.

После прохождения фронтом растворителей 70 мм пластинку вынимают из камеры, высушивают для удаления следов растворителя. Затем пластинку опрыскивают 10% раствором алюминия хлорида, высушивают в сушильном

шкафу при 100-105⁰ С в течение 2-3 минут и просматривают в УФ свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора ГСО гиперозида должна обнаруживаться зона с флюоресценцией желто-зеленого цвета с R_f около 0,4, принятой за $R_s=1,0$. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться широкая зона адсорбции на уровне зоны адсорбции ГСО гиперозида желто-зеленого цвета с $R_s=1,0$ (рис П24). На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться не менее восьми основных зон: семь зон с желтой флуоресценцией с R_s (по гиперозиду) около 0,3; 0,5; 1,0; 1,2; 1,5; 1,7; 1,9 и зона с желто-зеленой флуоресценцией с R_s около 2,1. Дополнительно на хроматограмме испытуемого раствора кроме основных зон адсорбции допускается наличие дополнительных зон со слабой синей флуоресценцией с R_s около 0,8 и 2,5; с желтой флуоресценцией с R_s около 0,7 и допускается широкая зона адсорбции с ярко голубой флуоресценцией от линии старта до значения $R_s = 0,2$.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

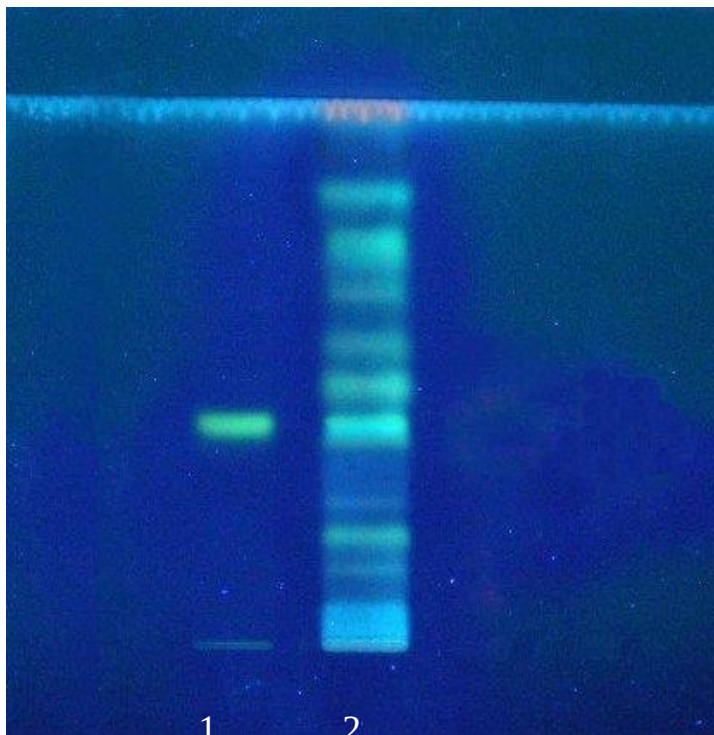


Рисунок П24 – Хроматограмма флавоноидов испытуемого раствора (2) и раствора ГСО гиперозида (1).

Примечания

1. Проверка пригодности хроматографической системы.

Рассчитывают критерий разрешения между зонами с R_s около 1,0 и 1,2 по формуле:

$$R = \frac{Z_1 - Z_2}{2 * (\sigma_2 - \sigma_1)} ,$$

где Z_1 – расстояние от линии старта до середины зоны с R_s около 1,2, мм; Z_2 – расстояние от линии старта до середины зоны с R_s около 1,0, мм; σ_1 , σ_2 – расстояние между верхней и нижней границами каждой из указанных зон (ширина зон), мм.

Критерий разрешения зон должен быть не менее 1,0.

Относительная ошибка величины R_s рассчитывается по формуле:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S \cdot 100}{\sqrt{n \cdot \bar{x}}} ,$$

где S – стандартное отклонение; n – x –
среднее значение величины R_s , рассчитанное от 3-х повторностей.

Относительная ошибка величины R_s должна быть не более 5%.

2. Приготовление раствора ГСО гиперозида.

Около 0,05 г (точная навеска) ГСО гиперозида, высушенного при температуре 100-105 °С до постоянной массы, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл 95% спирта этилового и нагревают на водяной бане в колбе с обратным холодильником до полного растворения кристаллов. После охлаждения раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 95% спиртом этиловым до метки и перемешивают.

3. Приготовление 10% раствора алюминия хлорида. 18 г алюминия хлорида гексагидрата (ГОСТ 3759-75) растворяют в спирте этиловом 95% в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора этим же

растворителем до метки. Срок годности раствора 1 месяц при хранении в хорошо укупоренной таре.

