На правах рукописи

Балагозян Эдгар Артурович

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ (URTICA DIOICA L.)

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Самара – 2017

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент ***Правдивцева Ольга Евгеньевна***

Официальные оппоненты:

Ханина Мениса Абдуллаевна **–** доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Министерства образования Московской области, заведующая кафедрой химии

Клен Елена Эдмундовна – доктор фармацевтический наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, профессор кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Казань

Защита диссертации состоится «__»_____2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса 165 Б)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2017/) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, Д 208.085.06
кандидат фармацевтических наук, доцент Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В рамках программ «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года», а также «Стратегия лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года» в настоящее время все большую актуальность приобретает разработка отечественных лекарственных препаратов. Препараты, полученные на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС), обладают рядом преимуществ по сравнению с синтезированными лекарственными средствами. Это, прежде всего, широта и мягкость терапевтического эффекта в сочетании с отсутствием значительного количества побочных эффектов и противопоказаний (Вайс Р.Ф., Финтельман Ф., 2004; Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2016; Самылина И.А. и др., 2010). Особенно это касается хронических заболеваний, когда прием лекарственных средств осуществляется в течение длительного периода.

Крапива двудомная (*Urtica dioica* L.) является лекарственным растением, листья которого широко применяются в качестве кровоостанавливающего средства. Другие части сырья крапивы двудомной в настоящее время в РФ не используются в качестве источника лекарственных препаратов. Однако известно, что за рубежом находят применение корневища с корнями крапивы двудомной. Данный вид сырья является источником получения лекарственных препаратов для лечения гиперплазии предстательной железы. Актуальной проблемой для современной медицины является эффективная терапия доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Однако ассортимент лекарственных препаратов для терапии данного заболевания на российском фармацевтическом рынке представлен в основном дорогостоящими синтетическими средствами иностранного производства. На наш взгляд, одним из перспективных растительных источников получения отечественных лекарственных средств для лечения аденомы предстательной железы являются корневища с корнями крапивы двудомной. Как известно, создание новых лекарственных препаратов начинается с вопросов углубленного изучения химического состава ЛРС, вопросов стандартизации для сырья и препаратов, а также проведения фармакологических исследований. Также необходимо отметить, что химический состав корневищ с корнями крапивы двудомной

изучен в недостаточной степени. Отсутствие широких сведений о химическом составе корневищ с корнями крапивы двудомной не позволяет успешно решать проблемы стандартизации, а также проработки рациональной технологии получения препаратов на основе данного сырья.

В связи с этим, актуальным вопросом является углубленное фармакогностическое изучение подземной части крапивы двудомной с целью научного обоснования целесообразности использования в медицинской практике корневищ с корнями крапивы двудомной.

Степень разработанности темы.

В медицинской практике Российской Федерации широко используются листья крапивы двудомной (ГФ РФ XIII изд.), однако другие виды сырья данного растения не применяются. Однако за рубежом имеется успешный опыт применения лекарственных препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной. В настоящее время в РФ отсутствуют методики стандартизации для корневищ с корнями крапивы двудомной. В литературных источниках имеются лишь некоторые сведения о химическом составе и фармакологических свойствах препаратов на основе корневищ с корнями, а также травы и плодов крапивы двудомной (Вайс Р.Ф., Финтельман Ф., 2004). При этом зарубежные источники неоднозначно трактуют фармакологические свойства биологически активных соединений (БАС) крапивы двудомной, называя в качестве действующих веществ разные группы соединений. Кроме того, отсутствует унифицированный подход к стандартизации корневищ с корнями крапивы двудомной.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование по обоснованию целесообразности применения в медицинской практике нового вида ЛРС «Крапивы двудомной корневища с корнями».

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проведение сравнительного морфолого-анатомического исследования корневищ с корнями крапивы двудомной и возможных примесных видов - крапивы жгучей и яснотки белой;

2. Проведение углубленного фитохимического исследования корневищ с корнями крапивы двудомной с выделением индивидуальных соединений;

3. Разработка методики качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной;

4. Разработка методики количественного определения содержания БАС в корневищах с корнями крапивы двудомной;

5. Сравнительное изучение химического состава различных органов крапивы двудомной и ее основных примесей на содержание различных групп БАС;

6. Изучение показателей качества ЛРС «Крапивы двудомной корневища с корнями»;

7. Обоснование целесообразности разработки способа получения жидкого и густого экстрактов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной;

8. Изучение диуретической активности густого экстракта на основе корневищ с корнями крапивы двудомной;

9. Разработка проекта фармакопейной статьи на новый вид ЛРС – «Крапивы двудомной корневища с корнями».

Научная новизна. Морфолого-анатомическое исследование подземной части крапивы двудомной, произрастающей в различных регионах Российской Федерации, позволило выявить диагностические признаки, характерные для корневищ с корнями крапивы двудомной. Для корневищ и корней крапивы двудомной характерен пучковый тип строения, в то время как корни крапивы жгучей, а также корни и корневища яснотки белой имеют на поперечном срезе непучковый тип строения.

Впервые в РФ в виде индивидуального соединения из корневища с корнями крапивы двудомной выделено вещество стериновой природы – эргостерин, являющийся доминирующим и диагностически значимым компонентом сырья данного растения.

