№ 10 (129) 2012
Выпуск 18/2
НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

НАУЧНЫЕ ВЕДОМОСТИ
Белгородского государственного университета
Медицина Фармация

Основан в 1995 г.

Журнал входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

Belgorod State University Scientific bulletin
Medicine Pharmacy

Учредитель:
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»)

Издатель:
НИУ «БелГУ».
Издательско-полиграфический комплекс НИУ «БелГУ»

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охраны культурного наследия

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС 77-21121 от 19 мая 2005 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА

Главный редактор

О.Н. Полухин,
и.о. ректора НИУ «БелГУ», доктор политических наук, профессор

Зам. главного редактора

И.С. Константинов,
и.о. проректора по научной работе НИУ «БелГУ», доктор технических наук, профессор

Ответственные секретари:

В.М. Московкин,
профессор кафедры мировой экономики НИУ «БелГУ», доктор географических наук

О.В. Шевченко
зам. начальника УНИД НИУ «БелГУ», кандидат исторических наук

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ СЕРИИ ЖУРНАЛА

Главный редактор серии
О.А. Ефремова
доктор медицинских наук, профессор (НИУ «БелГУ»)

Заместитель главного редактора
А.А. Должиков
доктор медицинских наук, профессор (НИУ «БелГУ»)

Ответственный секретарь
О.П. Лебедева
кандидат медицинских наук, доцент (НИУ «БелГУ»)

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОР

Классические и современные методы масс-спектрометрии. ***Д.И. Писарев 5***
Транс-резвератрол – перспективное биологически активное соединение. ***Д.И. Писарев, О.О. Новиков, Г.В. Васильев 12***
Биологическая активность полифенолов растительного происхождения. Перспектива использования антоцианов в медицинской практике. ***Д.И. Писарев, О.О. Новиков, О.А. Селютин, Н.А. Писарева 17***
Методы выделения и анализа эфирных масел. ***Д.И. Писарев, О.О. Новиков 25***

ПРАКТИЧЕСКАЯ ФАРМАЦИЯ

Аптечное изготовление лекарственных форм для лечебно-профилактических учреждений: изучение современной номенклатуры. ***Р.Р. Сабиржан, С.Н. Егорова 31***
Информационно-компьютерное обеспечение: изучение потребительских предпочтений провизоров-технологов. ***Л.Н. Минапов, С.Н. Егорова 36***

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ

Исследование полисахаридного комплекса, выделенного из травы вероники австрийской (*Veronica Austriaca l.*). ***В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Кондратова 43***
Определение качественного и количественного состава флавоноидных соединений медуницы неясной. ***В.С. Казакова, О.О. Новиков, Д.И. Писарев, Н.Н. Шестопалова, Д.А. Фадеева 46***
Стандартизация листьев первоцвета весеннего по показателю «содержание аскорбиновой кислоты» ***Г.М. Латыпова, В.Н. Бубенчикова, З.Р. Романова, Д.Ф. Галимова 51***
Изучение аминокислотного состава пузыреплодника калинолистного (*Physocarpus opulifolius (l.) maxim*). ***И.А. Сафонова, В.Я. Яцюк, А.В. Кузьминова 57***
Метод экстракции и очистки антоцианов из плодов аронии черноплодной. ***Л.А. Дейнека, И.П. Блинова, А.Н. Чулков, И.И. Саенко, В.И. Дейнека, В.Н. Сорокопудов 60***
Исследования по содержанию горьких кислот сырья хмеля обыкновенного. ***Г.М. Латыпова, Г.В. Аюпова, В.Н. Бубенчикова, Д.Ф. Галимова, Е.Д. Батырова, С.Ф. Шафикова 65***
Определение требований, предъявляемых к ряду стерильных лекарственных форм. ***И.В. Сакаева, К.А. Биченова, Р.А. Лавренчук, Е.И. Саканян 70***
Опыт использования метода MALDI/TOF/MS в фармацевтическом анализе. ***Д.И. Писарев, О.О. Новиков, Г.В. Васильев, О.А. Селютин 76***
Результаты сравнительных исследований варианта внутреннего стандарта MALDI/TOF/MS с другими методами количественного анализа резвератрола. ***Д.И. Писарев, О.О. Новиков, Г.В. Васильев 86***
Элементный состав листьев некоторых представителей рода berberis l. в условиях Белгородской области. ***В.Ю. Жиленко, В.Н. Сорокопудов, Д.А. Колесников, О.А. Сорокопудова, Н.И. Мячикова 94***
Изучение стабильности при хранении комбинированных суппозиториев для лечения простатитов ***Т.Г. Ярных, Е.В. Толочко,В.Н. Чушенко 98***
Плоды видов рода *Amelanchier medik.* как источник антоцианов в условиях Белогорья ***А.В. Степанова, В.Н. Сорокопудов, О.А. Сорокопудова, Н.И. Мячикова, Д.В. Степанова 103***
Разработка и валидация методики количественного определения азитромицина. ***А.Х. Валиев, В.А. Георгиянц, А.А. Здорик 107***
Исследование микроэлементного состава фракций крови у больных острым панкреатитом алкогольной этиологии. ***А.А. Хабаров, К.А. Лушов, Е.О. Федоров, А.Л. Локтионов 111***

