

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БАЛАГОЗЯН ЭДГАР АРТУРОВИЧ

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
доцент Правдивцева Ольга Евгеньевна

Самара - 2017

Оглавление

Введение.....	7
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ВИДОВ РОДА <i>URTICA</i> L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..	18
1.1. Этимология названия растения и историческая справка.	18
1.2. Морфолого-анатомические и эколого-ценотические признаки видов рода <i>Urtica</i> L.....	19
1.2.1. Ботаническое описание представителей видов растений рода <i>Urtica</i> L. и примесных к ним растений.....	19
1.2.2. Заготовка сырья крапивы двудомной.....	23
1.2.3. Современные вопросы стандартизации сырья.....	23
1.3. Характеристика важнейших групп биологически активных соединений из сырья крапивы	25
1.4. Фармакологические свойства препаратов крапивы двудомной.....	29
1.5. Проблемы создания лекарственных препаратов из сырья крапивы двудомной.....	33
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.....	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1. Объекты исследования.....	37
2.2. Методы исследования.....	38
2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа.....	38
2.2.2. Метод тонкослойной хроматографии	39
2.2.3. Метод спектрофотометрии	41
2.2.4. Метод гравиметрии.....	42
2.2.5 ¹ H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии	42
2.3. Технологические методы получения препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной.....	42
2.4. Метод препаративной адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии.....	46

2.5.	Фармакологические методы.....	46
2.5.1.	Изучение острой токсичности	46
2.5.2.	Изучение диуретической активности	47
2.6.	Микробиологические методы.....	47
2.7.	Статистические методы обработки результатов исследований.....	48
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДЗЕМНЫХ ЧАСТЕЙ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ, КРАПИВЫ ЖГУЧЕЙ И ЯСНОТКИ БЕЛОЙ.....		
3.1.	Сравнительное морфологическое исследование подземных частей крапивы двудомной, крапивы жгучей и яснотки белой	49
3.2.	Анатомо-гистологическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной	52
3.2.1.	Анатомо-гистологическое исследование корня вторичного строения крапивы двудомной	52
3.2.2.	Анатомо-гистологическое исследование корневища крапивы двудомной	55
3.3.	Морфолого-анатомический исследование подземной части крапивы жгучей	59
3.4.	Морфолого-анатомический исследование подземной части яснотки белой	61
3.4.1.	Анатомо-гистологическое исследование корня яснотки белой	62
3.4.2.	Анатомо-гистологическое исследование корневища яснотки белой	63
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....		64
ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ		
		67

ДВУДОМНОЙ	
4.1. Разработка качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной методом тонкослойной хроматографии.....	67
4.1.1. Исследования по разработке качественного анализа методом ТСХ	67
4.1.2. Методика качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной методом ТСХ	70
4.2.3. Сравнительный качественный анализ корневищ с корнями крапивы двудомной и примесных к ней видов методом ТСХ	71
4.2. Разработка качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной методом УФ-спектрофотометрии...	73
4.2.1. Исследования по разработке качественного анализа методом УФ-спектрофотометрии	73
4.2.2. Методика качественного анализа корневища с корнями крапивы двудомной методом УФ-спектрофотометрии...	75
4.2.3. Сравнительный качественный анализ корневищ с корнями крапивы двудомной и примесных к ней видов методом УФ-спектрофотометрии	76
4.3. Выделение и идентификация индивидуальных биологически активных соединений из корневищ с корнями крапивы двудомной	77
4.4. Разработка методики количественного определения содержания стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной.....	82
4.5. Методика количественного анализа суммы стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной.....	83
4.6. Изучение содержания стеринов в различных видах сырья крапивы двудомной	87

4.7. Определение содержания стероидов в образцах, примесных к крапиве двудомной.....	89
4.8. Анализ суммы полисахаридов в различных видах сырья крапивы двудомной	90
4.9. Содержание фенилпропаноидов в различных видах сырья крапивы двудомной	92
4.10. Содержание флавоноидов в различных видах сырья крапивы двудомной	93
4.11. Содержание белков в различных видах сырья крапивы двудомной	95
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	97
ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ.....	99
5.1. Изучение способов получения жидкого и густого экстрактов из корневищ с корнями крапивы двудомной.	99
5.2. Определение острой токсичности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной.....	103
5.3. Изучение диуретической активности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной.....	103
5.4. Определение микробиологической активности жидкого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной.....	106
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	109
Список сокращений.....	112
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	113
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ПРИЛОЖЕНИЕ 5 Акты внедрения

Патент на изобретение

Фармакопейная статья «Крапивы двудомной корневище с корнями»

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В рамках программы «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года», а также «Стратегии 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 применяется 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 стерина 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 стерина 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 стерина 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 Фармакопеей РФ XIII издания, а также с использованием компьютерных программ.

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»).

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); в 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 рождения 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.

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 24 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 сравнительное исследование 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 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».

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ВИДОВ РОДА *URTICA* L. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Этимология названия растения и историческая справка

Родовое латинское наименование - *Urtica* образовано от латинского *urere* - жечь в связи с тем, что стебли и листья крапивы покрыты волосками, в том числе крупными жгучими (эмергенцами) [13]. Оболочка этих волосков очень ломкая из-за того, что пропитана углекислым кальцием и кремнеземом. Когда при легком механическом воздействии волоски ломаются, из них выделяется жгучая жидкость (муравьиная кислота) [59].

Видовой эпитет *dioica* от греч. *di* — два, дважды, а от лат. *di* (*dis-*) — разделение, разъединение и *oikos* - дом, жилище (из-за пестичных и тычиночных цветков, развивающихся на разных экземплярах) [57, 59, 127].

Русское название происходит от древнерусского слова «коприна» — шелк [57]. Это связано с тем, что из травы крапивы получали волокно для выработки тканей, причем в качестве текстильного растения она известна в разных странах. В народной медицине России крапива ценилась как кровоостанавливающее и ранозаживляющее средство. Народная мудрость гласит: «Одна крапива заменяет семерых врачей» [2, 72].

Многочисленные лекарственные свойства крапивы отмечал Авиценна в своем труде «Каноне врачебной науки». О применении крапивы упоминали в своих сочинениях Гиппократ, Диоскорид, а также Гален. Парацельс в своем труде «О медицине» назвал крапиву «продуктом хорошего сока», который помогает «очищению желудка» [2].

Ранее крапиву двудомную широко использовали как техническую культуру в разных странах. Из стеблей этого растения получали прочное волокно, из которого шили крепкие паруса, мешки, «крапивники» [35, 72]. В Японии крапивный жгут в сочетании с шёлком был главным материалом в изготовлении дорогих самурайских доспехов, из одревеневших стеблей крапивы делали щиты, а из крепчайшего крапивного волокна, кручёного и натёртого воском, — тетивы для луков [35].

При определенной обработке крапивное волокно превращается в ткань, пригодную для получения одежды. В Европе на основе травы крапивы получали лёгкую, тёплую и практичную ткань «шевиот» [32].

1.2. Морфолого-анатомические и эколого-ценотические признаки видов рода *Urtica* L.

1.2.1. Ботаническое описание лекарственных представителей видов растений рода *Urtica* L. и примесных к ним растений

Семейство Крапивные *Urticaceae* – одно из самых крупных семейств в классе двудольных, включающее около 60 родов и более 1000 видов растений. Большинство представителей этого семейства обитают в тропических странах, где они составляют основную часть травянистой и кустарниковой растительности лесов. Отдельные виды встречаются в умеренных и холодных областях [9, 26, 67, 92].

Большинство крапивных — травы или кустарники с простыми листьями, часто усаженными жгучими волосками. В системе порядка главным эмбриологическим отличием крапивных является ортотропный и базальный или почти базальный семязачаток и прямой лопатовидный зародыш, а также преобладание травянистых жизненных форм, реже кустарников, деревьев с мягкой древесиной и лиан. К последним относится большинство африканских видов [50, 62, 96, 111].



Рисунок 1 – Представители рода *Urtica* (крапивные) [111].

Обозначения: 1 - стрекательный волосок; 2 - крапива двудомная *Urtica dioica* L. (верхняя часть растения с плодами); 3 - мужской цветок до опыления; 4 - мужской цветок после опыления; 5 - плод; 6 - крапива жгучая *Urtica urens* L. (верхняя часть растения с соцветиями); 7 - продольный разрез женского цветка; 8 - крапива коноплевая *Urtica cannabina* L. (верхняя часть растения с плодами); 9 - лист.

Род крапива *Urtica* представлен однолетними или многолетними травами со жгучими и простыми волосками. Листья супротивные, с прилистниками, цельные или пальчато- либо перисто-раздельные, с пильчатым краем. Соцветия пазушные, колосовидные, цветки почти сидячие. Околоцветник из четырех зеленых листочков. В мужских цветках четыре тычинки и недоразвитый пестик (рис. 1). Пестик женского цветка с недоразвитым рыльцем. На территории бывшего СССР встречается 10 видов рода [1, 50, 59, 111]. В средней полосе РФ обитает 4 вида крапивы: двудомная, жгучая, коноплевая и пушистая [1, 9, 26, 67, 79, 112].

В европейской медицинской и фармацевтической практике официально применяются только два вида крапивы: крапива двудомная и крапива жгучая [46]. Необходимо отметить, что за рубежом в качестве ЛРС активно используются не только листья и трава крапивы, но и

подземные органы, представляющие собой корневища с корнями. В РФ фармакопейным сырьем являются только листья одного вида – крапивы двудомной [19, 20, 46]. Другие виды крапивы при заготовке сырья являются примесными к крапиве двудомной. При этом в настоящее время лекарственный препарат на основе корней крапивы жгучей входит в реестр лекарственных средств РФ [21].

При заготовке листьев крапивы двудомной возможными примесями называют, крапиву жгучую и крапиву коноплевую. Примесями они являются в виду их морфологического сходства, близкого ареала обитания и характерной черты для всех крапивных - жгучестью за счет наличия эмергенцев (жгучих волосков) [41, 67, 79, 112].

Кроме того, к примесным видам относят и яснотку белую *Lamium album* L. семейство губоцветные *Lamiaceae* (рис. 2). Народное название яснотки – «глухая крапива» связано с высокой степенью морфологического сходства её листьев с листьями крапивы двудомной. Эта особенность и близость ареалов обитания влечет за собой вероятность случайной примеси при заготовке крапивы в качестве лекарственного растительного сырья. Важно отметить, что яснотка белая, как и все представители губоцветных, не обладает жгучестью, характерной для крапивных (не имеют жгучих волосков) [9, 25, 26, 32, 62, 67, 112]. Для этого растения характерен своеобразный приятный запах, как и для многих представителей семейства губоцветные. При этом яснотка белая в ряде европейских стран является фармакопейным видом, в качестве сырья у неё используется надземная часть растения (цветки, листья и трава) [46, 47].

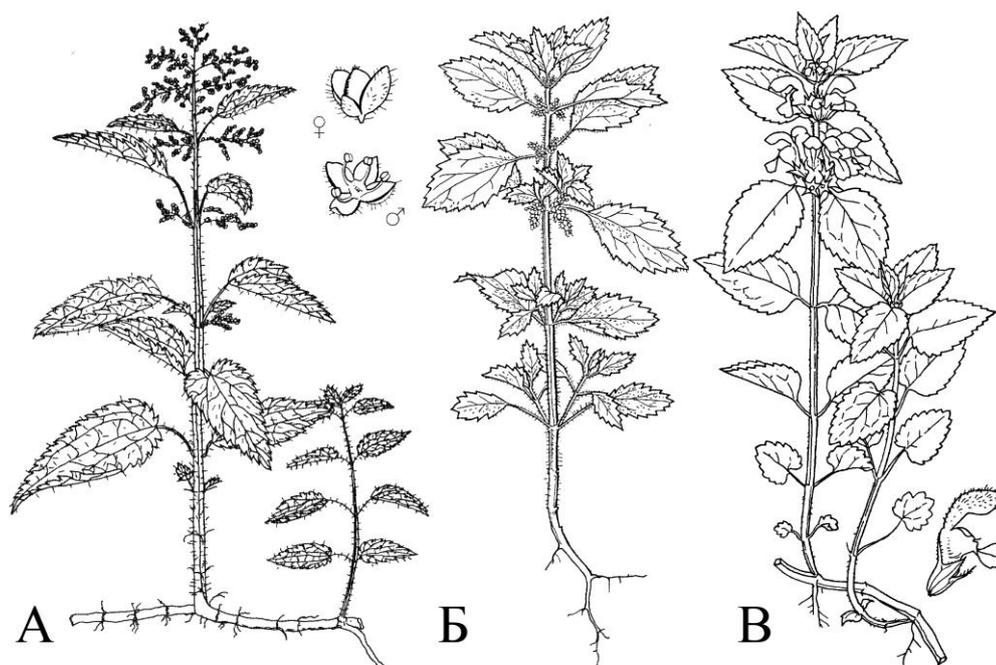


Рисунок 2 – Крапива двудомная и примесные виды [25, 26]: А – крапива двудомная; Б – Крапива жгучая; В – Яснотка белая.

Анализ литературы показал значительный интерес к изучению вопросов применения и диагностики представителей рода *Urtica* [6, 42, 43, 44, 55, 68, 88, 89, 90, 91, 119]. На наш взгляд, крапива двудомная и крапива жгучая произрастающие в одинаковых экологических условиях имеют гораздо больше черт сходства чем крапива коноплевая. На наш взгляд, крапива коноплевая существенно отличается от крапивы двудомной характером листовой пластинки, что исключает большинство ошибок при заготовке. Кроме того, свойства сырья крапивы коноплевой было подробно изучено ранее отечественными учеными [27, 28, 29].

Проанализировав литературные данные отечественных и зарубежных исследователей, а также данные собственных исследований, нами составлена сравнительная таблица морфологических признаков фармакопейного вида крапивы двудомной и примесных к ней (Приложение 2, табл. 1).

1.2.2. Заготовка сырья крапивы

В настоящее время в ГФ РФ XIII издания регламентируется только качество листьев крапивы двудомной ФС.2.5.0019.15.

Листья крапивы двудомной заготавливают во время цветения (май-июль), потому что позже увядает часть листьев, особенно нижних. Сушат листья крапивы на чердаках с хорошей вентиляцией или под навесами, разложив их на бумаге или на ткани слоем не толще 3-5 см. Сушка на солнце не допускается, поскольку происходит обесцвечивание сырья. Разрешается искусственная сушка при температуре нагрева листьев не более 40-50°C. Затем из сырья удаляют отдельные стебли, цветки, пожелтевшие, побуревшие и почерневшие листья и посторонние примеси [15, 59, 88, 93, 126].

Корневище с корнями. Несмотря на то, что подземная часть крапивы двудомной не заготавливается в РФ, существуют общие правила при заготовке подземных органов растений, на которые мы опирались в своей работе [60, 96]. Рекомендуется заготавливать корневище с корнями осенью или в конце лета. В конце вегетационного периода растения, приблизительно в сентябре-октябре. Для этого выкопанные корневища с корнями необходимо отряхнуть от земли и сразу же промыть в холодной воде. Затем необходимо разрезать массивные части корневища на более мелкие во избежание их гниения при последующей сушке. Сушить сырье следует в помещениях с хорошей вентиляцией, вдали от солнечного света. Искусственная сушка допускается при температуре 40-50 °С. Окончание сушки определяют по ломкости корней.

1.2.3. Современные вопросы стандартизации сырья

Контроль качества листьев крапивы двудомной в ГФ РФ XIII издания (ФС.2.5.0019.15) проводится по следующим показателям: «Внешние признаки» (для цельного и измельченного сырья), «Микроскопия»,

«Качественные реакции», «Количественное определение», «Числовые показатели» [20].

Подлинность сырья в вышеупомянутой ФС определяется по внешним признакам и его анализу анатомо-гистологического строения, описанному в разделе «Микроскопия» для цельного, измельченного и порошкообразного сырья. ФС содержит микрофотоснимки диагностических признаков листа крапивы двудомной, что позволяет провести более верную диагностику. Также имеется физико-химический метод определения подлинности сырья – ТСХ-анализ. Методика основывается на обнаружении наличия в сырье хлорогеновой кислоты и витамина К₁ [19].

Качество сырья регламентируется испытаниями на влажность, общая зола, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, качество измельченности сырья, посторонние примеси. Количественное определение проводится методом прямой спектрофотометрии. Следует обратить внимание на то, что в указанной методике расчет осуществляется на хлорогеновую кислоту, хотя листья используются как поливитаминное сырье, в частности, как сырье с большим содержанием витамина К₁ (филлохинон) и витамина С (аскорбиновая кислота).

Что касается зарубежного опыта, то необходимо отметить более проработанный вопрос по стандартизации сырья крапивы, особенно в США и Великобритании [133, 135]. В частности, за рубежом имеются полноценные ФС на корневище с корнями крапивы двудомной, листья крапивы жгучей (*Urtica urens* L.). В ФС Британской фармакопеи на крапиву двудомную есть раздел «Количественное определение», который предполагает применение метода ВЭЖХ и также определение минимального содержания кофеино-яблочной и хлорогеновой кислоты, в пересчете на хлорогеновую кислоту (см. Приложение 1) [135].

Зарубежные фармакопейные статьи, в частности, American Herbal Pharmacopoeia имеют глубоко проработанные разделы «Микроскопия» с

микрофотоснимками анатомических и гистологических признаков (Приложение 1, рис. 1) для листьев двух видов крапивы (жгучая и двудомная), а также корневищ с корнями крапивы двудомной [133].

Известно, что отечественные ученые занимались детальным изучением анатомии и гистологии надземной части крапивы двудомной. В частности, уже в 1977 г. имелась информация об основных эпидермальных признаках крапивы двудомной, а также потенциально примесного растения - яснотки белой в сравнительном аспекте (Приложение 1, рис. 2). Позднее, также в сравнительном аспекте были изучены эпидермальные признаки листьев двух видов крапивы - жгучей и двудомной и предоставлен их сравнительный анализ [21, 32, 55, 68, 76, 88, 89]. Однако все микроскопические признаки изучались лишь в отношении фармакопейного вида сырья – листьев крапивы двудомной. Микроскопия листьев крапивы жгучей и яснотки белой описывалась лишь в отличительных деталях от официального вида. В научной литературе широко не встречаются глубокие проработки микроскопических признаков других видов сырья крапивы двудомной.

1.3. Характеристика важнейших групп биологически активных соединений из сырья крапивы

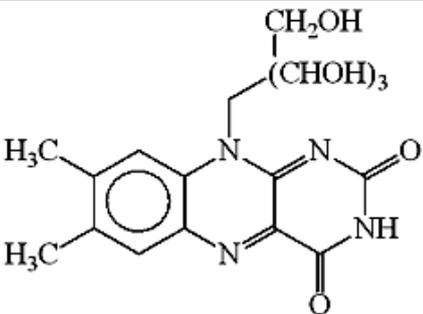
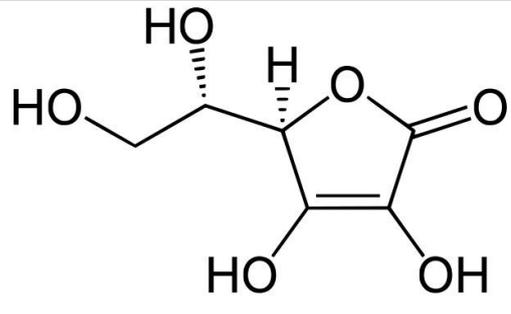
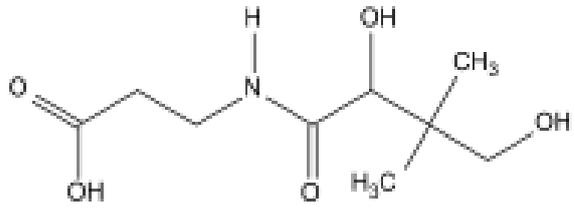
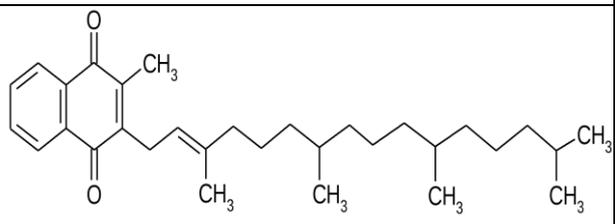
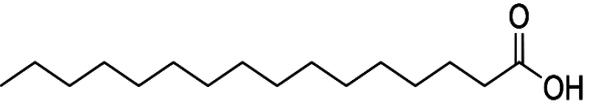
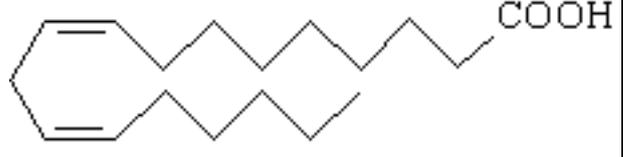
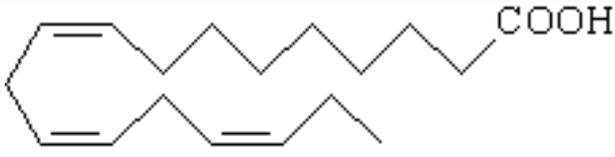
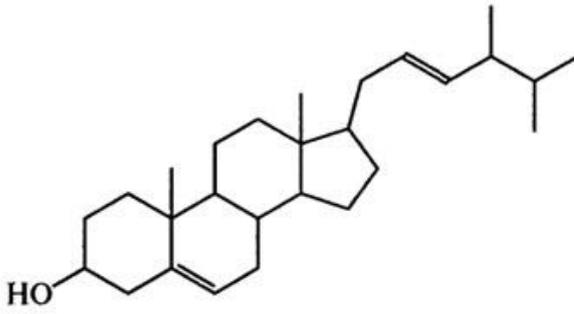
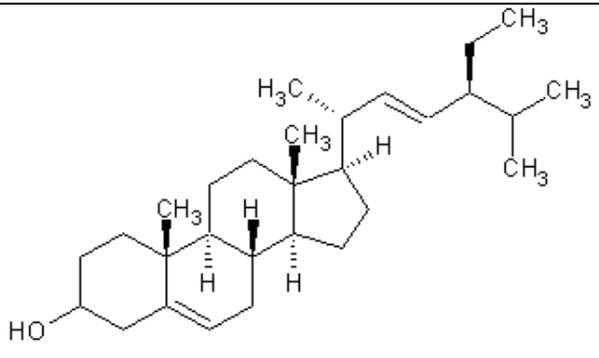
В настоящее время, хорошо изучен химический состав только листьев крапивы двудомной [12, 20, 38, 42, 45, 49, 52]. Другие части крапивы двудомной, в частности, корневище с корнями изучены в меньшей степени, однако есть сведения о содержании в корневищах с корнями крапивы двудомной нескольких групп действующих веществ [37, 39, 53, 59]. Также мало сведений о химическом составе других видов крапивы, таких как крапива жгучая и крапива коноплевая. Для крапивы жгучей приводятся данные о схожести химического состава сырья с аналогичными видами сырья крапивой двудомной, однако в научной литературе этот вопрос освещен не в полной мере [45, 63, 64, 78, 131]. Сырье крапивы коноплевой также, с точки зрения химического состава изучено в меньшей

степени [27, 22, 29, 87, 109]. При этом в нашей стране определению подвергался аминокислотный и элементный состав спиртового извлечения из надземной части *Urtica cannabina* L. [27].

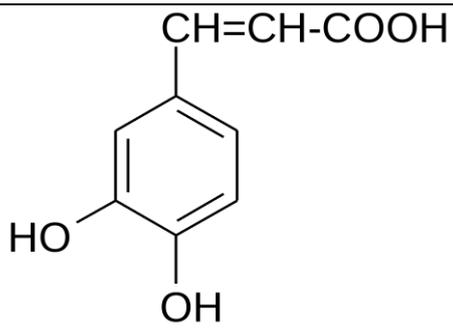
Листья крапивы двудомной являются поливитаминным сырьем содержат витамин K_1 (филлохинон), аскорбиновую кислоты (витамин С), витамин B_2 (рибофлавин $C_{17}H_{20}O_6N_4$), пантотеновую кислоту, протопорфирин $C_{34}H_{34}O_4N_4$ и копропорфирин-1 $C_{36}H_{38}O_8N_4$, а также каротиноиды (до 50мг%), β -каротин $C_{40}H_{56}$, ксантофилл $C_{40}H_{56}O_2$, ксантофиллэпоксид $C_{40}H_{56}O_3$, виолаксантин $C_{40}H_{56}O_4$. Среди сопутствующих веществ листьев крапивы наиболее значимы полисахариды (19,5%). В сырье содержатся также хлорофилл (до 5-8%), гликозид уртицин, дубильные и белковые вещества, флавоноиды (кверцетин), кумарины (скополетин), кофейная, феруловая кислоты, ситостерин, гистамин $C_5H_9N_3$, органические кислоты, кремниевая кислота, муравьиная кислота и минеральные вещества, включая соли железа [1,12,13, 49, 59, 101, 103, 104, 105, 108, 113].

Подземная часть крапивы двудомной мало изучена, но есть данные о содержании в них стеринов (β -ситостерин, даукостерин, 7-гидроксиситостерин, брассикастерин), скополетина (кумарин), никотина (алкалоид), витамина С (аскорбиновая кислота), полисахаридов. Имеются данные о наличии в корнях лектинов [53]. Это особая группа БАС, белковая часть которых содержит остатки аминокислот (аспарагин, аспаригиновая кислота, серин, треонин и др.), а углеводная состоит из N-ацетилглюкозамина и соответствующих олигомеров. В корневищах обнаружены также лигнаны (неооливил), жирные кислоты (линолевая, линоленовая, пальмитиновая и др.), углеводород сквален (табл. 1) [14, 23, 49].

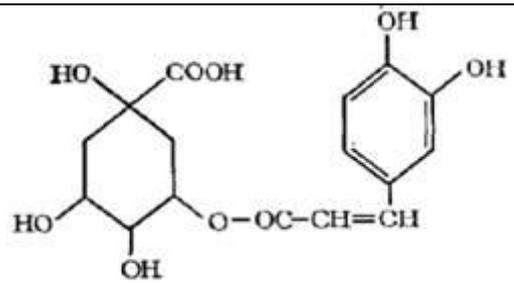
Таблица 1 – Химические формулы веществ крапивы двудомной

ВИТАМИНЫ	
	
Витамин В ₂ (рибофлавин)	Аскорбиновая кислота
	
Пантотеновая кислота	Витамин К ₁ (филлохинон)
ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ	
	
Пальмитиновая кислота	Линолевая кислота
	
Линоленовая кислота	
СТЕРИНЫ	
	
Брассикастерин	β-ситостерин

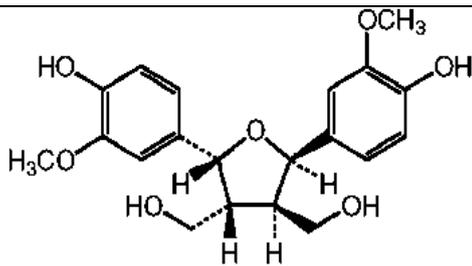
ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ



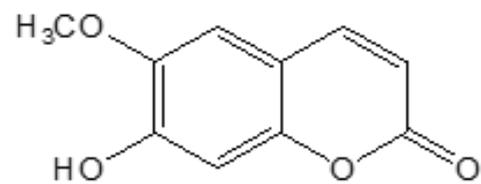
Кофейная кислота



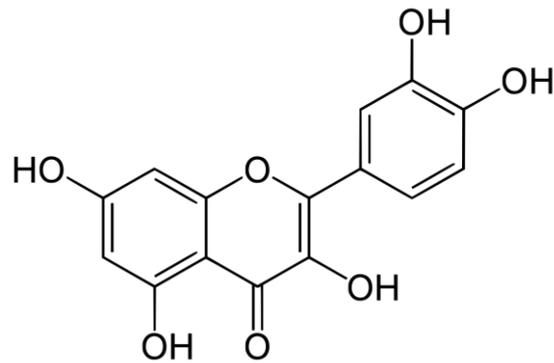
Хлорогеновая кислота



Неооливил

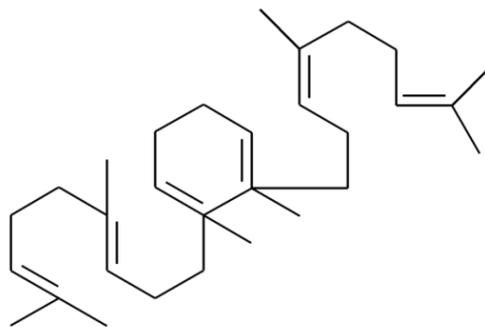


Скополетин



Кверцетин

УГЛЕВОДОРОДЫ



Сквален

Цветки крапивы двудомной содержат витамин С, семена – витамин С и жирное масло, в составе которого линоленовая кислота. Стебли содержат аскорбиновую кислоту, каротин и дубильные вещества, а также органические кислоты [95].

За последние 10 лет возрос интерес к изучению химического состава представителей рода *Urtica* [27, 117, 131, 148, 149]. Так, группой авторов определялась зависимость содержания фенольных соединений корней, листьев и стеблей крапивы, собранных из прибрежной части Средиземного, Эгейского, Черного и Мраморного моря [117, 149]. Был установлен качественный состав и количественное содержание биологически активных веществ травы крапивы двудомной. Определено также суммарное содержание водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, дубильных веществ, пигментов (каротиноидов и хлорофиллов), витамина К₁, тритерпеновых соединений [131, 148]. Проводилось также определение химического состава эфирного масла крапивы двудомной, а также оценивали его цитотоксический и генотоксический эффекты [106, 138].

Во Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений ФГБНУ (ВИЛАР) изучен состав липофильной фракции настоек гомеопатических матричных (НГМ) крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и крапивы жгучей (*Urtica urens* L.). В результате в липофильных фракциях идентифицированы вещества различной природы – жирные кислоты, терпеноиды, углеводороды [64, 128].

1.4. Фармакологические свойства препаратов крапивы двудомной

Листья крапивы двудомной, являются ценным поливитаминным средством. В народной и научной медицине широко применяются препараты крапивы при лечении гипо- и авитаминозов. Препараты листьев крапивы двудомной успешно используются в медицинской практике при различных внутренних кровотечениях - маточных

геморроидальных, желудочных, а также наружно для лечения хронических язв [1, 31, 96, 102, 107, 116].

Кроме того, препараты листьев крапивы благоприятно влияют на обмен веществ в организме, обладают общетонизирующим действием, способствуют увеличению содержания гемоглобина, повышают тонус гладкой мускулатуры, в частности матки.

Сухой экстракт листьев крапивы двудомной входит в состав препарата «Аллохол», применяемого при заболеваниях печени. Листья крапивы двудомной применяют и форме настоя или в виде жидкого экстракта. Также листья входят в состав желудочного и поливитаминного сборов, а также в сборы «Полифитохол», «Арфазетин» [11, 21, 23, 46, 53, 59, 70]. В последнее время для полисахаридов листьев крапивы выявлены иммуностимулирующие свойства [27, 107, 121].

Из листьев крапивы получают хлорофилл, используемый в фармацевтической и пищевой промышленности [53, 86]. Хлорофилл обуславливает общетонизирующее действие, усиливает основной обмен, стимулирует грануляцию и эпителизацию пораженных тканей. С этим связаны рекомендации по использованию настоя листьев крапивы при выпадении волос и болезнях кожи головы [53, 76, 139, 140].

За рубежом в качестве сырья помимо листьев используют также корневища с корями, траву, плоды и семена. На основе подземных частей крапивы двудомной и крапивы жгучей производят препараты, применяемые при лечении простатита и аденомы (гиперплазии) предстательной железы. Это такие средства как Проставер нуртика, Простафортон, Базотон и др. Также на основе крапивы двудомной получают препараты при лечении дисменореи, ревматизма, вирусных заболеваний (герпес), экземы и некоторых других заболеваний [38, 59, 53, 70, 84]. Однако по данным зарубежных источников крапива двудомная широко применяется в урологической практике. Отмечается, что подземные части крапивы двудомной являются эффективной основой для лечения гиперплазии предстательной железы, в

то время как надземные части, представляющие собой траву и листья крапивы двудомной можно использовать для лечения почек в качестве нефролитического средства [11]. В литературе имеются упоминания об антимикробных свойствах сырья крапивы [125, 139, 143].

За последние 10 лет проявился интерес к изучению фармакологических свойств извлечений из различных видов крапивы [109, 111, 132, 134, 136, 139]. Нами обнаружено порядка 10 публикаций различных групп авторов, посвященных изучению фармакологических эффектов различных извлечений на основе как надземных, так и подземных органов представителей рода *Urtica*. При этом интерес проявляли к таким видам, как крапива двудомная, а также жгучая и коноплевая.

Изучалась антиоксидантная, противомикробная, противоязвенная и болеутоляющая активность водных экстрактов крапивы двудомной с использованием различных тестов антиоксидантов, в том числе снижение мощности, свободных радикалов. По результатам исследования было выявлено эффективное снижение свободных радикалов, в частности, супероксид-анион-радикала, при этом активность водных экстрактов была сравнима с эффективностью таких антиоксидантов, как кверцетин и α -токоферол [111, 139].

Антимикробная активность водных экстрактов была выявлена в отношении штамма *Helicobacter pylori*, значимая проявлением с точки зрения противоязвенной активности данных экстрактов [136, 139].

Кроме того, у водно-спиртовых извлечения надземной часть крапивы двудомной выявлены антигипертензивные и антидиабетические свойства. Причем авторами выявлена резистентность экспериментальных животных к инсулину водно-спиртовых извлечений из крапивы [132, 134].

Наибольшее количество публикаций посвящено изучению противоопухолевой активности различных экстрактов (как водных, так и спиртовых) двух видов крапивы – жгучая и двудомная [137, 142, 147, 145]. По литературным данным известен положительный эффект использования

крапивы при лечении доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) [145, 146, 148].

У водного экстракта листьев крапивы двудомной было выявлено свойство ингибитора дезаминазы аденозина в ткани простаты у пациентов с раком предстательной железы. Предположительно, экстракт листьев крапивы двудомной тормозит аденозиндезаминазу, что может являться одним из механизмов действия наблюдаемых при положительном эффекте препаратов крапивы двудомной в случае лечения рака простаты [137].