Разработаны и обоснованы методики качественного анализа для корневищ с корнями крапивы двудомной, основанные на определении действующих веществ при помощи метода тонкослойной хроматографии (ТСХ), в котором

предусмотрено определение диагностически значимого компонента эргостерина. Кроме того, разработана и обоснована методика определения подлинности корневищ с корнями крапивы двудомной с использованием УФ-спектроскопии при аналитической длине волны 328 ± 2 нм продуктов взаимодействия стеринов с концентрированной серной кислотой.

Разработана и обоснована методика количественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной, основанная на прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 328 нм продуктов взаимодействия стеринов с концентрированной серной кислотой в пересчете на эргостерин.

Изучение химического состава различных образцов сырья крапивы двудомной в сравнительном аспекте позволило обосновать целесообразность применения подземной части наряду с листьями в рамках комплексного использования данного растения. Определена острая токсичность и диуретическая активность густого экстракта на основе корневищ с корнями крапивы двудомной.

Научная новизна диссертационных исследований подтверждается также патентом РФ №2599014 «Способ количественного определения стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной».

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны методики качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной методом ТСХ и УФ-спектроскопии, а также методика количественного определения содержания БАС стериновой природы в сырье в пересчете на эргостерин с использованием метода спектрофотометрии.

Обоснован способ получения жидкого экстракта из корневищ с корнями крапивы двудомной, заключающийся в экстракции сырья 70% спиртом этиловым.

Результаты диссертационных исследований внедрены в учебный процесс на кафедрах фармацевтической технологии, химии фармацевтического факультета, фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также в производственный процесс ЗАО «Самаралектравы» и в рабочий процесс ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования основана на изучении и систематизации литературных данных по фармакогностическому исследованию крапивы двудомной, на оценке актуальности и степени разработанности данной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

В качестве объектов исследования служили образцы сырья крапивы двудомной (как надземные, так и подземные части растения), собранные на территории РФ. Кроме того, были исследованы образцы сырья примесных растений (крапивы жгучей и яснотки белой), а также препараты, полученные из корневищ с корнями крапивы двудомной. Исследования проводили с использованием цифровой микроскопии, спектрофотометрии, ЯМР-спектроскопии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), масс-спектрометрии. Математическая обработка данных проводилась в соответствии с Государственной Фармакопеи РФ XIII издания, а также с использованием компьютерных программ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты морфолого-анатомических исследований подземных органов крапивы двудомной и возможных примесных видов.
2. Результаты фитохимического исследования корневищ с корнями крапивы двудомной.
3. Результаты исследований по разработке методики качественного анализа корневища с корнями крапивы двудомной (ТСХ и УФ-спектроскопия).
4. Результаты исследований по разработке методики количественного анализа веществ в корневищах с корнями крапивы двудомной (прямая спектрофотометрия с применением раствора эргостерина в качестве стандартного образца).
5. Результаты изучения химического состава разных видов сырья крапивы двудомной и ее основных примесей на содержание различных групп БАС.
6. Данные по изучению показателей качества ЛРС, включенные в проект ФС на новый вид ЛРС «Крапивы двудомной корневища с корнями».

7. Обоснование способа получения жидкого и густого экстрактов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной.

8. Обоснование целесообразности применения жидкого и густого экстрактов на основе нового вида лекарственного растительного сырья «Крапивы двудомной корневища с корнями» в медицинской практике.

Степень достоверности. Достоверность проведенных исследований подтверждена экспериментальными данными, полученными с помощью метода микроскопии, а также современных физико-химических и химических методов: ТСХ, УФ-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии.

Апробация работы. Материалы работы доложены и обсуждены на VI Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы использования и охраны природных ресурсов России» (г. Самара, 2012); на конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2013; 2014; 2015, 2016); на первой Всероссийской научно-практической конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва, 2013), на IX годичной научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием (г. Душанбе, 2014); на IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2014); 70 Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием (г. Екатеринбург, 2015); на Всероссийской конференции молодых ученых с Международным участием, посвященной 150-летию со дня рожденья академика Н.П. Кравкова (г. Рязань, 2015), в сборник научных трудов третьей научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века» (г. Москва, 2015), I межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2016).

Публикации. Основное содержание работы опубликовано в 26 научных работах, из них 7 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки РФ, и 1 патент РФ.

Внедрение результатов исследования. Полученные в результате диссертационных исследований данные используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической технологии, на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре управления и экономики фармации, на кафедре химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета. Кроме того, полученные результаты используются в рабочем процессе в ГБУ здравоохранения «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», а также ЗАО «Самаралектравы».

Личный вклад автора. Все приведенные экспериментальные результаты получены самим автором. Автором изучены морфологические и анатомо-гистологические особенности строения подземных органов крапивы двудомной, выявлены их диагностические признаки и отличия от примесных видов. С помощью колоночной хроматографии изучен химический состав корневищ с корнями крапивы двудомной, с выделением эргостерина и β-ситостерина в индивидуальном виде. Разработаны методики качественного и количественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной, которая заключается в определении веществ стериновой природы. Определена динамика накопления БАС стериновой природы для корневищ с корнями крапивы двудомной. Выбрана технология получения жидкого экстракта из корневищ с корнями крапивы двудомной, которая дает оптимальный выход веществ стериновой природы из сырья. Для густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной определена острая токсичность и диуретическая активность. Также проведено определение содержания в сырье крапивы двудомной суммы полисахаридов, белков и фенольных компонентов.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (№ Гос. регистрации 01200900568 до 28.04.2015; с 28.04.2015 № Гос. регистрации 115042810034; наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, изложенные в данной работе, соответствуют паспорту

научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 2 - «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 - «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 - «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье» и 6 - «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, полученные данные изложены в форме 23 таблиц и проиллюстрированы 29 рисунками. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 3 глав, в которых описаны результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения и списка литературы, включающего 149 источников, из которых 18 - на иностранных языках.