Члены редколлегии
А.П. Григоренко
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
Н.И. Жернакова
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
Е.Т. Жилякова
доктор фармацевтических наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
В.Ф. Куликовский
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
В.Д. Луценко
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
О.О. Новиков
доктор фармацевтических наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
В.С. Орлова
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
Т.В. Павлова
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
И.П. Парфенов
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
С.П. Пахомов
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
К.И.Прощаев
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
Ф.А. Пятакович
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
Т.А. Романова
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
И.В. Спичак
доктор фармацевтических наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
Б.В. Трифонов
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
Ж.Ю. Чефранова
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
М.И. Чурносов
доктор медицинских наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)
А.А. Шапошников
доктор биологических наук, профессор
(НИУ «БелГУ»)

Оригинал-макет *О.А. Ефремова, Н.А. Гапоненко*
E-mail: efremova.bgu@gmail.com,
doctor_ol@bk.ru

Подписано в печать 28.06.2012
Формат 60×84/8
Гарнитура Georgia, Impact
Усл. п. л. 20,46
Тираж 1000 экз.
Заказ 197

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» – 18078

Оригинал-макет подготовлен и тиражирован
в Издательско-полиграфическом комплексе
НИУ «БелГУ»
Адрес: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

Разработка и исследование фитопрепарата на основе чабреца, каштана, солодки, крапивы, зверобоя. ***Т.А. Володина, Н.А. Пеньевская, Э.Ф. Степанова 114***
Разработка технологии смородины чёрной листьев экстракта сухого. ***Т.М. Медведева, И.Е. Каухова 118***
Разработка состава и технологии инновационного комбинированного лекарственного препарата для лечения инфекционных конъюнктивитов бактериальной этиологии. ***Е.Т. Жилякова, О.О.Новиков, М.Ю. Новикова, Н.Н. Попов 123***
Технология и анализ суппозиториев, содержащих растительные масляные экстракты рябины обыкновенной, зверобоя продырявленного и сушеницы топяной. ***А.А. Чахирова, Н.В. Благоразумная, В.А. Чахирова, Е.Ю. Благоразумная, Ю.А. Морозов 127***
Получение лабораторного образца субмикро- и/или наноструктурированной глины и экспериментальное подтверждение изменения его структуры. ***Е.Т. Жилякова, А.В. Бондарев 133***

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Тригерный механизм противоишемического действия эритропоэтина и резвератрола. ***Л.М. Даниленко, М.В. Покровский, О.О. Новиков, Л.В. Корокина, Д.В. Гончарова, А.В. Индерова, Е.Н. Светличная 138***
Оценка биологической и антагонистической активности препаратов на основе иммобилизованных бактерий. ***А.В. Корочинский, Э.Ф. Степанова, Ю.И. Остроумов 143***
Коррекция экспериментального гестоза тадалафилом. ***М.В. Покровский, В.В. Гуреев, А.А. Должиков, О.С. Полянская, А.С. Мостовой, С.А. Алехин 146***
Исследование фармакологической активности субмикроструктурированной субстанции таурина. ***В.И. Кочкаров, О.О. Новиков, Е.Т. Жилякова, М.Ю. Новикова, О.С. Воронкова 152***
Значение интраоперационного электрофизиологического мониторинга при выборе тактики нейрохирургического лечения симптоматической эпилепсии. ***А.Г. Могилев 159***