Сообщается также о антипролиферативном действии на клетки рака предстательной железы человека. Препарат был получен на основе водно-метанольного извлечения из подземных органов крапивы двудомной. Это указывает на наличие в этом экстракте БАС с противоопухолевым действием [141, 142].

При этом использование крапивы двудомной не лишено побочных эффектов. Сообщалось, что для лечения ДГПЖ, в Турции был выявлен один случай гинекомастии у мужчины. Этот случай связывают с употреблением фиточая с крапивой [34, 147].

Был проведен скрининг антимикробной активности различных экстрактов крапивы двудомной в отношении 28 бактерий, трех штаммов дрожжей и семи грибковых изолятов, с использованием положительных контролей в отношении каждого (амоксициллин, ванкомицин, миконазола нитрат). В результате, авторы исследований выяснили, что экстракты могут быть пригодны в качестве антимикробных препаратов в фармацевтической и пищевой промышленности [125, 143].

Группа американских исследователей выявила противовоспалительную активность липофильных экстрактов из четырех частей растений (корни, стебли, листья и цветы) крапивы двудомной. Результаты показывают, что использование липофильных экстрактов крапивы может быть более эффективным, чем применение традиционных настоек в клинической практике для лечения воспалительных заболеваний [129, 140, 144].

Кроме того, крапиву двудомную широко используют для приготовления пищи [95]. Молодые стебли и листья используют для салатов, супов, щей, соусов. Получают также начинку для пирожков. Надземную часть крапивы двудомной используют в соленом и квашеном виде. Молодые нежные соцветия в высушенном виде заваривают в качестве суррогата чая. Крапиву применяют также при уходе за волосами, отвар крапивы помогает при выпадении волос. Трава крапивы может применяться на корм скоту [53, 76, 139, 140].

1.5. Проблемы создания лекарственных препаратов из сырья крапивы двудомной

Аденомой (от греч. *aden*– железа) называется доброкачественная опухоль, сохраняющая строение железистой исходной ткани (рис. 3) [40, 48, 121].

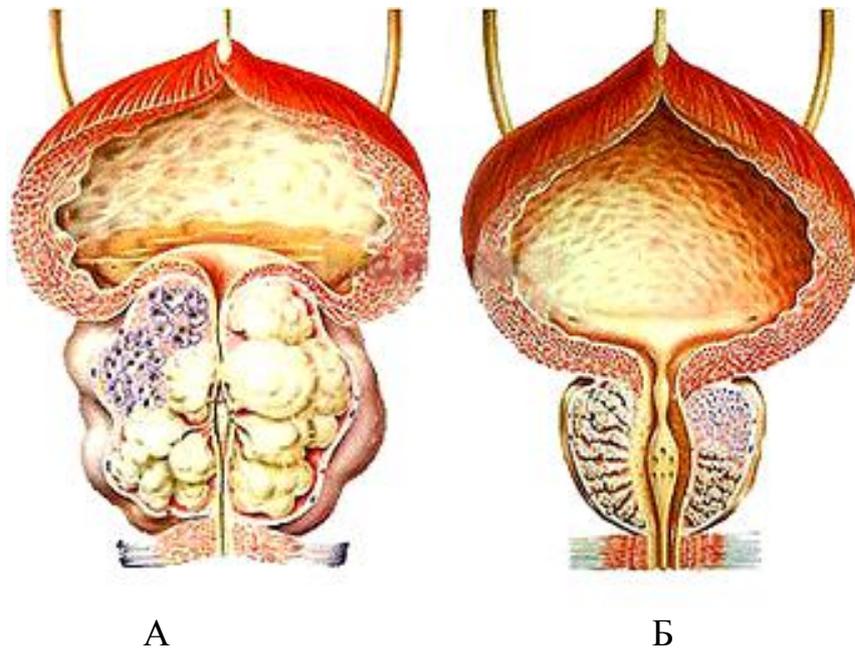


Рисунок 3 - Анатомия здоровой (Б) и увеличенной предстательной железы (А) [136].

ДГПЖ достаточно распространённое заболевание, характеризующееся разрастанием железистой ткани в области шейки мочевого пузыря [124].

По данным статистики в Российской Федерации в 2009 году выявлено около 24000 новых случаев рака предстательной железы (РпЖ). В 2000 году по раку предстательной железы на учете состояло около 37000 больных, в 2010 году уже в пределах 108000 больных [83, 124]. За 10 лет прирост заболеваемости составил 155% [83, 124]. Первично выявленный рак был разделен на группы: 0-59 лет 3550 человек, 60-69 лет – 7986 человек, 70 лет и старше – 14732 человека [83, 124].

Было замечено, что определяющую роль в развитие опухоли играет гормональный баланс в простате, меняющийся с возрастным, а именно, с повышением содержания в ней дигидротестостерона и эстрадиола – женского гормона. Доказанно, что в аденоматозной ткани наличие этих гормонов в несколько раз выше, чем в нормальной. Более того, тестостерон под воздействием фермента 5-а-редуктазы с возрастом становится более активным [36, 37]. В тканях простаты клетки делятся под контролем дигидротестостерона, поэтому увеличение его концентрации приводит к разрастанию железы. Из тестостерона также образуется эстрадиол, но под воздействием другого фермента – ароматазы. Этот гормон также обладает пролиферативными (способствующим делению клеток) свойствами [38, 48, 141].

До сих пор оперативный способ является основным при лечении аденомы предстательной железы [36]. Однако операция по удалению аденомы или ее части не прерывает паталогический процесс гормонального нарушения. В связи с этим консервативные методы приобретают все большее значение и среди них существенное место занимает фитотерапия [36, 66].

Вплоть до последнего времени, лекарства, для лечения гиперплазии предстательной железы, действовали неэффективно и часто вызывали побочные явления. За последние года в области терапии этой патологии произошел определенный прогресс. Было выявлено, что развитие гиперплазии в простате тормозят растительные фитостерины и некоторые

другие БАВ растений [36, 65]. Механизм их действия очень сложен и изучен недостаточно. Экспериментально было установлено, что некоторые соединения предотвращают связывание дигидротестостерона со специфическими рецепторами в простате, другие – подавляют ферменты 5- α -редуктазу и ароматазу, превращающие тестостерон в дигидротестостерон и эстрадиол, третьи – непосредственно тормозят деление клеток. По некоторым данным, растительные препараты улучшают лишь субъективные ощущения у больных, вызывая только к уменьшению отека простаты [11]. Ученые, опираясь на экспериментальные данные из ряда стран, создали фитопрепараты, которые способны значительно улучшить состояние больных с ДГПЖ [36, 65].

В настоящее время в РФ зарегистрировано множество таких препаратов, однако большая часть их иностранного производства (Простагут Форте, Уртирон). Кроме того, высокая цена на указанные препараты снижает их доступность для различных слоёв населения. Следует также отметить, что этой патологией страдают пожилые люди, часто с низким уровнем дохода. Отечественные ЛС для терапии аденомы предстательной железы на основе корневищ с корнями крапивы двудомной в РФ не производятся [22]. При этом крапива двудомная является широко распространённым растением. Имеются сведения и про другие растительные источники из представителей отечественной флоры, оказывающие терапевтическое действие при гиперплазии простаты: тыква обыкновенная, каштан конский, осина обыкновенная и др. [52, 121]. Химический состав данных растений различается, поэтому и могут отличаться по спектру производимого действия. Очевидно, что возможно создание многокомпонентных растительных препаратов. При этом именно лекарственные средства растительного происхождения целесообразно применять для лечения хронических заболеваний, учитывая длительность приема препаратов. На наш взгляд, исследования в направлении

поиска новых эффективных лекарственных препаратов необходимо проводить постоянно.

Таким образом, в настоящее время в РФ препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной для эффективной терапии аденомы предстательной железы не производится. При этом существует потребность в данной группе препаратов. С целью создания отечественных импортозамещающих препаратов из сырья крапивы двудомной необходимо углубленное изучение данного сырья, а также разработка нормативной документации, регламентирующей его качество [56]. Как отмечалось ранее, крапива двудомная является широко распространенным растением на территории РФ, запасы которого велики.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.

1. В зарубежной практике в качестве сырья используются не только листья, но и корневища с корнями крапивы двудомной для терапии аденомы предстательной железы.
2. В настоящее время в РФ отсутствуют отечественные препараты для лечения гиперплазии предстательной железы из корневищ с корнями крапивы двудомной.
3. Листья крапивы двудомной глубоко изучены с точки зрения фитохимии, однако для корневищ с корнями вопрос о химическом составе и действующих веществах остается нерешенным.
4. В Российской Федерации отсутствует нормативная документация на сырье корневища с корнями крапивы двудомной, которое используется в зарубежной практике, поэтому применение данного вида сырья в официальной медицинской практике препятствует.
5. Необходимым является всестороннее изучение анатомо-морфологических, фитохимических и фармакологических свойств корневищ с корнями крапивы двудомной, как источника БАС.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

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

Заготовку сырья проводили следующим образом: корни и корневища с корнями выкапывали, очищали от остатков земли, надземных частей растения и почерневших частей корневищ. После этого корневища с корнями быстро промывали холодной проточной водой и раскладывали для сушки тонким слоем на бумаге. Крупные части разрезали на куски.

Сушку проводили на воздухе без доступа прямых солнечных лучей. Окончание сушки определяли по ломкости сырья.

Экспериментальные данные получали с помощью следующей приборной базы:

1. Набор сит с размером отверстий 1 мм; 2 мм; 3 мм, 7 мм.
2. Аналитические весы «Mettler Toledo XS 204»; весы Мора ВА-4М; весы для сыпучих материалов технические ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20; весы электронные САРТО ГОСМ ЛВ 210-А.
3. Спектрофотометры СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) и «Specord 40» (Analytik Jena, Germany).
4. Спектрометр «Bruker AM-300» (ЯМР-спектроскопии).

5. Пластинки для хроматографии «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ, Россия» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ, Россия».
6. Системы для хроматографирования (хлороформ-этиловый спирт, хлороформ-этиловый спирт-вода, бутанол-уксусная кислота-вода в соотношении 4:1:2 и 4:1:5 по объёму).
7. Цифровые микроскопы марки Motic: DM-111, DM-1802 и DM-39C-N9GO-A.
8. Масс-спектрометр «Kratos MS-30» (масс-спектрометрии).

2.2. Методы исследования.

2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа.

Макро- и микроскопический анализ сырья проводили в соответствии с фармакопейной статьей на корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы Государственной Фармакопее СССР XI издания и Государственной Фармакопее РФ XIII издания (ОФС.1.5.1.0006.15) [18, 19, 20, 21]. Исследовали корни, рассматривая их невооруженным глазом и с помощью лупы (10×). Изучали и оценивали диагностические признаки: форму, особенности наружной поверхности и излома, размер, цвет с поверхности и на свежем изломе, запах и вкус.

- Определяли размеры корней линейкой и при помощи программного оборудования цифрового стереоскопического микроскопа MoticDM-39C-N9GO-A. При дневном освещении определяли цвет, при разламывании – запах, пробовали измельченные части растений для оценки вкуса.

Микроскопическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной и яснотки белой, а также крапивы жгучей проводили при помощи световых микроскопов.

Подготовку микропрепаратов осуществляли по общей фармакопейной методике на корни корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы [19, 21].

Приготовление микропрепаратов «Поперечный срез корней и корневищ крапивы двудомной и яснотки белой, корня крапивы жгучей».

Небольшие куски подземных органов помещали в очищенную холодную воду и выдерживали около суток, затем помещали в смесь этилового спирта 95% и глицерина (1:1) на 3 суток. После размягчения, готовили поперечные срезы, затем микропрепараты в растворе глицерина 33% [19].

Окраску микропрепаратов осуществляли следующим способом:

1. Одревесневшую (лигнифицированную) оболочку клеток окрашивали раствором сернокислого анилина:
2. Крахмальные зерна окрашивали раствором Люголя.
3. Пробковую ткань окрашивали раствором Судана III.

Приготовление раствора сернокислого анилина: 2,0 г сернокислого анилина растворяли в смеси из 4 мл ледяной уксусной кислоты и 194 мл 50% спирта этилового [21, 32, 59].

Приготовление раствора Судана III: 0,01 г судана III растворяли в 5 мл 96% спирта этилового, добавляли 5 мл глицерина безводного [19,21, 32].

Приготовление раствора Люголя: 2,0 г калия иодида растворяли при нагревании в 5 мл воды очищенной, добавляли 1,0 г кристаллического иода, доводили водой до 300 мл [21, 130].

2.2.2. Метод тонкослойной хроматографии.

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли для анализа водно-спиртовых извлечений из растительного сырья, а также при контроле хода колоночной хроматографии.

ТСХ-анализ осуществляли на пластинках «Сорбфил ПТСХ–АФ–А–УФ». Пластинки предварительно выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100 - 105°C в течение 1 часа. На расстоянии 1,5 см от края

пластинки проводили линию старта, на которую наносили пробы образцов точечно микропипеткой, выдерживая между соседними пятнами интервал в 1 см. Затем высушивали пластинку на воздухе в течении 5 минут, помещали в камеру, предварительно насыщенную парами, и хроматографировали восходящим способом в различных системах растворителей:

1. хлороформ – этиловый спирт – вода 26:16:3
2. хлороформ – этиловый спирт 19:1, 16:1, 9:1
3. *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2)

При прохождении фронта растворителей около 8 см, пластинку вынимали и сушили на воздухе в течение 5 – 10 минут до полного удаления запаха растворителей. Детекцию проводили в видимом и УФ-свете при длине волны $\lambda=254$ нм и $\lambda=366$ нм. Для химической оценки природы веществ, обнаруживаемых на хроматограмме, пластинку обрабатывали реактивами: раствором diazobenzolсульфокислоты (ДСК), 20% раствором серной кислоты, 20% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты, 10% раствором фосфорно-молибденовой кислоты в спирте (на наличие стероидных веществ).

Приготовление щелочного раствора diazobenzolсульфокислоты:

0,01г diazobenzolсульфокислоты растворяют в 10 мл 10% раствора натрия карбоната. Раствор используют свежеприготовленным (для выявления фенольных соединений).

Приготовление раствора фосфорновольфрамовой кислоты:

2,0 г фосфорновольфрамовой кислоты растворяют в 10 мл воды. Раствор используют свежеприготовленным (для выявления тритерпеновых сапонинов).

Приготовление 20 % раствора серной кислоты:

20 мл серной кислоты смешивают с достаточным количеством воды (50-70 мл), охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до 100 мл (для выявления тритерпеновых сапонинов) [41].

Приготовление раствора фосфорномолибденовой кислоты:

1,0 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в 10 мл 95 % спирта. Раствор используют свежеприготовленным.

2.2.3. Метод спектрофотометрии.

Метод использовали для качественного анализа и количественной оценки содержания БАВ в сырье растительных объектов [3, 17, 18, 75, 81, 11]. Изучение характеристик кривой поглощения позволило сделать предварительные выводы о химическом составе сырья. С целью количественной оценки групп БАВ провели количественный анализ суммы стеринов при взаимодействии с серной кислотой концентрированной, флавоноидов при взаимодействии с хлоридом алюминия, фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту и белков при взаимодействии с биуретовым реактивом [15, 19, 20, 21, 73, 86].

2.2.3.1. Методика количественного определения стеринов

Определение суммы стеринов в сырье крапивы двудомной проводили методом, разработанным основе определения тритерпеновых соединений в концентрированной серной кислоте в пересчете на олеаноловую кислоту [15, 73].

2.2.3.2. Методика количественного определения суммы флавоноидов сырья крапивы двудомной

Флавоноиды определяли методом дифференциальной спектроскопии в пересчете на рутин [20, 21].

2.2.3.3. Методика количественного определения фенилпропаноидов в различных видах сырья крапивы двудомной

Определение фенилпропаноидов проводили методом спектроскопии в пересчете на хлорогеновую кислоту. Методику определения фенилпропаноидов в листьях крапивы двудомной ГФ XIII (т. 3, ФС.2.5.0019.15) применили и для остальных видов сырья [20].

2.2.3.4. Методика количественного определения суммы белков.

Анализ суммы белков проводили методом прямой спектрофотометрии с использованием биуретового реактива [86].

2.2.4. Метод гравиметрии

В связи с отсутствием единой методики количественного определения полисахаридов, мы проводили гравиметрическое определение суммы этой группы веществ, взяв за пример частную статью на листья подорожника большого [20].

2.2.5. ¹H-ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия

Спектральные и физико-химические свойства выделенных веществ изучали с использованием следующих методов: ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker AM 300 SF=300.13 MHz на базе Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва). 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 °C [18].

2.3. Технологические методы получения препаратов на основе корневищ с корнями крапивы двудомной

Для определения наиболее оптимального способа получения жидкого экстракта из корневищ с корнями крапивы двудомной, использовали следующие методы: реперколяция и ремацерация. Причем они проводились как по классической схеме, так и с применением

нагревания на последней стадии получения препарата. Все образцы жидких экстрактов были получены в лабораторных условиях. Все жидкие экстракты были получены нами на основе 70% этилового спирта в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:1.

Технология получение жидкого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной методом ремацерации [118]: 1/3 рассчитанного экстрагента заливали на измельченное сырье, настаивали в течение 2-х суток, сливали в колбу для готового экстракта. После этого, сырье в колбе заливали 2-й порцией экстрагента. На следующие сутки извлечение опять сливали в ту же емкость, объединяя с первым извлечением. Сырье в колбе снова заливали новой порцией экстрагента. Через сутки сливали содержимое колбы в ту же колбу, объединяя все 3 извлечения.

Перемешивав суммарное извлечение, оставляли на двое суток при температурном режиме не выше 8 °С. Извлечение, отфильтровывав от осадка, фасовали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Технология получение жидкого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной методом ремацерации с нагреванием: 1/3 рассчитанного экстрагента заливали на измельченное сырье, настаивали в течение 2-х суток, сливали в колбу для готового экстракта. После этого, сырье в колбе заливали 2-й порцией экстрагента. На следующие сутки извлечение опять сливали в ту же емкость, объединяя с первым извлечением. Сырье в колбе снова заливали новой порцией экстрагента. Через сутки содержимое колбы нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане и сливали извлечение в ту же колбу, объединяя все 3 извлечения.

Перемешивав суммарное извлечение, оставляли на двое суток при температурном режиме не выше 8 °С. Извлечение, отфильтровывав от осадка, фасовали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Технология получение жидкого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной методом реперколяции с нагреванием [118]:

День 1. В 3 термостойкие колбы помещали по одной части корневищ с корнями крапивы двудомной. В 1-ю колбу добавляли три объема 70% спирта этилового, во вторую колбу – два объема спирта этилового 70% на смачивание. Колбы плотно укупоривали, оставляли на сутки.

День 2. Из 1-й колбы полученное извлечение переливали во 2-ю колбу. В 1-ю колбу добавляли один объем чистого экстрагента – 70% спирта этилового. В 3-ю колбу добавляли два объема спирта этилового 70% на смачивание. Колбы плотно укупоривали, оставляли на сутки.

День 3. Из 2-й колбы полученное извлечение переливали в 3-ю колбу, а извлечение из 1-й колбы – во 2-ю. В 1-ю колбу добавляли один объем этилового спирта 70%. Укупоривали колбу и оставляли на сутки.

День 4. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник, из 2-й колбы извлечение переносили в 3-ю колбу. Содержимое 1-й колбы нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане, затем остужали и переносили извлечение во 2-ю колбу. 2-ю и 3-ю колбу плотно укупоривали и оставляли на сутки. Разгружали 1-ю колбу.

День 5. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник. Содержимое 2-й колбы нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане, затем остужали и переносили извлечение в 3-ю колбу. Укупоривали 3-ю колбу и оставляли на сутки. Разгружали 2-ю колбу.

День 6. Содержимое 3-й колбы нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане, затем остужали и переносили извлечение в приемник. Разгружали 3-ю колбу.

Перемешивав суммарное извлечение, оставляли на двое суток при температурном режиме не выше 8 0С. Извлечение, отфильтровывав от осадка, фасовали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Технология получение жидкого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной методом реперколяции [118]:

День 1. В 3 термостойкие колбы помещали по одной части корневищ с корнями крапивы двудомной. В 1-ю колбу добавляли три объема 70%

спирта этилового, во вторую колбу – два объема 70% спирта этилового на смачивание. Колбы плотно закупоривали, оставляли на сутки.

День 2. Из 1-й колбы полученное извлечение переливали во 2-ю колбу. В 1-ю колбу добавляли один объем чистого экстрагента – 70% спирта этилового. В 3-ю колбу добавляли два объема 70% спирта этилового на смачивание. Колбы плотно закупоривали, оставляли на сутки.

День 3. Из 2-й колбы полученное извлечение переливали в 3-ю колбу, а извлечение из 1-й колбы – во 2-ю. В 1-ю колбу добавляли один объем 70% спирта этилового. Закупоривали колбу и оставляли на сутки.

День 4. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник, из 2-й колбы извлечение переносили в 3-ю колбу. Извлечение из 1-й колбы переносили во 2-ю колбу. 2-ю и 3-ю колбу закупоривали и оставляли на сутки. Разгружали 1-ю колбу.

День 5. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник. Извлечение из 2-й колбы переносили в 3-ю колбу. 3-ю колбу закупоривали и оставляли на сутки. Разгружали 2-ю колбу.

День 6. Извлечение из 3-й колбы и переносили в приемник. Разгружали 3-ю колбу.

Перемешивав суммарное извлечение, оставляли на двое суток при температурном режиме не выше 8 °С. Извлечение, отфильтровывая от осадка, фасовали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Во всех случаях мы получили жидкость темно-желтого цвета со специфичным запахом.

Также нами был получен образец густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной. Для получения густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной использовали метод сгущения (упаривания) жидкого экстракта крапивы двудомной в роторно-вакуумном испарителе. Температура при этом не превышала 50 °С. Полученный густой экстракт представлял собой вязкую массу темно-коричневого цвета со специфичным запахом.

2.4. Метод препаративной адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии

Для изучения химического состава корневищ с корнями крапивы двудомной и для препаративного выделения веществ в индивидуальном виде нами использовался метод адсорбционной колоночной хроматографии.

Для нанесения на сорбент использовался экстракт корневищ с корнями крапивы двудомной, полученный в соотношении 1:5.

Жидкий экстракт из корневищ с корнями крапивы двудомной упаривали в роторно-вакуумном испарителе до густого остатка, который смешивали с силикагелем в соотношении 1:3 (Силикагель КСКГ фр. 0,04-0,10мм ГОСТ 3956-76), высушивали и вносили в колонку в виде взвеси в хлороформе. Вещества элюировали в градиентном режиме смесью гексана с хлороформом, хлороформа с этанолом и этанола с водой в градиентном режиме.

В результате исследования были получены фракции (более 50), содержащие отдельные БАС подземной части крапивы двудомной. С целью их очистки использовали полиамид для колоночной хроматографии (производитель WoelmPharma, Германия) и силикагель (марка описана выше). Очищение целевых веществ проводили методом рехроматографии и перекристаллизации.

2.5. Фармакологические методы

2.5.1. Изучение острой токсичности.

Острую токсичность густого экстракта корневищ с корнями крапивы изучали на 20 белых беспородных половозрелых крысах мужского пола массой 200-220 г. Животных разделили на 2 группы по 10 крыс в каждой. Одна группа получала однократно внутрижелудочно густой экстракт в дозе 15 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, а другая группа – очищенную воду в аналогичном объеме. В первый день животные находились под

непрерывным наблюдением. Общая продолжительность эксперимента составила 2 недели [5, 78, 87].

2.5.2. Изучение диуретической активности.

Исследуемые препараты вводили внутривентрикулярно через зонд в дозе 10 мг/кг на фоне водной нагрузки в объеме 3% от массы тела животного [7, 8, 10]. Препарат разводили очищенной водой непосредственно перед введением животным. После введения животных помещали в обменные клетки для сбора мочи на 24 ч. В ходе исследования определялся диурез, натрийурез, калийурез и креатининурия за 4 ч и 24 ч эксперимента. Собирались 4-х ч и 24-х ч порции мочи. Определялась почечная экскреция воды, регистрировалась концентрация натрия и калия методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости ПАЖ-1, креатинина – колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3 [8, 39, 54, 69, 85, 97].

2.6. Микробиологические методы

В рамках настоящей работы проводился скрининговый анализ антимикробной активности водно-спиртовых извлечений (на 40% и 70% этиловом спирте) из корневищ с корнями крапивы двудомной. Для контроля использовались экстрагенты – спирт этиловый 40% и спирт этиловый 70%. Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом двойных серийных разведений в бульоне (микрометод) в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Учет результатов осуществляли путем визуального сравнения роста микроорганизма в присутствии препарата с ростом культуры в ячейке и без него. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма [82].

Для определения антимикробной активности настоек использовали следующие тестовые культур микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 27853), *Staphylococcus aureus* (штамм 25923), *Escherihia coli* (штамм 25922), *Bacillus cereus* (клинические штаммы), *Candida albicans* (клинические штаммы).

2.7. Статистические методы обработки результатов исследований

Математическая обработка данных проводилась в соответствии с ГФ РФ XIII издания, а также с использованием компьютерных программ. Статистическую обработку экспериментальных данных исследований (P=95%) проводили с помощью программы Microsoft Excel, Statistica и критерия Стьюдента с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения. Отсутствие систематической ошибки разработанных методик подтверждали опытами с добавками.

Таким образом исследования проводили с помощью современных методов исследования лекарственного растительного сырья на современных моделях оборудования.

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДЗЕМНЫХ ЧАСТЕЙ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ, КРАПИВЫ ЖГУЧЕЙ И ЯСНОТКИ БЕЛОЙ

В рамках фармакогностического исследования сырья корневищ с корнями крапивы двудомной нами решался комплекс задач, в том числе, вопросы стандартизации ЛРС. Как известно, одним из основных методов подтверждения подлинности ЛРС является морфолого-анатомический анализ [16, 18, 49, 81].

В текущем разделе приводятся результаты морфолого-анатомических исследований корневищ с корнями крапивы двудомной, а также сравнительных анализ подземных частей сырья примесных ей видов: корней крапивы жгучей и корневищ с корнями яснотки белой [16, 21, 27, 46, 55, 57, 74].

Как отмечалось ранее (см. Глава 1), диагностические признаки, характерные для корневищ с корнями крапивы двудомной частично описаны в ряде зарубежных фармакопей [113, 115]. Однако в РФ нормативная документация на корневища с корнями крапивы двудомной отсутствует. Это в свою очередь препятствует процессу разработки современных отечественных ЛС на их основе [60].

3.1. Сравнительное морфологическое исследование подземных частей крапивы двудомной, крапивы жгучей и яснотки белой

Как указывалось выше (см. Глава 1), основными примесями при заготовке листьев крапивы двудомной являются крапива жгучая и яснотка белая. Это связано с большим морфологическим сходством листьев этих растений, а также тем обстоятельством, что все три растения произрастают в сходных экологических условиях (рис. 3). Следует также отметить, что ошибочный сбор сырья возможен лишь при заготовке сырья от дикорастущих растений [20, 89, 90, 91]. При изучении морфологических признаков трех видов растений нами были систематизированы

литературные данные, а также результаты собственных исследований [6] и оформлены в виде сравнительной таблицы (Приложение 2, табл. 1).

Из таблицы 1 Приложения 2 видно, что основной морфологической чертой, отличающей яснотку белую от представителей рода *Urtica*, является строение цветка и отсутствие эмергенцев на поверхности листовых пластинок. Крапива жгучая по отношению к крапиве двудомной более низкорослое растение, листовые пластинки которой имеют яйцевидную почти овальную форму с городчатым краем, а не пильчатым, как у крапивы двудомной. Кроме того, крапива жгучая – однолетник и не имеет сильно развитой подземной системы с мощным корневищем.

Тем не менее, необходимость в сравнительном исследовании подземных органов целевого вида (крапива двудомная) и примесных видов (крапива жгучая и яснотка белая) остается, так как в ходе заготовки подземных органов крапивы двудомной, которая осуществляется в осенний период, надземные органы растений практически отсутствуют или не имеют весомого значения для правильной диагностики заготавливаемых растений. Учитывая возможность заготовки сырья от дикорастущих растений, необходимым условием является проведение морфолого-анатомического анализа для подтверждения подлинности. Поэтому работа по изучению морфологических, анатомических и гистологических признаков является столь актуальной задачей.

Морфологически корневища с корнями крапивы двудомной представляют собой совокупность сильно переплетенных корней различной длины (до 30 см). Корни с поверхности имеют желто-коричневую окраску (рис. 4Б). Корни крапивы двудомной варьируют в диаметре по всей их длине, достигая 9 мм. Они часто тангентально сдавлены либо имеют клубнеподобные утолщения (рис. 4В) На изломе корни ровные, цвет излома светло-желтый, почти белый. Запах слабый специфический.



Рисунок 4 - Корневище с корнями крапивы двудомной (Самара, 2014).
 А – Фрагмент корневища; Б – фрагмент корня; В – корень растения с поверхности (x40).

Корневища крапивы двудомной темно-бурые с поверхности. Они имеют четко выраженные расширенные узлы с отходящими придаточными корнями и междоузлия более узкие и ребристые, чаще четырехгранные (рис. 4А). На изломе корневище волокнистое. Оно ломается с трудом и в его центре отчетливо заметна темноокрашенная, в сравнении с ксилемной частью, сердцевина или полость (рис. 4А).



Рисунок 5 – Подземные органы примесных видов.
 А – крапива жгучая; Б – ясотка белая.
 Обозначения: 1 – стебель; 2 – корневище; 3 - корень.

Корень крапивы жгучей тонкий, светло-желтый с поверхности. Корень практически не ветвится. По диаметру поперечного сечения он

значительно уступает таковому у крапивы двудомной (рис. 5А). В основании корня часто имеется остаток стебля (рис. 5А).

Корневище яснотки по структуре схоже с корневищем крапивы двудомной и отличается меньшим диаметром. Корни тонкие, светло-серые с поверхности, сильно переплетенные между собой (рис. 5Б).

Выявленные особенности строения подземных органов крапивы двудомной, крапивы жгучей и яснотки белой сведены в сравнительную таблицу (см. Приложение 2).

3.2. Анатомо-гистологическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной

Ввиду того, что анализируемое сырье крапивы двудомной является морфологически сложно организованным, а именно оно содержит как корневище, так и корни вторичного типа, имеется необходимость доработки и усовершенствования раздела микроскопии проекта ФС. Для разработки раздела «Микроскопия» на корневище с корнями крапивы двудомной, был проведен морфолого-анатомический анализ указанного сырья.

3.2.1. Анатомо-гистологическое исследование корня вторичного строения крапивы двудомной

При рассмотрении на поперечном сечении, корень крапивы двудомной имеет классическое строение пучкового типа (рис. 6, 7).

С поверхности корень покрыт слоем пробки толщиной от 3 до 5 слоев клеток. Стенки клеток пробки окрашены в светло-коричневый цвет. Дают классическую реакцию на раствор Судана III (рис. 8).

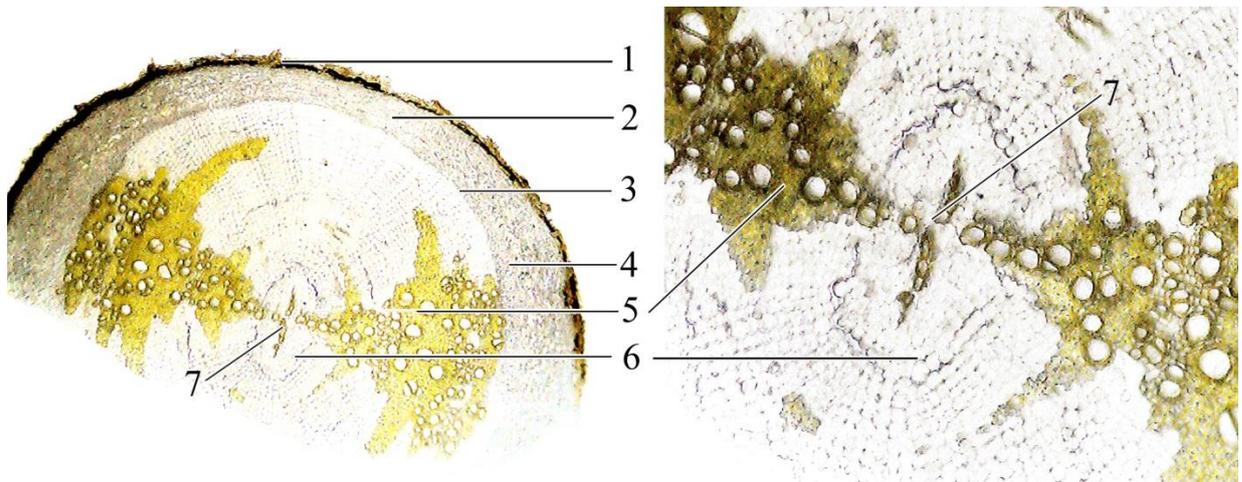
Непосредственно под пробкой располагается слабо выраженный слой паренхимы перициклической зоны коры пластинчатого типа (рис. 8). Клетки её при рассмотрении на поперечном сечении вытянутые, тангентально-сплюснутой формы. Клетки живые, имеют протопласт.

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 (Приложение 3).

Лубяные волокна в большом количестве хаотично располагаются в паренхиме коры. На поперечном сечении лубяные волокна угловатой формы, редко окрашенные. Они не образуют скоплений. При обработке сернокислым анилином, стенки клетки не окрашиваются, следовательно, не одревесневшие.

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 (рис. 6, 7).

Паренхима радиальных лучей представлена клетками округлой формы, протопласт которых содержит большое количество крахмала (Приложение 3). Клетки паренхимы радиальных лучей расположены линейно друг под другом, слоями. Сектора вторичной ксилемы имеют форму конусов, расходящихся к периферии корня.