Во введении изложена актуальность темы исследования, сформулирована цель и задачи, определена научная новизна и практическая значимость проводимого исследования, приведены основные положения, выносимые на защиту, изложены сведения об апробации работы и публикациях.

Глава 1 посвящена обзору литературы отечественных и зарубежных авторов по состоянию исследований сырья крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.). В данной главе приведены имеющиеся сведения о химическом составе различных видов сырья крапивы двудомной и применению его в научной и народной медицине. Представлены подходы к стандартизации сырья крапивы двудомной, применяемые за рубежом и в РФ.

В главе 2 описаны объекты и методы исследования, методики идентификации и количественного определения содержания групп

биологически активных веществ в корневищах с корнями крапивы двудомной, а также в препаратах на ее основе.

Глава 3 содержит морфолого-анатомический анализ подземной части крапивы двудомной, а также сравнительные исследования корневищ с корнями крапивы двудомной и возможных примесных видов (корней крапивы жгучей и корневищ с корнями яснотки белой).

Глава 4 посвящена описанию результатов фитохимических исследований корневища с корнями крапивы двудомной. Приведены результаты выделения индивидуального БАС из подземной части крапивы двудомной, установление структуры. Также представлены результаты разработки методик качественного анализа сырья крапивы двудомной, методики определения количественного содержания БАС в сырье крапивы двудомной, результаты анализа динамики накопления действующих веществ в сырье крапивы двудомной, а также сравнительный фитохимический анализ возможных примесных видов сырья – корней крапивы жгучей и корневища с корнями яснотки белой.

Глава 5 посвящена описанию способа получения и стандартизации лекарственных препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной, а также исследованиям по оценке диуретической активности и острой токсичности разработанных препаратов корневищ с корнями крапивы двудомной.

Диссертация завершается заключением и списком литературы.

В приложениях представлены фотографии микропрепаратов корневищ с корнями крапивы двудомной, сравнительные таблицы морфолого-анатомических признаков корневищ с корнями крапивы двудомной и примесных видов, акты внедрения, проект фармакопейной статьи «Крапивы двудомной корневище с корнями», патент РФ № 2599014 «Способ количественного определения стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили образцы высушенных на воздухе корневищ с корнями, листьев, травы и семян крапивы двудомной *Urtica dioica* L., заготовленные в период с 2014 г. по 2016 г. на территории РФ. Также

изучены образцы сырья потенциально примесных видов растений - корни крапивы жгучей *Urtica urens* L., заготовленные на территории Самарской области, корневищ с корнями яснотки белой *Lamium albium* L., заготовленные на территории Пермского края. Образцы сырья собирали в разный вегетационный период с мая по сентябрь. Объектами исследования также служили жидкие экстракты и густой экстракт из корневищ с корнями крапивы двудомной и индивидуальные вещества – эргостерин, β-ситостерин, хлорогеновая кислота, рутин.

Морфолого-анатомическое исследование проводили с использованием цифровых микроскопов марки Motic: DM-111, DM-1802 и DM-39C-N9GO-A – с увеличениями х20, х40, х100, х400, х1000.

Изучения химического состава корневищ с корнями крапивы двудомной проводили методом адсорбционной колоночной хроматографии с использованием сорбента силикагель КСКГ (фр. 0,04-0,10 мм) ГОСТ 3956-76 (Чехия), полиамид марки «Wolem» (Германия). Вещества элюировали в градиентном режиме смесью гексана с хлороформом, хлороформа с этиловым спиртом, а также этилового спирта с водой в градиентном режиме.

Для анализа извлечений из сырья выделенных веществ и полученных экстрактов методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» (Россия).

Спектральные исследования проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) и СФ-2000 (ОКБ Спектр) в кюветах с толщиной слоя 10 мм. ^{1}Н-ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker AM300 SF=300.13 MHz. Масс-спектры электронного удара регистрировали на приборе «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и варьировании температуры ионного источника от 100 до 250 ^{0}С.

Получение жидких экстрактов осуществляли методом ремацерации и реперколяции. Два последних метода были использованы в двух вариантах: с нагреванием и без нагревания. Проводили исследования острой токсичности и диуретической активности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной на белых беспородных крысах. Препарат вводили внутрижелудочно. В качестве препарата сравнения для исследования диуретической активности использовали гипотиазид.