Сведения об авторах ***167***

Информация для авторов ***170***

© Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 2012

№ 10(129) 2012
Issue 18/2

SCIENTIFIC REVIEWING JOURNAL

Founded in 1995

The Journal is included into the list of the leading peer-reviewed journals and publications coming out in the Russian Federation that are recommended for publishing key results of the theses for Doktor and Kandidat degree-seekers

Belgorod State University Scientific bulletin
Medicine Pharmacy

НАУЧНЫЕ ВЕДОМОСТИ
Белгородского государственного университета

Медицина Фармация

Founder:
Federal state autonomous educational establishment of higher professional education
«Belgorod National Research University»

Publisher:
Belgorod National Research University.
Belgorod National Research UniversityPress

The journal is registered in Federal service of control over law compliance in the sphere of mass media and protection of cultural heritage

Certificate of registration of mass media
ПИ № ФС 77-21121 May 19, 2005.

EDITORIAL BOARD OF JOURNAL
Editor-in-chief
O.N. Poluchin,
Acting Rector of Belgorod National Research University, doctor of political sciences, Professor

Deputy editor-in-chief
I.S. Konstantinov,
Acting Vice-rector of Belgorod National Research University, doctor of thecnical sciences, Professor

Assistant Editors
V.M. Moskovkin,
Professor of world economy department Belgorod National Research University,
Doctor of geographical sciences

O.V. Shevchenko,
Deputy head of department of scientific and innovative activity of
Belgorod National Research University,
Candidate of Historical Sciences

EDITORIAL BOARD OF JOURNAL SERIES

Editor-in-chief of the series
O.A. Efremova
Doctor of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

Deputy of chief editor
A.A. Dolzhikov
Doctor of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

Responsible secretary
O.P. Lebedeva
Candidate of medicine sciences
(Belgorod National Research University)

Members of editorial board
A.P. Grigorenko
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)
N.I. Zhernakova
Doctor of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

E.T. Zhilaykova
Doctor of pharmacy sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

CONTENTS

REVIEW

Classical and modern methods of mass-spectrometry. ***D.I. Pisarev 5***
Trans-resveratrol - a perspective biological active substance. ***D.I. Pisarev, O.O. Novikov, G.V. Vasiliev 12***
Biological activity of polyphenols of plant origin. Prospect of medical practice of anthocyanins. ***D.I. Pisarev, O.O. Novikov, O.A. Seljutin, N.A. Pisareva 17***
Methods of isolation and analysis of essential oils. ***D.I. Pisarev, O.O. Novikov 25***

PRACTICAL PHARMACY

Pharmacy production of drug forms for medical and preventive treatment facilities: studying of the current nomenclature. ***R.R. Sabirjan, S.N. Egorova 31***
Information and computer software: the study of consumer preferences of chemist-technologists. ***L.N. Minapov, S.N. Egorova 36***

PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, PHARMACOGNOSY

The investigation of polysaccharide complex was isolated from above-ground part of *Veronica austriaca L.* ***V.N. Bubenchicova, Yu. A. Kondratova 43***
Qualitative and quantitative determination of *Pulmonaria obscura*'s flavonoid compounds ***V.S. Kazakova, O.O. Novikov, D.I. Pisarev, N.N. Shestopalova, D.A. Fadeeva 46***
Standartization of primula officinalis leaves according to the indicator «Ascorbic acid content». ***G.M. Latypova, V.N. Bubenchikova, Z.R. Romanova, D.F. Galimova 51***
Studying of aminoacids structure of *Physocarpus opulifolius (l.) maxim.* ***I.A. Safonova, V.Y. Yatzuk, A.V. Kuzminova 57***
Method of extraction and purification of chokeberry fruit anthocyanins. ***L.A. Deineka, I.P. Blinova, A.N. Chulkov, I.I. Saenko, V.I. Deineka, V.N. Sorokopudov 60***
Study for identification of bitter acids in *Humulus lupulus.* ***G.M. Latypova, G.V. Ayupova, V.N. Bubenchikova, D.F. Galimova, E.D. Batyrova, S.F. Shafikova 65***
Establishing of quality requirements to some sterile dosage forms. ***I.V. Sakaeva, K.A. Bichenova, R.A. Lavrenchuk, E.I. Sakanjan 70***
Experiences of MALDI / TOF / MS in pharmaceutical analysis. ***D.I.Pisarev, O.O. Novikov, G.V. Vasiliev, O.A. Seljutin 76***
Results of comparative studies OF MALDI / TOF / MS using internal standard with other techniques of quantitative analysis of Resveratrol. ***D.I. Pisarev, O.O. Novikov, G.V. Vasiliev 86***
Element structure of leaves of some representatives of sort Berberis L. in the conditions of the Belgorod region. ***V. Yu. Zhilenko, V.N. Sorokopudov, D.A. Kolesnikov, O.A. Sorokopudova, N.I. Myachikova 94***
Research of stability of combined suppositories for prostatitis treatment during storage. ***T.G. Yarnych, K.V. Tolochko, V.M. Chushenko 98***
Fruits of *Amelanchier medi*k. as a source of anthocyanins in Belgorod region. ***A.V. Stepanova, V.N. Sorokopudov, O.A. Sorokopudova, N.I. Mjachikova, D.V. Stepanova 103***
Development and validation of the method for quantitative determination of azithromycin. ***A.H. Valiev, V.A. Georgiyants, A.A. Zdoryk 107***
The study of blood fractions trace-element composition of patients with acute pancreatitis of alcoholic etiology. ***A.A. Khabarov, K.A. Lushov, E.O. Fedorov, A.L. Laktionov 111***

PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY, BIOTECHNOLOGY

Development and research of the plant-based preparation on basis of mother-of-thyme, chestnut, glycyrrhiza, nettle, st-john's-wort. ***U.U. Volodina, N.A. Penyevskaya, E.F. Stepanova 114***

V.F. Kulikovsky
Doctor of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

V.D. Lutsenko
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

O.O. Novikov
Doctor of pharmacysciences, Professor
(Belgorod National Research University)

V.S. Orlova
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

T.V. Pavlova
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

I. P. Parfenov
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

S.P. Pachomov
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod State University)

K.I. Proshchaev
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

F.A. Pjatakovich
Doctor of of medicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

T.A. Romanova
Doctor ofmedicine sciences, Professor
(Belgorod National Research University)

I.V. Spichak
Doctor of pharmacy, Professor
(Belgorod National Research University)

B.V. Triphonov
Doctor of of Medical Science, Professor
(Belgorod National Research University)

Z.Y. Chephranova
Doctor of of Medical Science, Professor
(Belgorod National Research University)

M.I. Churnosov
Doctor of of Medical Science, Professor
(Belgorod National Research University)

A.A. Shaposhnikov
Doctor of of Medical Science, Professor
(Belgorod National Research University)

Dummy layout by *O.A. Efremova*,
N.A. Gaponenko
e-mail: efremova.bgu@gmail.com, doctor_ol@bk.ru

Passed for printing 28.06.2012
Format 60×84/8
Typeface Georgia, Impact
Printer's sheets 20,46
Circulation 1000 copies
Order 197

Subscription reference
in Rospechat' agency catalogue – 18078

Dummy layout is replicated at BNRU Publishing-polygraphic complex
Address: 85, Pobedy str., Belgorod, Russia, 308015

Development of technology of black currant leaves dry extract. ***T.M. Medvedeva, I.Ye. Kaukhova 118***
The development of composition and technology of innovational combined medicinal preparation for treatment of infectious conjunctivitis bacterial etiology ***E.T. Zhilyakova, O.O. Novikov, M.Yu. Novikova, N.N. Popov 123***
Technology and analysis of suppositories containing vegetable oil extracts of mountain ash, St. John's wort and marsh cudweed. ***A.A. Chahirova, N.V. Blagorazumnaia, V.A. Chahirova, E.Y. Blagorazumnaia, Y.A. Morozov 127***
Getting laboratory sample submicro- and/or nanostructured of clays and experimental confirmation of changes its structure. ***E.T. Zhilyakova, A.V. Bondarev 133***