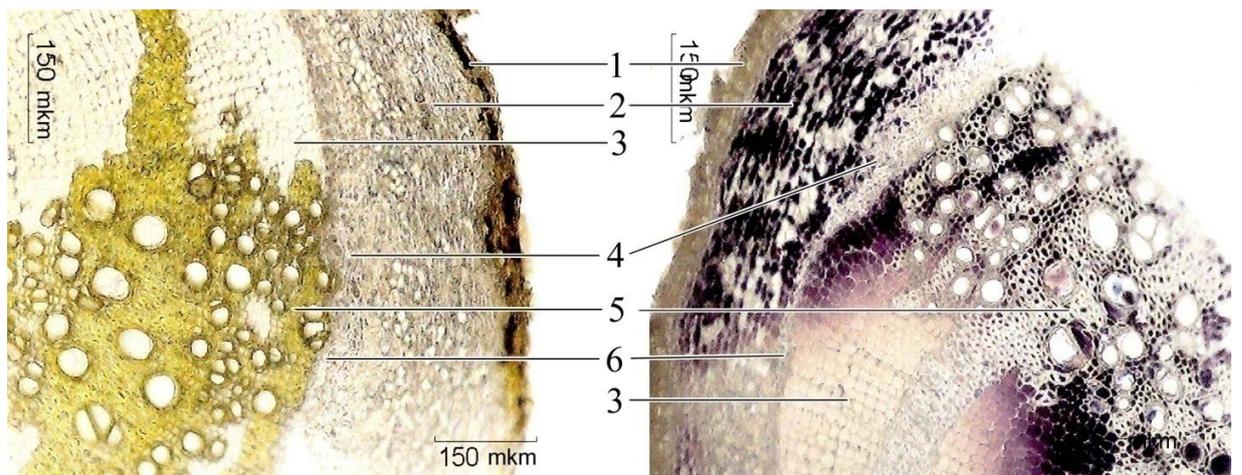
А

Б

Рисунок 6 – Поперечный срез корня вторичного строения крапивы двудомной, окрашенный сернокислым анилином.

А - общий вид (x40) Б - фрагмент центрального цилиндра (x100).

Обозначения: 1 - пробка; 2 - паренхима коры; 3 - зона камбия; 4 - флоэма; 5 - ксилема вторичная; 6 - радиальный луч; 7 - ксилема первичная.



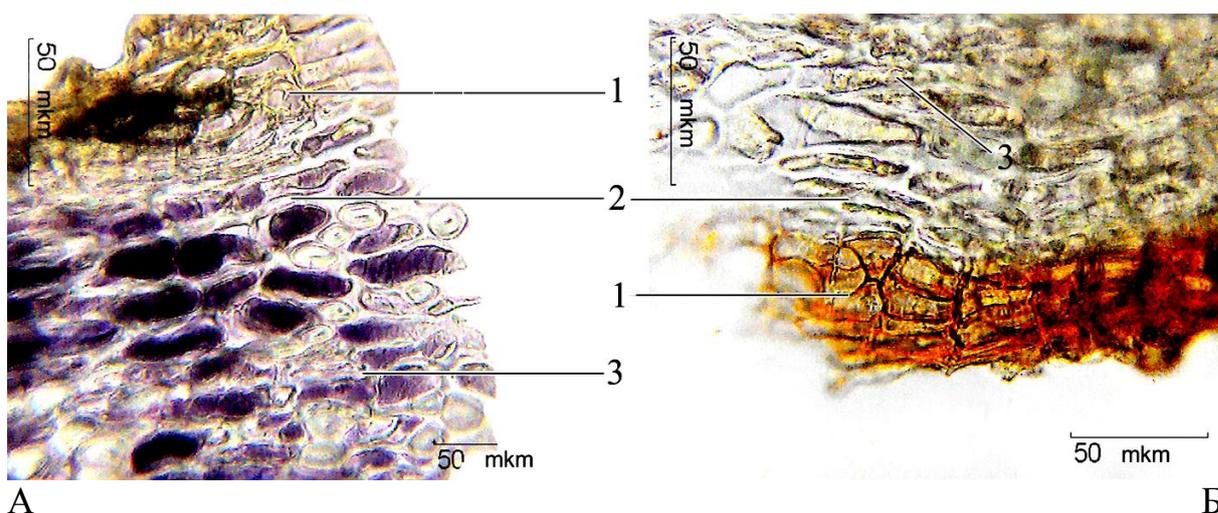
А

Б

Рисунок 7 – Поперечный срез корня вторичного строения крапивы двудомной (x100).

А – обработан р-м сернокислого анилина; Б – обработан р-м Люголя.

Обозначения: 1 – пробка; 2 - паренхима коры; 3 - радиальный луч; 4 - ткани флоэмы; 5 - ксилема вторичная; 6 - зона камбия.



А

Б

Рисунок 8 – Поперечный срез корня вторичного строения крапивы двудомной. Пробка (x400).

А - обработан р-м Люголя; Б - обработан р-м Судана III.

Обозначения: 1 - клетки пробки; 2 - паренхима перициклической зоны; 3 - паренхима коры.

3.2.2. *Анатомо-гистологическое исследование корневища крапивы двудомной*

На поперечных срезах корневища крапивы двудомной видно, что оно имеет пучковое строение (рис. 9). Покровная ткань представлена пробкой, клетки которой окрашиваются раствором Судана III (рис. 10).

Паренхима коры в объеме незначительна, содержит темные включения. В коре встречаются группы клеток, содержащие большое количество запасного крахмала (рис. 10, 11). Кора содержит также механические элементы, представленные группами одревесневших клеток (рис. 10).

Клетки камбиальной зоны вытянутые, с тонкими стенками, расположены параллельными рядами. Камбиальная зона проходит сплошным кольцом по всему корневищу, включает пучковый и межпучковый камбий (рис. 13).

Проводящие пучки открытые, коллатеральные. Ксилема значительно мощнее флоэмы. Проводящие элементы ксилемы представлены сосудами (рис. 9, 11). Пучки соединены характерными кольцами склеренхимы (рис.

12). Клетки склеренхимы многоугольные, внутри имеют полость, их стенки подвергаются одревеснению, в связи с чем окрашиваются раствором сернокислого анилина в желтый цвет.

В межпучковой паренхиме центрального цилиндра встречаются группы клеток, содержащие большое количество запасного крахмала. Причем, эти группы клеток находятся в ближайших к первичной коре слоях паренхимы. Более глубокие слои паренхимы (ближе к сердцевине) не содержат крахмала (Приложение 3).

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 значительно больше (Приложение 3).

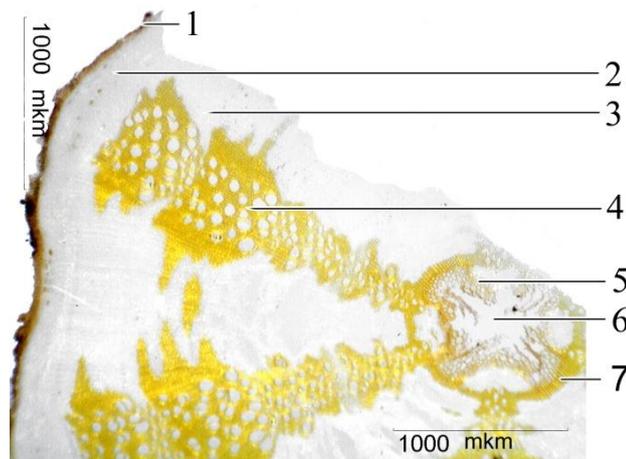
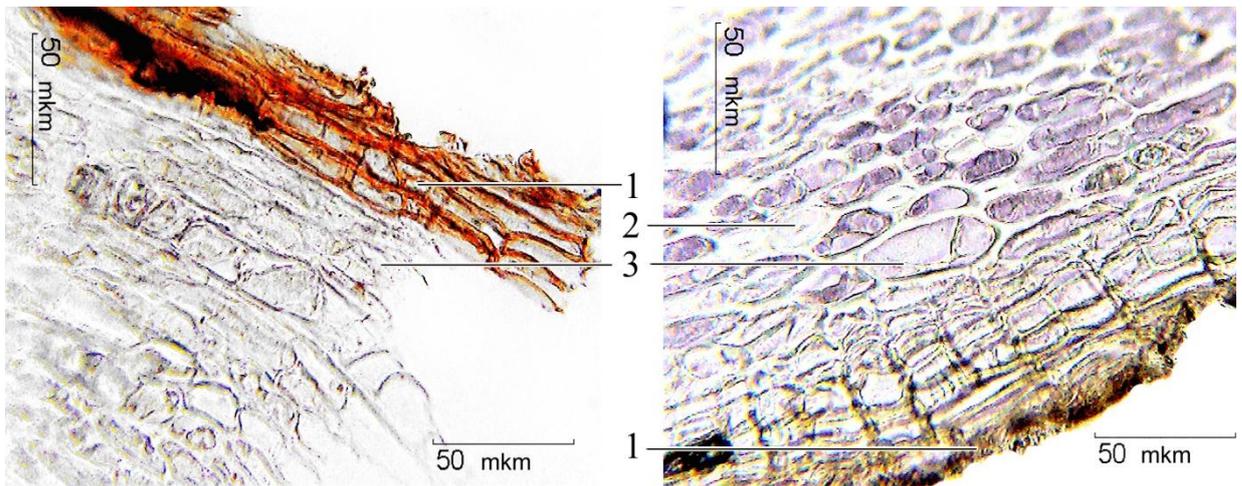


Рисунок 9 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной (x40).

Обозначения: 1 - пробка; 2 - клетки первичной коры; 3 - сердцевидный луч; 4 - ксилема; 5 - первичная ксилема; 6 - сердцевина; 7 - склеренхимное кольцо.



А

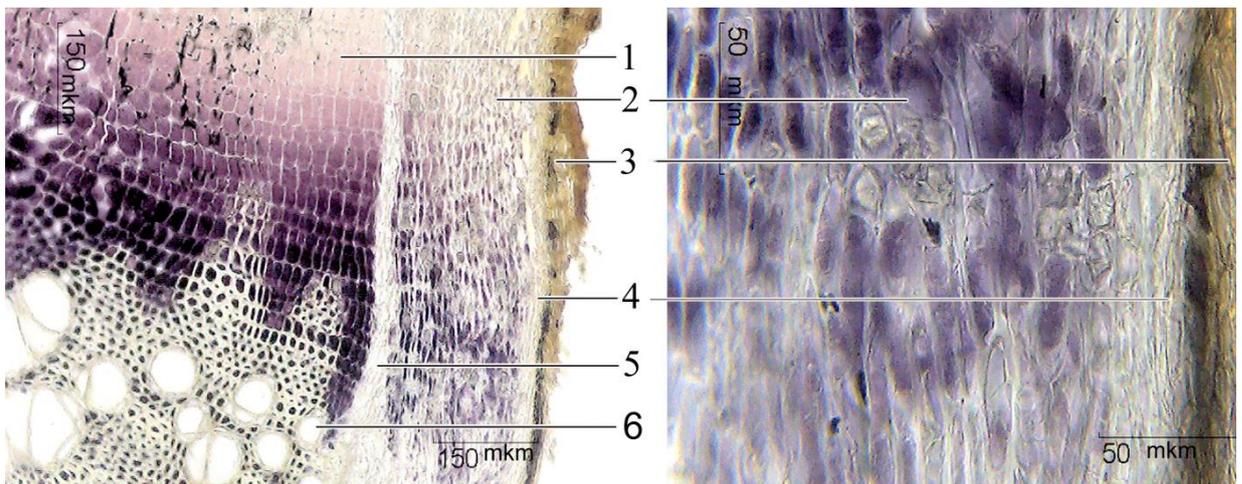
Б

Рисунок 10 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной.

Покровная ткань (x400)

А - обработан р-м Судана III; Б - обработан р-м Люголя.

Обозначения: 1 - пробка; 2 – ткани флоэмы; 3 - клетки первичной коры.



А

Б

Рисунок 11 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной, окрашенный р-м Люголя. Первичная кора.

А - пробка (x100); Б - фрагмент коры (x400).

Обозначения: 1 - радиальный луч; 2 - паренхима первичной коры; 3 - пробка; 4 – смятые клетки паренхимы; 5 - камбий; 6 - ксилема.

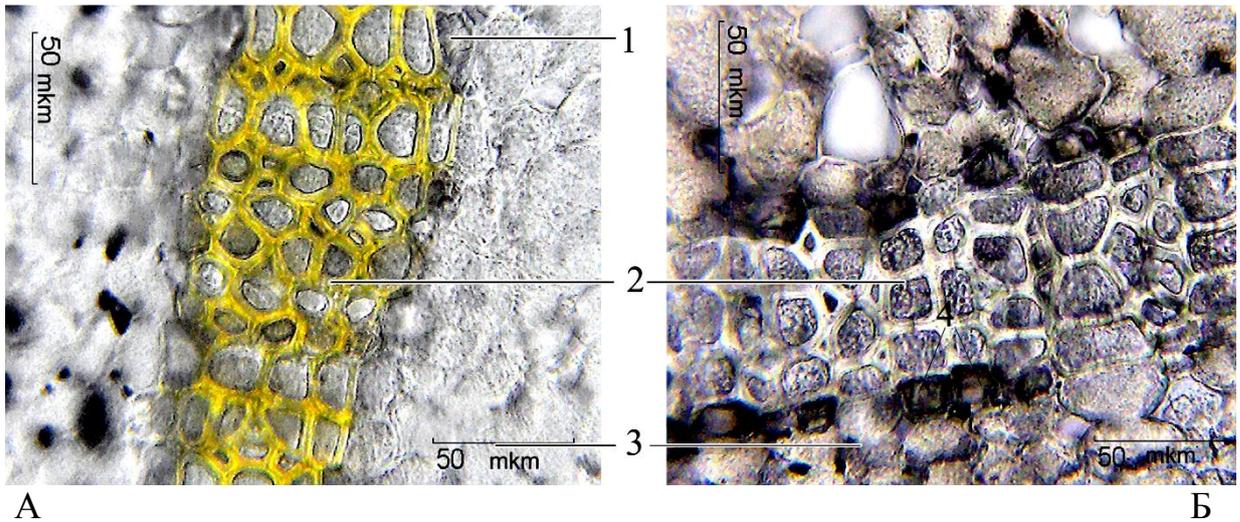


Рисунок 12 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной. Склеренхимное кольцо (x400).

А - обработан р-м сернокислого анилина; Б - обработан р-м Люголя.

Обозначения: 1 - склеринхимное кольцо; 2 - клетки склеренхимы; 3 - паренхима радиального луча.

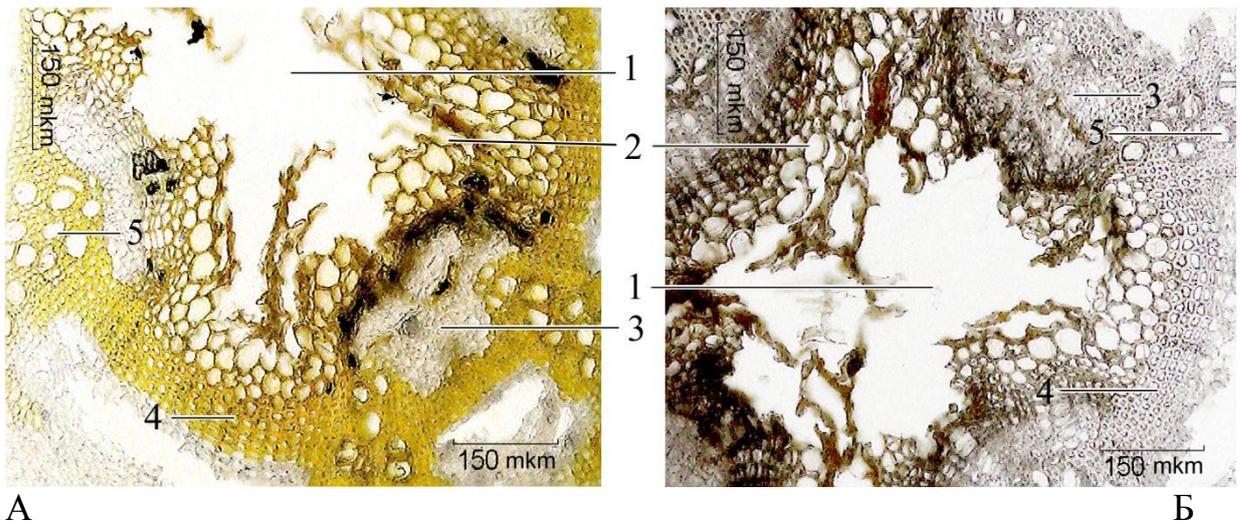


Рисунок 13 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной (x400).

А - обработан р-м сернокислого анилина; Б - до обработки.

Обозначения: 1 - разрыв паренхимы; 2 - клетки сердцевины; 3 - радиальный луч; 4 - склеренхимное кольцо; 5 - ксилема.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были выявлены характерные анатомо-диагностические признаки корневищ и корней крапивы двудомной.

На основании полученных данных можно выделить следующие диагностические признаки, характерные для корней вторичного строения крапивы двудомной:

- ✓ В центре корня диархная структура первичной ксилемы;
- ✓ Проводящие ткани центрального цилиндра представлены двумя коллатеральными пучками в виде нарастающих конусов вторичной ксилемы и тканей вторичной коры;
- ✓ Покровные ткани в виде нескольких слоев (до 5) пробки;
- ✓ Ткани коры содержат значительный запас неструктурированного крахмала;
- ✓ Ткани радиальных лучей склерифицированные и одревесневшие.

Диагностические признаки, характерные для корневища крапивы двудомной:

- ✓ наличие открытых коллатеральных проводящих пучков с хорошо развитой ксилемой;
- ✓ характерное групповое расположение паренхимных клеток, содержащих запасной крахмал;
- ✓ характерное дугообразное расположение слоев склеренхимы, соединяющих проводящие пучки;
- ✓ склеренхимное кольцо, окружающее разрушенную сердцевину.

На основании выявленных признаков нами был переработан имеющийся раздел «Микроскопия» фармакопейной статьи (ФС) на корневища с корнями крапивы двудомной.

3.3. Морфолого-анатомическое исследование подземной части крапивы жгучей

Как указывалось выше (см. Глава 1 настоящих исследований), крапива жгучая является однолетним растением, имеющим стержневую корневую систему. Однако может являться примесью к крапиве двудомной. В связи с

этим, целесообразно введение в раздел ФС «Числовые показатели» такой показатель, как «Части других растений» не более 5%.

Визуально корни крапивы жгучей слабо отличаются от таковых крапивы двудомной, особенно в измельченном сырье.

Корни крапивы жгучей вторичного строения, непучкового типа. На поперечном сечении, в центре корня, видны элементы двулучевой первичной ксилемы по аналогии с крапивой двудомной (рис. 14А; Приложение 5 рис. 5Б).

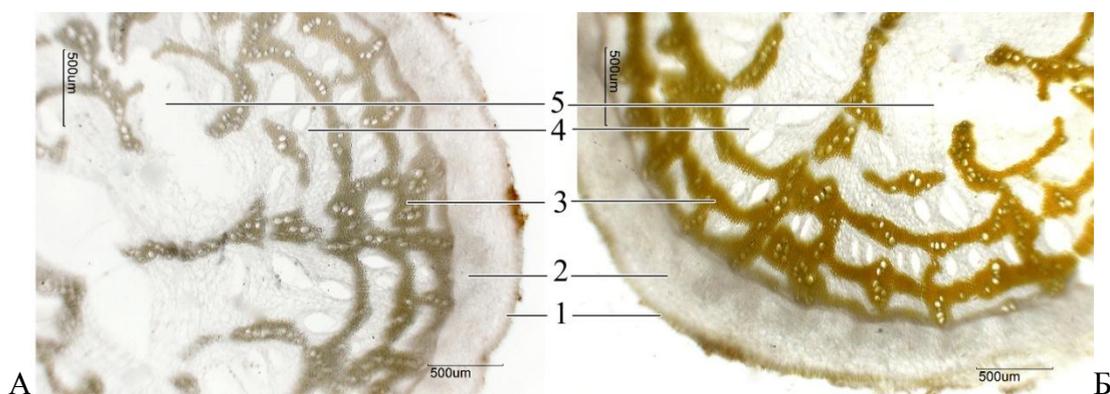


Рисунок 14 – **Корень крапивы жгучей. Поперечный срез (x40):**

А – Общий вид до окраски, Б – Окраска раствором сернокислого анилина. Обозначения: 1 – пробка; 2 – паренхима коровой части; 3 – склерифицированные ткани ксилемы; 4 – паренхима ксилемы; 5 – сосуды ксилемы.

С поверхности корень покрыт незначительным слоем пробки, состоящей из крупных угловатых тангентально сжатых клеток (Приложение 5, рис. 1).

Коровая часть корня выражена слабо и составлена мелкими тонкостенными клетками, содержащими незначительное количество ассимиляционного крахмала (Приложение 5, рис. 2).

Проводящие элементы флоэмы мелкоклеточные, как правило, нативно слабо окрашенные в желто-коричневый цвет.

Основной объем корня занимает ксилемная часть. Проводящие элементы ксилемы расположены внутри радиальных групп, сильно армированных склеренхимных волокон. Паренхима радиальных лучей,

состоящая из крупных тонкостенных клеток, имеет полости рексигенного происхождения (Приложение 5 рис. 4Б). Паренхимные лучи армированы склеренхимными волокнами, расположенными по окружности поясами толщиной до 10-ти клеток, чередующихся с фрагментами паренхимы. Склеренхимных поясов может насчитываться от 3-х до 7-ми в зависимости от размера корня (Приложение 5 рис. 4А). При этом частота склеренхимных поясов увеличивается ближе к камбиальной зоне.

Необходимо отметить, что общее строение корня крапивы жгучей схоже по строению с таковым крапивы двудомной, однако у вторичного корня крапивы двудомной почти отсутствуют армирующие пояса склеренхимы. Они выражены у корневища, что является отличительной особенностью корневой системы и корней сравниваемых видов. Также нами отмечено, что корни крапивы двудомной содержат значительно больше неструктурированного крахмала, чем ткани корня крапивы жгучей. Эта особенность подтверждалась нами гистохимически с помощью реакции с раствором Люголя при многократном повторении окраски поперечных срезов корней сравниваемых видов.

На основании полученных данных можно выделить следующие **диагностические признаки, характерные для корней вторичного строения крапивы жгучей:**

- ✓ Проводящие ткани центрального цилиндра непучкового типа;
- ✓ Незначительный слой пробки;
- ✓ Ткани коры содержат незначительный запас крахмала;
- ✓ характерное дугообразное расположение слоев склеренхимы;
- ✓ В центре корня диархная структура первичной ксилемы.

3.4. Морфолого-анатомическое исследование подземной части яснотки белой

Подземные органы яснотки белой морфологически значительно отличаются от таковых у крапивы двудомной. Однако в виду некоторого

сходства надземных частей растений они все же могут являться примесью. Особенно важное значение при подтверждении подлинности измельченного сырья приобретают анатомические и гистологические признаки, когда морфологические признаки уже не играют большой роли.

3.4.1. Анатомо-гистологическое исследование корня яснотки белой

Корни яснотки белой имеют вторичное строение, на поперечном сечении имеют округлое очертание, без ребер. С поверхности корень покрыт блоком первичной коры (рис. 15). Экзодерма коры с поверхности корня сильно пигментирована, темно-бурого цвета (Приложение 4, рис. 1). Основная паренхима мезодермы – относительно центрального цилиндра – выражена значительно и занимает около 45% от объема органа. Эндодерма не диагностируется, однако при окраске раствором Судана III хорошо визуализируется и заметна по розовой окраске её суберинизированных клеточных стенок (Приложение 4, рис. 3).

Центральный цилиндр непучкового типа с радиально расположенными сосудами вторичной ксилемы. В центре хорошо заметны радиальные лучи первичной ксилемы – остатки тетрархного проводящего пучка первичного корня (Приложение 4, рис. 2).

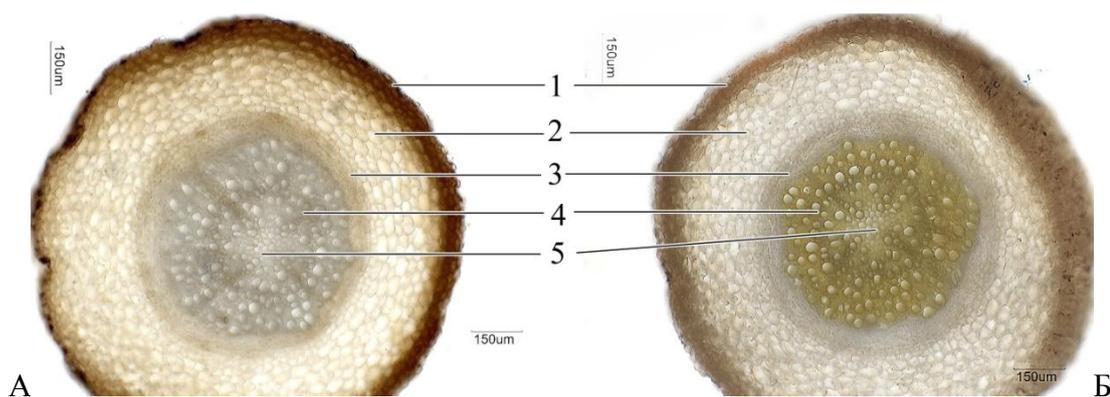


Рисунок 15 – Корень яснотки белой. Поперечный срез (x100):

А – Общий вид до окрашивания; Б – Окраска раствором сернокислого анилина.

Обозначения: 1 – пробка; 2 – запасяющая паренхима; 3 – флоэма; 4 – вторичная ксилема; 5 – первичная ксилема.

Необходимо отметить, что непучковое строение центрального цилиндра и длительно сохраняющиеся элементы первичной коры являются устойчивыми признаками, отличающими придаточные корни яснотки от подземных органов крапивы двудомной.

3.4.2. Анатомо-гистологическое исследование корневища яснотки белой

Корневище яснотки белой значительно крупнее по диаметру относительно её корня. На поперечном сечении оно имеет угловатые неправильные очертания (рис. 16). С поверхности корневище покрыто эпидермой, изредка заменяемой на пробковый слой. Пробка неоднородная, крупноклеточная, окрашенная в бурый цвет (Приложение 5, рис. 4).

Коровая часть выражена слабо и представлена основной паренхимой с тонкостенными клетками. Эндодерма хорошо заметна по пигментированным клеточным стенкам, она исходно светло-коричневого цвета, которые при обработке раствором Судана III окрашиваются в розовый цвет (Приложение 4, рис.4).



Рисунок 16 – Корневище яснотки белой. Поперечный срез (x40):

А – Общий вид до окрашивания; Б – Окраска раствором сернокислого анилина.

Обозначения: 1 – пробка; 2 – паренхима коровой части; 3 – камбий; 4 – ксилема; 5 – вторичный корень; 6 – перимедулярная зона; 7 - сердцевина.

Центральный цилиндр корневища непучкового типа строения с заметными годичными кольцами ксилемы. В центре корневище имеет

небольшую сердцевину округлой формы. Паренхима сердцевины часто содержит полости рексигенного типа.

На основании полученных данных можно выделить следующие **диагностические признаки, характерные для корней вторичного строения яснотки белой:**

- ✓ Основная паренхима выражена значительно больше центрального цилиндра;
- ✓ В центре заметны остатки тетрадного проводящего пучка первичного корня;
- ✓ Проводящие ткани центрального цилиндра непучкового типа;
- ✓ Практически отсутствует запасной крахмал.

Диагностические признаки, характерные для корневища яснотки белой:

- ✓ Неоднородная пробка бурого цвета;
- ✓ Центральный цилиндр непучкового строения;
- ✓ Запасного крахмала не наблюдается.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. К селективным морфологическим признакам корневищ с корнями крапивы двудомной относятся:
 - 1) Обязательное присутствие в сырье и корней, и корневищ;
 - 2) Корни крапивы двудомной с поверхности окрашены в желто-коричневый цвет. Они отличаются по диаметру по всей длине (до 9 мм) и часто тангентально сдавлены и имеют клубнеподобные утолщения. Излом корней ровный, цвет излома светло-желтый, почти белый;
 - 3) Корневища крапивы двудомной темно-бурые с поверхности. Они имеют четко выраженные, расширенные узлы с отходящими придаточными корнями и междоузлия более узкие и ребристые,

чаще четырехгранные. Корневище крапивы двудомной ломается с трудом. На изломе корневище волокнистое, в его центре отчетливо заметна темноокрашенная, в сравнении с ксилемной частью, сердцевина или полость.

2. К селективным анатомо-гистологическим признакам корневищ с корнями крапивы двудомной относятся:

1) Корни крапивы двудомной вторичные пучкового типа строения. В центре органа отчетливо диагностируется двулучевая первичная ксилема. Ксилемная часть центрального цилиндра корня сильно армирована волокнами либриформа, образующими по окружности органа полудуги, иногда замыкающиеся в кольцо. Тонкостенные клетки паренхима сердцевинных лучей содержат неструктурированный крахмал;

2) Корневище пучкового строения. Проводящие пучки открытые, коллатеральные. Ксилема значительно мощнее флоэмы. Пучки соединены характерными дугами или кольцами склеренхимы. Первичная кора относительно центрального цилиндра выражена слабо. В центре паренхима сердцевины сильно пигментирована и, как правило, разорвана.

3. Селективными анатомо-гистологическими признаками корней крапивы жгучей являются следующие черты: непучковый тип строения центрального цилиндра; незначительный слой пробки; незначительный запас крахмала в паренхиме коры; наличие характерных дугообразных слоев склеренхимы; диархная структура первичной ксилемы.

4. Селективными анатомо-гистологическими признаками корневищ с корнями яснотки белой являются следующие черты: основная паренхима корня выражена значительнее центрального цилиндра; в центре корня заметны остатки тетрадного проводящего пучка; проводящие ткани центрального цилиндра корня и корневища непучкового типа; практически

отсутствует запасной крахмал; у корневища неоднородная пробка бурого цвета.

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ

В рамках фитохимического исследования нами проводилось выделение индивидуальных веществ методом колоночной хроматографии и их идентификация, качественное и количественное определение доминантного БАВ, скрининговый ТСХ-анализ водно-спиртовых извлечений из корневищ с корнями крапивы двудомной, определение спектральных характеристик извлечений, изучение динамики накопления веществ.

4.1. Разработка качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной методом тонкослойной хроматографии

4.1.1. Исследования по разработке качественного анализа методом ТСХ

С целью разработки ЛРП на основе корневищ с корнями крапивы двудомной, необходимо подтвердить и уточнить особенности выделения целевых групп биологически активных соединений (БАС) из сырья.

По литературным данным (Глава 1) стеридные вещества являются доминирующими в подземных органах крапивы двудомной и для них наиболее оптимальным экстрагентом для извлечения является 95% этиловый спирт [3, 50, 120]. Однако в зависимости от сырья, данная концентрация не всегда бывает эффективна. В качестве экстрагентов нами использовался этиловый спирт в концентрациях 40%, 70%, 95%, а также хлороформ.

В начале определяли оптимальную концентрацию этилового спирта для получения извлечения из сырья, максимально извлекающего стеридные вещества.

Оптимальный экстрагент выявляли под контролем ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» в системах: *n*-бутанол-ледяная

уксусная кислота-вода (4:1:2) для гидрофильных веществ и хлороформ-этиловый спирт (9:1) для гидрофобных.

Результат оценивали, просматривая хроматограммы в УФ-свете с $\lambda=366$ и 264 нм, а также после обработки реактивами ДСК, ФВК при нагревании до 100 °С (рис. 17).

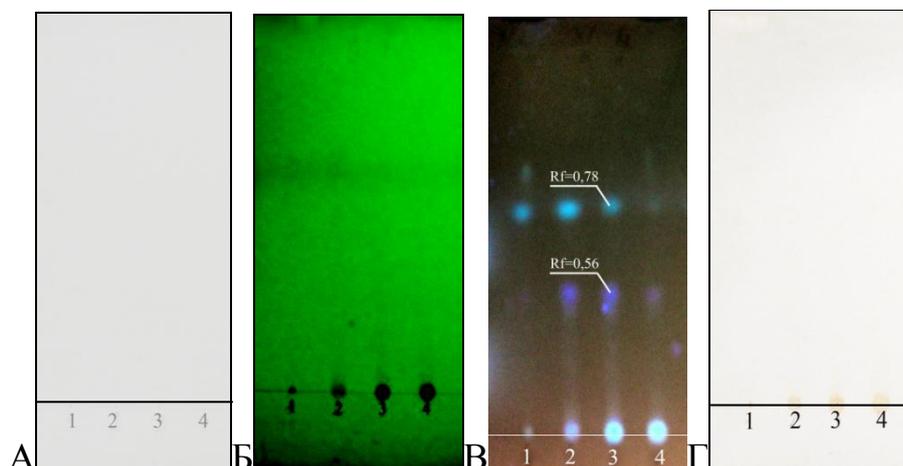


Рисунок 17 - **Хроматограмма анализа сырья в системе растворителей хлороформ – этиловый спирт (9:1).**

А - детекция в видимом свете; Б - детекция при УФ-свете с $\lambda=264$ нм; В - детекция при УФ-свете с $\lambda=366$ нм; Г - проявление раствором ДСК.

Обозначения: 1 – хлороформное извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной; 2 - 95% спиртовое извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной; 3 - 70% спиртовое извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной; 4 - 40% спиртовое извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной.

Хроматограмма, полученная в липофильной хроматографической системе растворителей, обработанная реактивом ДСК, не показала наличие фенольных соединений. Однако детектировали вещества нефенольной природы, сине-зеленой и сине-фиолетовой флуоресценции в УФ свете при длине волны 366 нм с $R_f=0,78$ и $R_f=0,56$ в спиртовых извлечениях. Необходимо отметить, что в хлороформных извлечениях пятно с $R_f=0,56$ почти не флуоресцирует, следовательно, его концентрация крайне низкая (рис.17).

Извлечения аналогичных образцов делится при хроматографировании в системе *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода

(4:1:2). В отличие от предыдущей хроматографической системы, бутанольная делит и сопутствующие вещества фенольной природы, эффективно выявляющиеся обработкой реактивом ДСК. При детекция при УФ-свете с $\lambda=366$ нм обнаруживаются пятна с аналогичной флуоресценцией, как в предыдущей системе, однако значение подвижности отличаются. У сине-зеленого пятна величина $R_f=0,7$, а у сине-фиолетового величина $R_f=0,65$. Необходимо отметить также наличие пятен розоватого цвета, появляющиеся после обработки пластинки реактивом ФВК, что характерно для тритерпеновых структур. Значение R_f этих пятен совпадают с пятнами, детектируемыми при УФ-свете с $\lambda=366$ нм. Аналогичная ситуация сохраняется с 70% и 40% спиртовыми и хлороформными извлечениями, интенсивность свечения пятен которых гораздо ниже, а порой и отсутствуют (рис.18).