4. Приготовление сернокислого реактива. К 90 мл холодной воды очищенной осторожно, при помешивании приливают 10 мл серной кислоты концентрированной.

УФ-спектр. В мерную колбу, вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение»), доводят спиртом этиловым 70 % до метки и перемешивают. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 70 %. УФ-спектр поглощения испытуемого раствора в области длин волн от 220 нм до 320 нм должен иметь максимум в интервале 272-285 нм и минимум поглощения в интервале 256-262 нм.

Числовые показатели. *Измельченное сырье.* Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,6 %; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 25 %; влажность не более 10 %; золы общей не более 10 %; золы, не растворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной не более 2 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм, не более 2 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм, не более 5 %, органической примеси не более 2%, минеральной примеси не более 2 %.

Порошок. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,6 %; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 25 %; влажность не более 10 %; золы общей не более 10 %; золы, не растворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной не более 2 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, не более 3 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,2 мм, не более 6 %.

Примечание. Отбор средней и аналитических проб в соответствии с ОФС 42–0013–03. Масса средней пробы – 250 г. Масса аналитической пробы для определения подлинности измельченности и содержания примесей – 50 г, влажности – 25 г, золы и действующих веществ – 100 г.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с методами ОФС 42-0067-07, Категория 4А.

Масса содержимого упаковки. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОСТ 64-492-85 «Средства лекарственные. Допустимые отклонения на промышленное фасование» и ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб».

Количественное определение

1. *Определение содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой.* Аналитическую пробу измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл воды очищенной и далее поступают, как указано в статье «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье» ГФ XI, вып. 1, с. 295.

2. *Определение содержания суммы флавоноидов.* Аналитическую пробу измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, Около 2 г (точная навеска) измельченного сбора помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 70 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом этиловым 70 %, в мерную колбу вместимостью 200 мл, избегая попадания частиц сырья на фильтр. В колбу со шлифом прибавляют 80 мл спирта этилового 70 % и экстракцию повторяют. После охлаждения извлечение фильтруют в ту же мерную колбу. Сырье в колбе дважды промывают 10 мл спирта этилового 70 % и фильтруют в ту же мерную колбу. Доводят объем раствора в мерной колбе спиртом этиловым 70 % до метки тем же растворителем и перемешивают (раствор А).

5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 10 % раствора алюминия хлорида и 0,1 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки и перемешивают.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 408 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 5 мл раствора А, 0,1 мл уксусной кислоты и спирт этиловый 95 % до 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО рутина: 1 мл раствора ГСО рутина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 10 % раствора алюминия хлорида, 0,1 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки и перемешивают. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 1 мл раствора ГСО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты и спирт этиловый 95 % до 25 мл. Измерения проводят аналогично испытуемому раствору.

Содержание флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W) \cdot 100 \cdot 25 \cdot 5} = \frac{D_1 \cdot a_0 \cdot 4000}{D_0 \cdot a_1 \cdot (100 - W)},$$

где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина; a – масса сырья, в граммах; a_0 – масса ГСО рутина, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Примечания

1. Приготовление раствора ГСО рутина. Около 0,05 г (точная навеска) ГСО рутина (ФС 42-2508-87), высушенного при T 130-140°C до постоянной массы, растворяют при нагревании на водяной бане в 80 мл спирта этилового 70% в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора тем же растворителем после охлаждения до метки. Срок годности раствора 1 месяц.

2. Приготовление 10% раствора алюминия хлорида. 18 г алюминия хлорида гексагидрата (ГОСТ 3759-75) растворяют в спирте этиловом 95% в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора этим же растворителем до метки. Срок годности раствора 1 месяц при хранении в хорошо закупоренной таре.

Упаковка. В соответствии с ГОСТ 6077–80 и ГОСТ 17768–90 и ГФ XI, вып. 2, с. 381.

«Ангро». Измельченное сырье или порошок упаковывают по 10 кг и 15 кг в мешки бумажные многослойные по ГОСТ 2226-88.

Пачки. Измельченное сырье фасуют по 50 г, 100 г в пачку картонную по ГОСТ 12303–80 или по ГОСТ 12301-81, с внутренним пакетом бумажным по ГОСТ 24370-80, изготовленным из бумаги оберточной марки «А» по ГОСТ 8273-75 или подпергамента по ГОСТ 1760-86. Пачки картонные изготавливаются из картона по ГОСТ 7933-89, или картона типа «хром-эрзац» по ТУ 5453-015-04766356-95. Допускается нанесение текста инструкции по применению на пачку.