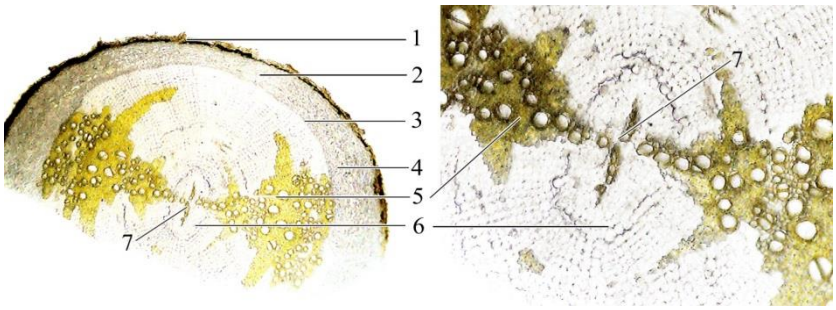
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Морфолого-анатомическое исследование подземной части крапивы двудомной, крапивы жгучей и яснотки белой

Морфолого-анатомическому анализу подвергались как корни, так и корневища крапивы двудомной. С поверхности корень покрыт слоем пробки толщиной от 3 до 5 слоев клеток. Непосредственно под пробкой располагается слабо выраженный слой паренхимы перициклической зоны коры пластинчатого типа. Клетки её на поперечном сечении вытянутые, тангентально-сплюснутой формы. Глубже располагается паренхима вторичной коры, клетки которой мелкие, более или менее округлые и незначительно уплощенные на поперечном сечении неравномерно-угловатые со слабо утолщенными стенками. При обработке среза раствором Люголя, в них обнаруживается большое содержание неструктурированного крахмала, который накапливается в протопласте, не оформляясь в крахмальные зерна. Центральный цилиндр представлен двумя сердцевидными лучами. Они сложены проводящими элементами ксилемы камбиального происхождения и флоэмы и образуют два открытых коллатеральных пучка, расположенных друг против друга. На поперечном срезе четко прослеживается кольцо камбия. В центре корня заметны лучи первичной ксилемы. Сектора вторичной ксилемы имеют форму конусов, расходящихся к периферии корня (рис. 1).

На поперечных срезах корневища крапивы двудомной заметно, что оно имеет пучковое строение. Покровная ткань представлена пробкой. Паренхима коры в объеме незначительна, содержит темные включения. В коре встречаются группы клеток, содержащие большое количество запасного крахмала. Клетки камбиальной зоны вытянутые, с тонкими стенками, расположены параллельными рядами. Камбиальная зона проходит сплошным кольцом по всему корневищу, включает пучковый и межпучковый камбий. Проводящие пучки открытые, коллатеральные. Ксилема значительно мощнее флоэмы. Проводящие элементы ксилемы представлены сосудами. Пучки соединены характерными кольцами склеренхимы. Клетки склеренхимы многоугольные, внутри имеют полость, окрашиваются раствором сернокислого анилина в желтый цвет. В центре сердцевины в корневище расположена полость, окруженная кольцом склеренхимы. Клетки сердцевины округлые,

тонкостенные, не содержат крахмала. В более старых корневищах полость с фрагментами разрушенной сердцевины значительнее (рис. 2).



А Б

Рис. 1. Поперечный срез корня вторичного строения крапивы двудомной, окрашенный сернокислым анилином
А – Поперечный срез корня (х40); Б - фрагмент центрального цилиндра (х100)
Обозначения: 1 – пробка; 2 - паренхима коры; 3 - зона камбия; 4 - флоэма; 5 - ксилема вторичная; 6 - радиальный луч; 7 – ксилема первичная

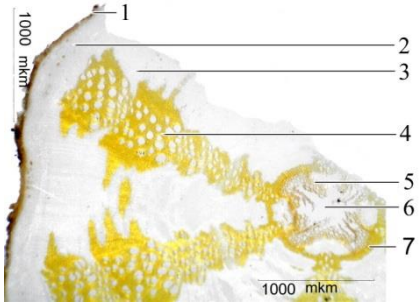
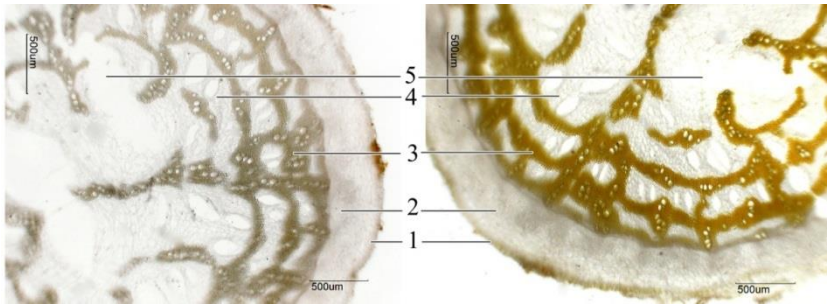


Рис. 2. Поперечный срез корневища крапивы двудомной, окрашенный сернокислым анилином (х40)
Обозначения: 1 – пробка; 2 - клетки первичной коры; 3 - сердцевинный луч; 4 – ксилема; 5 - первичная ксилема; 6 – сердцевина; 7 - склеренхимное кольцо



А Б

Рис. 3. Поперечный срез корня крапивы жгучей (х40)
А – Поперечный срез до обработки; Б – Поперечный срез после обработки сернокислым анилином
Обозначения: 1 – пробка; 2 – паренхима коровой части; 3 – склеренхимные кольца; 4 – паренхима ксилемы; 5 – сосуды ксилемы

А Б

Рис. 4. Поперечный срез корневища яснотки белой (х40)
А – поперечный срез до обработки; Б - поперечный срез после обработки сернокислым анилином
Обозначения: 1 – пробка; 2 – паренхима коровой части; 3 – камбий; 4 – ксилема; 5 – вторичный корень; 6 – перимедулярная зона; 7 - сердцевина

Анализ анатомии поперечных сечений корней крапивы жгучей позволил выявить весьма схожие структурные особенности с крапивой двудомной. У крапивы жгучей аналогично выражены слои склеренхимы, перемежающиеся с областями основной запасающей паренхимы. Отличительной особенностью корней крапивы жгучей является значительная паренхимизация ксилемной части центрального цилиндра и непучковый тип строения (рис. 3).