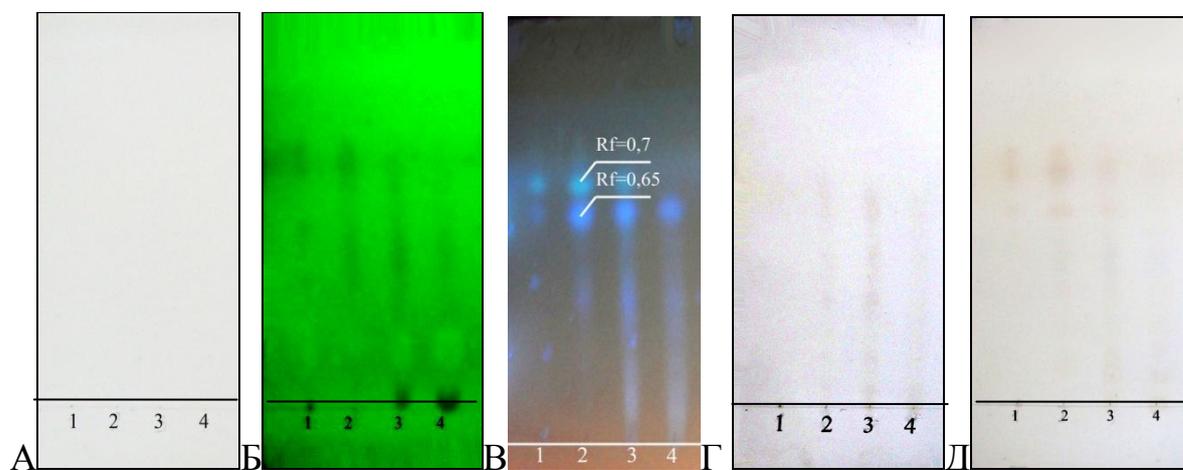


Рисунок 18 - Хроматограмма анализа сырья в системе растворителей *n*-бутанол - уксусная кислота – вода (4:1:2).

А - детекция в видимом свете; Б - детекция при УФ-свете с $\lambda=264$ нм; В - детекция при УФ-свете с $\lambda=366$ нм; Г - проявление раствором ДСК; Д - проявление раствором ФВК.

Обозначения: 1 – хлороформное извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной; 2 - 95% спиртовое извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной; 3 - 70% спиртовое извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной; 4 - 40% спиртовое извлечение корневищ с корнями крапивы двудомной.

Таким образом, ТСХ-анализ дает примерно одинаковые результаты в случае 95% и 70% спирта этилового в качестве экстрагента. Однако по совокупности полученных результатов и литературных данных наиболее оптимальными экстрагентами являются 70% и 95% этиловый спирт. Обе системы позволяют эффективно разделять компоненты для всех, однако предпочтительней является система хлороформ – этиловый спирт – вода (26:16:3), в случае которой достигается более эффективное разделение БАС.

4.1.2. Методика качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной методом ТСХ

Около 1 г сырья (точная навеска) воздушно-сухого сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, добавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. После этого закрывают той же пробкой, охлаждают до комнатной температуры. После чего колбу снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

Хроматографическую пластинку размером 10 x 10 см активируют в сушильном шкафу при 100 - 105 °С в течение 1 ч. На линию старта пластинки микропипеткой наносят 0,02 мл испытуемого раствора в виде точки. Рядом наносят 0,01 мл раствора СО эргостерина в виде точки и 0,01 мл раствора СО β -ситостерина в виде точки. Пластинку помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 1 часа смесью растворителей: хлороформ – этиловый спирт - вода (26:16:3), и хроматографируют восходящим способом.

Пластинку вынимают из камеры, когда фронт растворителей пройдет около 8 см, сушат на воздухе в течение 5 мин. Затем хроматограмму проявляют 10% раствором фосфорно-молибденовой кислоты и нагревают при 100-105 °С. При этом происходит окрашивание пятен эргостерина ($R_f=0,6$) и β -ситостерина ($R_f=0,9$) и пятен испытуемого раствора на аналогичном уровне. Допускается наличие других пятен.

4.2.3. Сравнительный качественный анализ корневищ с корнями крапивы двудомной и примесных к ней видов методом ТСХ

С целью сравнения корневищ с корнями крапивы двудомной с подземными частями примесных растений, провели сравнительный ТСХ-анализ экстрактов из каждого сырья, полученных на 70% спирте.

Исследование методом тонкослойной хроматографии проводилось на хроматографических пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» с применением системы 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 мы 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, не окрашивается при проявлении. При этом для корневищ с корнями яснотки белой характерным является пятно со светло-желтой флуоресценцией с R_f около 0,1.

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 РСО. При этом для крапивы

двудомной это пятно является доминирующим, а у крапивы жгучей оно заметно бледнее. Также для извлечений из обоих видов крапивы характерным является наличие пятен с R_f около 0,7. Однако оно более ярко выражено в случае крапивы жгучей. Таким образом, метод тонкослойной хроматографии позволяет отличить корневища крапивы двудомной от ее основных примесей. При этом у извлечения из корневищ с корнями яснотки белой обнаруживается только пятно с R_f около 0,1, серо-коричневого цвета (рис.19).

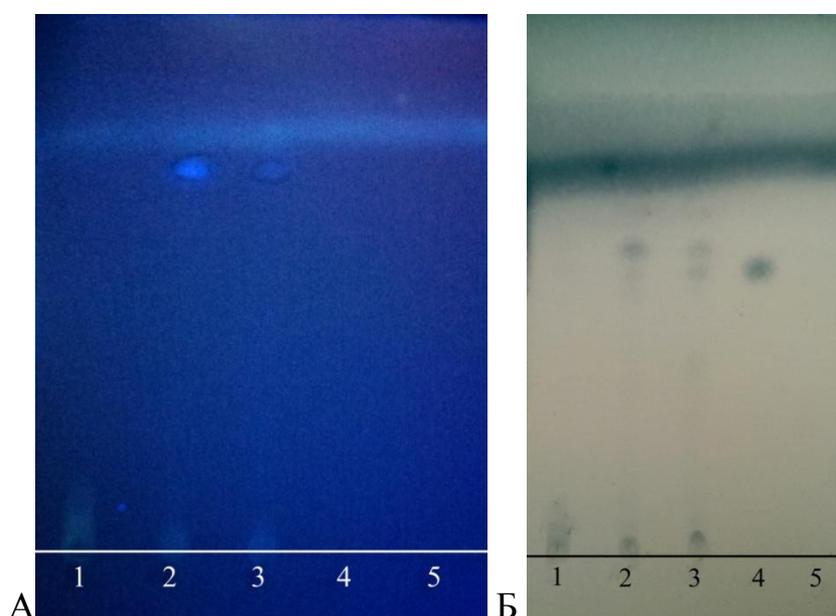


Рисунок 19 - Хроматограмма анализа экстрактов в система растворителей хлороформ-этиловый спирт-вода (26:16:3).

А - детекция при УФ- свете с $\lambda=366$ нм; Б - проявление раствором фосфорно-молибденовой кислоты 10%.

Обозначения: 1 - экстракт яснотки белой на 70% спирте; 2 - экстракт крапивы жгучей на 70% спирте; 3 - экстракт крапивы двудомной на 70% спирте; 4 - СО эргостерина; 5 - СО β -ситостерина

4.2. Разработка качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной методом УФ-спектрофотометрии

4.2.1. Исследования по разработке качественного анализа УФ-спектрофотометрии

Для проведения первичного спектрального анализа взяты водно-спиртовые извлечения корневищ с корнями крапивы двудомной на основе 40, 70, 95% спирте этиловом в соотношении 1:10. Были получены кривые поглощения с максимумом $\lambda=281$ нм. Наибольшая оптическая плотность при данной длине волны наблюдается у 40 и 70% спиртовых извлечений (рис. 20).

Наблюдаемый на спектральных кривых максимум поглощения с $\lambda=281$ нм характерен для фенольных структур, возможно, для фенилпропаноидов и флавоноидов. В связи с этим, была проведена дифференциальная спектрофотометрия с исходными извлечениями при добавлении раствора алюминия хлорида $AlCl_3$ (рис.21, 22). Эксперимент показал незначительное содержание фенольных структур во всех извлечениях. Батохромного сдвига при добавлении раствора алюминия хлорида не наблюдалось (рис.21, 22).

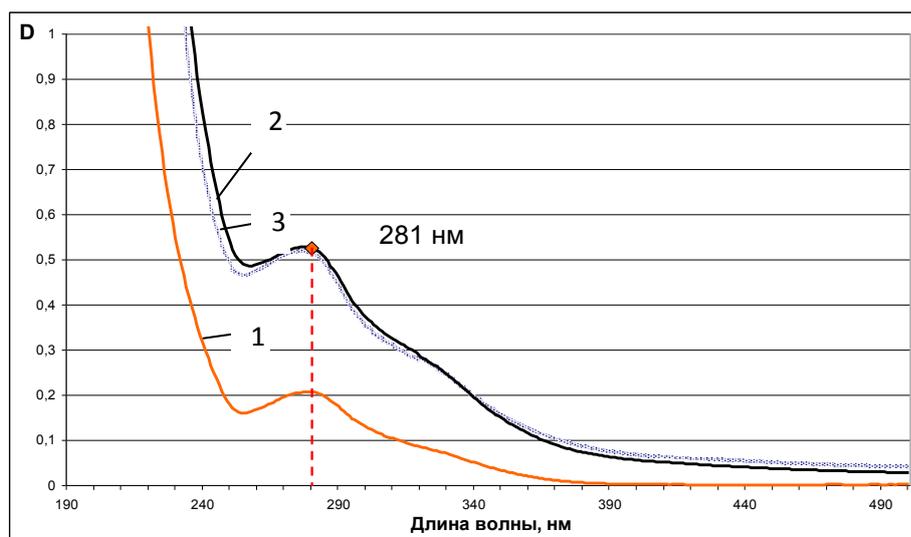


Рисунок 20 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений корневищ с корнями крапивы двудомной (1:100).

Обозначения: 1 - извлечение на 95% этиловом спирте; 2 - извлечение на 70% этиловом спирте; 3 - извлечение на 40% этиловом спирте.

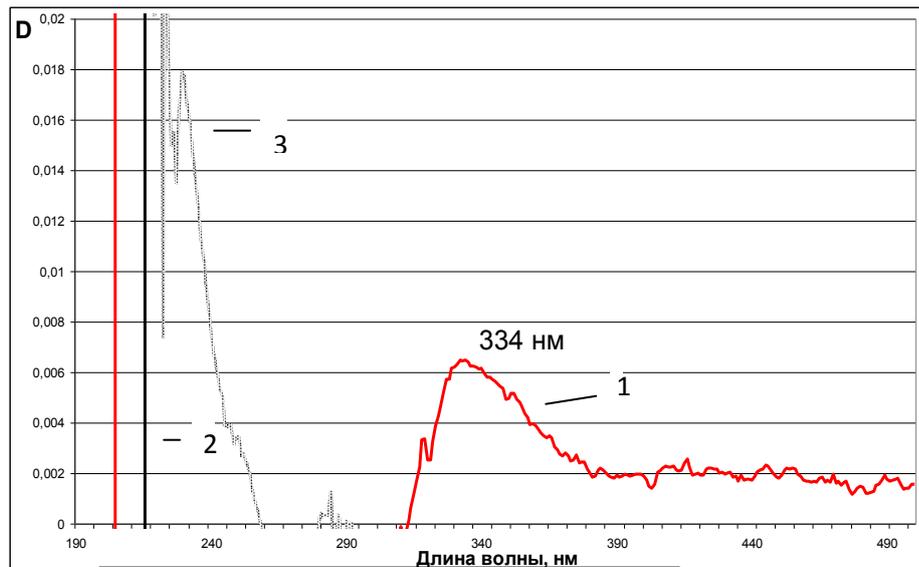


Рисунок 21 – Дифференциальные кривые водно-спиртовых извлечений корневищ с корнями крапивы двудомной(1:100).
 Обозначения: 1 - извлечение на 95% этиловом спирте; 2 - извлечение на 70% этиловом спирте; 3 - извлечение на 40% этиловом спирте.

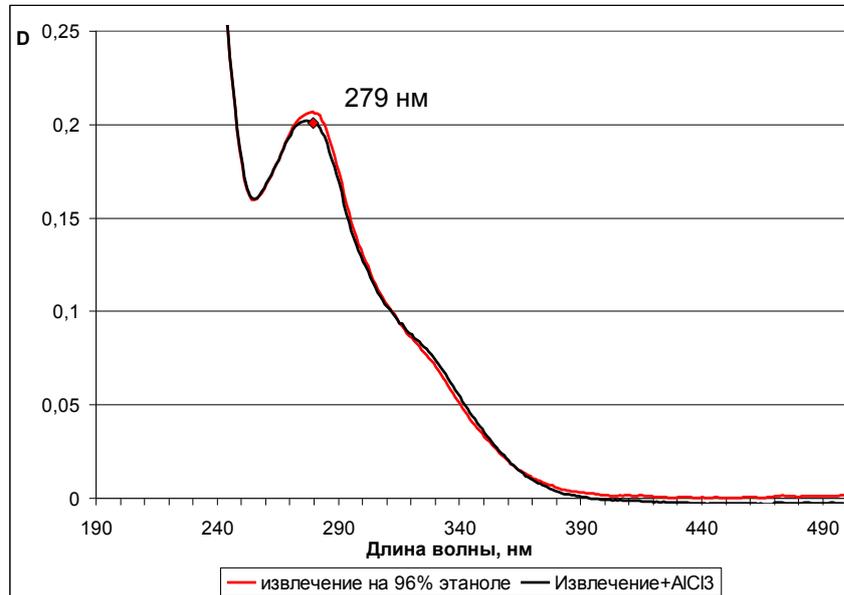


Рисунок 22- Электронные спектры растворов из корневищ с корнями крапивы двудомной (1:100).

Таким образом УФ-спектроскопия позволяет провести качественный анализ для корневищ с корнями крапивы двудомной.

4.2.2. Методика качественного анализа корневища с корнями крапивы двудомной методом УФ-спектрофотометрии

Для испытуемого раствора А (см. 4.5.) проводят измерение оптической плотности в диапазоне длин волн 200-500 нм. Раствором сравнения является концентрированная серная кислота. Кривая поглощения должна иметь максимум при 328 ± 2 нм (рис. 23).

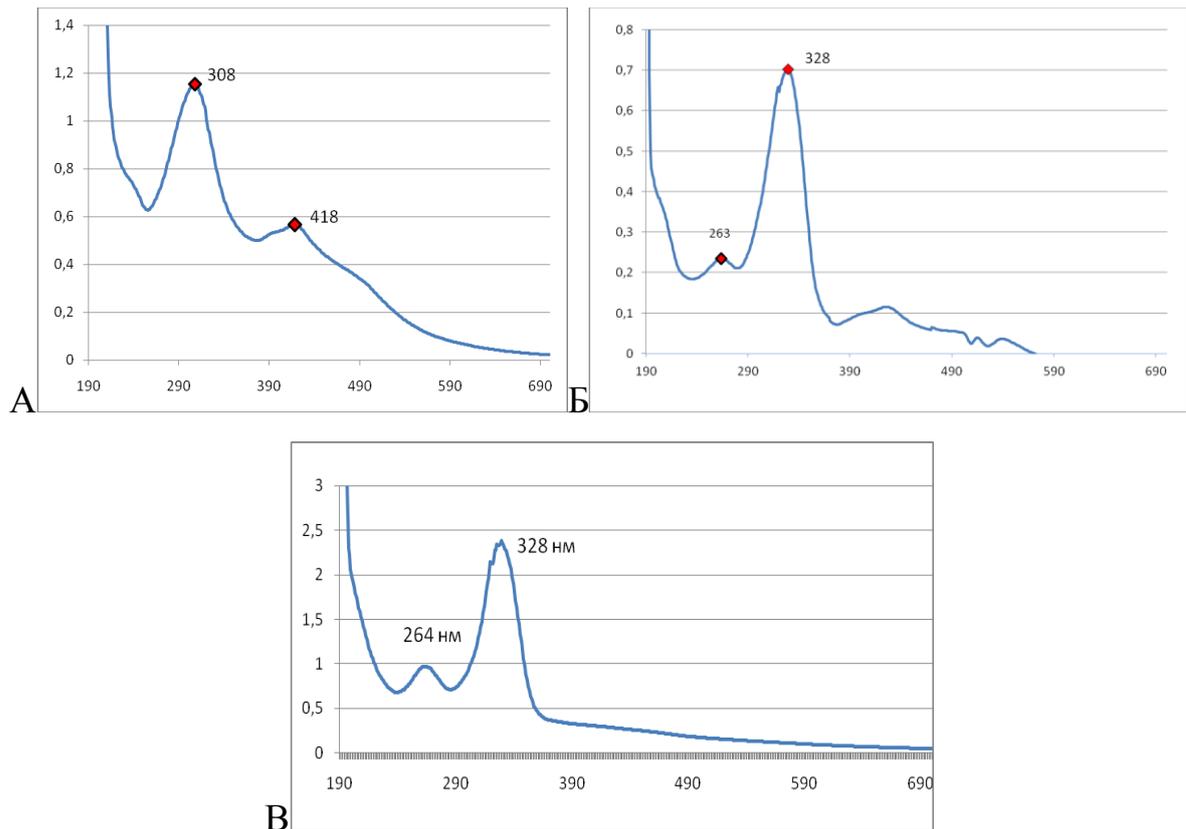


Рисунок 23 – Электронные спектры в среде серной кислоты.

А – раствора β - систостерина; Б – раствора эргостерина; В – извлечение на 70% спирте этиловом из корневищ с корнями крапивы двудомной.

Результаты исследования показывают расхождение максимумов поглощения у раствора β – систостерина и извлечения из крапивы. Спектральные кривые наглядно демонстрируют, что пики максимума у извлечения из корневищ с корнями крапивы двудомной практически идентичны раствору эргостерина, что позволяет использовать УФ-спектроскопию для качественной идентификации сырья.

4.2.3. Сравнительный качественный анализ корневищ с корнями крапивы двудомной и примесных к ней видов методом УФ-спектрофотометрии

Был проведен сравнительный УФ-спектрофотометрический анализ корневища с корнями крапивы двудомной с подземными органами примесных видов.

При анализе извлечений на 70% спирте этиловом корня крапивы жгучей и корневища с корнями яснотки белой получены кривые, представленные на рисунке 24.

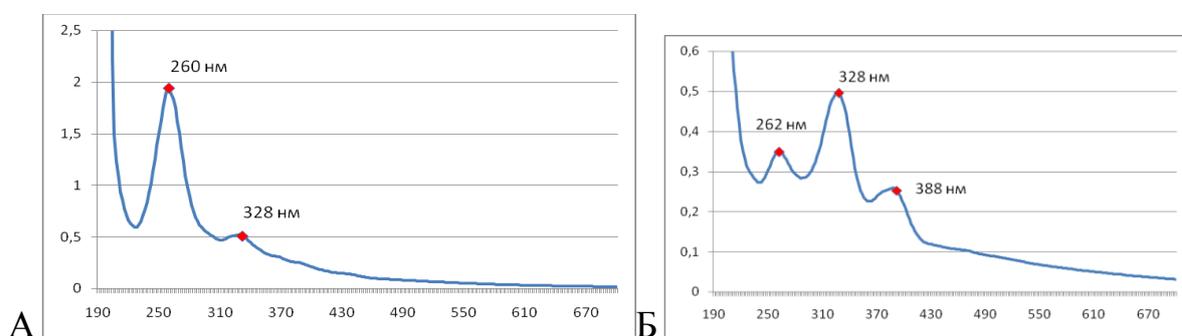


Рисунок 24 - Электронные спектры растворов в среде серной кислоты (1:100).

А – извлечение на 70% спирте этиловом из корня крапивы жгучей; Б – извлечение на 70% спирте этиловом из корневищ с корнями яснотки белой.

При изучении полученных данных, наглядно видно, что кривая поглощения извлечения крапивы жгучей имеет иной характер, чем кривая поглощения у крапивы двудомной, также заметные отличии имеет кривая поглощения у яснотки белой.

Для кривой поглощения извлечения из крапивы жгучей характерным является максимум 260 нм, отсутствующий у крапивы двудомной. У кривой поглощения извлечения из корневищ с корнями яснотки белой имеется нехарактерный для крапивы двудомной максимум при длине волны 388 нм.

Полученные результаты позволяют использовать УФ-спектрофотометрию в качестве качественного анализа для корневищ с корнями крапивы двудомной.

4.3. Выделение и идентификация индивидуальных биологически активных соединений из корневищ с корнями крапивы двудомной

В продолжение химического анализа, с целью выделения обнаруженных стеридных веществ и определение их структуры, нами была проведена колоночная хроматография. Методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии выполнили первичное разделение веществ.

Извлечение упарили в роторно-вакуумном упаривателе до небольшого объема и нанесли на 30,0 г силикагеля марки «для хроматографии» (силикагель КСКГ фр. 0,04-0,10 мм ГОСТ 3956-76). Отвешивали для колонки примерно такую же массу сорбента.

Высушенный порошок с пробой наносили на слой силикагеля, сформированный в виде взвеси в хлороформе.

Гексан был выбран в качестве первого элюента, так как при экстракции сырья хлороформом в извлечение переходят в основном высоколипофильные соединения. Градиентное повышение концентрации хлороформа в элюирующей смеси позволило десорбировать анализируемые высоколипофильные вещества в порядке увеличения их полярности. Последующее градиентное повышение концентрации этанола в элюирующей смеси в еще большей степени увеличило ее полярность и позволило десорбировать менее липофильные соединения.

Процесс разделения и состав фракций контролировали с помощью метода ТСХ. Пластинки детектировали в видимом и УФ-свете с длиной волны 254 и 366 нм.

При первичном разделении веществ было получено 57 фракций (табл. 2).

Таблица 2 - Схема элюирования при разделении веществ корневищ с корнями крапивы двудомной

№ фракции	Состав элюента, об. %				Объем фракций, мл
	Гексан	Хлороформ	Этанол 95%	Вода	
1	100	0	0	0	100
2, 3	90	10	0	0	200
4, 5	80	20	0	0	200
6, 7	70	30	0	0	200
8, 9	50	50	0	0	200
10, 11	20	80	0	0	200
12-16	0	100	0	0	300
17-26	0	95	5	0	500
27, 28	0	93	7	0	200
29-33	0	90	10	0	600
34, 35	0	85	15	0	200
36, 37	0	80	20	0	200
38-43	0	70	30	0	500
44-46	0	60	40	0	300
47, 48	0	50	50	0	200
49,50	0	30	70	0	200
51	0	0	100	0	300
52, 53	0	0	90	10	400
54, 55	0	0	70	30	300
56	0	0	40	60	300
57	0	0	0	100	200

Фракции №1-14 содержали неполярные соединения, поэтому ТСХ этих фракций проводили в системе хлороформ-этиловый спирт (16:1).

Фракции №15-36 содержали малополярные компоненты, и оптимальной для их анализа оказалась система растворителей хлороформ – этиловый спирт-вода (26:16:3).

Фракции №38-57 уже содержали более полярные вещества, поэтому оптимальной для этих фракций системой оказалась система растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2).

В количественном отношении наиболее богатыми оказались фракции №26-31. Из рисунка 25 видно, что фракции №28-31 содержат доминирующий компонент стрериновой природы с $R_f = 0,63$, на что указывает характерное розовое окрашивание при обработке реактивом ФВК, не флуоресцирующий в УФ-свете. Перед дальнейшим разделением эти фракции объединили.

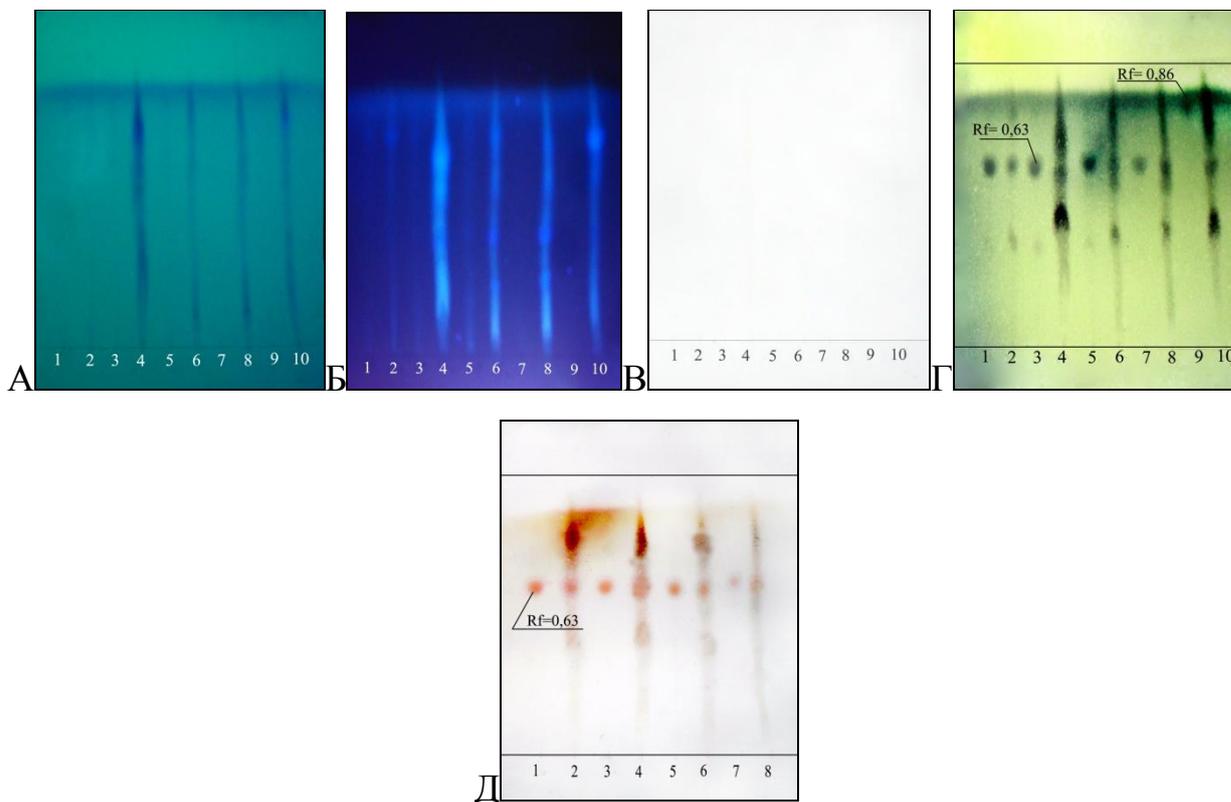


Рисунок 25 - Хроматограмма анализа фракций в системе растворителей хлороформ – этиловый спирт-вода (26:14:3).

А - детекция в УФ-свете с $\lambda=264$ нм; Б - детекция в УФ-свете с $\lambda=366$ нм; В - детекция в видимом свете; Г - проявление реактивом ФМК 20%; Д - проявление реактивом ФВК.

Обозначения: 1 - фракция 28; 2 - фракция 28, маточник; 3 - фракция 29; 4 - фракция 29, маточник; 5 - фракция 30; 6 - фракция 30, маточник; 7 - фракция 31; 8 - фракция 31, маточник; 9 - РСО β -ситостерина; 10 - фракция 28, маточник.

Для выделения индивидуальных соединений данные фракции подвергли более глубокой очистки методом перекристаллизации смесью хлороформа с этанолом. Таким образом, было получено несколько фракций с индивидуальным веществом высокой степени чистоты. Полученные вещества кристаллической структуры белого цвета,

нерастворимы в воде, хорошо растворимы на 95% этиловом спирте (рис. 26).

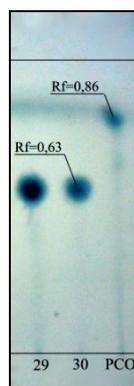


Рисунок 26 - Хроматограмма анализа очищенных фракций №29 и №30 в системе растворителей хлороформ – этиловый спирт-вода (26:14:3).

Кривые поглощения в среде серной кислоты имеют 2 пика с максимумами 265 и 328 нм, а в среде спирта этилового не имела пиков. Полученные результаты, позволили предположить, что данное вещество является стеринном (рис. 27).

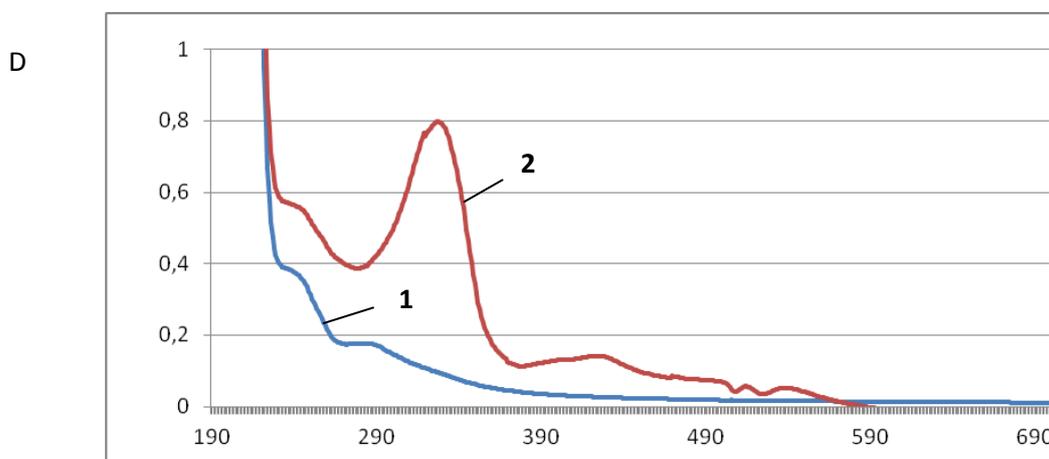


Рисунок 27 – Электронные спектры растворов фракции № 29 в разных средах (1:100).

Обозначения: 1 - спиртовой раствор; 2 - в среде серной кислоты

Вещество было очищено методом перекристаллизации и исследовано с использованием масс-спектрологии и ЯМР-спектрологии. Для образцов определялся ^{13}C -ЯМР-спектр и ^1H -ЯМР-спектр в дейтерохлороформе, а также был снят масс-спектр, который позволил выявить молекулярную массу, равную 398 (рис.28, табл. 3).

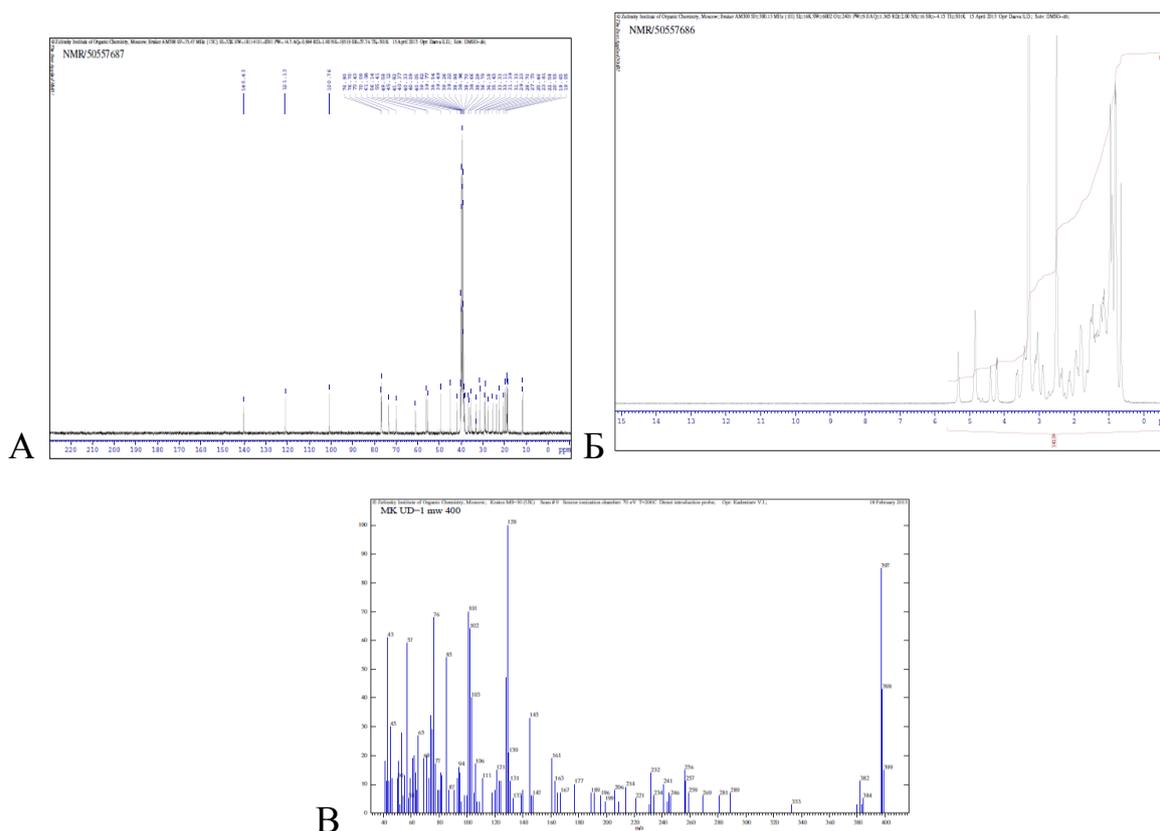
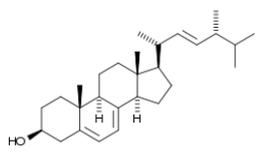
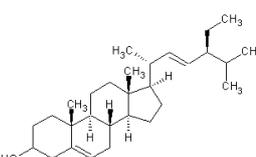


Рисунок 28 - Спектральные характеристики анализируемой структуры.

А - ^{13}C -ЯМР-спектр; Б - ^1H -ЯМР-спектр; В - масс- спектр.

Таблица 3 - 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 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$; т. пл. 163-165 °С, УФ-спектр (EtOH, λ_{max}): 271 нм. ^1H -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 °С, m/z, %): 398 (M^+ , 100), 255 (7), 213 (13), 147 (28), 80 (34), 57 (52), 43 (68)
2	β -ситостерин		Пластинчатые кристаллы белого цвета, $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$; т. пл. 132-133 °С (метанол), ^1H -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 °С, 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).