Фильтр-пакеты. Порошок фасуют по 3 г в фильтр-пакеты, изготовленные из бумаги термосвариваемой пористой неразмокаемой по ТУ 13-7308001-770-88 или импортной, разрешенной к использованию МЗ РФ. По 20 фильтр-пакетов помещают в пачку картонную по ГОСТ 12303-80, изготовленную из бумаги для упаковывания пищевых продуктов по ГОСТ 7247-90, или картона типа «хром-эрзац» по ТУ 5453-015-04766356-95. Допускается нанесение текста инструкции по применению на пачку.

Транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка. В соответствии с ГОСТ 6077-80, ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 2, с. 384.

«Ангро». Измельченное, порошок. На этикетке указывают наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак, юридический адрес (телефон, факс), наименование лекарственного средства на русском языке, состав сбора, массу 10 кг или 15 кг при влажности 10 %, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код, номер серии, «Годен до», «Продукция прошла радиационный контроль по СанПиН 2.3.2.560-96».

Пачки. Измельченное. На пачке указывают: наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак, юридический адрес (телефон, факс), наименование лекарственного средства на русском языке, состав сбора, массу

50 г или 100 г при влажности 10 %, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код, номер серии, «Годен до», «Продукция прошла радиационный контроль по СанПиН 2.3.2.560-96», «Отпускается без рецепта», назначение, способ применения.

Фильтр-пакеты. Порошок. На пачке с фильтр-пакетами указывают: наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак, юридический адрес (телефон, факс), наименование лекарственного средства на русском языке, состав сбора, массу содержимого одного фильтр-пакета 3 г при влажности 10 %, 20 фильтр-пакетов в пачке, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код, номер серии, «Годен до», «Продукция прошла радиационный контроль по СанПиН 2.3.2.560-96», «Отпускается без рецепта», назначение, способ применения.

Маркировка транспортной упаковки в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 6077-80, ГОСТ 17768-90 и ГФ XI, вып. 2, с. 385.

Хранение. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI, вып. 1, с. 296.

В сухом защищенном от света месте.

Срок годности. Измельченное сырье – 3 года. Порошок – 2 года.

Примечание. Методы анализа, реактивы и методики определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи XI издания, вып. 1, 2.

Приложение 2

Отчет о специфической активности сбора противооксидантного

Заболевания мочевыделительной системы классифицируют по этиопатогенезу на инфекционно-воспалительные, иммуновоспалительные, токсические и заболевания при нарушениях обмена веществ. Клинически различают острые и хронические формы болезней. Анатомически отдельно выделяют заболевания с преимущественным поражением клубочков, канальцев или интерстиция почек. Гломерулонефриты (ГН) представляют собой группу заболеваний почек, общим признаком которых является поражение клубочков нефронов. Морфологически гломерулонефриты подразделяются на следующие гистологические варианты: минимальные изменения, мембранозный ГН, фокально-сегментарный ГН, мезангиальный ГН, мезангио-пролиферативный ГН, синдром Гудпасчера (Окороков А.Н., 2003). Причинами развития гломерулонефритов часто являются бактериальные инфекции, вирусы (в том числе гепатита В и С) и токсины.

Гломерулонефриты связаны с различными типами иммунного воспаления в почечной ткани и могут быть или отдельными нозологическими единицами, или частью иммунной патологии, например васкулитов, аутоиммунных болезней.

Представленный образец измельченного сырья, заготовленного в 2006 году, был изучен на модели экспериментального гломерулонефрита.

С целью установления специфической активности сбора у животных моделировали хроническую патологию почек. Для оценки эффективности проводимой терапии определяли фоновые биохимические (креатинин, мочевины, общий белок, псевдохоллинэстераза) и иммунологические (циркулирующие иммунные комплексы, криоглобулины) показатели крови и мочи. По окончании курса терапии исследуемым сбором и препаратом сравнения канефроном Н оценивали изменение выше перечисленных показателей.

2. Материалы и методы

Существенные изменения наблюдали на 28-е сутки. В контроле происходило значимое увеличение концентрации ЦИК, криоглобулинов, что свидетельствовало о выраженности иммуно-воспалительного процесса. Данные представлены в таблице П1.