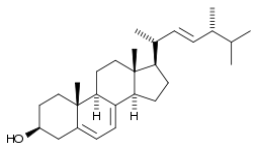
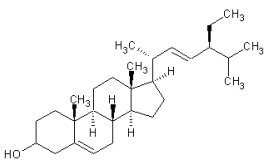
Корневище яснотки имеет непучковый типа строения, с плотной ксилемой и без паренхимных вставок. В ней отсутствуют характерные для представителей сем. крапивные ряды склеренхимы. В центре выражена округлая сердцевина. Первичная кора развита незначительно (рис. 4).

2. Фитохимические исследования сырья крапивы двудомной

2.1. Идентификация выделенных веществ

С целью обоснования методик качественного и количественного анализа и препаратов из корневища с корнями крапивы двудомной с использованием колоночной хроматографии выделены два индивидуальных веществ стериновой природы – эргостерин и β-ситостерин (табл. 1). Причем эргостерин из корневищ с корнями крапивы двудомной впервые выделен. Для установления химической структуры выделенных соединений использовали ^{1}H-, ^{13}C-ЯМР-, УФ-спектроскопию и масс-спектрометрию, а также результаты химических взаимодействий (рис. 5).

Таблица 1. Физико-химические константы и спектральные характеристики соединений, выделенных из корневищ с корнями крапивы двудомной

№ п/п	Название	Химическая формула	Физико-химические характеристики
1	Эргостерин		Мелкокристаллическое вещество серого цвета состава $C_{28}H_{44}O$; т. пл. 163-165 ^{o}C, УФ-спектр (EtOH, λ_{max}): 271 нм. ^{1}H-ЯМР-спектр (300 МГц, ($CDCl_3$, δ, м.д., J/Гц): 5,35 (м, 2H, H-6, H-7), 4,37 (д, 2H, 7,7, H-22, H-23), (м, 1H, H-3), 3,1-3,4 (м, 2H, H-9, H-14), 0,65-2,4 (м, 47H, в том числе 6 CH_3). Масс-спектр (70 eV, 200 ^{o}C, m/z, %): 396 (M^+, 100), 255 (7), 213 (13), 147 (28), 80 (34), 57 (52), 43 (68)
2	β-ситостерин		Пластинчатые кристаллы белого цвета, $C_{29}H_{50}O$; т. пл. 132-133 ^{0}C (метанол), ^{1}H-ЯМР-спектр (300 МГц, ($CDCl_3$, δ, м.д.): 5,32 (м, 1H, H-6), 3,73 (м, 1H, H-3), 0,8-2,2 (м, 47H, в том числе 6 CH_3). Масс-спектр (70 eV, 200 ^{o}C, m/z, %): 414 (M^+, 32), 255 (32), 231 (19), 213 (27), 145 (34), 135 (37), 119 (60), 105 (43), 97 (58), 71 (63), 69 (65), 43 (50).

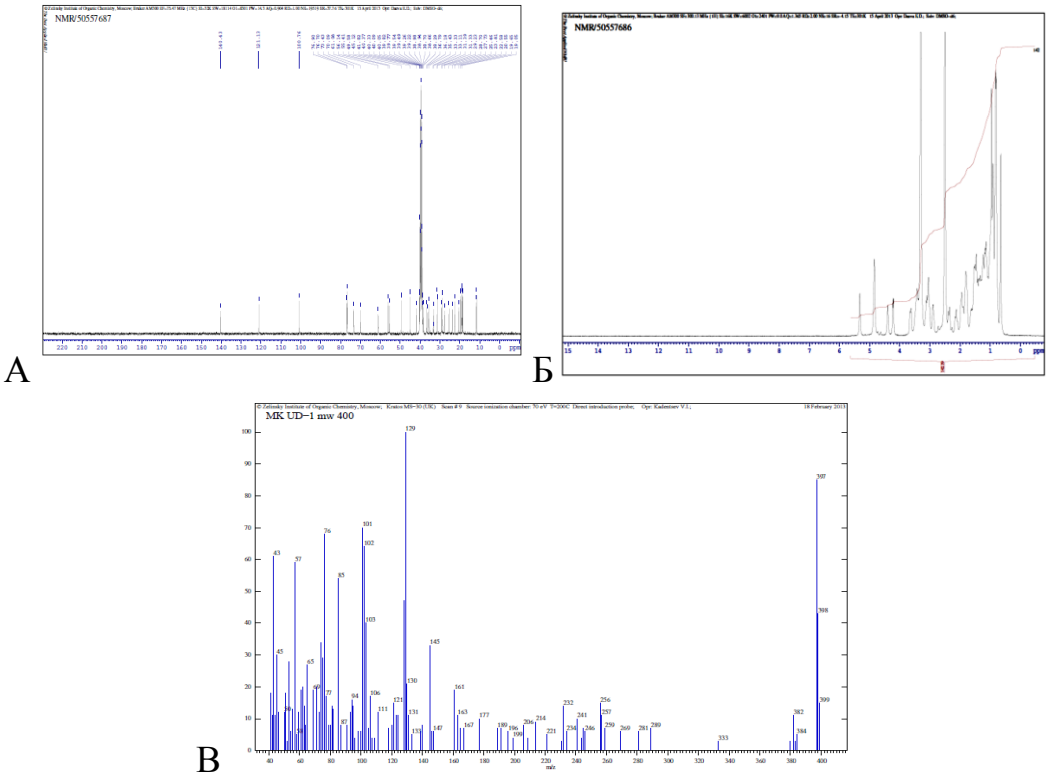


Рис. 5. Спектральные характеристики анализируемой структуры
А -^{13}С-ЯМР-спектр; Б- ^{1}Н-ЯМР-спектр; В - масс-спектр