По совокупности полученных данных, вещество стериновой природы идентифицировано как эргостерин.

4.4. Разработка методики количественного определения содержания стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной

Анализа суммы стеринов проводили по методу, основанному на взаимодействии концентрированной серной кислоты с тритерпеновыми соединениями [80]. Наши исследования, позволили оптимизировать описанную в литературе методику за счет исключения стадии выпаривания на водяной бане (табл. 4), что приводит к сокращению времени, необходимому для проведения анализа, а также повышает точность метода [73]. Результаты анализа представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Изучение влияния параметров методики на результаты количественного определения содержания стеринов

№ п/п	Условия анализа	Содержание суммы стеринов в извлечениях в пересчете на эргостерин, %
1.	Выпаривание и термостатирование	3,14±0,05
2.	Термостатирование без выпаривания	3,31±0,05
3.	Без выпаривания и термостатирования	2,91±0,04

Для разработки методики количественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной получали ряд извлечений, с использовался разными условиями экстракции (время, соотношение «сырье:экстрагент», процент этилового спирта). В таблице 5 приведены данные, указывающие, что наиболее оптимальными условиями для извлечения стеринов является

экстракция при соотношении сырье-экстрагент 1:100, оптимальным экстрагентом при этом является 70% этиловый спирт. Суммы стеридов в корневищах с корнями крапивы двудомной нами анализировали методом прямой спектрофотометрии с использованием раствора РСО эргостерина в качестве стандарта.

Таблица 5 - Зависимость полноты извлечения суммы стеридов из корневищ с корнями крапивы двудомной от параметров экстракции

№ п/п	Концентрация этилового спирта (экстрагента)	Соотношение сырье (г) – экстрагент (мл)	Время экстракции, мин	Содержание суммы стеридов (в пересчете на эргостерин), %
1.	60%	1:30	60	2,84±0,03
2.	70%	1:30	60	2,67±0,04
3.	95%	1:30	60	2,26±0,035
4.	70%	1:30	30	2,28±0,035
5.	70%	1:30	60	2,98±0,046
6.	70%	1:30	90	2,35±0,036
7.	70%	1:30	60	2,36±0,036
8.	70%	1:50	60	2,94±0,035
9.	70%	1:100	60	3,27±0,05

4.5. Методика количественного анализа суммы стеридов в корневищах с корнями крапивы двудомной

Испытание проведено в нескольких повторностях. Все данные были статистически обработаны. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет ± 1,54 % (табл.6).

Определение содержания суммы стеридных соединений в сырье крапивы двудомной применяли метод спектрофотометрии в пересчете на эргостерин (рис. 28) [7, 73, 80, 92, 98, 120, 123].

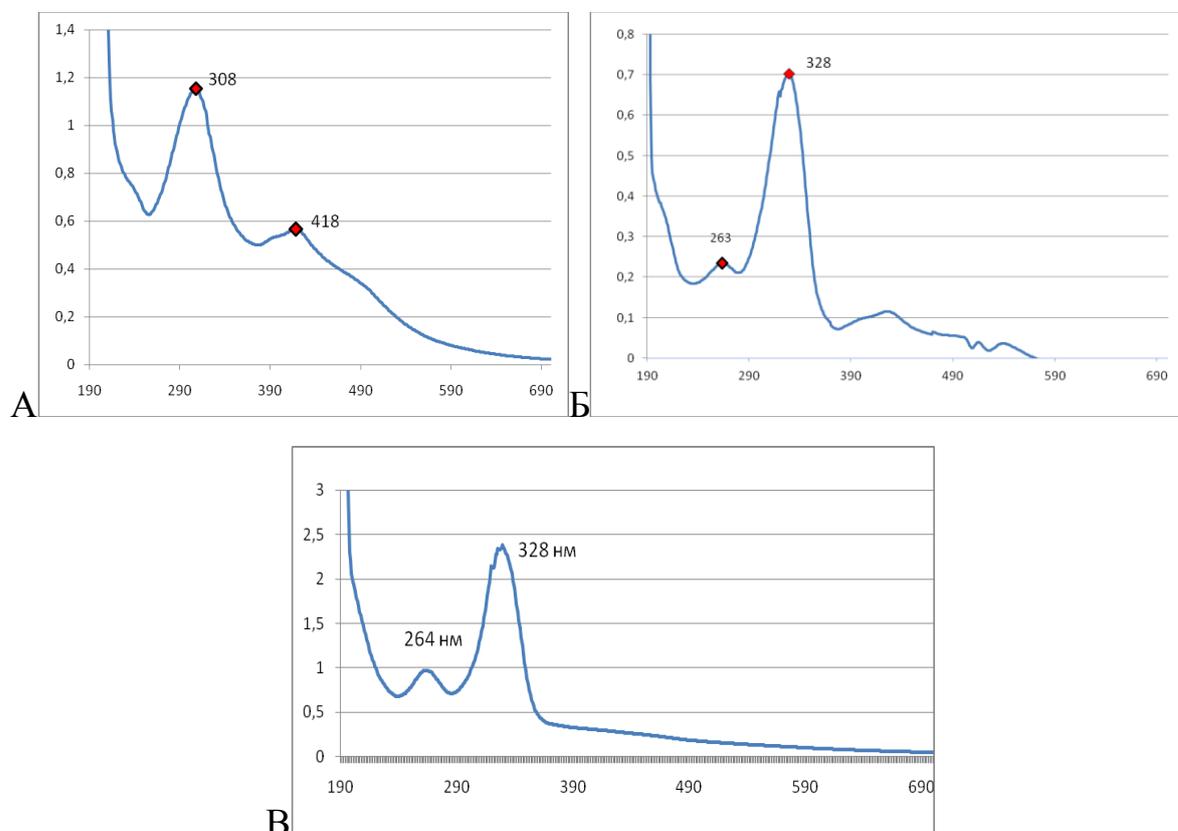


Рисунок 28 – Электронные спектры в среде серной кислоты.

А – раствора β -систерина; Б – раствора эргостерина; В – извлечение на 70% спирте этиловом из корневищ с корнями крапивы двудомной.

Около 1 г сырья (точная навеска) воздушно-сухого сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, добавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем закрывают той же пробкой, охлаждают до комнатной температуры. После чего колбу снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение перемешивают и фильтруют через

бумажный фильтр. 1 мл полученного извлечения помещают в градуированную пробирку на 10 мл, добавляют осторожно по каплям 4 мл серной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при температуре 70 °С в течение 1 часа (термостатирование). Затем содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят концентрированной серной кислотой до метки (испытуемый раствор А).

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм.

Приготовление раствора эргостерина: около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца эргостерина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл концентрированной серной кислоты, нагревают в водяной бане при температуре 70°С в течение 1 часа, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают.

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм.

При использовании рабочего стандартного образца эргостерина расчет результатов количественного определения содержания (X) суммы стеринов в сырье в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье проводят по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 4 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность раствора стандартного образца;

m – точная навеска сырья, г;

m₀ – точная навеска эргостерина, г;

W – влажность сырья, %.

При отсутствии рабочего стандартного образца эргостерина расчет содержания суммы стеринов осуществляется с использованием экспериментально установленного нами значения удельного показателя поглощения (1250):

$$X = \frac{A * 25 * 100 * 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} * m * 1 * (100 - W)} = \frac{A * 100 * 25 * 100}{1250 * m * (100 - W)},$$

где:

A– оптическая плотность испытуемого раствора;

m – точная навеска анализируемого образца, г;

W – влажность сырья, %.

1250 - удельный показатель поглощения эргостерина.

Таблица 6 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы стеринов корневищах с корнями крапивы двудомной

<i>n</i>	<i>f</i>	\bar{X}	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>	ΔX	<i>E, %</i>
11	10	3,37	0,0232	95	2,23	$\pm 0,052$	$\pm 1,54$

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 %.

Проводили валидационную оценку разработанной методики по следующим показателям: линейность, прецизионность и правильность. Линейность методики устанавливали для серии растворов СО эргостерина (концентрации в диапазоне 0,010–0,050 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99998. Прецизионность устанавливали определением содержания для пяти параллельных измерений. Правильность методики

определяли путем добавления раствора СО эргостерина с известной концентрации к исследуемому раствору. Открываемость находилась в пределах от 98% до 102%.

4.6. Изучение содержания стеринов в различных видах сырья крапивы двудомной

Для определения наиболее оптимального периода для сбора корневищ с корнями крапивы двудомной, проводили анализ по динамике накопления стериновых веществ подземных органах растения. Содержание стеринов оценивали по разработанной нами методике, основанной на взаимодействии стеринов с концентрированной серной кислотой [6].

Также анализировали образцы воздушно-сухих листьев, соцветий, корневищ с корнями, а также плодов, заготовленных отдельно от мужских и женских экземпляров растений на содержание стеринов. Сырье собиралось одномоментно в июле 2015 г.

Для уточнения возможных пределов содержания стериновых соединений в корневищах с корнями крапивы двудомной, использовали образцы, собранные в различных регионах России в течение 2014-2015 гг. в августе и сентябре.

Полученные данные, указывают, что содержание стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной начинает несколько снижаться к моменту цветения растения в июне, но затем начинает увеличиваться, достигая максимума к сентябрю (табл. 7).

Таблица 7 - Динамика содержания стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной

№ п/п	Месяц сбора сырья	Содержание стеринов, %
1.	Май	3,09 ± 0,05%
2.	Июнь	1,88 ± 0,03%
3.	Июль	2,60 ± 0,04%
4.	Август	3,00 ± 0,05%
5.	Сентябрь	3,42 ± 0,05%

Содержание суммы стеринов в корневищах с корнями и соцветиях женских экземпляров крапивы двудомной, оказалось несколько выше, чем в сырье мужских экземпляров. Также высокое содержание действующих веществ отмечается в женских соцветиях и плодах (табл. 8). Все образцы заготавливались в августе-сентябре, когда содержание стеринов было максимальным.

Таблица 8 - Содержание стеринов в различных органах крапивы двудомной

№ п/п	Вид сырья	Содержание стеринов, %
1.	Корневища с корнями, собранные с женских экземпляров растения	7,34 ± 0,11%
2.	Корневища с корнями, собранные с мужских экземпляров	3,91 ± 0,06%
3.	Листья	11,77 ± 0,18%
4.	Соцветия женские	14,30 ± 0,21%
5.	Соцветия мужские	3,85 ± 0,06%
6.	Плоды	14,32 ± 0,21%

Исследование образцов подземных органов крапивы двудомной, собранных в различных регионах России, показало, что содержание стеринных веществ обычно лежит в пределах 2,23% – 7,34% (табл. 9).

Таблица 9 - Содержание стеринных в корневищах с корнями крапивы двудомной, заготовленных в различных регионах РФ

№ п/п	Название региона	Содержание стеринных, %
1.	Самарская область	7,34 ± 0,11%
2.	Пензенская область	2,23 ± 0,03%
3.	Саратовская область	3,44 ± 0,05%
4.	Ульяновская область	4,85 ± 0,07%
5.	Республика Татарстан	2,71 ± 0,04%
6.	Республика Мордовия	2,52 ± 0,04%

Накопление суммы стеринных соединений в корневищах с корнями крапивы двудомной несколько снижается в июне и плавно увеличивается к сентябрю, что соответствует фазам вегетационного периода растения.

В качестве нижнего предела содержания стеринных в корневищах с корнями крапивы двудомной рекомендован показатель - 2%.

4.7. Определение содержания стеринных в образцах, примесных к крапиве двудомной

С целью сравнительного анализа, проводили количественную оценку содержания стеринных веществ в примесном сырье по разработанной нами методике. Полученные данные свидетельствуют, что корни крапивы жгучей значительно уступают по содержанию стеринных веществ корневищам с корнями крапивы двудомной и яснотки белой (табл. 9). Однако по данным анализа содержание суммы стеринных в корневищах с корнями яснотки белой и крапивы двудомной находятся практически на одинаковом уровне (табл. 10).

Таблица 10 - Содержание суммы стеринов в подземной части крапивы двудомной и примесных растений

№ п/п	Исследуемое сырьё	Содержание суммы стеринов (в пересчете на эргостерин и абсолютно сухое сырьё), %
1.	Корневище с корнями крапивы двудомной	3,91 ± 0,06%
2.	Корневище с корнями яснотки белой	4,62 ± 0,07%
3.	Корни крапивы жгучей	1,07 ± 0,02%

Таким образом, корневища крапивы двудомной имеют ряд фитохимических отличий от ее основных примесей: корней крапивы жгучей и корневищ с корнями яснотки белой.

4.8. Анализ суммы полисахаридов в различных видах сырья крапивы двудомной

Важными биологически активными веществами, входящими в состав компонентов изучаемого растения, являются полисахариды, которые по некоторым литературным источникам могут обладать иммуностимулирующим и антинеопластическим действиями [27, 107, 121]. Известны данные об антибактериальной, антивирусной, противолучевой и противоопухолевой активности этих соединений [111, 136, 139].

Определение суммы полисахаридов осуществляли в соответствии ГФ РФ XIII издания статье «*Folia Plantaginis majoris*» гравиметрическим методом после осаждения 96% этиловым спиртом из водного извлечения и последовательного промывания осадка суммы полисахаридов органическими растворителями [19]. Определяли содержание полисахаридов в разном сырье женских и мужских экземпляров крапивы

двудомной (табл. 12). Также определяли динамику накопления БАВ. Результаты определения представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Динамика содержания полисахаридов в сырье крапивы двудомной

№ п/п	Месяц сбора	Содержание полисахаридов в корневищах с корнями, %	Содержание полисахаридов в листьях, %
1.	Май	7,90 ± 0,40%	8,84 ± 0,44%
2.	Июнь	6,78 ± 0,34%	8,28 ± 0,41%
3.	Июль	9,83 ± 0,49%	14,82 ± 0,74%
4.	Август	11,15 ± 0,56%	12,32 ± 0,62%
5.	Сентябрь	14,32 ± 0,72%	9,72 ± 0,49%

Таблица 12 - Содержание полисахаридов в сырье крапивы двудомной

№ п/п	Исследуемое сырье	Содержание полисахаридов в женских экземплярах растений, %	Содержание полисахаридов в мужских экземплярах растений, %
1.	Корневища с корнями	11,68 ± 0,58%	11,52 ± 0,58%
2.	Листья	17,52 ± 0,88%	17,13 ± 0,86%
3.	Стебли	9,03 ± 0,45%	10,75 ± 0,54%
4.	Соцветия	17,16 ± 0,86%	15,34 ± 0,77%
5.	Плоды	13,38 ± 0,67%	-

Анализируя полученные данные, можно отметить, что содержание полисахаридов в листьях и корневищах с корнями несколько снижается в

июне - к моменту цветения растений. Затем содержание полисахаридов начинает увеличиваться в корневищах с корнями, достигая максимума к сентябрю. При этом в листьях происходит некоторое увеличение уровня содержания полисахаридов к июлю, а затем наблюдается постепенное снижение к сентябрю.

4.9. Содержание фенилпропаноидов в различных видах сырья крапивы двудомной

Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания предусматривает в разделе «Количественное определение» для листьев крапивы двудомной анализ содержания суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту [20]. На наш взгляд, анализ фенольных соединений в корневищах с корнями этого растения также представляет интерес.

Сумму фенилпропаноидов (оксикоричных кислот) анализировали методом прямой спектрофотометрии в соответствии по методике, описанной в ФС.2.5.0019.15 [20].

Сравнительное исследование извлечений из различных видов сырья крапивы двудомной установило, что наличие фенилпропаноидов во всех исследуемых видах сырья крапивы двудомной. Однако наибольшее содержание фенилпропаноидов характерно для листьев крапивы двудомной.

Таблица 13 - Содержание фенилпропаноидов в сырье крапивы двудомной

№ п/п	Вид сырья	Содержание суммы фенилпропаноидов в женских экземплярах растений, %	Содержание суммы фенилпропаноидов в мужских экземплярах растений, %
1.	Корневища с корнями	0,29 ± 0,01%	0,36 ± 0,01%
2.	Листья	3,71 ± 0,18%	3,06 ± 0,15%
3.	Стебли	0,91 ± 0,04%	0,94 ± 0,05%
4.	Соцветия	2,74 ± 0,14%	3,40 ± 0,17%
5.	Плоды	1,99 ± 0,09%	-

4.10. Содержание флавоноидов в различных видах сырья крапивы двудомной

Флавоноиды анализировали методом дифференциальной спектрофотометрии. Сумму флавоноидов вели в пересчете на рутин [20, 21]. Результаты анализа представлены в таблице 13 и 14.

Полученные данные свидетельствуют, что в листьях и соцветиях содержатся соединения флавоноидной природы. Также необходимо указать, что на кривых поглощения УФ-спектров извлечений листьев, корневищ с корнями, соцветий и плодов крапивы двудомной присутствуют характерные отличительные признаки. При добавлении раствора $AlCl_3$ имеет место батохромный сдвиг в длинноволновую область с максимумом около 410 нм. Образовавшийся комплекс с раствором $AlCl_3$ показывает наличие флавоноидов. На рисунке 29 видно, что кривые поглощения извлечений на основе женских соцветий и плодов крапивы двудомной имеют одинаковые максимумы поглощения (около 290 и 330 нм), что свидетельствует о сходном химическом составе.

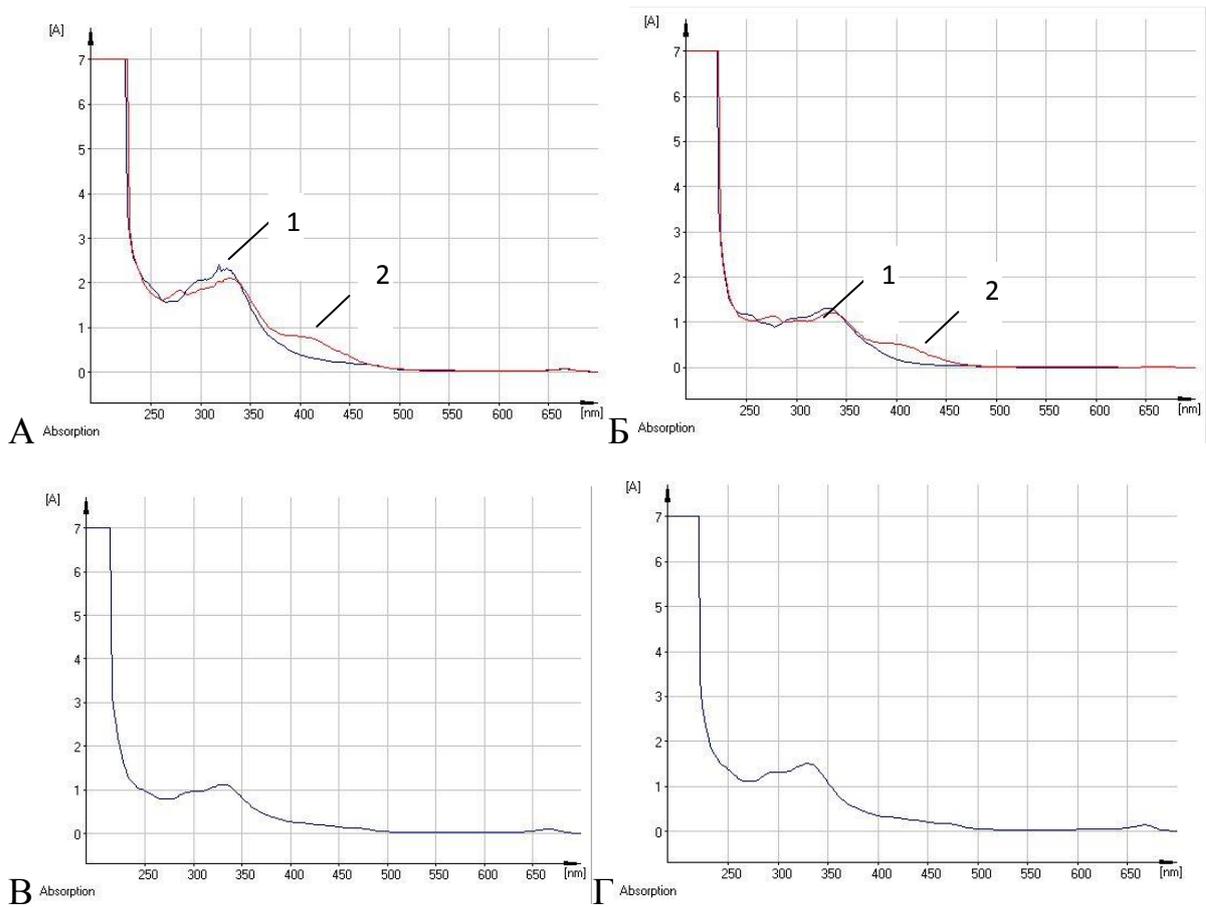


Рисунок 29 – Электронные спектры поглощения извлечений на 70% этиловом спирте.

А - листьев крапивы двудомной (1:500); Б - мужских соцветий (1:500); В - женских соцветий (1:1500); Г – плодов (1:1500).

Обозначение: 1 - УФ-спектр спиртового извлечения; 2 - УФ-спектр спиртового извлечения с добавлением алюминия хлорида.

Сравнительный фитохимический анализ извлечений из различных видов сырья крапивы двудомной показал, что для надземных органов характерно наличие флавоноидов, тогда как в подземной части крапивы двудомной обнаруживаются стеринны.

Таблица 14 - Содержание флавоноидов в сырье крапивы двудомной

№ п/п	Вид сырья	Содержание суммы флавоноидов в женских экземплярах растений, %	Содержание суммы флавоноидов в мужских экземплярах растений, %
1.	Корневища с корнями	0,02 ± 0,001%	0,03 ± 0,001%
2.	Листья	1,80 ± 0,09%	1,45 ± 0,07%
3.	Стебли	0,15 ± 0,01%	1,18 ± 0,06%
4.	Соцветия	1,40 ± 0,07%	2,39 ± 0,12%
5.	Плоды	0,91 ± 0,04%	-

Анализируя полученные данные, можно отметить, что содержание суммы флавоноидов характерно для всех видов сырья крапивы двудомной. Однако корневища с корнями значительно уступают в содержании суммы флавоноидов листьям и соцветиям этого растения.

4.11. Содержание белков в корневищах с корнями крапивы двудомной

В литературном обзоре указывалось, что существует мнение, утверждающее, что терапевтическое действие подземной части крапивы двудомной оказывается за счет лектинов и белковых структур. В связи с этим, был проведен эксперимент, определяющий количественное содержание белков в сырье крапивы двудомной (табл. 15)

Таблица – 15 Содержание белка в корневищах с корнями крапивы двудомной

№ п/п	Вид сырья	Содержание белка в женских экземплярах растений, %	Содержание белка в мужских экземплярах растений, %
1.	Корневища с корнями	0,083 ± 0,004	0,121 ± 0,006

Таблица 16 – Динамика содержания белков в корневищах с корнями крапивы двудомной

№ п/п	Вид сырья	Содержание белка в корневищах с корнями крапивы двудомной в пересчете на абсолютно сухое сырье, %
1.	Май	0,030 ± 0,001
2.	Июнь	0,067 ± 0,003
3.	Июль	0,091 ± 0,004
4.	Август	0,106 ± 0,005
5.	Сентябрь	0,068 ± 0,003

Анализируя полученные данные, можно отметить, что содержание белков в различных видах сырья крапивы двудомной составляет менее одного процента. Следует отметить, что наибольшее содержание белка в корневищах с корнями крапивы двудомной наблюдается в августе, что логично для этой группы веществ, как первичного метаболита (табл. 16). Содержание белка в корневищах с корнями мужских экземпляров несколько больше, чем в женских.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. В результате изучения химического состава корневищ с корнями крапивы двудомной определено, что доминирующим и диагностически значимым компонентом является вещество стериновой природы – эргостерин, который впервые выделен из данного растения и идентифицирован на основании УФ- и ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.
2. Разработана методика качественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной, с помощью ТСХ-анализа на пластинках марки «Сорбфил» с использованием системы хлороформ – этиловый спирт – вода (26:16:3), которая позволяет отличить их от примесных видов.
3. Разработана методика количественного определения для сырья и препаратов корневищ с корнями крапивы двудомной, основанный на определении содержания суммы стеринов в среде серной кислоты концентрированной методом спектроскопии в пересчете на эргостерин при аналитической длине волны 328 ± 2 нм.
4. Сравнительный анализ показал, что содержание стериновых соединений в корневищах с корнями и соцветиях женских экземпляров крапивы двудомной, оказалось выше, чем в аналогичном сырье, мужских экземпляров. Корневища с корнями крапивы двудомной, заготовленные в различных регионах РФ, отличаются по содержанию суммы стериновых соединений.
5. Проведенный сравнительный анализ методом тонкослойной хроматографии показывает убедительные отличия корневищ с корнями крапивы двудомной от яснотки белой, при этом количественное определение суммы стериновых веществ позволяет однозначно отличить корневища с корнями крапивы двудомной от крапивы жгучей. Метод тонкослойной хроматографии и спектрофотометрию целесообразно использовать при стандартизации сырья корневищ с корнями крапивы двудомной.

6. Полученные данные исследования не выявили существенного различия в содержании полисахаридов в сырье мужских и женских экземпляров крапивы двудомной. Высокое содержание полисахаридов отмечается в соцветия и плоды крапивы двудомной.
7. Определено, что сырье мужских и женских экземпляров крапивы двудомной несущественно отличается по содержанию флавоноидов и фенилпропаноидов. Высокое содержание флавоноидов и фенилпропаноидов наблюдается в листьях и соцветиях крапивы двудомной.

ГЛАВА 5. ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ

5.1. Изучение способов получения жидкого и густого экстрактов из корневищ с корнями крапивы двудомной

В лабораторных условиях нами были получены образцы жидких экстрактов корневищ с корнями крапивы двудомной. Все жидкие экстракты были получены одновременно с использованием в качестве экстрагента 70% этиловый спирт в соотношении «сырье-экстрагент» 1:1. Жидкие экстракты были получены с помощью методов ремацерация и реперколяция. В случае методов ремацерация и реперколяция были получены два вида извлечений – первые по классической схеме, вторые с применением нагревания на водяной бане на последней стадии получения препарата.

Анализ суммы стеринов проводили методом прямой спектрофотометрии. Результаты анализа приведены в таблице 17.

Таблица 17 - Содержание суммы стеринов в жидких экстрактах корневищ с корнями крапивы двудомной

№ п/п	Название метода	Содержание суммы стеринов (в пересчете на абсолютно сухое сырье), %
1	Ремацерация	0,45±0,02 %
2	Ремацерация с нагреванием	0,26±0,01 %
3	Реперколяция	1,52 ±0,08%
4	Реперколяция с нагреванием	0,63±0,03 %

Анализируя полученные данные, можно отметить, что содержание стеринов в различных видах препаратов крапивы двудомной существенно отличается. Наибольшие значения показывает методы, при которых не

применяется стадия нагревания. Самый высокий результат показал жидкий экстракт, полученный методом реперколяции.

Проведенное исследование показало, что содержания суммы стеринов в пересчете на эргостерин в жидких экстрактах корневищ с корнями крапивы двудомной варьирует в пределах 0,26%-1,52%.

На наш взгляд, жидкий экстракт корневищ с корнями крапивы двудомной может служить как самостоятельным ЛС, так и быть основой для получения других ЛФ, в том числе и для получения густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной. Густой экстракт корневищ с корнями крапивы двудомной в свою очередь может быть введен в мягкие и твердые ЛФ.

Нами был получен образец густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной. Основой для густого экстракта явился жидкий экстракт крапивы двудомной. Для его получения использовали метод сгущения (упаривания) жидкого экстракта крапивы двудомной в роторно-вакуумном испарителе. Температура при этом не превышала 50 °С. Содержание суммы стеринов в густом экстракте варьирует в пределах 10,45 – 14,32%.

Расчет содержания стеринов в пересчете на эргостерин в полученных экстрактах проводили по следующим методикам:

Методика анализа жидкого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной: 5 мл экстракта помещали в градуированную пробирку на 10 мл, добавляют осторожно по каплям 4 мл серной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при температуре 70 °С в течение одного часа (термостатирование). Затем содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят концентрированной серной кислотой до метки (испытуемый раствор А).

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм.

При использовании рабочего стандартного образца эргостерина расчет результатов количественного определения содержания (X) суммы стерина в сырье в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье проводят по формуле:

$$X = \frac{A * m_0 * 25 * 1 * 100}{A_0 * V * 25 * 25} = \frac{A * m_0 * 4}{A_0 * 5}$$

где:

A– оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность раствора стандартного образца;

V – объем испытуемого раствора, мл;

m₀– точная навеска эргостерина, г.

При отсутствии рабочего стандартного образца эргостерина расчет содержания суммы стерина осуществляется с использованием экспериментально установленного нами значения удельного показателя поглощения (1250):

$$X = \frac{A * 25}{E_{1\text{см}}^{1\%} * V * 1} = \frac{A * 5}{1250}$$

где:

A– оптическая плотность испытуемого раствора;

V – объем испытуемого раствора, мл;

1250- удельный показатель поглощения эргостерина.

Содержание суммы стерина в жидком экстракте по нашим данным лежит в пределах 0,26-1,52%.

Методика анализа густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной: 0,1 г (точная навеска) экстракта помещали в градуированную пробирку на 10 мл, добавляют осторожно по каплям 4 мл серной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при температуре 70 °С в течение одного часа (термостаторование). Затем содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу

вместимостью 25 мл и объем раствора доводят концентрированной серной кислотой до метки (испытуемый раствор А).

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм.

При использовании рабочего стандартного образца эргостерина расчет результатов количественного определения содержания (X) суммы стерина в сырье в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье проводят по формуле:

$$X = \frac{A * m_0 * 25 * 100}{A_0 * m * 25 * 25} = \frac{A * m_0 * 4}{A_0 * m * 5}$$

где:

A– оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность раствора стандартного образца;

m – точная навеска анализируемого образца, г;

m₀– точная навеска эргостерина, г.

При отсутствии рабочего стандартного образца эргостерина расчет содержания суммы стерина осуществляется с использованием экспериментально установленного нами значения удельного показателя поглощения (1250):

$$X = \frac{A * 25}{E_{1\text{см}}^{1\%} * m * 1} = \frac{A * 25}{125}$$

где:

A– оптическая плотность испытуемого раствора;

m – точная навеска анализируемого образца, г;

1250- удельный показатель поглощения эргостерина.

Содержание суммы стерина в густом экстракте по нашим данным лежит в пределах 10,45 – 14,32%.

5.2. Определение острой токсичности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной

При создании новых препаратов растительного происхождения одним из обязательных критериев при проведении доклинических испытаний является оценка их безопасности, в связи с чем и проводился анализ острой токсичности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной.

Изучение острой токсичности густого экстракта корневищ с корнями крапивы было проведено на 20 белых беспородных половозрелых крысах мужского пола массой 200-220 г. Животных разделили на 2 группы по 10 крыс в каждой. Первой группе вводили однократно внутривентрикулярно густой экстракт в дозе 15 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, а второй группе – очищенную воду в аналогичном объеме. Животные в первый день находились под непрерывным наблюдением, общая продолжительность эксперимента составила 2 недели [5, 78, 87].

Летальных случаев в процессе исследования не зарегистрировано. За время наблюдения изменений в поведенческой активности крыс контрольной и опытной групп не зафиксировано. При анализе динамики массы тел грызунов обеих групп отличий не выявили. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что исследуемый образец густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

5.3. Изучение диуретической активности густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной

Диуретическую активность густого экстракта определяли на белых беспородных крысах мужского пола массой 200-220 г. Животные содержались в условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде. Каждая опытная группа состояла из 10 животных. Густой

экстракт вводили внутривенно через зонд в дозе 10 мг/кг на фоне водной нагрузки в объеме 3% от массы тела животного [7, 8, 10]. Непосредственно перед введением животным, препарат разводили очищенной водой. После введения помещали животных в обменные клетки для сбора мочи на 24 ч. В ходе исследования определялся диурез, натрийурез, калийурез и креатининурез за 4 ч и 24 ч эксперимента. Собирались 4-х ч и 24-х ч порции мочи. Определяли почечную экскрецию воды, определяли концентрацию Na и K методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости ПАЖ-1, креатинина – колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3. Как препарата сравнения использовали гидрохлортиазид [8, 39, 54, 85, 97].

В ходе эксперимента на крысах было установлено, что густой экстракт корневищ с корнями крапивы двудомной в дозе 10 мг/кг при внутривенном введении за 4 ч опытного периода не приводит к достоверному изменению исследуемых показателей выделительной функции почек по сравнению с водным контролем (табл. 18).

Таблица 18 – Данные воздействия на выделительную функцию почек крыс внутривенного введения густого экстракта корневищ с корнями крапивы за четыре часа эксперимента

Контроль/Опыт	Диурез, мл/4 ч	Натрийурез, мкм/4 ч	Калийурез, мкм/4 ч	Креатининурез, мг/4 ч
Контроль (вода)	2,09±0,11	263,74±14,85	176,82±11,58	1,46±0,14
Опыт (густой экстракт корневищ с корнями крапивы)	2,10±0,12	255,97±17,60	180,15±24,63	1,34±0,10

Однако, данный препарат за 24 ч эксперимента – достоверно повышает показатели почечной экскреции воды (на 18%, $p=0,007$), натрия (на 26%, $p=0,008$), калия (на 43%, $p=0,037$), креатининуруз при этом возрастает недостоверно (табл. 19).

Таблица 19 - Данные воздействия на выделительную функцию почек крыс внутрижелудочного введения густого экстракта корневищ с корнями крапивы за 24 часа эксперимента

Контроль/Опыт	Диурез, мл/сут	Натрийурез, мкм/сут	Калийурез, мкм/сут	Креатининуруз, мг/сут
Контроль (вода)	2,31±0,09	766,90±44,42	557,70±37,06	2,51±0,23
Опыт (густой экстракт корневищ с корнями крапивы)	2,73±0,10*	963,47±48,45*	797,88±55,45*	2,63±0,24

Примечание: здесь и в таблице 3 * - $p<0,05$.

В свою очередь препарат сравнения гидрохлортиазид в аналогичной дозе способствовал росту суточных показателей диуреза (на 40%), натрийуреза (на 54%) и калийуреза (на 55%), креатининуруз при этом изменялся недостоверно (табл. 20).