Таблица П1 – Влияние изучаемого сбора на биохимические и иммунологические показатели крови при гломерулонефрите

Группа/препарат	ЦИК, %	КГ, ед. ОПх100	Креатинин, мкМ/л	Мочевина, мм/л	Общий белок, г/л
11-е сутки					
Интактные	12±2	1,0±0,4	54±5	4,3±0,2	74±6
Контроль	32±4*	4,4±0,5*	106±8*	7,5±0,2*	55±4*
Канефрон Н, 3,0 мл/кг	29±4*	3,2±0,6*	92±7*	6,4±0,2*	56±3*
СПО, 5,0 мл/кг	30±6*	3,1±0,3*	96±9*	6,9±0,4*	56±9*
СПО, 20,0 мл/кг	27±3*	4,0±0,2*	94±7*	6,7±0,3*	57±4*
28-е сутки					
Интактные	10±5	0,9±0,5	61±4	3,9±0,5	75±4
Контроль	47±4*	6,1±0,6*	174±7*	8,9±0,2*	32±3*
Канефрон Н, 3,0 мл/кг	22±6 */**	2,9±0,2*/**	105±6*/**	5,0±0,3**	66±5**
СПО, 5,0 мл/кг	33±5*/**	5,8±0,3*	116±5*/**	5,9±0,2**	51±4**
СПО, 20,0 мл/кг	20±6*/**	2,2±0,5*/**	83±8*/**	5,6±0,3**	66±3**

Примечание: * отличия значимы по сравнению с интактными, $p<0,05$;

**отличия значимы по сравнению с контролем, $p<0,05$;

Канефрон Н оказал значимое влияние на большинство лабораторных показателей крови при АИГ. Так, при введении его в дозе 3,0 мл/кг на 28 –е сутки отмечали существенное снижение уровней ЦИК, криоглобулинов, мочевины и креатинина по сравнению с контрольной группой. Содержание общего белка крови возрастало при использовании этого фитопрепарата.

Изучаемый настой сбора противооксалатного (СПО) снижал выраженность иммунологических показателей, наиболее активно при введении в дозе 20 мл/кг. Азотемия также существенно снижалась, что свидетельствовало об улучшении депурационной функции почек при использовании данного сбора.

По способности восстанавливать диурез, исследуемый сбор не уступал препарату сравнения канефрону Н. Наряду с увеличением водновыделительной способности почек, отмечали уменьшение эритроцитурии. Реакция мочи смещалась в сторону увеличения рН. В мочевых осадках увеличивалось содержание аморфных фосфатов, оксалатов не отмечали. Данные представлены в таблице П2.

Таблица П2 – Влияние настоя СПО на выделительную функцию почек при гломерулонефрите

Группа/ препарат	Диурез, % от нагрузки/ 4 часа	Белок, г/л	Эритроциты, клет./мкл	ПХЭ Е/мг белка
Интактные	93±5	0,30±0,05	0±5	0,13±0,04
Контроль	32±6*	2,75±0,34*	420±50*	2,17±0,11*
Канефрон Н, 3,0 мл/кг	73±4*/**	0,62±0,10*/**	25±13*/**	1,09±0,16*/**
ННК, 5,0 мл/кг	54±7*/**	1,61±0,09*/**	50±3*/**	2,18±0,10*
ННК, 20,0 мл/кг	69±5*/**	0,78±0,06*/**	25±10*/**	1,65±0,09*/**

Примечание: * отличия значимы по сравнению с интактными, $p<0,05$;

** отличия значимы по сравнению с контролем, $p<0,05$;

При морфологическом изучении почек установлено, что препарат сравнения и изучаемый сбор умеренно снижали выраженность патологических изменений: отечность стромы, гиперемию клубочков, петельчатость капилляров, канальцевую дистрофию и лейкоцитарную инфильтрацию. Данные морфологического исследования в виде суммарного индекса патологии почек представлены на рисунке П25.