PHARMACOLOGY, CLINICAL PHARMACOLOGY

Trigger mechanism of antiischemic action of erithropoietin and resveratrol. ***L.M. Danilenko, M.V. Pokrovskiy, O.O. Novikov, L.V. Korokina, D.B. Goncharova, A.B. Inderova, E.N. Svetlichnaya 138***
Assessment of biological and antagonistic activity of preparations on the basis of the immobilized bacteria. ***A.V. Korochinskiy, E.F. Stepanova, U.I. Ostroumov 143***
Experimental preeclampsy correction by tadalafil. ***M.V. Pokrovsky, V.V. Gureev, A.A. Dolgikov, O.S. Poljanskaja, A.S. Mostovoy, S.A. Alehin 146***
Studiing of pharmacological activity of submicrostructured substance of taurine. ***V.I. Kochkarov, O.O. Novikov, E.T. Zhilyakova, M.Yu. Novikova, O.S.Voronkova 152***
Value of intraoperative electrophysiological monitoring for choice tactics for neuro-surgical treatment of symptomatic epilepsy. ***A.G. Mogilev 159***

Information about Authors ***167***

Information for Authors ***170***

© Belgorod National Research University, 2012

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.51

КЛАССИЧЕСКИЕ И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Д.И. ПИСАРЕВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

В статье охарактеризован метод масс-спектрометрии. Рассмотрены различные способы ионизации веществ.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, ионизация.

Популяризации масс-спектрометрии способствовало интенсивное развитие физики элементарных частиц, что привело к открытию за последние тридцать лет новых методов ионизации молекул, в связи с чем масс-спектрометрия в настоящее время считается наиболее востребованным и чувствительным методом анализа органических молекул. Современные масс-спектрометрические методы очень хорошо подходят для анализа природных соединений, поскольку дают возможность получать информацию о точных молекулярных массах, структуре, то есть каким образом отдельные структурные фрагменты соединены друг с другом в составе молекулы, и количественном содержании. Кроме того, по данным масс-спектра можно сделать вывод относительно размера и структуры углеродных заместителей, что трудно установить другими методами.

Масс-спектрометрия – физический метод измерения отношения массы заряженных частиц (ионов) к их заряду. Масс-спектрометрию используют для определения относительной молекулярной массы M_r веществ, которую выражают в атомных единицах массы (а.е.м.) или дальтонах (Da). Масс-спектр представляет собой зависимость интенсивности сигнала детектора от отношения *массы иона к его заряду (m/z)*.

Ионы генерируются при потере или получении заряда нейтральными частицами. После образования ионы направляются в анализатор массы, где разделяются соответственно своему *m/z* и, наконец, детектируются [1].

Масс-спектрометрия в настоящее время используется для установление подлинности, изучения структуры и количественного определения органических веществ.

Масс-спектрометр состоит из четырёх основных узлов: системы напуска, источника ионизации (ионизатора) с ускорителем ионов, масс-анализатора, где ионы разделяются в зависимости от их массы к заряду и детектора с регистрирующим устройством, который измеряет количество отрицательных или положительных ионов. Чтобы исключить химические реакции ионов с другими атомами и молекулами, анализ проводится в высоком вакууме.

Существуют прямой и непрямой способы ввода пробы. При *непрямом* способе пробу вводят в масс-спектрометр в газообразном состоянии. При исследовании жидких или твердых образцов их необходимо предварительно перевести в пар путем нагревания до температур порядка 500°С в условиях вакуума. Пробу испаряют в специ-

альной камере, из которой пары в виде молекулярного пучка поступают через отверстие в ионизатор.

Прямой ввод пробы используют тогда, когда проба труднолетучая. В этих случаях образец непосредственно вводят в ионизатор через систему шлюзовых камер.

Количество структурной информации, получаемой на масс-спектре анализируемых веществ, зависит от метода ионизации. В зависимости от энергии, сообщаемой молекулам в момент ионизации, принято выделять *жёсткие* и *мягкие* способы ионизации. Высокая передача энергии происходит во время *жёсткой* электронной ионизации веществ, и в этих случаях, как правило, видна фрагментация молекулярных ионов. Когда применяются мягкие методы ионизации, фрагментация веществ в спектрах наблюдается редко.