2. 2. Качественный анализ

Для качественного анализа сырья и препаратов из корневищ с корнями крапивы двудомной предложен метод ТСХ-анализа с определением стериновых веществ с использованием раствора СО эргостерина. ТСХ-анализ проводили на пластинках «Сорбфил ПТСХ–АФ–А–УФ» в системе растворителей хлороформ-этиловый спирт-вода в соотношении 26:16:3. Детекция веществ на хроматограммах осуществлялась просматриванием в УФ-свете при длине волны 366 нм, а также проявлением раствором фосфорно-молибденовой кислоты. В эксперименте использовали растворы СО эргостерина и β-ситостерина. При этом при просматривании в УФ-свете у извлечений из крапивы двудомной и жгучей наблюдаются пятна с ярко-голубой флуоресценцией с R_f около 0,8. Данное пятно, принадлежащее веществу ароматической природы, при проявлении не окрашивается. При этом для корневищ с корнями яснотки белой характерным является пятно со светло-желтой флуоресценцией с R_f около 0,1.

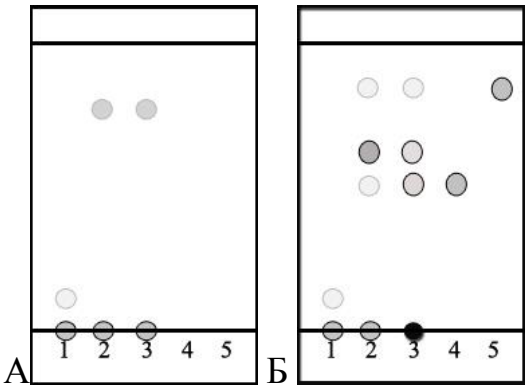


Рис. 6. Хроматограмма анализа экстрактов в система растворителей хлороформ-этанол-вода (26:16:3)
А - детекция при УФ- свете с λ=366 нм; Б - проявление раствором фосфорно-молибденовой кислоты 10%
Обозначения: 1 – извлечение из подземной части яснотки белой на 70% этиловом спирте; 2 – извлечение из подземной части крапивы жгучей на 70% этиловом спирте; 3 – извлечение из подземной части крапивы двудомной на 70% этиловом спирте; 4 – раствор СО эргостерина; 5 – раствор СО β-ситостерина

После обработки пластинки раствором фосфорно-молибденовой кислоты на хроматограммах извлечений из крапивы жгучей и двудомной обнаруживаются пятна серо-синего цвета, соответствующие эргостерину (R_f около 0,6) и β-ситостерину (R_f около 0,9). Оба пятна располагаются на уровне пятен соответствующих растворов СО. Для крапивы двудомной это пятно является доминирующим, в то время как у крапивы жгучей оно заметно бледнее. Для извлечений из обоих видов крапивы характерным является наличие пятен с R_f около 0,7. Однако пятно более ярко выражено в случае крапивы жгучей. При этом у извлечения из корневищ с корнями яснотки белой обнаруживается только пятно с R_f около 0,1, серо-коричневого цвета (рис. 6). Таким образом, метод тонкослойной хроматографии позволяет отличить корневища крапивы двудомной от ее основных примесей.

2. 3. Количественное определение

Для количественного определения суммы стеринов в сырье и препаратах из корневищ с корнями крапивы двудомной применяли метод спектрофотометрии в пересчете на эргостерин при аналитической длине волны 328 нм. Определено, что оптимальным экстрагентом является 70% этиловый спирт, соотношение «сырье-экстрагент» - 1:100, время экстракции – 30 мин.

Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет ± 1,54 % (табл. 2).

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы стеринов корневищах с корнями крапивы двудомной

П	*f*	$\overline{X}$	*S*	*P, %*	*t (P,f)*	*ΔX*	*E, %*
11	10	3,37	0,0232	95	2,23	±0,052	±1,54

Содержание суммы стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной, заготовленных в различных регионах РФ, находится в пределах 2,23-7,34%. В качестве нижнего предела содержания стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной рекомендован показатель 2,0 %.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: линейность, прецизионность и правильность. Линейность методики определяли для серии растворов СО эргостерина (с концентрациями в диапазоне от 0,010 до 0,050 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99998. Для установления прецизионности проводили определение содержания для пяти параллельных измерений. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора СО эргостерина с известной концентрации к исследуемому раствору. Открываемость находилась в пределах от 98% до 102%.