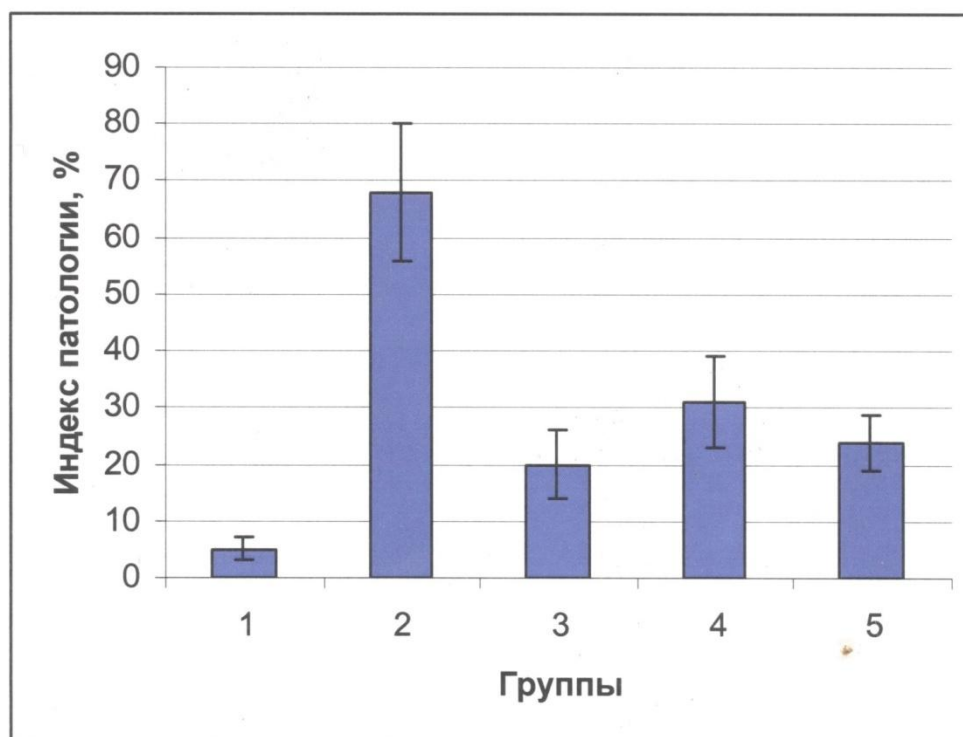


Рисунок П25 – Выраженность морфологических изменений при гломерулонефрите Группы: 1 - интактные; 2 - контроль; 3 - канефрон Н; 4 - СПО, 5 мл/кг; 5 - СПО, 20 мл/кг

Таким образом, исследуемый сбор положительно влиял на основные показатели гломерулонефрита: способствовал восстановлению диуреза, уменьшению протеинурии, снижению азотемии, криоглобулинемии и уровня циркулирующих иммунных комплексов. По ряду показателей в дозе 20 мл/кг настой сбора не уступал по нефропротекторной активности препарату сравнения канефрону Н.

Из сырья получали настой на воде очищенной в соотношении 1:50 (сырье- готовое извлечение) методом горячей мацерации.

Аутологичный иммунокомплексный нефрит Хейманна воспроизводили у крыс самцов линии BD-9 Dark Agouty массой 160-180 г по Albin (1982) путём однократной иммунизации животных. Иммунотоксин вводили из расчёта 1 мл на 100 г массы тела крысы внутрибрюшинно. Препарат сравнения и настой сбора (СПО) вводили внутривентрикулярно атравматическим зондом с помощью дозирующего устройства.

Через 10 дней всех проиммунизированных животных помещали в обменные клетки и оценивали нагрузочный диурез. По результатам анализа мочи и выявления протеинурии и эритроцитурии животных разделяли на группы. В крови животных определяли показатели иммунной реакции - уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), криоглобулинов; выраженность нефротического синдрома - по уровню креатинина, мочевины, общего белка. Определяли диурез после водной нагрузки. В моче определяли уровень белка, активность псевдохолинэстеразы, а также проводили микроскопическое исследование мочевых осадков. Проводили морфологическое изучение срезов почек, окрашенных гематоксилин-эозином.

Для проведения биохимических исследований получали сыворотку после полного сворачивания крови или плазму. При необходимости, сыворотки и плазмы хранили в замороженном виде. Мочу для определения маркёров повреждения почек также центрифугировали и хранили в холодильнике.

В исследованиях пользовались унифицированными методами лабораторной диагностики, приборами и стандартными наборами реактивов фирмы «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург.

Содержание креатинина определяли по реакции Яффе псевдокинетическим методом. Концентрацию мочевины - уреазным фенолгипохлоритным методом. Общий белок определяли биуретовым методом.

Определение циркулирующих иммунных комплексов (метод 1)

Принцип метода

Для определения циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) использовали ПЭГ-метод. Полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 дальтон в низкой концентрации преципитировал растворимые комплексы антиген-антитело с различной молекулярной массой (агрегация ЦИК). Степень помутнения сыворотки в присутствии ПЭГ-6000 определяли на спектрофотометре при 450 нм по отношению к соответствующему контролю.

Процедура анализа

Около 3 мл крови инкубировали при 37°C в течение 2 часов для осаждения грубодисперсных белков. Затем пробы центрифугировали при 2000 об/мин 15 мин. Полученную сыворотку разводили боратным буфером (0,2 мл сыворотки + 0,4 мл буфера). В контрольную пробирку вносили 0,2 мл разведённой сыворотки и 1,8 мл боратного буфера. В опытную пробирку - 0,2 мл разведённой сыворотки и 1,8 мл раствора ПЭГ-6000 в боратном буфере. Обе пробы инкубировали при комнатной температуре 2 часа и определяли пропускание $T\%$ при 450 нм в 1 см кюветах.