Таблица 20 - Влияние внутрижелудочного введения гидрохлортиазид на выделительную функцию почек крыс за 24 ч эксперимента

Контроль/Опыт	Диурез, мл/сут	Натрийурез, мкм/сут	Калийурез, мкм/сут	Креатининуруз, мг\сут
Контроль (вода)	2,73±0,17	462,88±52,16	155,86±20,70	5,27±0,55

Опыт (гидрохлортиазид)	3,83±0,22*	711,31±90,84*	241,60±19,26*	6,85±0,59
-----------------------------------	------------	---------------	---------------	-----------

Таким образом, густой экстракт корневищ с корнями крапивы двудомной в дозе 10 мг/кг за 24 ч опыта умеренно стимулирует диурез и салурез.

5.4. Определение микробиологической активности жидкого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной

В рамках настоящей работы проводился скрининговый анализ антимикробной активности водно-спиртовых извлечений (на 40% и 70% этиловом спирте) из корневищ с корнями крапивы двудомной. Для контроля использовались экстрагенты – спирт этиловый 40% и спирт этиловый 70%. Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом двойных серийных разведений в бульоне (микрометод) в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Учет результатов осуществляли путем визуального сравнения роста микроорганизма в присутствии препарата с ростом культуры в ячейке и без него. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма [82].

Для определения микробиологической активности нами были использованы жидкие экстракты корневищ с корнями крапивы двудомной, полученные на основе 70% и 40% этилового спирта, полученные методом реперколяции из одного образца сырья в соотношении «сырье-экстрагент»- 1:1.

Было определено содержание стероидных веществ в полученных экстрактах в пересчете на эргостерин: в извлечении с 70% этиловым спиртом содержание 0,92%, в извлечении с 40% этиловым спиртом 0,57%.

Результаты исследования приведены в таблицах 21-22.

Таблица 21 – Антимикробная активность экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной на 70% спирте этиловом.

Тестовая культура микроорганизмов	Номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Синегнойная палочка (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Стафилококк золотистый (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кигечная палочка (<i>Escherihia coli</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Бацилла эхиноцереус (<i>Bacillus cereus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кандида альбиканс (<i>Candida albicans</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 22 - Антимикробная активность препарата сравнения - 70% спирт этиловый.

Тестовая культура микроорганизмов	Номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Синегнойная палочка (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Стафилококк золотистый (<i>Staphylococcus aureus</i>)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кигечная палочка (<i>Escherihia coli</i>)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Бацилла эхиноцереус (<i>Bacillus cereus</i>)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кандида альбиканс (<i>Candida albicans</i>)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Жидкий экстракт на 70% этаноле не показал активность в отношении исследуемых микроорганизмов (табл. 21, 22). При этом жидкий экстракт корневищ с корнями крапивы двудомной, полученный на основе 40% этилового спирта, оказался активен в отношении *Pseudomona saeruginosa* при разведении в 2, 4, 8, и 16 раз. При этом спирт этиловый 40% концентрации обладает подавляющим действием только при разведении в 2 и 4 раза. Кроме того, задерживается рост *Staphylococcus aureus* при

Бацилла эхиноцереус (<i>Bacillus cereus</i>)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кандида альбиканс (<i>Candida albicans</i>)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обобщив данные, можно сделать выводы о низкой противомикробной активности экстрактов корневищ с корнями крапивы двудомной.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Выявлен наиболее эффективный технологический способ получения жидкого экстракта из корневищ с корнями крапив двудомной, заключающийся в использовании метода реперколяции.
2. Разработаны методики количественного определения жидкого (0,26 – 1,52%) и густого (10,45 – 14,32%) экстрактов из корневищ с корнями крапивы двудомной.
3. Диуретические свойства густого экстракта, на наш взгляд, будут способствовать увеличению антитоксической функции организма, а препарат будет оказывать комплексное воздействие на организм.
4. Жидкий экстракт из корневищ с корнями крапивы двудомной показал невысокую антимикробную активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) позволило сделать следующие **общие 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 типа 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-, ¹H-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 стерина природы – эргостерина, с использованием его в качестве стандарта.

4. Обоснована целесообразность стандартизации сырья и препаратов корневищ с корнями крапивы двудомной по содержанию суммы стерина 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 стерина, 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 стерина в доброкачественном сырье находится в пределах 2,23-7,34%, что позволило обосновать числовой показатель «Содержание суммы стерина – 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 СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активные соединения

ЛР – лекарственное растение

ДСК – диазобензолсульфоокислота

ГФ – Государственная Фармакопея

НД – нормативная документация

ЛП – лекарственный препарат

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛФ – лекарственная форма

ЛС – лекарственное средство

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

ЛРС – лекарственное растительное сырьё

РСО – рабочий стандартный образец

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ФС – фармакопейная статья

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Библиографический список.

1. Акопов, И.Э. Важнейшие отечественные лекарственные растения и их применение / И.Э.Акопов. – Т.: Медицина, 1986. - С. 414-418.
2. Акопов, И.Э. Кровоостанавливающие растения / И.Э.Акопов. – Ташкент: «Медицина», 1977. – 218 с.
3. Арзамасцев, А.П. Фармацевтическая химия: Учебное пособие / Под ред. А.П. Арзамасцева. – М.: ГЕОТАР-МЕД, 2004. – 640 с.
4. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Под ред. Чикова П.С. – М., 1980. – 340 с.
5. 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.- № 1. - С. 62-64.
6. Балагозян, Э.А. Изучение петиолярных признаков листа крапивы двудомной / Э.А. Балагозян // В сборнике: Аспирантские чтения - 2014 Материалы конференции с международным участием "Молодые ученые 21 века - от современных технологий к инновациям", посвященной 95-летию СамГМУ. - 2014.- С. 252-253.
7. Балагозян, Э.А. Определение стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной / Э.А. Балагозян, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева //Фармация. – Москва. – 2016. № 2. С.18-21.
8. 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.
9. Благовещенский, В.В. Определитель растений Среднего Поволжья / В.В. Благовещенский // Л.: «Наука», 1984. – С. 47-48.
10. Быков, В.А. Состояние и социально-экономические предпосылки развития лекарственного растениеводства и заготовок лекарственного сырья в России / В.А. Быков, Т.П. Конон, В.М. Пучин, Л.Н. Зайко //

- Международная конференция лекарственного растениеводства: сб. научн. трудов. – М.: ВИЛАР, 2006. – 406 с.
11. Вайс, Р.Ф. Фитотерапия. // Р.Ф. Вайс, Ф. Финтельманн / Руководство: Пер. с нем. – М.: Медицина, 2004. – 552 с.
 12. Великая, Т.В. Определение качественного состава крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) методом ТСХ / Т.В. Великая, К.К. Кожанова, С.К. Жетерова, О. Дрегерт // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. - №1 (43). - С. 78-80.
 13. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения: справочное пособие. -3-е издание, переработанное и дополненное / А.Ф. Гаммерман, Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. – М.: Высшая школа, 1983. – 400 с. С. 283-285.
 14. Гельтман, Д. В. Род *Urtica* L. (*Urticaceae*) в СССР // Нов.сист. высших растений. -Л. - 1988. - 25. - С. 68-80.
 15. Генкина, Г.Л. Спектрофотометрия гликозидов олеаноловой кислоты и хедерагенина в концентрированной серной кислоте / Г.Л. Генкина, Л.Г. Мжельская, Т.Т. Шакирова, Н.К. Абубакирова // Химия природных соединений. – Ташкент. – 1977. - №2. – С. 220-227.
 16. ГОСТ 12529-67. Крапива (лист): Техн. условие. – Введ. 01.05.67. – Б.м., 1967. – 3 с.
 17. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е издание. Ч.1. / Москва: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
 18. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.1 / М.–2015. – 1470 с.
 19. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.2 / М.– 2015. – 1004 с.
 20. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.3 / М.– 2015. – 1294 с.
 21. Государственная фармакопея СССР. Одиннадцатое издание / МЗ СССР. - Вып. 2. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.

22. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>. – 16.07.16.
23. Государственный реестр лекарственных средств Т.1: официальное издание (по состоянию на 19.02.2013г.) (VIII ежегод. периодич. изд.) /Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения; Фонд фармацевт. информации. — М.: Минздрав РФ, 2006. – 1300 с.
24. Гринкевич, Н.Н. Лекарственные растения: справочное пособие / Н.Н. Гринкевич – М.: Высшая школа, 1991. - 152 с.
25. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров // Москва, 2004. – Т.3. – С. 125.
26. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров // Москва, 2003. – Т.2. – С. 40-41.
27. Губин, К.В. Анализ аминокислотного и элементного состава надземной части и сухого экстракта *Urtica cannabina* L. / К.В. Губин, М.А. Ханина // Медицина и образование в Сибири. – 2011.- №5. С.6.
28. Губин, К.В. Биологическая активность экстракта *Urtica cannabina* L. / К.В. Губин, А.В. Сенькова, М.А. Ханина, Т.А. Агеева // Бюллетень сибирской медицины. –2011. – Т. 10. – № 5. – С. 45-49.
29. Губин, К.В. Изучение химического состава надземной части *Urtica cannabina* L. Флоры Сибири / К.В. Губин, М.А. Ханина // Химия растительного сырья. – 2009. – № 2. – С. 89-92.
30. Гурьев, А.М. Химико-фармакологическое исследование полисахаридов высших растений и перспективы их использования в терапии злокачественных новообразований: дисс. ...д. фармац. наук: 14.04.02 / Гурьев Артем Михайлович. – Пятигорск, 2011. – 297 с.
31. Дикорастущие полезные растения России / отв.ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесновская. -СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. -663 с.

32. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладынина – М.: Медицина, 1977. - С. 215-217.
33. Дрозд, Г.А. Ограничения и противопоказания для лекарственного растительного сырья: Информационно-аналитическое пособие по побочным эффектам лекарственных растений / Г.А. Дрозд. – Курск: КГМУ, 2006. - С. 21.
34. Дрозд, Г.Ф. Ограничения и противопоказания для лекарственного растительного сырья: Информационно-аналитическое пособие по побочным эффектам лекарственных растений / Г.Ф. Дрозд – Курск, 2006. 79 с.
35. Елина, Г.А. Аптека на болоте: путешествие в неизведанный мир / Г.А. Елина. – СПб.: Наука, 1993. – С.89-93
36. Ефремов, А.П. Аденома простаты - проявление мужского климакса / А.П. Ефремов // Лекарственные растения.- 2002. - № 3 (4). - С.17-21.
37. Ефремов, А.П. Поиск растений, перспективных для лечения болезней предстательной железы / А.П. Ефремов, А.И. Шретер // Труды Первой Всероссийской конференции по ботаническому ресурсоведению. - Санкт-Петербург, 1996. – С. 218.
38. Ефремов, А.П., Шретер А.И. Травник для мужчин / А.П. Ефремов, А.И. Шретер. – М.: Асадаль, 1996. - 352 с.
39. Зайцева, Е.Н. Способ получения диуреза у лабораторных животных: патент на изобретение 2494703 Рос. Федерация. №2012104057/13; заявл. 06.02.12; опубл. 10.10.13 // Изобретения. Полезные модели. – 2013; 28: 11 с.
40. Калитеевский, П.Ф. Макроскопическая дифференциальная диагностика патологических процессов / П.Ф. Калитеевский. – М.: Медицина, 1987. - 400с.
41. Каррер, П. Курс органической химии / П. Каррер / Пер. с немецкого Государственное научно-техническое издательство химической литературы, Ленинград, 1962. - 1216 с.

42. Кирьякова, В.О. Фармакогностическое изучение некоторых видов рода *URTICA*, произрастающих на территории Алтайского Края: дисс. ... к.фармац.наук: 14.04.02 / Кирьякова Виктория Олеговна. - Пермь, 2013. – 253 с.
43. Кирьякова, В.О. Анатомическое изучение крапивы жгучей травы / В.О. Кирьякова, Т.В. Гербер, И.В. Давыдова // Ежегодный сборник научных и методических работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевтического факультета. - Барнаул, 2011. С. 41-48.
44. Кирьякова, В.О. Анатомическое изучение крапивы жгучей травы / В.О. Кирьякова, Т.В. Гербер, И.В. Давыдова // В сборнике: «Актуальные проблемы фармакологии и фармации» Ежегодный сборник научных и методических работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевтического факультета. Барнаул, 2011. С. 41-48.
45. Кирьякова, В.О. Изучение содержания витамина К₁ в надземной части растений рода *Urtica* / В.О. Кирьякова, Е.П. Куперман // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. – № 3-1 (35). – С. 62-63.
46. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – С. 112-200.
47. Киселева, Т.Л. Методические рекомендации по расширению номенклатуры отечественных официальных лекарственных растений / Т.Л. Киселева, Н.В. Юргель, А.А. Карпеев и др. // М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 88 с.
48. Коган, М.И. Радикальная хирургия рака предстательной железы / М.И. Коган, О.Б. Лоран, С.Б. Петров. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2006. – 352 с.
49. Коломиец, Н.Э. Стандартизация листьев крапивы двудомной / Н.Э. Коломиец, Г.И. Калинкина, Н.Н. Сапронова // Фармация. – Москва. – 2011. № 6. С. 22-24.

50. Комаров, В. Л. Флора СССР / В. Л. Комаров, Е. Г. Бобров и др. – Москва-Ленинград: Издательство Академии Наук СССР, 1936. - Т. 5. - с. 384-394.
51. Комаров, В. Л. Флора СССР / В. Л. Комаров, Е. Г. Бобров и др. – Москва-Ленинград: Издательство Академии Наук СССР, 1936. - Т. 21. - с. 134-135.
52. Копытько, Я.Ф. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* / Я.Ф. Копытько, Е.С. Лапинская, Т.А. Соколовская // Химико – фармацевтический журнал. - 2011. - Т. 45 - №10. - С. 33-41.
53. Корсун, В.Ф. Фитолектины / В.Ф. Корсун, В.М. Лахтин, Е.В. Корсун, А. Мицконас. – М.: Практическая медицина, 2007. – 288 с.
54. Котельников, Г.П. Доказательная медицина. Научно обоснованная медицинская практика: Монография / Г.П. Котельников, А.С. Шпигель. – Самара; СамГМУ, 2000. - 116 с.
55. Кувакова А.Р. Морфологические особенности крапивы двудомной (*Urtica dioica*) в различных фитоценозах Оренбуржья / А.Р. Кувакова, Е.Э. Гусарова // Новая наука: Стратегии и векторы развития. - 2016.- № 8.- С. 3-5.
56. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Фундаментальные исследования. – 2014. – №11. – С. 366-371.
57. Куркин, В.А. Иллюстрированный словарь терминов и понятий в фармакогнозии: Учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов, врачей и фармацевтических работников // В.А. Куркин, В.Ф. Новодранова, Т.В. Куркина. - Москва; Самара: ГП «Перспектива», СамГМУ, 2002. - С. 64.
58. Куркин, В.А. Проблемы рационального использования лекарственных и пищевых растений в научной и народной медицине / В.А. Куркин // Материалы международной научно-практической конференции «Самара в контексте мировой культуры». - Самара, 2001. - С. 15-25.

59. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов)/ В.А. Куркин. - 3-е изд., перераб. и доп. — Самара : 000 «Офорт» ; ФГОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. - С. 1279.
60. 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.
61. Лавренова, Г.В. От всех болезней (лекарственные растения полей и лесов); Справочник / Г.В. Лавренова, В.К. Лавренов, В.Д. Онипко. – Донецк: МП «Отечество», 1994. – С.403-405.
62. Лазарев, А.В. Система крапивоцветных / А. В. Лазарев. -Белгород.: Изд. БелГУ, 1988. -224 с.
63. Лапинская, Е.С. Аминокислоты и циклические дипептиды в настойках гомеопатических матричных *Urtica dioica* L. и *Urtica urens* L. / Е.С. Лапинская, Я.Ф. Копытько, Е.А. Тимохина // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42. – № 11. – С. 49-52.
64. Лапинская, Е.С. Изучение состава липофильной фракции настоек гомеопатических матричных крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и крапивы жгучей (*Urtica urens* L.) / Е.С. Лапинская, Я.Ф. Копытько // Химико – фармацевтический журнал. – 2008. - Т. 42. - №12. - С. 26-29.
65. Лопаткин, Н.А. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы / Н.А. Лопаткин, А.Г. Мартов, А.В. Сивков. – М.: Медицина, 1996.
66. Лотова, Л. Н. Морфология и анатомия высших растений / Е. Н. Лотова – М.: Эдиториал УРСС, 2001. - 528 с.
67. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России / П.Ф. Маевский. - 10-е изд., перераб. и доп. // Москва. – 2006. С. 186.
68. Маркова, Е.В. Особенности морфологии вегетативных побегов *Urtica dioica* L. / Е.В. Маркова, А.В. Лазарев // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки.- 2010.- Т. 15.- № 12.- С. 34-39.

69. Макаренко, Н.В. Исследование острой токсичности и диуретической активности металлопроизводных гуминовых, фульвовых и гумусовых кислот / Н.В. Макаренко, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев, Д.А. Андриянов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17. – № 5-3. – С. 925-929.
70. Машковский, М.Д. Лекарственные средства. / М. Д. Машковский. — Изд. 15-е, перераб., испр. и доп. — М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005. - 1200 с.
71. Меньшикова, З.А. Энциклопедия лекарственных растений / З.А. Меньшикова, И.Б. Меньшикова, В.Б. Попова. -М.: Эксмо, 2008. - С.134-135.
72. Могильницкий, А.В. Лекарственные растения и их применение / А.В. Могильницкий. – Владивосток, МП «Экслибрис», 1992. – С.74-76.
73. Муравьев, И.А. Спектрофотометрический метод количественного определения урсоловой кислоты / И.А. Муравьев, В.В. Шатило, В.Ф. Семенченко // Химия природных соединений. – Ташкент. – 1972. - №6. – С. 738-740.
74. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
75. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / Под ред. проф. В.Л. Багировой, проф. В.А. Северцева. – Санкт-Петербург: Спецлит. – 2001. – 223 с.
76. Никитин, А.А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений / А. А. Никитин, И.А. Панкова — Л., Наука, 1982. - с.351-358.
77. Никитин, В.В. Сорные растения флоры СССР. - Л.: «Наука», 1983. -454 с.
78. Николаев, С.М. Влияние комплексного растительного средства на морфофункциональное состояние печени белых крыс при этаноловом гепатите / С.М. Николаев, Я.Г. Разуваева, А.А. Торопова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2016. – № 6. – С. 167-170.

79. Новикова, В.С. Флора средней полосы России: Атлас-определитель / В.С. Новикова, К.В. Киселева, С.Р. Майоров // М.: ЗАО «Фитон+», 2010. – С. 184-185.
80. Оганесян, Э.Т. О механизме реакции тритерпеноидов с серной кислотой/ Э.Т. Оганесян // Химия природных соединений. – Ташкент. – 1980. - №5. – С. 647-651.
81. Ожигова, М.Г. Количественное определение суммарного содержания флавоноидов в листьях *Urtica dioica* (*Urticaceae*) спектрофотометрическим методом / М.Г. Ожигова, М.В. Богма, Л.С. Теслов // Растительные ресурсы. – 2006. – Т. 42. – № 2. – С. 126-130.
82. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. Т.6. – № 4. – С. 306-359.
83. Орехова, А.Д. Анализ номенклатуры лекарственных препаратов для терапии аденомы предстательной железы / А.Д. Орехова, Р.А. Мазитова, В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Вестник ПГФА. – 2015. – №16. – С. 89-90.
84. Палов, М. Энциклопедия лекарственных растений. Пер. с немецкого / М. Палов. - М.: Мир, 1998. –467 с.
85. Патент на ПМ 115651 Рос. Федерация №2011138631/13. Устройство для введения водной нагрузки лабораторным животным / Зайцева Е.Н.[и др.]; заявл. 20.09.11; опубл. 10.05.12 // Изобретения. Полезные модели. – 2012; 13: 2 с.
86. Первушкин, С.В. Анализ белков биомассы *Spirulina platensis* II / С.В. Первушкин, В.А. Куркин, А.А. Сохина, И.Ф. Шаталаев // Химия природных соединений. -2002.- Т. 41.- №3. -С. 101.
87. Пецуха, В.С. Изучение элементного состава крапивы коноплевой / В.С. Пецуха, Е.П. Чебыкин, Г.М. Федосеева // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск. – 2008. – Т. 81. – № 6. –С. 88-90.

88. Пещуха, В.С. Фармакогностическое изучение крапивы коноплевой: дисс. ...к.фармац.н: 15.00.02 / Пещуха Виктория Сергеевна. – Улан-Удэ, 2009. – 166 с.
89. Погоцкая, А. А. Анатомические диагностические признаки листьев яснотки белой (*Lamium album*) и крапивы двудомной (*Urtica dioica*) / А. А. Погоцкая, В. А. Суходольская, А. В. Ащю // Актуальные проблемы экологии -2012: материалы VIII Междунар. науч.-практ. конф., 24-26 октября 2012 г. - Гродно, 2012. - Ч. 1. - С. 54-56.
90. Погоцкая, А.А. Изучение анатомо-диагностических признаков некоторых представителей семейства *Lamiaceae* // А.А. Погоцкая, В.А. Суходольская // В сборнике: Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы материалы I Международной научной конференции. - 2013. - С. 398-400.
91. Погоцкая, А.А. Методы фармакогностического анализа в идентификации лекарственного растительного сырья крапивы двудомной и возможных примесей к нему // А.А. Погоцкая // Вестник развития науки и образования. -2013. - № 4. - С. 40-49.
92. Пономарев, В.Д. Спектры поглощения пентациклических тритерпеноидов в серной кислоте / В.Д. Пономарев, Э.Т. Оганесян, В.Ф. Семенченко // Химия природных соединений. – Ташкент, 1971. - №2. – С. 147-150.
93. Попов, А.И. Некоторые товароведческие показатели сырья крапивы двудомной и крапивы коноплевидной / А.И. Попов, Д.Н. Шпанько, Е.А. Черкасов // Техника и технология пищевых производств. - 2009. - № 3. - С. 54-58.
94. Пронченко, Г.Е. Лекарственные растительные средства / Г.Е. Пронченко. - М.: «ЭОТАР-Медиа», 2002. – 288 с.
95. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Magnoliaceae-Limoniaceae*. - Л.: Наука, 1984. С. 139-140.

96. Растения для нас / Под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб.: «Учебная книга», 1996. – 607 с.
97. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
98. Самылина, И.А. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств / И.А. Самылина // Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты: Материалы I Международного научного конгресса. – М.: Институт традиционных методов лечения МЗ РФ и др., 1994. – 254 с.
99. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности 060108 (040500)/ И.А. Самылина, В.А. Ермакова, О.Г. Аносова // М.: Гэотар-медиа, 2010. – Т. 2. – 384 с.
100. Сдобнина, Л.И. Сравнительный анализ двух видов крапивы / Л.И. Сдобнина. // Известия ПГПУ, Естественные науки. – 2006. - №1 (5). - С. 16-18.
101. Скалозубова Т.А. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // Фармация. - №2.- 2012. – С. 5-7.
102. Скалозубова, Т.А. Изучение гомеопатических лекарственных форм крапивы двудомной/ Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина // Материалы научн. конференции «Фармобразование-2013».-Воронеж, 2013.-С.504-506.
103. Скалозубова, Т.А. Изучение фенольных соединений листьев крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А.Сорокина // Прикладная аналитическая химия. 2011.- т.2. - № 3 (5). - С. 20-23.
104. Скалозубова, Т.А. Количественное определение кальция и магния в листьях и настоях крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина// Сборник научных трудов «Разработка, исследование и

- маркетинг новой фармацевтической продукции». – Вып. 66. - Пятигорск, 2011.- С. 178-179.
105. Скалозубова, Т.А. Содержание суммы флавоноидов в настое и листьях крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина// Развитие гомеопатического метода в современной медицине. Тезисы докладов XXI Московской международной гомеопатической конференции. - М., 2011.- С. 196-198.
106. Скалозубова, Т.А. Титриметрический метод определения биологически активных веществ листьев и настоя крапивы двудомной /Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина// Прикладная аналитическая химия. - №1(1).-т.1. -2010. – С. 35-37.
107. Соколов, С.Я. Лекарственные растения: Фитотерапия / Справочник специалиста / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев // М.: Vita, 1993. -С.351.
108. Сорокина, А.А. Определение кальция и магния в листьях и настое крапивы двудомной / А.А. Сорокина, Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова // Фармация. -2013. - № 2. - С. 5-8.
109. Сошникова О.В. Изучение химического состава и биологической активности растений рода крапива: Дис.... канд.фарм. наук. - Курск, 2006. - 202 с.
110. Справочник по лекарственным растениям / А.М. Задорожный, А.Г. Кошкин, С.Я. Соколов, А.И. Шретер. - М.: Экология, 1992. – 415 с.
111. Тахтаджян, А.Л. Жизнь растений / А.Л. Тахтаджян и др. // Москва: Просвещение, 1980. – Т.5 (I). – С. 284-289.
112. Терехов, А.Ф. Определитель весенних и осенних растений Среднего Поволжья и Заволжья / А.Ф. Терехов. - 3-е изд., испр. и доп. // Куйбышев, 1969. – С. 362-363.
113. Тринеева, О.В. Антиоксидантная активность водно-спиртовых извлечений листьев крапивы двудомной / О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, С.С. Воропаева, А.И. Сливкин // Фармация. – 2013. – № 1. – С. 11-12.

114. Тринеева, О.В. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, Е.Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. – 2015. – № 3. – С. 105-110.
115. Тринеева, О.В. Применение различных методов при определении дубильных веществ в листьях крапивы / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Фармация. – 2014. – № 1. – С. 16-19.
116. Турищев, С.П. Рациональная фитотерапия / С. П. Турищев. - М.: Информпечать. - 2000. – 240 с.
117. Ушанова, В.М. Исследование влияния условий произрастания на химический состав крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) / В.М. Ушанова, О.И. Лебедева, С.М. Репях // Химия растительного сырья. - 2001.- № 3. - С. 97–104.
118. Фармацевтическая технология. Руководство к лабораторным занятиям: учеб.пособие / В.А. Быков, Н.Б. Демина, С.А. Скатков, М.Н. Анурова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 304 с.
119. Федосеева, Л.М. Изучение анатомического строения крапивы коноплевой травы // Л.М. Федосеева, В.О. Кирьякова // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011.- № 3-1 (35). -С. 77.
120. Физер, Л. Химия природных соединений фенантренового ряда: перев с англ. / Л. Физер, М. Физер. – Москва-Ленинград, 1953. – 657 с.
121. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / Под ред. В.Г. Кукеса. - М.: Медицина, 1999. – 192 с.
122. Флора СССР: Т.5 / Под ред. Е.Г. Боброва, Н.Н. Цвелев. – М.: Наука, 1964. – 796 с.
123. Химическая энциклопедия: в 5 т. / Под редакц. Н.С. Зефирова. – М.: Большая Российская энциклопедия, 1995. – Т.4. - 639 с.
124. Чиссов, В.И. Заболеваемость раком предстательной железы в Российской Федерации / В.И. Чиссов, И.Г. Русаков – МНОИ им. Герцена,

- 2011 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.uroweb.ru/urology-in-frame/id-413> (дата обращения 15.12.2014).
125. Шантанова, Л.Н. Антибактериальные и противовоспалительные свойства растительного уросептического средства / Л.Н. Шантанова, А.Г. Мондодоев, В.В. Иванов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2009. - №3 (67). - С. 233-237.
126. Шретер, А.И. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций) / А.И. Шретер. - М.: Медицина, 1985. – С. 127- 130.
127. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: Учебное пособие / Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. - СПб.: Специальная литература, 1999. – 407 с.
128. Юдина, Н.В. Влияние параметров диспергирования крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) на изменения степени измельчения, выходов и свойств экстрактивных веществ / Н.В. Юдина, А.А. Иванов, Ю.В. Лоскутова // Химия растительного сырья. – 2012. – № 1. – С. 137-142.
129. Якимова, Т.В. Метаболические эффекты экстракта крапивы при модели сахарного диабета / Т.В. Якимова, О.Н. Насанова, М.В. Мелешко, В.Н. Буркова // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10. – № 5. – С. 116-120.
130. Яковлев, Г.П. Ботаника / Яковлев Г.П., Челомбитько В.А. – СПб.: СпецЛит, СПХФА, 2001. – 680 с.
131. Яцюк, В.Я. Биологически активные вещества травы крапивы двудомной / Яцюк В.Я., Чалый Г.А., Сошникова О.В. // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П.Павлова. – 2006. - №1. С. 25-29.
132. Ahangarpour, A. Antidiabetic effect of hydroalcoholic *Urtica dioica* leaf extract in male rats with fructose-induced insulin resistance / A. Ahangarpour, M. Mohammadian, M. Dianat. // Iran J Med Sci. – 2012. - 37(3). – 181 p.

133. American herbal pharmacopoeia® botanical pharmacognosy—microscopic characterization of botanical medicines – CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business, 2011.
134. Botanical medicines for the urinary tract / E. Yarnell // World J Urol. – 2002. – V. 20. - P. 285–293.
135. British Pharmacopoeia 2012 – CrownCopyright, 2011.
136. Damjanov, I. Cancer Grading Manual / I. Damjanov. – Kansas City, Kansas.: Springer Science+Business Media, 2007. – P. 55- 63.
137. Durak, I. Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer / I. Durak, H. Biri, E. Devrim, S. Sözen, A Avci. // Cancer BiolTher. – 2004. - 3(9). – P. 855.
138. Gul, S. Chemical Composition and In Vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. / S. Gul, B. Demirci. - Bull Environ ContamToxicol, 2012. - P.666–671.
139. Gülçin, I. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) / I. Gülçin, Ö. Küfrevioglu, M. Oktay et al. // Journal of Ethnopharmacology. – 2004. – V. 90. - P. 205–215.
140. Johnson, T.A. Lipophilic stinging nettle extracts possess potent anti-inflammatory activity, are not cytotoxic and may be superior to traditional tinctures for treating inflammatory disorders / T. A. Johnson, J. Sohn, W. D. Inman et al. // Phytomedicine. – 2013. – Vol. 20. - P.143– 147.
141. Kevin, T. Management of benign prostatic hypertrophy / T. Kevin. – Totowa, New Jersey Humana Press Inc., 2004. - 280 p.
142. Konrad, L. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. / L. Konrad, H. Müller, C. Lenz et al. // Planta Med. – 2000. – Vol. 66 (1). – P. 7.
143. Mochamed, C. Determination of antimicrobial activity of various extracts of stinging nettle (*Urtica dioica*) / C.Mochamed, A. Ibrahim, D. Fariza Sulaiman et al. // Journal of Medicinal Plants. - 2012. – Vol. 11(42). - P. 98-104.

144. Mzid, M. Chemical composition, phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Urtica urens* L. leaves / M. Mzid, S. Ben Khedir, S. Bardaa // Arch Physiol Biochem.- 2016. – V. 122. - P. 1-12.
145. Nahata, A. Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats / A. Nahata, V. K. Dixit // Andrologia XX. – 2012. - Vol.44. - P. 396-409.
146. Safarinejad, M.R. *Urtica dioica* for treatment of benign prostatic hyperplasia: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study / M.R. Safarinejad // Herb Pharmacother. – 2005. - Vol. 5. – P. 1-11.
147. Sahin, M. Gynaecomastia in a man and hyperoestrogenism in a woman due to ingestion of nettle (*Urtica dioica*) / M. Sahin, H. Yilmaz // The New Zealand medical journal. - 2007. – Vol. 120. - P. 1-3.
148. Savickiene, N. Research update: Lectin enriched fractions of herb and dry extract of *Urtica dioica* L. / N. Savickiene, D. Baniulis, V. Bendokas // Journal of Medicinal Plants Research. - 2012. - Vol. 6(5). - P. 888-892.
149. Semih, O. Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle / O. Semih, Y. Buket // The Scientific World Journal. – 2012. - Vol. 12. – P. 1-12.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

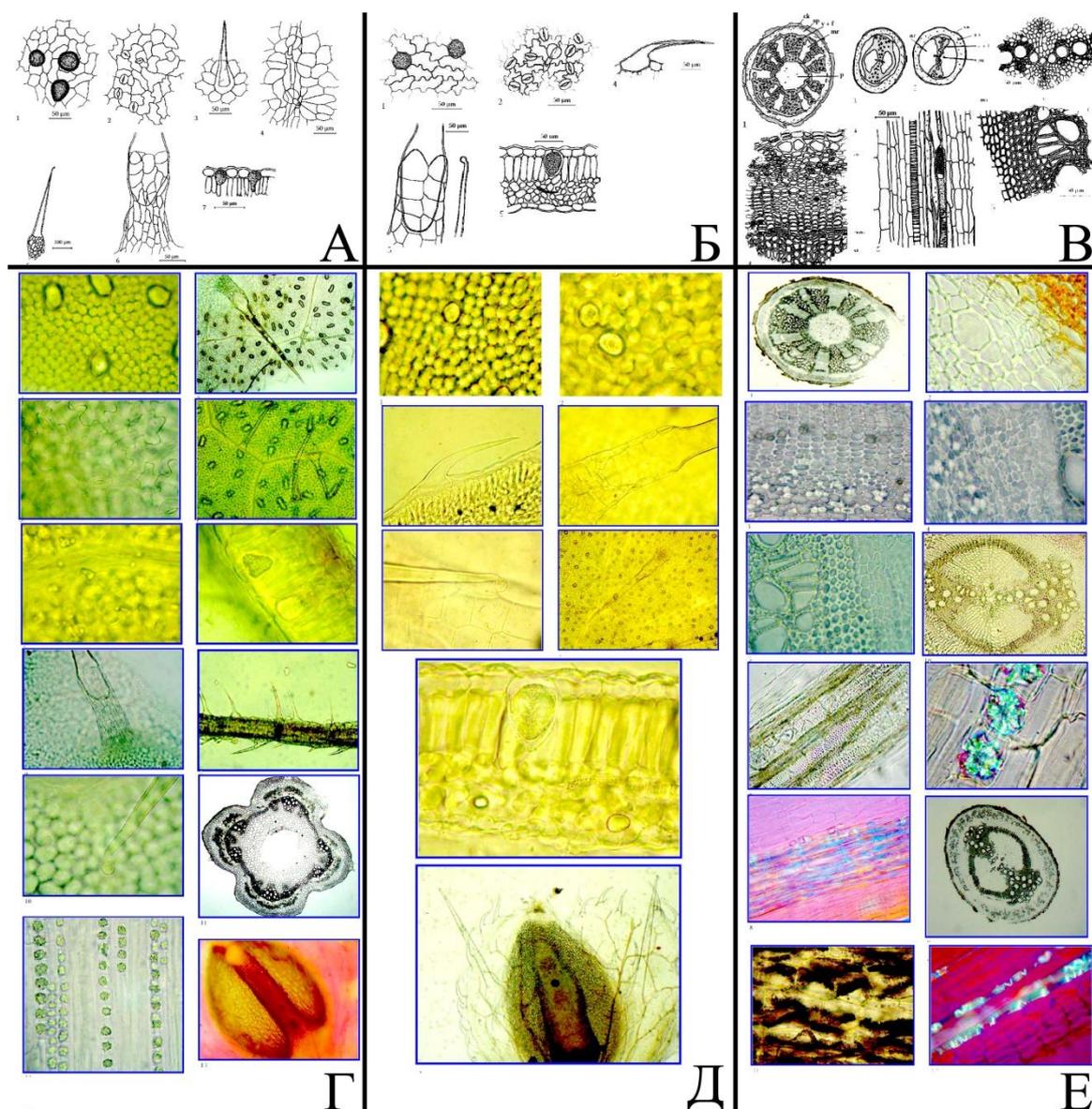


Рисунок 1 – Схемы-рисунки и микрофотоснимки анатомо-гистологических признаков крапивы двудомной и жгучей, приведенных в *American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy — Microscopic Characterization of Botanical Medicines* [112, 114].