В жёстких вариантах ионизации, где появляется множество осколочных ионов, образующихся при фрагментации исходного первичного молекулярного иона, фрагментарная информация служит способом идентификации молекул.

В мягких вариантах ионизации источником информации служит пик молекулярного иона или его производных с очень небольшим количеством фрагментных осколков. Эти методы применимы для идентификации полярных и высокомолекулярных веществ. Неполярные соединения малочувствительны к методам мягкой ионизации, так как не могут легко присоединять протон.

Характеристики и возможности масс-спектрометров зависят не только от применяемого способа ионизации, но и от типа масс-анализатора.

Масс-анализаторы используются для разделения ионов в соответствии с величинами отношений массы к заряду, причём заряд может быть обусловлен присоединением или потерей протона, катиона, аниона или электрона. Масс-анализаторы разделяют ионы по времени или в пространстве.

Детекторы. Самым распространённым детектором является электронный умножитель, который передаёт кинетическую энергию падающих ионов на поверхность, где она, в свою очередь, генерирует вторичные электроны.

Кроме того, существуют фарадеевские детекторы, представляющие собой_высокоомные сопротивления. Поток ионов, попадая на такой детектор, создаёт разность потенциалов, величина которой пропорциональна силе ионного тока.

Решающее значение для выбора оптимального масс-спектрометрического метода анализа конкретного объекта имеет метод ионизации. В зависимости от источника ионизации различают *газофазные*, *десорбционные* и *электроспрейные* методы ионизации.

В газофазных методах проба предварительно испаряется, что позволяет изучать термостабильные низкомолекулярные соединения, которые переходят в газообразное стостояние при температуре не выше 500 ℃. К газофазным относятся ионизация электронным ударом (*EI*) и химическая ионизация (*CI*).

Электронная ионизация (EI) – «*жёсткий*» способ ионизации, поэтому даёт большое число фрагментарных ионов. Образец для *EI* должен поступать в газообразной форме, что осуществляется его нагреванием посредством термической десорбции. Необходимая термическая десорбция образца для осуществления ионизации электронным ударом может привести к его температурному разложению до того, как произойдёт испарение. Обычно данный вариант ионизации используется в сочетании с газовой хроматографией и служит для анализа сложных смесей, в основном легколетучих, термостабильных, низкомолекулярных (до 1000 *Da*), липофильных компонентов, в первую очередь эфирных масел лекарственных растений, а также некоторых лекарственных препаратов терпеноидной структуры.

Химическая ионизация (CI) – более «*мягкий*» способ ионизации, даёт меньшую фрагментацию по сравнению с *EI* и используется для увеличения доли молекулярного иона. Однако, аналогично *EI*, образцы должны быть термически стабильными, так как испарение в *CI*-устройстве осуществляется при помощи нагревания. Процесс химической ионизации инициируется газом-реагентом, таким как метан, изобутан или аммиак, который ионизируется электронным ударом [2, 3].

Вплоть до 1980-х годов масс-спектрометрия нечасто попадала в поле зрения химиков-органиков, поскольку электронная ионизация (*EI*) оставалась единственным способом для анализа масс, и ограничивалась определением малых, термостабильных, легколетучих молекул. Высокомолекулярные органические соединения, биоорганические объекты, термолабильные органические и металлоорганические вещества вследствие ограниченной летучести или полного её отсутствия данным методом не определялись, поскольку их невозможно было перевести в газовую фазу в неповреждённом состоянии.

Радикальные изменения в масс-спектрометрии произошли в конце 1970-х годов, в связи с открытием мягких десорбционных методов.

Десорбционные методы ионизации в масс-спектрометрии — группа методов, для которых процессы десорбции твердого анализируемого вещества и его ионизация практически неотделимы во времени.

Принцип десорбции сводится к тому, что при мгновенном нагревании образца до высоких температур константа скорости его испарения будет превышать константу скорости разложения, что приводит к испарению вещества с любым молекулярным весом и химической структурой без его разложения.