Рассчитывали показатель $100 - T, \%$ как уровень циркулирующих иммунных комплексов.

Определение ЦИК по связыванию комплемента (Метод 2)

Для исследования необходима сыворотка крови или плазма, полученная на трилоне. Метод полуколичественный, выражается в $\%$ пропускания. Чувствительность около 10 мкг/мл агрегированного иммуноглобулина крови.

Процедура анализа

В сухие пробирки раскапывали по 20 мк насыщенного раствора ЭДТА, а затем по 200 мкл сыворотки или плазмы крови. Пробы встряхивали и помещали на водяную баню для инактивации собственного комплемента на 1 час.

По прошествии инактивации в лунки планшета раскапывали по 10 мкл не содержащей комплемента сыворотки или плазмы и в эти же лунки прибавляли по 10 мкл раствора комплемента 1:10. Планшет закрывали крышкой и инкубировали при комнатной температуре или в термостате (1 час или 30 мин соответственно).

После инкубации сывороток с комплементом в лунки приливали по 180 мкл 2,5 $\%$ раствора ПЭГ-6000 и оставляли для седиментации комплексов

антиген-антитело-комплемент. Через 60 мин измеряли абсорбцию растворов на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Абсорбцию растворов переводили в единицы пропускания по шкале ФЭКа и выражали концентрацию ЦИК в виде $100 - T, \%$.

В качестве контроля использовали 10 мкл комплемента, 10 мкл воды и 180 мкл 2,5 % раствора ПЭГ-6000. Контрольные пробы бланкировали.

Определение криоглобулинов

Принцип метода

Криоглобулины (КГ) представляют собой антитела к иммуноглобулинам и обладают аномальной способностью к обратимой преципитации при охлаждении их растворов. Наряду со стандартным методом определения криоглобулинов в течение 6 дней в клинике и эксперименте часто применяется быстрый фотометрический метод, который и был использован в данной работе.

Методика

1 мл сыворотки крови смешивали с 1 мл физиологического раствора натрия хлорида и разливали в две пробирки, одну из которых термостатировали при 37°C, а другую при 4°C в течение 1 часа. После инкубации в пробах определяли абсорбцию при 500 нм на спектрофотометре.

Расчёт

Содержание криоглобулинов (в единицах оптической плотности) рассчитывали по разности оптической плотности пробы при 4°C (A2) и 37°C (A1):

$$\text{КГ (Е.О.П.)} = (A2 - A1) \times 100 = \underline{\underline{A_{500}}} \times 100.$$

Определение псевдохолинэстеразы

Принцип метода

Псевдохолинэстераза (S-ПХЭ, ХЭ-2) представляет собой гликопротеид с М.в. 300000 Да. При взаимодействии эфиров тиохолина с холинэстеразой образуется эквивалентное количество свободного тиохолина, сульфгидрильные группы которого реагируют с ДТНБ (5,5-дитиобис-(2-нитробензойной

кислотой)). Фотометрическое определение интенсивно окрашенного продукта реакции (тиофенолят нитробензойной кислоты) позволяет выявить наличие и активность холинэстеразы в биожидкости.

Методика

В лунки планшета раскапывали по 50 мкл биожидкости (в контроле воды). Добавляли эквивалентный объем фосфатного буфера и смешивали на шейкере 3 минуты. Затем к содержимому лунок добавляли 50 мкл субстратной смеси (БТХ + ДТНБ), закрывали планшет крышкой и инкубировали в термостате ровно 15 минут. Реакцию останавливали добавлением ингибитора.

После остановки реакции пробы фотометрировали при 405 нм по программе IFA-Reader против контрольной пробы со спонтанным гидролизом БТХ.

Калибровку прибора проводили по растворам стандарта пропионилхолинэстеразы с активностью не менее 5 Е/мг. Из разведений готовили пробы, которые обрабатывали по вышеизложенной методике. В программе прибора строили кривую зависимости содержания ПХЭ от оптической плотности растворов.

Расчёт

$$\text{ПХЭ} = \frac{A(\text{п.})}{A(\text{ст.})} \times E \text{ (активность стандарта),}$$

где

A (п.) - оптическая плотность пробы при 405 нм;

A (ст.) - оптическая плотность стандарта при 405

нм; ПХЭ - содержание фермента в единицах на мг

белка.

Определение креатинина

Концентрацию креатинина определяли по цветной реакции с пикратом натрия (реакция Яффе) псевдокинетическим методом без депротеинизации для крови и мочи.