А - схем-рисунки гистологических особенностей листа крапивы двудомной;

Б - рисунки гистологических особенностей листа крапивы жгучей;

В - рисунки гистологических особенностей корневищ с корнями крапивы двудомной;

Г - фотоснимки анатомо-гистологических особенностей листа крапивы двудомной;

Д - фотоснимки анатомо-гистологических особенностей листа крапивы жгучей;

Е - фотоснимки анатомо-гистологических особенностей корневищ с корнями крапивы двудомной.

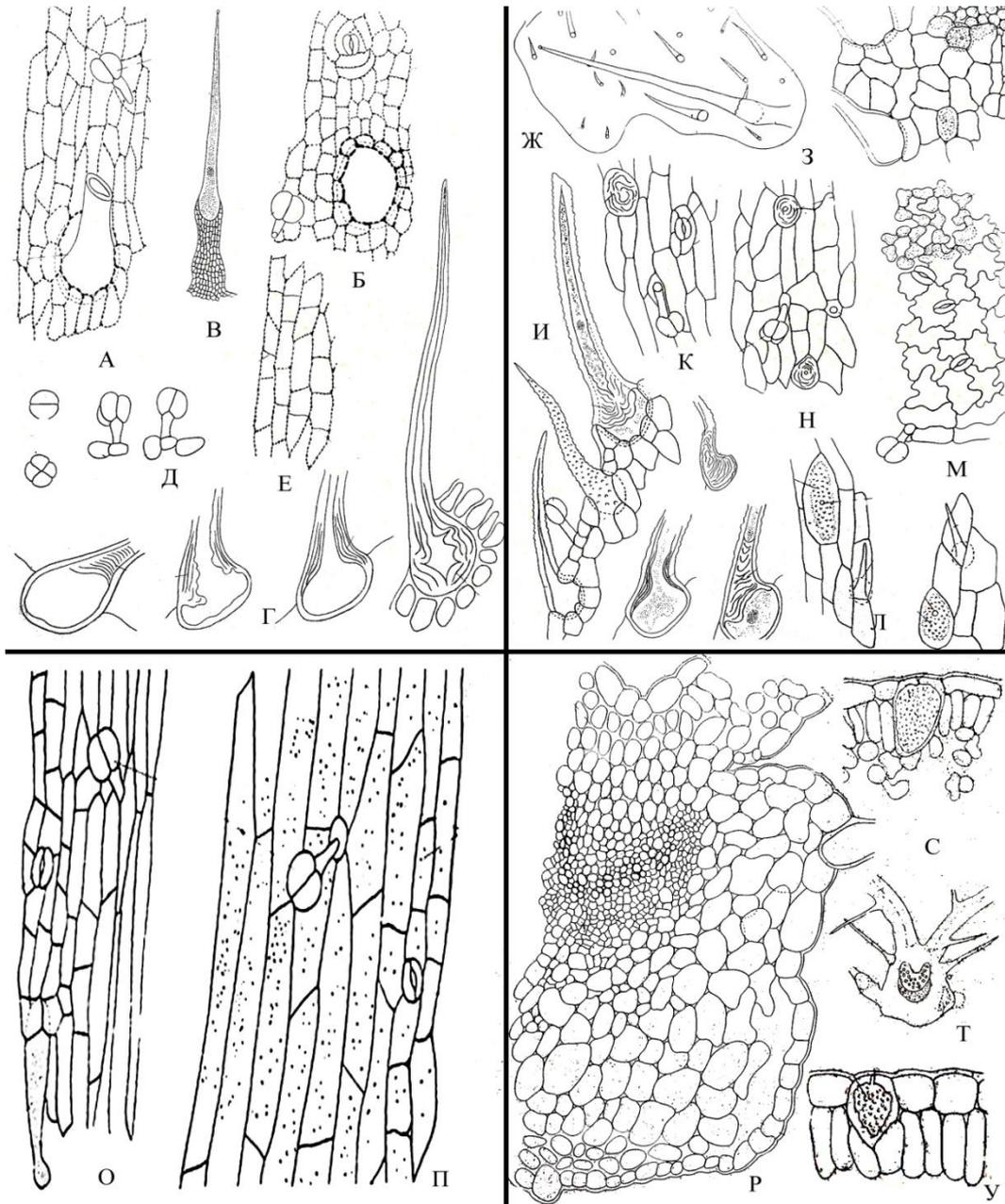


Рисунок 2 – Стебель крапивы двудомной. *А* и *Б* — эпидермис молодого растения (май) с поверхности: *А* - реберной части, *Б* - межреберной части; *В* - жгучий волосок; *Г* - простой волосок целиком и основания трех полосковой; *Д* - железки; *Е* - эпидермис более старого растения (июнь - июль) с поверхности;

Прилистник крапивы двудомной. *И* - краевая часть с поверхности (крайние волоски изображены в оптическом разрезе); *Н* и *Л* - эпидермис с поверхности: *Н* - верхней (внутренней) стороны, *К* - нижней (наружной) стороны; *Л* - два участка внутреннего эпидермиса с поверхности с цистолитами в двух клетках;

Стебель крапивы жгучей (молодое растение). *О* и *П* - эпидермис с поверхности: *О* - верхушки, *П* - средней части.

Листовая пластинка крапивы двудомной. *Ж* - общий вид участка с поверхности (схематизировано); *З* и *М* - эпидермис с подстилающим мезофиллом с поверхности: *З* - верхний, *М* - нижний; *У* и *С* - участки пластинки с цистолитом в поперечном разрезе: *У* - молодого листа, *С* - старого листа; *Т* - общий вид поперечного разреза в области главной жилки (схематизировано); *Р* - деталь к рисунку *Т* [64].

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица 1

Сравнительная характеристика морфологических диагностических признаков крапивы двудомной, жгучей, коноплевой и яснотки белой [9, 14, 25, 26, 43, 50, 51, 79]

Признак	Крапива двудомная	Крапива жгучая	Крапива коноплевая	Яснотка белая
Ареал обитания (с уточнением по европейской части РФ)	Почти во всех районах СНГ, в том числе в Российской Федерации, за исключением Крайнего Севера	Европейская часть СНГ, на Кавказе, в Западной Сибири, занесена в Восточную Сибирь и на Дальний Восток	Западная и Восточная Сибирь, Дальний Восток, Монголия, Китай.	По всей территории холодного и умеренного поясов Северного полушария
Экологические особенности произрастания (геоценоз)	Влажные вязовые и черноольховые леса, поймы рек, где она образует густой наземный ярус. На склонах и террасах речных долин, а также около жилья и дорог.	На склонах и террасах речных долин, а также около жилья и дорог.	На склонах и террасах речных долин, а также около жилья и дорог.	На склонах и террасах речных долин, а также около жилья и дорог.
Одно-дву- много- летнее растение	Многолетнее	Однолетнее	Многолетнее	Многолетнее
Высота растения	60-200 см	5-40 см	70-150 см	30-140 см
Время цветения	Июнь-август	Июнь-август	Июнь-август	С апреля до конца осени (октября)
Особенности цветка <ul style="list-style-type: none"> • Околоцветник • Половость • Гинецей • Андроцей 	Цветок актиноморфный, околоцветник простой, четырех- или пятичленный. В мужских цветках 4-5 свободных тычинок. Гинецей псевдомономерный, сросшийся из 2-х плодолистиков	Цветки мелкие, с простым околоцветником, светло-зеленые, однополые (тычиночные и пестичные)	Однодомное, изредка двудомное. Цветки мелкие, раздельнополые. Цветки однополые, однодомные, мужские – в пучках по 4 в пазухах верхних листьев, женские – в густых пучках в пазухах верхних листьев. Околоцветник женских цветков сросшийся.	Околоцветник двойной. Чашечка пятизубчатая, двугубая. Венчик двугубый. Тычинок 4. Гинецей ценокарпный из 2-х плодолистиков, каждый из которых делится пополам продольной перегородкой. Столбик один с двулопастным рыльцем
Тип соцветия	Колосовидное, разветвленные	Колосовидное расположенные пучками в пазухах верхних и нижних листьев.	Колосовидное	Мутовчатое
Тип и размер плода	Орешек яйцевидный, длиной 1-1,5мм с остатками столбиков	Орешек яйцевидный, сплюснутый буровато-желтый до 1,5 мм длиной	Орешек яйцевидный или эллиптические, 1.9-2.5 мм длиной и 1.2-2.8 мм шириной	Четырех-орешек, темно-серые удлиненно-яйцевидные, покрытые

				бородавчатыми выростами	
Размер пластинки	листовой	Длиной до 10-17 см, шириной до 5-7 см	Длиной 2—6 см и 1,5— 3 см шириной	Длиной до 16 см	Длинной 3-8 см и 1,5-5 см шириной
Форма пластинки	листовой	Яйцевидная или ланцетовидная с длинной заостренной верхушкой	Яйцевидная или эллиптическая с острой верхушкой и клиновидным или закругленным основанием	Трех-рассеченная или трех- раздельная. Первые 2-3 листа и листья пазушных побегов цельные, крупнозубчатые	Яйцевидная или сердцевидная по краю усеченная
Край пластинки	листовой	Крупнопильчатый с сердцевидным или округлым основанием и длиннозаостренной верхушкой	Остропильчатый	Каждый сегмент перисторассеченны й	Остропильчатый
Тип корневой системы		Корневище горизонтальное, шнуровидное, подземное, реже надземное, желтое, разветвленное, с тонкими придаточными корнями	Стержневая система с выраженным главным корнем и мелкими боковыми корнями.	Корневище горизонтальное, мощное, но не ползучее	Корневище расположено горизонтально, длинное, ползучее с тонкими, многочисленным и корнями, отходящими от узлов.

**Сравнительная характеристика анатомо-гистологических
диагностических признаков крапивы двудомной,
жгучей и яснотки белой**

<i>Анатомо-гистологические признаки подземных органов</i>			
Признак	Крапива двудомная	Крапива жгучая	Яснотка белая
<u>Корневище</u>		-	
Покровная ткань	Покровная ткань представлена пробкой	-	Покрыто эпидермой, изредка заменяемой на пробковый слой. Пробка неоднородная, крупноклеточная, окрашенная в бурый цвет
Степень развитости первичной коры	Паренхима коры в объеме незначительна, содержит темные включения, содержит большое количество запасного крахмала, также механические элементы, представленные группами одревесневших клеток	-	Коровая часть выражена слабо и представлена основной паренхимой с тонкостенными клетками
Степень развитости центрального цилиндра	Проводящие пучки открытые, коллатеральные. Ксилема значительно мощнее флоэмы. Проводящие элементы ксилемы представлены сосудами	-	Центральный цилиндр корневища непучкового типа строения
Армированность центрального цилиндра	Пучки соединены характерными кольцами склеренхимы. Клетки многоугольные, внутри имеют полость, их стенки подвергаются одревеснению	-	Не характерна
Особенность камбиальной зоны	Клетки вытянутые, с тонкими стенками, расположены параллельными рядами. Камбиальная зона проходит сплошным кольцом по всему корневищу, включает пучковый и межпучковый камбий	-	Имеются заметные годовичные кольца ксилемы
Особенность флоэмной части	Без особенностей	-	Без особенностей
Особенность ксилемной части	Значительно мощнее флоэмы	-	Значительно мощнее флоэмы
Клеточные включения запасных веществ	Большое количество неструктурированного крахмала. Встречаются	-	В эндодерме встречаются клетки с пигментированным

	друзы		содержимым
Сердцевина/полость	В центре сердцевины расположена полость, окруженная кольцом склеренхимы		Паренхима сердцевины часто содержит полости рексигенного типа
<u>Корень</u>			
Тип корня	Вторичный Пучковый тип строения	Вторичный Непучковый тип строения	Вторичный Непучковый тип строения
Степень выраженности блоков тканей	Паренхима коры в объеме незначительна, основной объем приходится на центральный цилиндр	Коровая часть корня выражена слабо, основной объем корня занимает ксилемная часть	Основная паренхима мезодермы – относительно центрального цилиндра выражена значительно и занимает около 45% от объема органа
Особенности пробки	Пробка в толщину имеет 3-5 слоев клеток, стенки которой окрашены в светло-коричневый цвет	Незначительный слой из крупных угловатых тангентально сжатых клеток	Экзодерма коры сильно пигментирована, темно-бурого цвета
Особенности флоэмы	Клетки угловатой формы, редко окрашенные, лубяные волокна не одревесневшие	Клетки мелкие, слабо окрашенные в желто-коричневый цвет	Без особенностей
Особенности ксилемы	Диархная структура первичной ксилемы	Занимает основную часть центрального цилиндра радиальными группами, сильно армированными склеренхимными волокнами. Диархная структура первичной ксилемы	Тетрархная структура первичной ксилемы
Клеточные включения экскреторного типа	Паренхима коры содержит темные включения	Отсутствуют	Экзодерма коры с поверхности корня сильно пигментирована
Клеточные включения запасных веществ	Большое содержание неструктурированного крахмала	Содержание крахмала небольшое	Не содержит крахмала

Микрофотоснимки морфолого-анатомического анализа подземной части крапивы двудомной

1. Анатомо-гистологические признаки корня крапивы

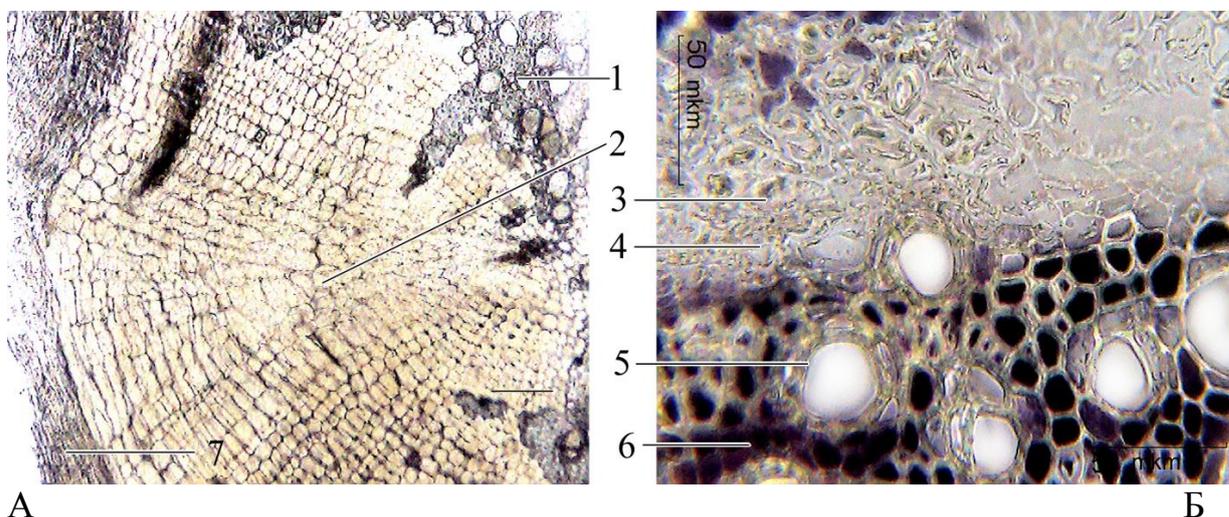


Рисунок 1 – Поперечный срез корня вторичного строения крапивы двудомной.

А - Радиальный луч (x100); Б – флоэма, обработанная р-м Люголя (x400).
 Обозначения: 1 - ксилема вторичная, 2 - ткани радиального луча, 3 - флоэма, 4 - зона камбия, 5 - сосудистые клетки ксилемы, 6 - паренхима ксилемы с крахмалом, 7 - пробка.

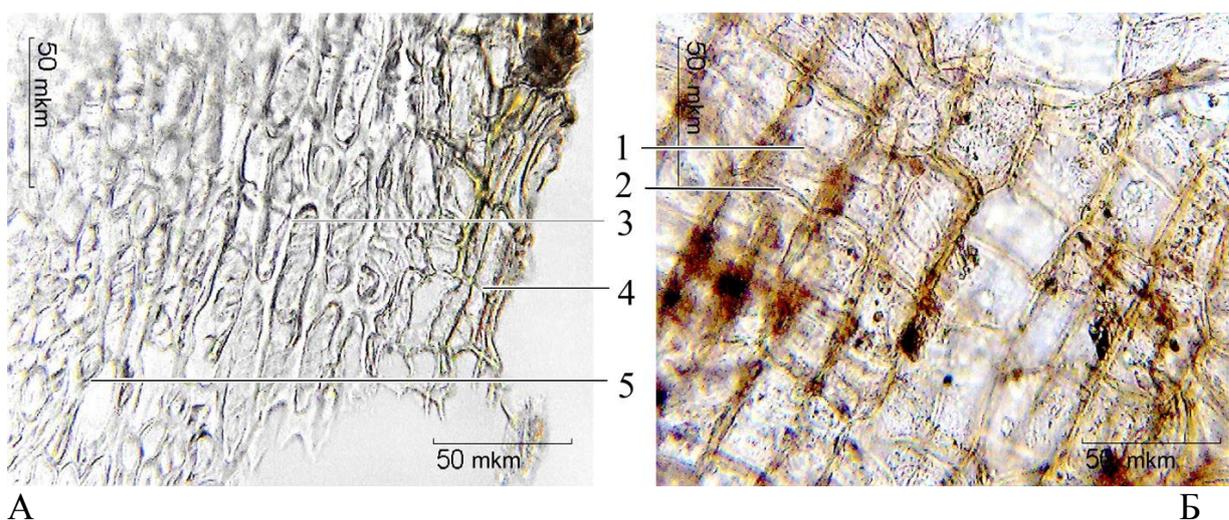


Рисунок 2 – Поперечный срез корня вторичного строения крапивы двудомной. Пробка (x400).

А – поперечный срез, обработанный р-м сернокислого анилина; Б – вид с поверхности, обработанный р-м судана III

Обозначения: 1 - полость клетки, 2 - стенка клетки, 3 – паренхима корня, 4 - клетки пробки, 5 – глубокие слои коровой паренхимы.

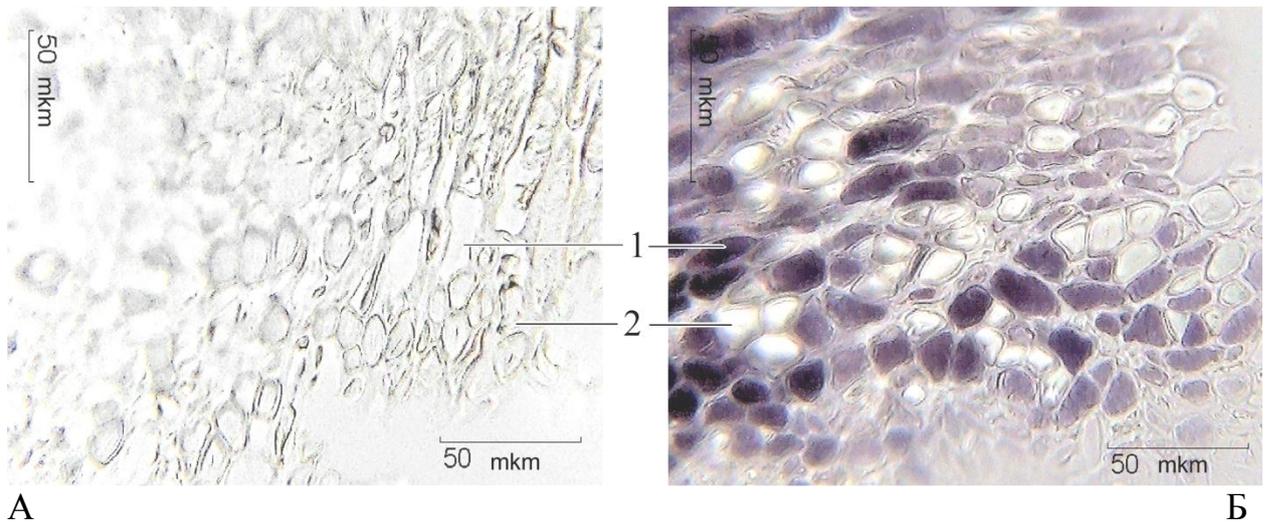


Рисунок 3 – Поперечный срез корня вторичного строения крапивы двудомной. Паренхима коры (x400).

А – обработан р-м сернокислого анилина; Б – обработан р-м Люголя
 Обозначения: 1- клетки паренхимы с крахмалом, 2 - лубяные волокна.

2. Анатомо-гистологические признаки корневища крапивы

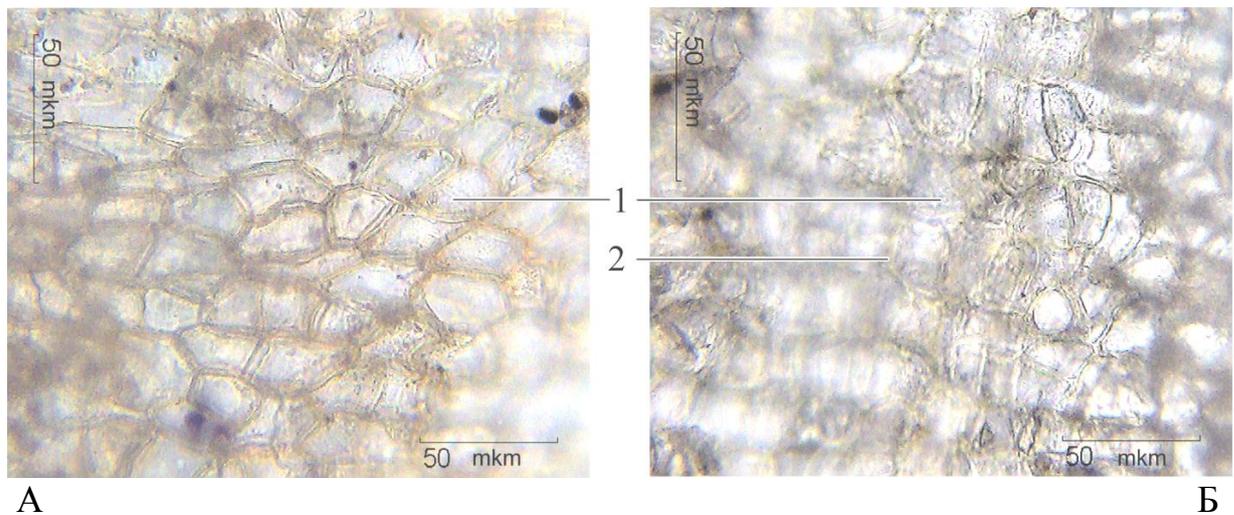
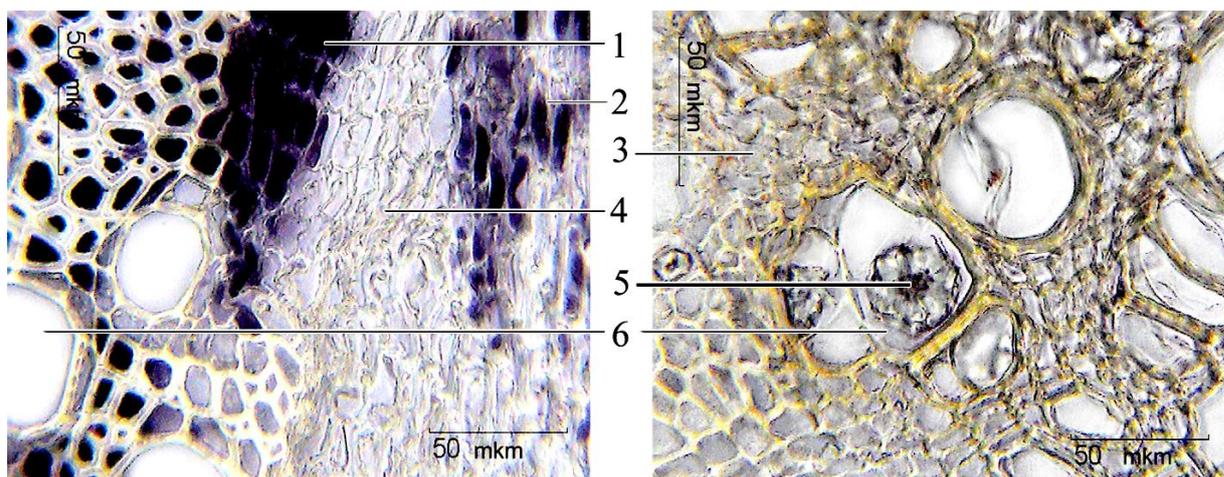


Рисунок 4 – Поверхность корневища крапивы двудомной (x400).

А - обработан р-м судана III; Б - до обработки.

Обозначения: 1 - полость клеток пробки; 2 - стенки клеток пробки.



А

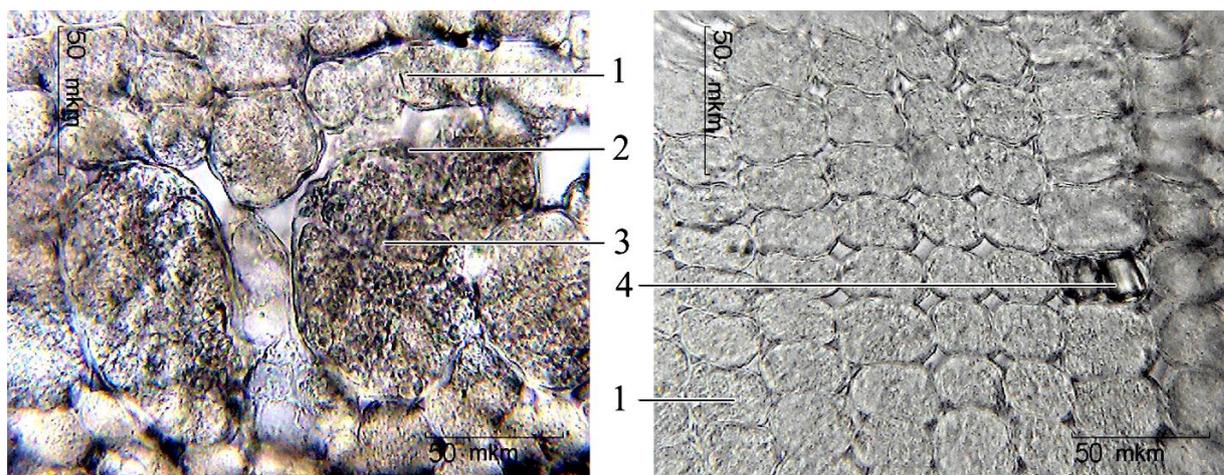
Б

Рисунок 5 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной. Камбиальная зона (x400).

А - обработан р-м Люголя; Б - обработан р-м сернокислого анилина.

Обозначения: 1 - клетки с крахмалом; 2 - клетки коровой паренхимы;

3 - ксилемная паренхима; 4 - камбиальная зона; 5 - друзы; 6 - сосуды ксилемы.



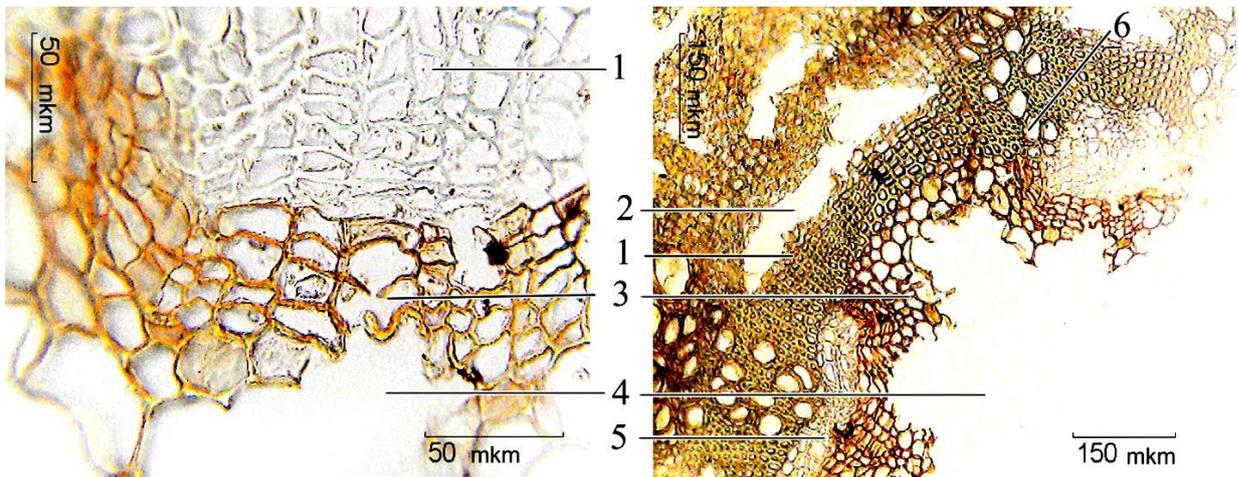
А

Б

Рисунок 6 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной. Паренхима сердцевидного луча (x400)

А - фрагмент с крупными клетками; Б - фрагмент с мелкими клетками.

Обозначения: 1,3 - клетки радиальных лучей; 2 - стенка клетки радиального луча; 4 - монокристаллы.



А

Б

Рисунок 7 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной. Клетки сердцевинки, окрашенные р-м Судана III.

А - фрагмент (x400); Б - общий вид (x100).

Обозначения: 1,5 - клетки сердцевидного луча; 2 - разрыв; 3 - окрашенные клетки сердцевинки; 4 - полость сердцевинки; 6 - сосуды ксилемы.

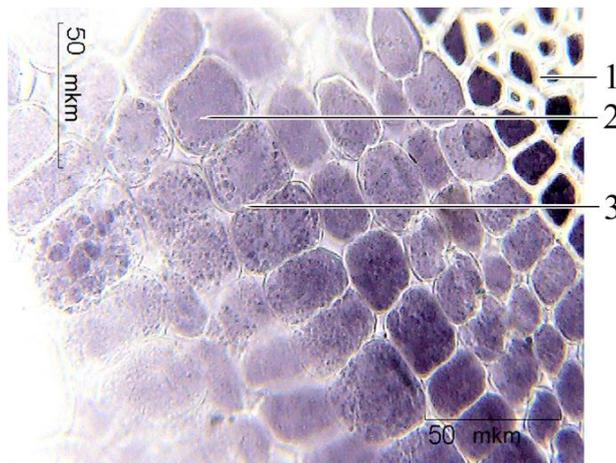


Рисунок 8 – Поперечный срез корневища крапивы двудомной.

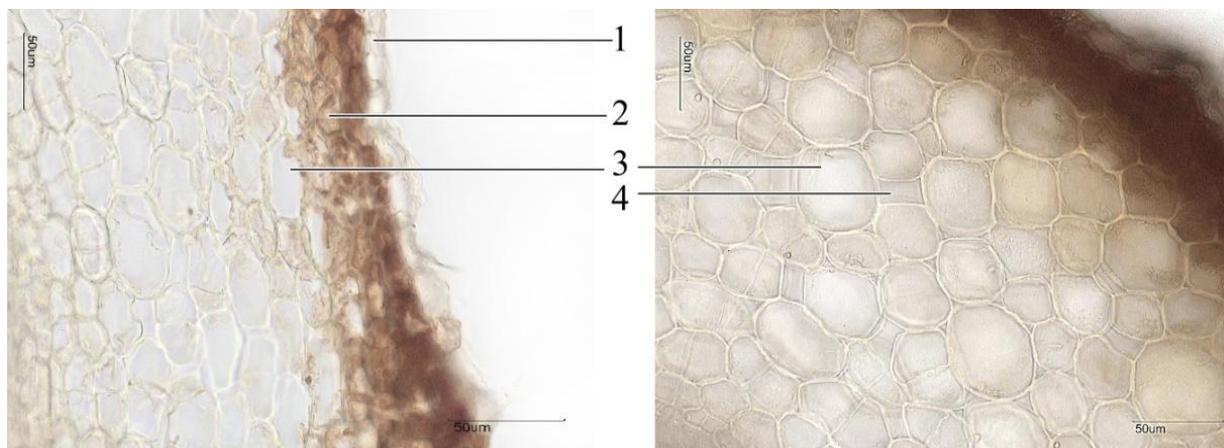
Крахмал в паренхиме радиального луча, окрашенный р-м Люголя (x400).