2.4. Исследование содержания полисахаридов, фенольных соединений и белков

Исследования содержания суммы полисахаридов в корневищах с корнями крапивы двудомной коррелирует с содержанием стеринов, достигая максимума к сентябрю (14,32 ± 0,72%). При этом для корневищ с корнями крапивы двудомной характерно незначительное содержание флавоноидов в пересчете на рутин (0,02 ± 0,001%) и фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту (0,29 ± 0,01%). Также низким оказался и уровень содержания белка в корневищах с корнями крапивы двудомной (0,083 ± 0,004 %).

По результатам морфолого-анатомического, фитохимического и товароведческого анализа подготовлен проект ФС на новый вид ЛРС «Крапивы двудомной корневища с корнями».

3. Обоснование целесообразности создания лекарственных растительных препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной

В лабораторных условиях нами были получены образцы жидких экстрактов корневищ с корнями крапивы двудомной в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:1 с использованием в качестве экстрагента 70% этилового спирта. Жидкие экстракты были получены с помощью методов ремацерации и реперколяции. В каждом случае были получены два вида извлечений – первые

по классической схеме, вторые с применением нагревания на водяной бане на последней стадии получения препарата. Анализ суммы стеринов в полученных жидких экстрактах показал, что содержание стеринов варьирует в пределах 0,26±0,01 – 1,52±0,08%.

Путем сгущения жидкого экстракта получен густой экстракт, в котором содержание стеринов варьирует в пределах 10,45 – 14,32%.

3.1. Изучение фармакологических свойств густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной

При создании новых препаратов растительного происхождения одним из обязательных критериев является оценка их безопасности, поэтому проводили анализ острой токсичности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной. Исследование проводили на белых беспородных крысах. Препарат вводили внутрижелудочно в дозе 15 г/кг на фоне 3% водной нагрузки от массы тела. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что густой экстракт корневищ с корнями крапивы двудомной в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

Исследования диуретической активности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной проводили на белых беспородных крысах массой 200-220 г. В ходе проведенных экспериментов было установлено, что данный препарат в дозе 10 мг/кг на фоне водной нагрузки в объеме 3% от массы тела за 24 ч эксперимента достоверно повышает показатели почечной экскреции воды (на 18%, p=0,007), натрия (на 26%, p=0,008), калия (на 43%, p=0,037), креатининурез при этом возрастает недостоверно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных диссертационных исследований научно обоснована целесообразность использования в медицинской практике нового вида лекарственного растительного сырья «Крапивы двудомной корневища с корнями» в качестве источника биологически активных соединений для создания отечественных лекарственных препаратов, обладающих диуретической активностью.

Выводы

1. Выявлены морфолого-анатомические особенности для корневищ с корнями крапивы двудомной, имеющие диагностическое значение и отличия от

основных примесных видов. Для корней и корневищ крапивы двудомной характерным является пучкового тип строения, в то время как корни крапивы жгучей, а также корни и корневища яснотки белой имеют на поперечном срезе непучковый тип строения.

2. Впервые в РФ из корневищ с корнями крапивы двудомной выделен доминирующий и диагностически значимый компонент, идентифицированный на основании данных УФ-, ^{1}Н-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии как эргостерин.

3. Разработана методика качественного анализа сырья и препаратов корневищ с корнями крапивы двудомной методом тонкослойной хроматографии, заключающийся в определении доминирующего и диагностически значимого компонента стериновой природы – эргостерина, с использованием его в качестве стандарта.

4. Обоснована целесообразность стандартизации сырья и препаратов корневищ с корнями крапивы двудомной по содержанию суммы стериновых веществ в пересчете на эргостерин с использованием прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 328 нм.

5. Анализ различных образцов сырья крапивы двудомной показал, что содержание стеринов, полисахаридов и белков характерно как для подземной, так и для надземной частей растения, фенольные соединения содержатся преимущественно в надземной части растения.

6. Определены показатели качества нового вида ЛРС «Крапивы двудомной корневище с корнями». Содержание суммы стеринов в доброкачественном сырье находится в пределах 2,23-7,34%, что позволило обосновать числовой показатель «Содержание суммы стеринов – не менее 2,0%».

7. Определены оптимальные условия для получения жидкого и густого экстрактов корневищ с корнями крапивы двудомной.

8. В ходе фармакологических исследований для густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной выявлен диуретический эффект, сопоставимый с действием гипотиазида.

9. Разработан проект ФС «Крапивы двудомной корневища с корнями» с перспективой включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XIII издания.

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации сырья, содержащего стерины, могут быть использованы в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия», «Фармацевтическая химия», «Фармацевтическая технология», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава лекарственного растительного сырья и препаратов крапивы двудомной, а также разработки методик стандартизации, отвечающих современным требованиям. Кроме того, важным вопросом является научное обоснование комплексного использования крапивы двудомной в медицинской практике в качестве источника лекарственных препаратов, в том числе на основе корневищ с корнями данного растения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Куркин, В.А. Изучение возможностей комплексной переработки корней и корневищ крапивы двудомной / В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Э.А. Балагозян // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. - 2012. - Т. 14, № 1 (9). – С. 2246-2248.
2. Балагозян, Э.А. Изучение диуретической активности густого экстракта из корневищ крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, О.Е. Правдивцева, Е.Н. Зайцева // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** - 2015. - Т. 17 - № 2 (2). - С. 442-444.
3. Балагозян, Э.А. Определение стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева // **Фармация.** –2016. – № 2. – С.18-21.
4. Балагозян, Э.А. Разработка подходов к стандартизации корневищ с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, В.М. Рыжов // **Аспирантский вестник Поволжья.** – 2016. – № 1-2. – С. 239-241.