Процедура анализа

Рабочий реагент готовили в день эксперимента путем смешения равных объемов пикриновой кислоты и щелочи. Смесь реактивов инкубировали при 37°C в течение часа.

В кювету спектрофотометра помещали 400 мкл плазмы крови и прибавляли 2,5 мл рабочего реагента. Отмечали время внесения реактива и точно через 1 мин измеряли первую абсорбцию при 505 нм. Через 2 мин снова определяли абсорбцию. Аналогичную процедуру проводили со стандартным раствором креатинина разведенного предварительно в 100 раз.

Рассчитывали разность поглощения проб в опыте и стандарте и вычисляли содержание креатинина.

Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента с помощью программ статистической обработки. Вычисляли средние значения, их стандартные отклонения и доверительные интервалы при $P=0,05$.

3. Результаты

Все эксперименты выполнены в соответствии с требованиями этического комитета относительно работы с лабораторными животными. В работе использовались методы и приемы, сводящие к минимуму стресс и травматизацию животных. Эвтаназию осуществляли гуманным методом путем обескровливания под легким наркозом.

Оценку нефропротекторной активности проводили на 50 крысах самцах линии BD-9 массой 160-180 г. В группах было взято по 10 животных. Изучали

эффективность исследуемых препаратов и извлечений в режиме лечения. Данный подход позволял оценить способность препарата или извлечения стабилизировать лабораторные показатели, улучшать функциональную активность почек.

Через 10 дней после введения иммунотоксина всех опытных животных помещали в метаболические клетки для оценки функции почек. В моче регистрировали следующие показатели: рН, общий белок, эритроциты. Рандомизацию проводили таким образом, чтобы в опытных и контрольных группах были крысы с однородно близкими показателями массы тела и степени протеинурии.

Исследуемые препараты вводили ежедневно в течение 30 дней. На 11-е и 28-е сутки отбирали пробы крови и собирали мочу для определения специфических маркеров АИГ.

Тяжесть гломерулонефрита постепенно усиливалась со значимыми изменениями лабораторных показателей на 11-е сутки. В контрольной группе отмечали существенное увеличение концентрации циркулирующих иммунных комплексов, криоглобулинов, мочевины и креатинина. Содержание общего белка снижалось, отмечали умеренную протеинурию и эритроцитурию.

При оценке эффективности проводимого лечения на ранних сроках (11-е сутки) значимых изменений лабораторных показателей в положительную сторону не отмечали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа полученных данных было установлено, что изучаемый сбор противооксалатный обладает нефропротекторной активностью на модели экспериментального гломерулонефрита Хейманна.

Нефропротекторная активность сбора реализуется вероятно, через нормализацию уродинамики, уменьшение выраженности аутоиммунных процессов в клубочках почек и ангиопротекторное действие.

Приложение 3

Акты внедрения

ГУЗ «Центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»
министерства здравоохранения Хабаровского края»
680011, г. Хабаровск, ул. Советская, 34

АКТ
апробации и внедрения

В ГУЗ «Центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» апробирована методика определения флавоноидов в противооксалатном сборе.

Методика разработана на кафедре фармакогнозии и ботаники Дальневосточного государственного медицинского университета аспирантом Е.В. Загузовой под руководством д.ф.н., профессора Т.А. Степановой.

Методика заключается в определении суммы флавоноидов в сборе противооксалатном методом дифференциальной спектрофотометрии.

Методика чувствительна, воспроизводима, исключает использование токсичных реагентов.

Разработанная методика рекомендуется для определения количественного содержания флавоноидов и включения в проект нормативной документации на сбор противооксалатный.

Директор ГУЗ «ЦКК и

21.04.2008



Мас

А.И.Мостицкая

**КГКУЗ «Центр контроля качества и сертификации
лекарственных средств»
министерства здравоохранения Хабаровского края
(680011, г.Хабаровск, ул.Советская, 34)**

**АКТ
апробации и внедрения**

В Краевом государственном казенном учреждении здравоохранения «Центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» министерства здравоохранения Хабаровского края апробирована методика определения суммы флавоноидов в листьях земляники восточной.

Методика разработана на кафедре фармакогнозии и ботаники Дальневосточного государственного медицинского университета доцентом кафедры Г.Я. Мечиковой, профессором кафедры Т.А. Степановой и соискателем кафедры Е.В. Загузовой.

Валидационная оценка методики показала, что она специфична, линейна, правильная и прецизионна в условиях повторяемости и воспроизводимости.

Методика чувствительна, исключает использование токсичных и дорогостоящих реагентов, занимает минимум рабочего времени.