Обозначения: 1 - склеренхима; 2 - крахмал; 3 - стенки клеток.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Микрофотоснимки морфолого-анатомического анализа подземной части яснотки белой

1. Анатомо-гистологические признаки корня яснотки



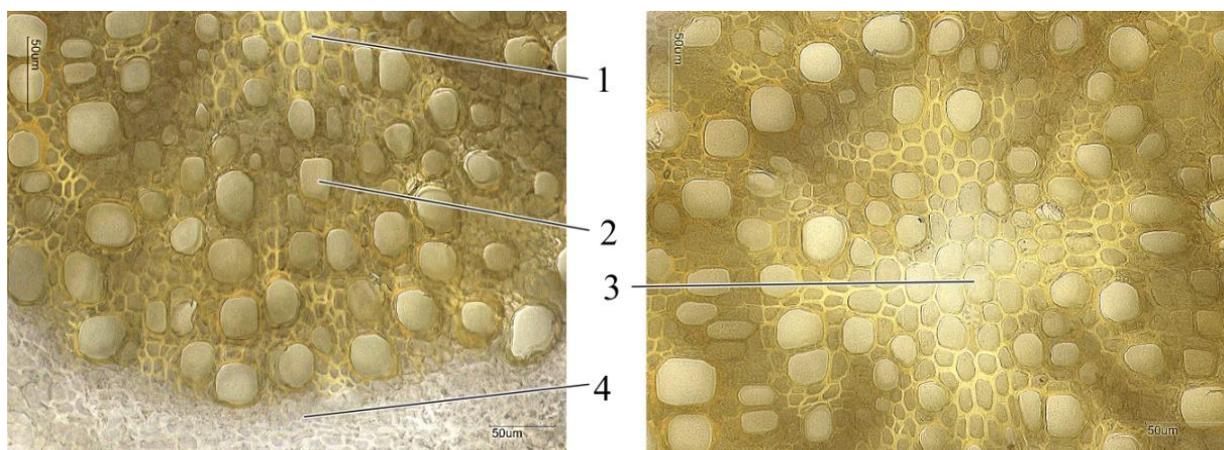
А

Б

Рисунок 1 - Коровая часть корня яснотки. Поперечный срез.

А – фрагмент (x100), Б - фрагмент (x400).

Обозначения: 1 – непигментированные клетки пробки, 2 – пигментированные клетки пробки, 3 – паренхима коровой части, 4 - межклетник.



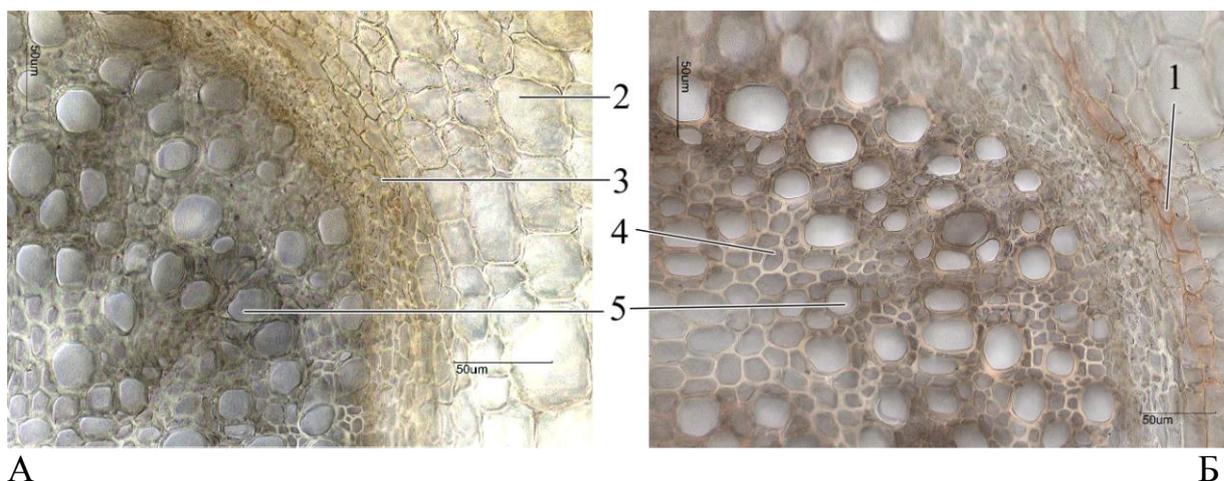
А

Б

Рисунок 2 – Ксилемная часть центрального цилиндра. Поперечный срез.

А – фрагмент с камбием (x400), Б – Центр корня (x400).

Обозначения: 1 – ксилемная склеренхима, 2 – сосуд вторичной ксилемы, 3 – первичная ксилема, 4 - камбий.



А

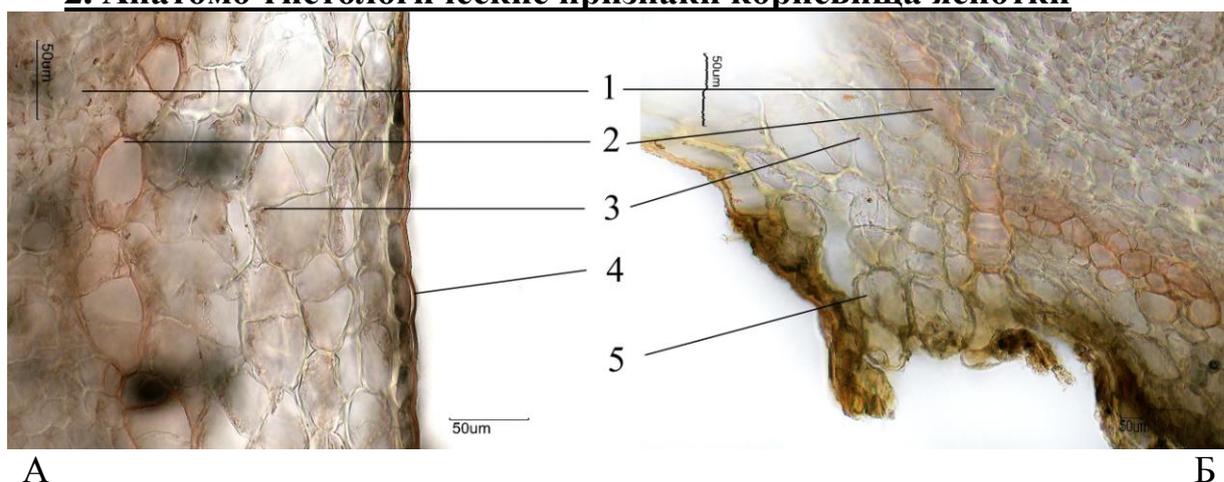
Б

Рисунок 3 – Гистохимические реакции с препаратами поперечного среза корня яснотки (x400).

А – Окраска раствором Люголя, Б – окраска раствором Судана III.

Обозначения: 1 – клетки флоэмы окрашенные суданом, 2 – флоэмная паренхима, 3 - камбий, 4 – ксилемная склеренхима, 5 – сосуды ксилемы.

2. Анатомо-гистологические признаки корневища яснотки



А

Б

Рисунок 4 – Коровая часть корневища яснотки. Поперечный срез.

Окраска раствором Судана III (x400).

А – фрагмент с эпидермой, Б – фрагмент с пробкой.

Обозначения: 1 - флоэма, 2 - эндодерма, 3 – паренхима первичной коры, 4 - эпидерма, 5 – клетки пробки.

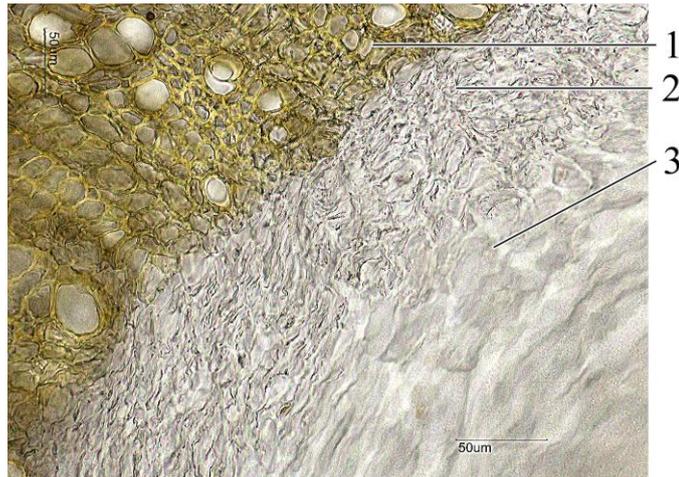
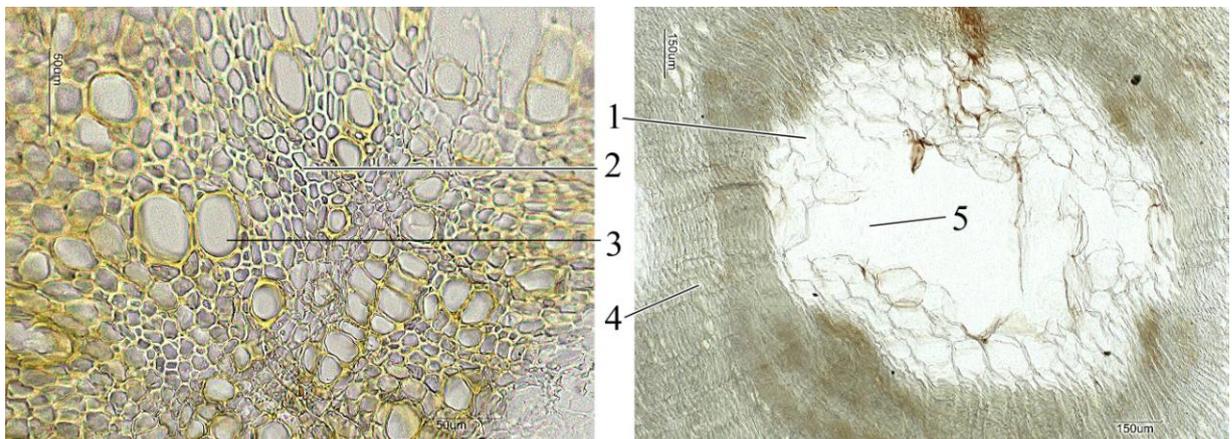


Рисунок 5 – Флоэма корневища яснотки. Поперечный срез. Окраска раствором сернокислого анилина (x400).

Обозначения: 1 - ксилема, 2 – камбиальная зона, 3 – флоэма.



А

Б

Рисунок 6 – Ксилемная часть центрального цилиндра.

А – фрагмент ксилемы. Окраска раствором сернокислого анилина (x400),
Б – фрагмент с сердцевинной полостью (x100).

Обозначения: 1 - паренхима сердцевинной полости, 2 – ксилемная паренхима, 3 –
сосуды ксилемы, 4 – ксилема, 5 – полость сердцевинной полости реликтного
происхождения.

Микрофотоснимки морфолого-анатомического анализа подземной части крапивы жгучей

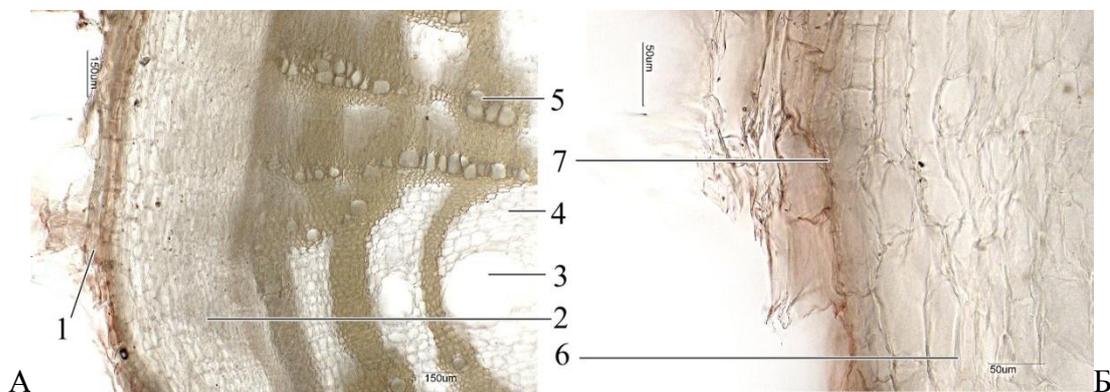


Рисунок 1 – Корень крапивы жгучей. Окраска раствором Судана III.
А – фрагмент корня (x 100), Б – пробка корня (x400).

Обозначения: 1 - пробка, 2 – паренхима коровой части, 3 – склеренхимные кольца, 4 – паренхима ксилемы, 5 – сосуды ксилемы, 6 – паренхима коровой части, 7 - пробка.

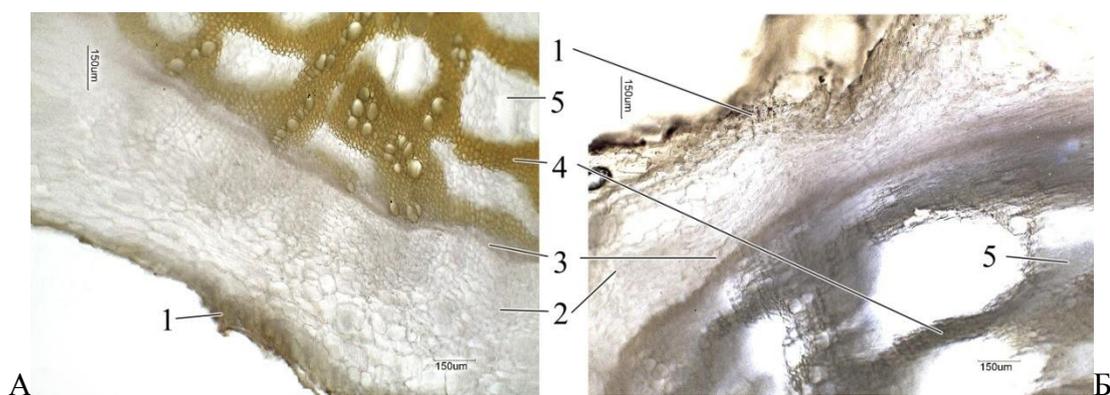


Рисунок 2 – Коровая часть корня крапивы жгучей.

А – окраска раствором сернокислого анилина, Б – окраска раствором Люголя.

Обозначения: 1 - пробка, 2 – паренхима коры, 3 – камбиальная зона, 4 – склерифицированное кольцо, 5 – паренхима сердцевинного луча.

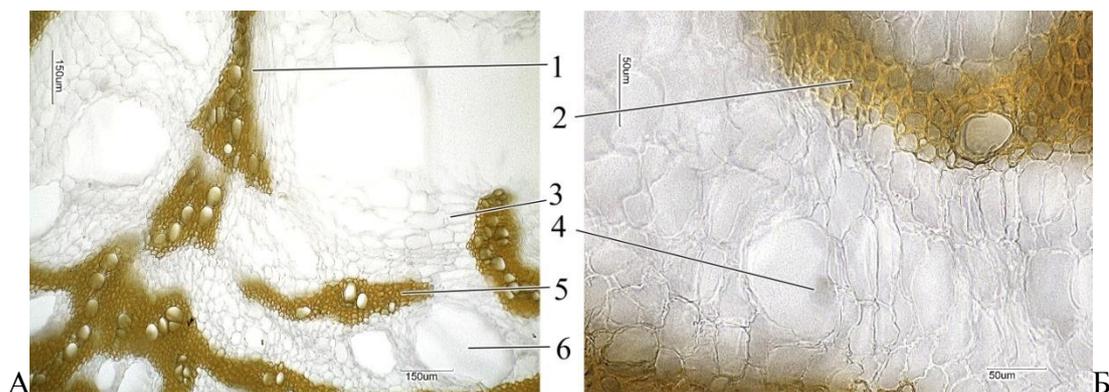


Рисунок 4 – Ксилемная часть центрального цилиндра корня крапивы жгучей. Окраска раствором сернокислого анилина.

А – фрагмент ксилемных тканей (x100), Б – фрагмент сердцевинного луча (x400).

Обозначения: 1 – ксилема, 2 – склеренхима ксилемы, 3 – паренхима луча, 4 – реокисигенная полость, 5 - склеренхима.

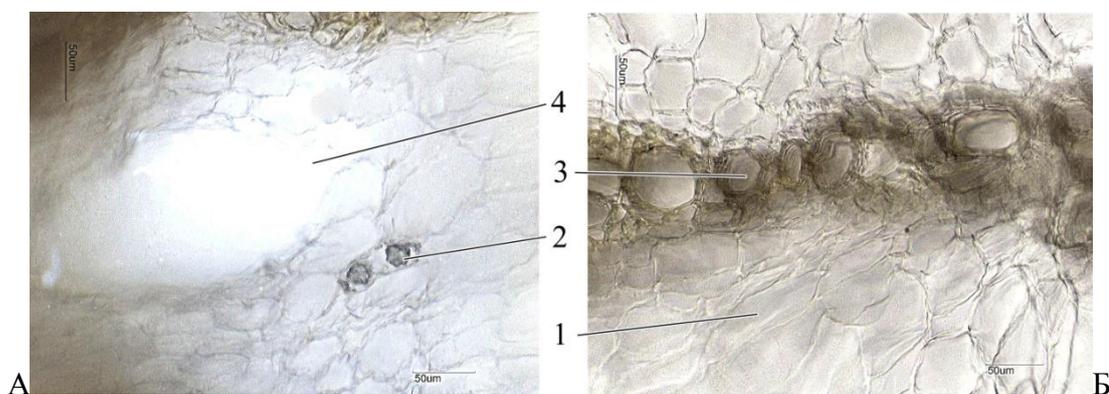


Рисунок 5 - Ксилемная часть центрального цилиндра корня крапивы жгучей (x400).

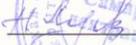
А – Реокисигенная полость паренхимы сердцевинного луча, Б - .

Обозначения: 1 – клетки основной паренхимы, 2 – друзы оксалата кальция, 3 – первичная ксилема, 4 - реокисигенная полость.

«Утверждаю»

Генеральный директор

ЗАО «Самаралектравы»

 Н.Д. ЛУЖКОВ

«10» февраля 2017 г.

АКТ

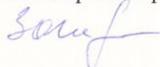
о внедрении результатов диссертационной работы Балагозяна Эдгара Артуровича «Фармакогностическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загрянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Балагозяна Э.А., посвященного фитохимическому изучению корневищ с корнями крапивы двудомной, определению диагностических признаков сырья и обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья.

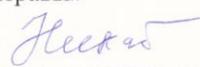
Разработанные методики качественного и количественного анализа корневищ с корнями крапивы двудомной, а также жидкого и густого экстрактов из данного лекарственного растительного сырья апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов из крапивы двудомной.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»

 А.Н. ЗАГРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»

 А.В. НИКИТЕНКОВ

446554, Самарская обл., Сергиевский район, с. Антоновка, ул. Полевая, д. 19А

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ



«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

Е.А. КАЛАБУХОВА

2017 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Балагозяна Эдгара Артуровича «Фармакогностическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» заместителя начальника центра Осиповой О.В., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Жнякиной Л.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Балагозяна Э.А., посвященного фармакогностическому изучению корневищ с корнями крапивы двудомной при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы предприятия. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и УФ-спектроскопии в присутствии СО эргостерина и β -ситостерина. Методики определения подлинности сырья и препаратов крапивы двудомной, а также методики определения содержания суммы стероидов воспроизводима и удобна в работе. Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Балагозяна Э.А. будут способствовать повышению объективности стандартизации крапивы двудомной, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

Заместитель начальника ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Г.И. ВЛАСОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Л.Е. ЖНЯКИНА

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ПУЖИН

«10»

2017 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Балагозяна Эдгара Артуровича «Фармакогностическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д.фарм.н., профессора В.А. Куркина, профессора, д.фарм.н. Е.В. Авдеевой, доцента, д.фарм.н. О.Е. Правдивцевой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Балагозяна Э.А., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных препаратов на основе крапивы двудомной, содержащих стероидные вещества, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют разработке методик диагностики и определению качества сырья крапивы двудомной и препаратов на его основе.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н., профессор

В.А. КУРКИН

Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н.

Е.В. АВДЕЕВА

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н.

О.Е. ПРАВДИЦЕВА

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ШУКИН

«10» февраля 2017 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Балагозяна Эдгара Артуровича «Фармакогностическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета: зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, д.б.н., профессора И.Ф. Шаталаева, доцента, к.фарм.н. А.В. Воронина, доцента, к.х.н. С.Х. Шариповой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Балагозяна Э.А., посвященного изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов крапивы двудомной, содержащих стероидные вещества, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего стероидные соединения. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе крапивы двудомной.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета,
д. б. н., профессор

И.Ф. ШАТАЛАЕВ

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. фарм .н.

А.В. ВОРОНИН

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. х. н.

С.Х. ШАРИПОВА

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ШУКИН

«10» декабря 2017 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Балагозяна Эдгара Артуровича «Фармакогностическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии: зав. кафедрой фармацевтической технологии, д.фарм.н., профессора С.В. Первушкина, доцента, к.фарм.н. Л.Д. Климовой, старшего преподавателя, к.фарм.н. О.В. Бер подтверждает использование материалов диссертационного исследования Балагозяна Э.А., посвященного изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и препаратов на основе крапивы двудомной, содержащих стероидные вещества, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по созданию и производству лекарственных препаратов на основе стероидных соединений. Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья и лекарственных препаратов являются методической и методологической основой.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии,
д. фарм. н., профессор

С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.

Л.Д. КЛИМОВА

Старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.

О.В. БЕР

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2599014

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СТЕРИНОВ В КОРНЕВИЩАХ С КОРНЯМИ КРАПИВЫ
ДВУДОМНОЙ

Патентообладатель(ли): *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015136340

Приоритет изобретения 26 августа 2015 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 08 сентября 2016 г.

Срок действия патента истекает 26 августа 2035 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»,
доктор фармацевтических наук,
профессор

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Крапивы двудомной
корневища с корнями

ФС 42 –
Вводится впервые

Urticae dioicae rhizomata cum radicibus

Срок введения установлен
с «__» _____ 20__ г.
до «__» _____ 20__ г.

Собранные осенью или ранней весной, освобожденные от остатков листьев и стеблей, отмытые от земли и высушенные корневища с корнями многолетнего дикорастущего травянистого растения крапивы двудомной - *Urtica dioica* L., сем. Крапивные — *Urticaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. Корни с поверхности окрашены в желто-коричневый цвет, отличаются по диаметру по всей длине (до 9 мм) и часто тангентально сдавлены и имеют клубнеподобные утолщения. Излом корней ровный, цвет излома светло-желтый, почти белый. Корневище темно-бурое с поверхности, имеют четко выраженные, расширенные узлы с отходящими придаточными корнями и междоузлия более узкие и ребристые, чаще четырехгранные. На изломе волокнистое, в центре отчетливо заметна темноокрашенная, в сравнении с ксилемной частью, сердцевина или полость. Запах слабый, вкус водного извлечения горьковатый.

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ различной формы и цилиндрические кусочки корней с гладкой или слегка продольно-морщинистой поверхностью, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Цвет кусочков желтовато-, беловато-, серовато-коричневый, коричневый или темно-коричневый. Запах слабый, вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки корневищ с корнями различной формы с гладкой или слегка продольно-морщинистой поверхностью, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Цвет кусочков желтовато-, беловато-, серовато-коричневый, коричневый или темно-коричневый. Запах слабый, вкус водного извлечения горьковатый.

Микроскопические признаки. Цельное сырье. При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корня виден слой пробки толщиной от 3 до 5 слоев клеток. Стенки клеток пробки окрашены в светло-коричневый

цвет. Под пробкой располагается слабо выраженный слой паренхимы перициклической зоны коры пластинчатого типа. Клетки её вытянутые, тангентально-сплюснутой формы, живые, имеют протопласт. Клетки паренхимы вторичной коры 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. Лубяные волокна угловатой формы, редко окрашенные, не образуют скоплений, не одревесневшие. Центральный цилиндр представлен двумя сердцевидными лучами и образуют два открытых коллатеральных пучка, расположенных друг против друга. Четко прослеживается кольцо камбия. В центре корня заметны лучи первичной ксилемы.

Паренхима радиальных лучей содержит большое количество крахмала.

При рассмотрении микропрепаратов поперечного среза корневища видно, что оно имеет пучковое строение: открытые и коллатеральные. 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. Ксилема значительно мощнее флоэмы. Пучки соединены характерными кольцами склеренхимы. Клетки склеренхимы многоугольные, внутри имеют полость, их стенки подвергаются одревеснению. В межпучковой паренхиме центрального цилиндра встречаются группы клеток, содержащие большое количество запасного крахмала. 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 значительно больше.

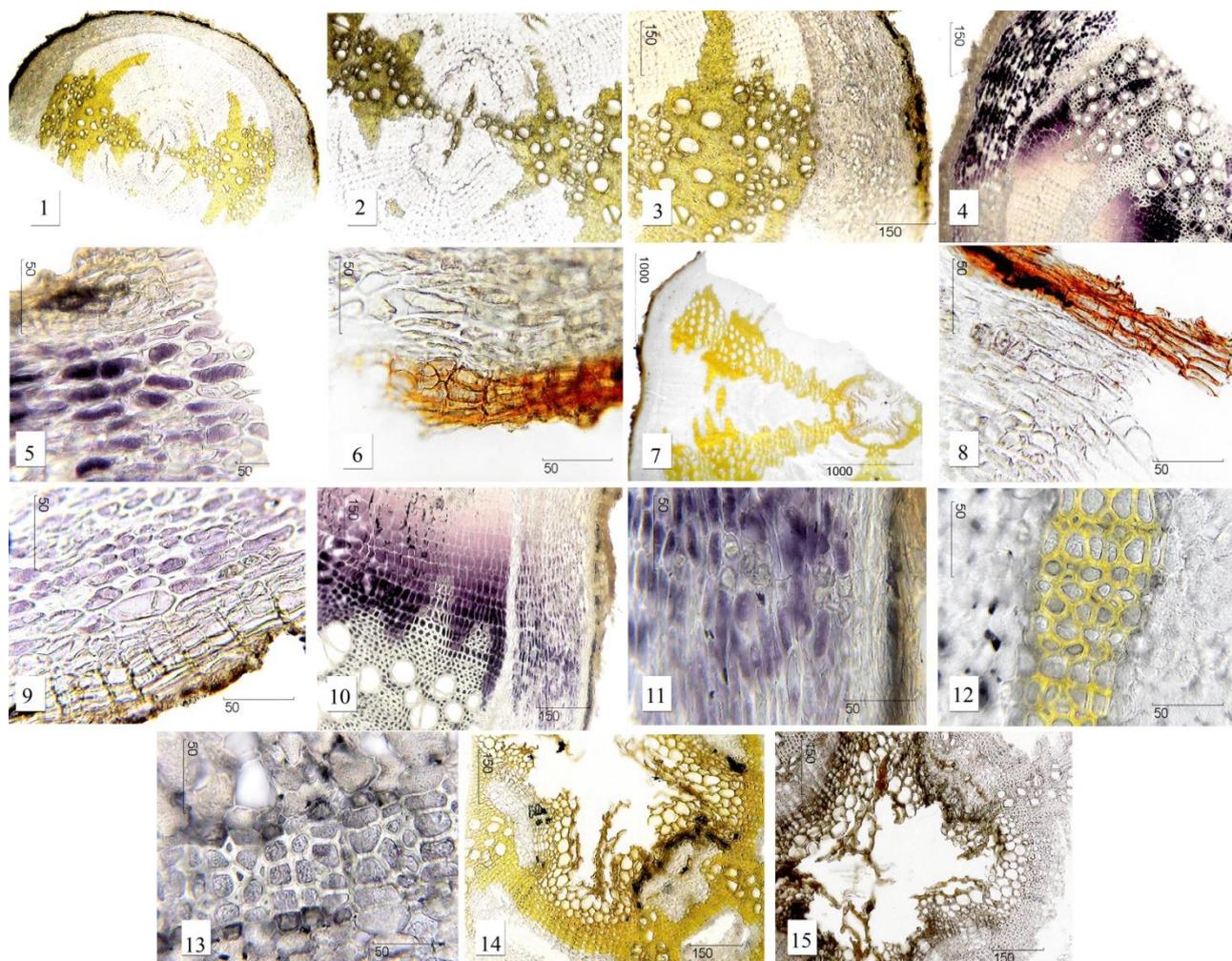


Рисунок 1 – Крапивы двудомной корневище с корнями.

1 - поперечный срез корня вторичного строения (40×); 2 – фрагмент центрального цилиндра корня вторичного строения (100×); 3 - поперечный срез корня вторичного строения, обработанный р-м сернокислого анилина (100×); 4 – поперечный срез корня вторичного строения, обработанный р-м Люголя (100×); 5 – фрагмент пробки корня вторичного строения, обработанный Люголя (400×); 6 – фрагмент пробки корня вторичного строения, обработанный р-м Судана III (400×); 7 – поперечный срез корневища (40×); 8 – фрагмент пробки корневища, обработанный Судана III (400×); 9 – фрагмент пробки корневища, обработанный р-м Люголя (400×); 10 – поперечный срез корневища, обработанный р-м Люголя (100×); 11 – фрагмент коры корневища, обработанный р-м Люголя (400×); 12 – фрагмент склеренхимного кольца, обработанный р-м сернокислого анилина (400×); 13 – фрагмент склеренхимного кольца, обработанный р-м Люголя (400×); 14 – сердцевина корневища, обработанный р-м сернокислого анилина (400×); 15 - сердцевина корневища (400×).

Измельченное сырье, порошок. При рассмотрении микропрепаратов должны быть видны группы паренхимных клеток, содержащих неструктурированный крахмал; фрагменты пробки, окрашенные в темно-коричневый цвет (3-5 слоев клеток); фрагменты центрального цилиндра с частью склеренхимного кольца

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Ультрафиолетовый спектр раствора А (см. раздел «Количественное определение») в области от 100 нм до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны $328 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$.

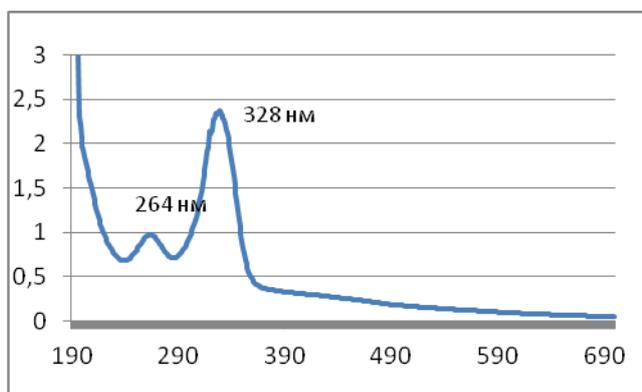


Рисунок 2 – УФ- спектр извлечение на 70% спирте этиловом из корневищ с корнями крапивы двудомной в среде серной кислоты.

Приготовление растворов

Фосфорномолибденовая кислота. 1,0 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в 10 мл 95 % спирта. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартного образца (СО) эргостерина. Около 0,02 г (точная навеска) эргостерина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15-20 мл 95% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 95% этиловым спиртом до метки.

Стандартного образца (СО) β -ситостерина. Около 0,02 г (точная навеска) β -ситостерина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15-20 мл 95% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 95% этиловым спиртом до метки.

2. Пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (ТУ 26-11-17-89) размером 10 x 10 см или размером 10 x 15 и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100 - 105 °С в течение 1 ч. На линию старта пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» микропипеткой наносят 0,02 мл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение») в виде точки. Рядом микропипеткой наносят 0,01 мл раствора РСО эргостерина в виде точки и 0,01 мл раствора β-ситостерина в виде точки. Хроматографическую пластинку помещают в камеру, которую предварительно насыщают в течение 1 часа смесью растворителей: хлороформ – этанол - вода (26:16:1), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 8 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин. Затем хроматограмму проявляют 10% раствором фосфорно-молибденовой кислоты и нагревают при 100-105 °С. При этом происходит окрашивание пятен эргостерина ($R_f=0,6$) и β-ситостерина ($R_f=0,9$) и пятен испытуемого раствора на аналогичном уровне. Допускается наличие других пятен

Раздел «Тяжелые металлы». В соответствии с ГФ РФ XIII издания.

Числовые показатели. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок. влажность не более 15,0%; золы общей не более 14%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 10,0%; органической примеси не более 2%; минеральной примеси не более 2%.

Измельченное сырье. Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 5%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,1 мм не более 10%.

Порошок. Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,18 мм не более 10%.

Количественное определение. Около 1 г сырья (точная навеска) воздушно-сухого сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, добавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем закрывают той же пробкой, охлаждают до комнатной температуры. После чего колбу снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр (испытуемое извлечение). 1 мл полученного извлечения помещают в градуированную пробирку на 10 мл, добавляют осторожно по каплям 4 мл серной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при температуре 70°C в течение 1 часа (термостаторование). Затем содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят концентрированной серной кислотой до метки (испытуемый раствор А).

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм.

Приготовление раствора эргостерина: Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца эргостерина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл концентрированной серной кислоты, нагревают в водяной бане при температуре 70°C в течение 1 часа, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают. 1 мл полученного

раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают.

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 328 нм.

При использовании рабочего стандартного образца эргостерина расчет результатов количественного определения содержания (X) суммы стерина в сырье в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье проводят по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 1 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot m_0 \cdot 4 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность раствора стандартного образца;

m – точная навеска сырья, г;

m₀ – точная навеска эргостерина, г;

W – влажность сырья, %.

При отсутствии рабочего стандартного образца эргостерина расчет содержания суммы стерина осуществляется с использованием экспериментально установленного нами значения удельного показателя поглощения (1250):

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{1250 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – точная навеска анализируемого образца, г;

W – влажность сырья, %.

1250 - удельный показатель поглощения эргостерина.

Микробиологическая чистота. В соответствии с ГФ XII издания, часть 1,

ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота», категория 4А.

Содержание радионуклидов. В соответствии с требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – М.: Минздрав России, 2002. - С. 74, методиками ОФС 42-0011-03 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье. Стронций-90 и цезий-137. Отбор проб, анализ и оценка результатов» и ГФ РФ XIII издания.

Упаковка. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Срок годности. 3 года.

Ректор ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
Академик РАН, лауреат Государственной
премии РФ и дважды лауреат премии
Правительства РФ, заслуженный
деятель науки РФ,
профессор

Г.П. Котельников

«__» _____ 2017

Заведующий кафедрой фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ

Минздрава России, доктор
фармацевтических наук, профессор

В.А. Куркин

«__» _____ 2017

г.

Доцент кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ

Минздрава России, доктор

фармацевтических наук, доцент

О.Е. Правдивцева

«__» _____ 2017

г.

Очный аспирант кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

Э.А. Балагозян

«__» _____ 2017

г.