5. Балагозян, Э.А. Сравнительный фитохимический анализ сырья крапивы двудомной и ее основных примесей / Э.А. Балагозян, О.Е. Правдивцева, А.Д. Орехова, В.А. Куркин // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2016. – Т. 19. – № 12. – С. 15-18.
6. Балагозян, Э.А. Фармакогностическое изучение корневищ с корнями крапивы двудомной как перспективного вида лекарственного растительного сырья / Э.А. Балагозян, О.Е. Правдивцева, В.А. Куркин // **Сеченовский вестник**. – 2016. – № 2 (24). – С. 37.
7. Балагозян, Э.А. Содержание стеринов в сырье крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева // **Химия растительного сырья.** - 2016. - № 2. - С. 67-71.
8. Балагозян, Э.А. Анатомо-гистологическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной как перспективного источника противоопухолевых препаратов / Э.А. Балагозян // Сборник материалов VI Всероссийской (80-ой Итоговой) студенческой научной конференции «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты». Самара, 2012. С. 31-32.
9. Балагозян, Э.А. Выделение эргостерина из корневищ с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян // Материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые - медицине». Аспирантские чтения - 2013. – Самара, 2013. – С. 266-268.
10. Балагозян, Э.А. Разработка отечественных препаратов для терапии опухолей предстательной железы / Э.А. Балагозян, В.М. Рыжов // Материалы Первой Всероссийской научно-практической конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». – Москва, 2013. - С. 10.
11. Балагозян, Э.А. Изучение диагностических особенностей анатомии и гистологии корневищ с корнями крапивы двудомной как перспективного источника противоопухолевых препаратов / Э.А. Балагозян, В.М. Рыжов // Материалы IX годичной научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием «Достижения и перспективы развития медицинской науки». – Душанбе, 2014. – С. 262.
12. Балагозян, Э.А. Изучение острой токсичности экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, О.Е. Правдивцева, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев // Интер-медикал. - 2014. - № 5. - С. 62-64.
13. Балагозян, Э.А. Изучение петиолярных признаков листа крапивы двудомной / Э.А. Балагозян // Материалы конференции с международным участием "Молодые ученые

21 века - от современных технологий к инновациям". Аспирантские чтения – 2014. – Самара, 2014. - С. 252-253.

14. Балагозян, Э.А. Исследование стериновых соединений густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.М. Рыжов // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», СПб.: Изд-во СПХФА, 2014. – С. 406-409.
15. Балагозян, Э.А. Изучение диуретических свойств густого экстракта корневищ крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев // Материалы 70 Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». – Екатеринбург, 2015. – С. 732-733.
16. Балагозян, Э.А. Изучение подходов к стандартизации корневищ с корнями крапивы двудомной // Материалы научно-практической конференции «Молодые ученые XXI века - от идеи к практике». Аспирантские чтения - 2015. Самара, 2015. - С. 158-159.
17. Балагозян, Э.А. Перспективы использования препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, А.В. Лямин, О.Е. Правдивцева // Фармация и фармакология. – 2015. – № 6 (13). – С. 16-19.
18. Балагозян, Э.А. Содержание полисахаридов и стеринов в различных видах сырья крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева // Сборник научных трудов третьей научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века». Москва, 2015. – С. 175-178.
19. Балагозян, Э.А. Изучение диуретической и антитоксической активности препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Лямин, О.Е. Правдивцева // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. Рязань, 2015. – С. 29-32.
20. Балагозян Э.А. Содержание полисахаридов в различных видах сырья крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, О.Е. Правдивцева, В.А. Куркин, А.Д. Орехова, Р.А. Мазитова // Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». Ижевск, 2016. – С. 13-14.
21. Балагозян, Э.А. Сравнительное анатомо-морфологическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной и ее основных примесей / Э.А. Балагозян, В.М. Рыжов // Сборник материалов I межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии». Самара, 2016. – С. 33-37.

22. Балагозян, Э.А. Содержание белка в корневищах с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян // Сборник материалов I межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии». Самара, 2016. – С. 37-41.
23. Балагозян, Э.А. Изучение состава препаратов крапивы двудомной / Э.А. Балагозян // Сборник материалов I межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии». Самара, 2016. – С. 41-45.
24. Балагозян, Э.А. Содержание флавоноидов и фенилпропаноидов в различных видах сырья крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева, Р.А. Мазитова // Сборник статей I Международной (71 Всероссийской) научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». Екатеринбург, 2016. – Т.3. – С. 2571-2574.
25. Балагозян, Э.А. Сравнительное исследование УФ-спектров различных видов сырья крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4. – № 2 (15). – С. 71-78.
26. Балагозян, Э.А. Сравнительное фитохимическое исследование различных видов сырья крапивы двудомной / Э.А. Балагозян // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Молодые учёные – от технологий XXI века к практическому здравоохранению». Аспирантские чтения - 2016. Самара, 2016. – С. 206-207.
27. Патент РФ на изобретение № 2599014 «Способ количественного определения стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной» / Куркин В.А., Балагозян Э.А., Правдивцева О.Е. – *G01N33/98, G01N21/31*. – Бюл. № 28 от 10.10.2016.