Разработанная методика рекомендуется для определения количественного содержания суммы флавоноидов и включена в проект нормативной документации на листья земляники восточной.

Директор КГКУЗ «ЦККиСДС»

07.02.2013



А.И. Мостицкая

**КГКУЗ «Центр контроля качества и сертификации
лекарственных средств»
министерства здравоохранения Хабаровского края
(680011, г.Хабаровск, ул.Советская, 34)**

**АКТ
апробации и внедрения**

В Краевом государственном казенном учреждении здравоохранения «Центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» министерства здравоохранения Хабаровского края апробирована методика определения суммы фенольных соединений в листьях земляники восточной.

Методика разработана на кафедре фармакогнозии и ботаники Дальневосточного государственного медицинского университета доцентом кафедры Г.Я. Мечиковой, профессором кафедры Т.А. Степановой и соискателем кафедры Е.В. Загузовой.

Методика заключается в определении суммы фенольных соединений в листьях земляники восточной методом спектрофотометрии.

Валидационная оценка методики показала, что она специфична, линейна, правильна и прецизионна в условиях повторяемости и воспроизводимости.

Методика чувствительна, исключает использование токсичных и дорогостоящих реагентов, занимает минимум рабочего времени.

Разработанная методика рекомендуется для определения количественного содержания суммы фенольных соединений и включена в проект нормативной документации на листья земляники восточной.

Директор КГКУЗ «ЦККиСЛС»
07.02.2013



А.И. Мостицкая

МИНЗДРАВ РОССИИ
государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ГБОУ ВПО ДВГМУ Минздрава России)

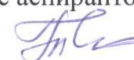
«Утверждаю»
Проректор по учебной работе
ГБОУ ВПО ДВГМУ
Минздрава России
Г.С. Томилка
2014 г.

АКТ

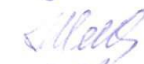
о внедрении в учебный процесс результатов диссертационной работы Е.В. Загузовой

Комиссия в составе: председателя Т.А. Степановой, заведующего кафедрой фармакогнозии и ботаники, д.ф.н, профессора, членов комиссии: Е.В. Чуевой, доц. кафедры, к.ф.н., Г.Я. Мечиковой, доц. кафедры, к.ф.н., составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Е.В. Загузовой «Фармакогностическое изучение и стандартизация сбора противооксалатного и листьев земляники восточной», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, используются в учебном процессе кафедры «Фармакогнозии и ботаники» при чтении лекций и проведении семинарских занятий, а также у студентов последипломного обучения и слушателей ФУП по темам: «Современные методы анализа лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов», «Заготовка лекарственного растительного сырья». Данные по разработке методик количественного определения используются при выполнении курсовых и дипломных работ, а также в работе аспирантов.

Председатель комиссии:

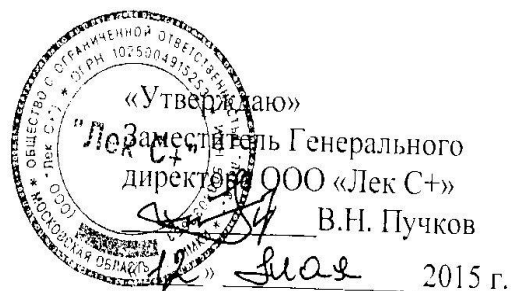
 Т.А. Степанова

Члены комиссии:

 Г.Я. Мечикова
 Е.В. Чуева

«Подписи Т.А. Степановой, Г.Я. Мечиковой,
Е.В. Чуевой заверяю»
Начальник отдела кадров П.Э. Кравцова





АКТ

о внедрении результатов кандидатской диссертационной работы Е.В. Загузовой

Комиссия в составе: председателя – начальника ОКК Литвиненко О.В., членов комиссии: заведующего лабораторией Минаевой Т.А., координатора производства Усачевой И.В. составила настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Е.В. Загузовой «Фармакогностическое изучение и стандартизация сбора противооксалатного и листьев земляники восточной», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, планируются к использованию в производственной деятельности ООО «Лек С+».

Предприятию передан проект фармакопейной статьи на сбор противооксалатный, разработанный соискателем кафедры фармакогнозии и ботаники Дальневосточного государственного медицинского университета Е.В. Загузовой, под руководством зав. кафедрой, д.ф.н., проф. Т.А. Степановой. Предприятие рассматривает вопрос о регистрации противооксалатного сбора и его производство на ООО «Лек С+».

Председатель комиссии: Литвиненко О.В. (Литвиненко О.В.)

Члены комиссии: Минаева Т.А. (Минаева Т.А.)

Усачева И.В. (Усачева И.В.)