Десорбционные методы можно разделить на две группы: десорбция, индуцированная бомбардировкой высокоэнергетическими частицами, или воздействием лазерным излучением.

Первоначально *R. D. Macfarlane* с сотрудниками был разработан метод плазменной десорбции (*plasma desorption – PD/MS*). Было обнаружено, что при радиоактивном распаде нуклида калифорния Cf 252 выделяется энергия, которая переходит в кинетическую энергию осколочных частиц. Пучок частиц распада проходит через тонкую металлическую фольгу, на поверхности которой расположен анализируемый образец, вызывая быстрый нагрев и десорбцию образца [4].

Ещё один появившийся метод – десорбционная химическая ионизация (*DCI/MS*) – обеспечивал быстрый нагрев аналита, преодолевая проблемы термического разложения, присущие обычной химической ионизации [5].

Тем не менее, этот метод редко применяют для анализа флавоноидов [6, 7].

Позднее *A. Benninghoven* с сотрудниками использовали для ионизации бомбардировку ионами Ar^+, что послужило началом развития метода ионизации вторичными ионами (*Secondary Ion – SI*) [8].

В начале 1980-х годов в работах *M. Barber* с сотрудниками [9] был представлен метод бомбардировки быстрыми атомами инертного газа (*Fast Atom Bombardment – FAB*). В методе *FAB* пучок быстрых высокоэнергетичных нейтральных атомов (например, Ar) формируется за счет предварительно образованных в газоразрядном устройстве ионов (Ar^+). При этом вся кинетическая энергия определяется ускоряющим напряжением, прикладываемым к промежуточным образованным ионам.

В это же время *D. J. Surman* и *J. C. Vickerman* выдвинули идею использования жидкой матрицы для поглощения большей части кинетической энергии ионизирующих частиц [10]. Ионы анализируемого вещества генерируются из капли состоящего из растворителя (матрица) и растворенного в ней исследуемого вещества. [11]. В качестве матрицы в методах *FAB* и *SI* были использованы глицерин, тиоглицерин и м-нитробензиловый спирт [12].

Создание методов *PD*, *FAB* и *SI* означало принципиальный прорыв в технике ионизации термически нестойких соединений без их деструкции.

Дальнейшее развитие представлений о способах ионизации привело к вытеснению этих методов технически более удобным, основанным на ионизации вещества импульсным лазерным излучением, получившим название лазерно-десорбционной ионизации (*Laser Desorption Ionization – LDI/MS*). Изначально метод *LDI* имел ограничения, поскольку лазер вызывал термическое разложение анализируемых веществ [13]. Для подавления процесса термического разложения в 1985 году *K. Tanaka* была предложена методика использования мелкодисперсного порошка кобальта поглощающего излучение лазера в глицериновом растворе [14]

M. Karas и *F. Hillenkamp* предложили в качестве матрицы органические вещества, способные интенсивно поглощать ультрафиолетовое излучение, поэтому они понижают деструктивные свойства лазерного излучения и облегчают ионизацию анализируемого вещества [15, 16]. Таким образом, был создан метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации.

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – MALDI/MS*) — метод ионизации, обусловленнный воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Источником ионизации служат различные типы импульсных лазеров (газовые, твердотельные, лазеры на красителях). Большинство масс-спектрометров *MALDI/MS* снабжено азотным лазером с длиной волны излучения 337 нм (3,68 эВ) и длительностью импульса 10^{-9} с.

Этот мягкий метод ионизации в основном сочетается с времяпролётным анализатором масс (*TOF/MS*).

Согласно современным представлениям о механизме ионизации в *MALDI* при облучении лазером из образца, представляющего собой твёрдую смесь анализируемого вещества и матрицы, происходит выброс материала в виде микрочастиц. Переданной энергии, как правило, бывает достаточно для возникновения локального нагрева, выделяется значительная энергия, которая переходит в энергию электронного и колебательного возбуждения, а также кинетическую энергию молекул. Над поверхностью образца возникает область высокого локального давления — факел, который преимущественно состоит из нейтральных частиц. Вместе с тем, в нем присутствуют и заряженные частицы, доля которых составляет 10^{-5}—10^{-3} от полного числа всех частиц. На начальном этапе образования факела его плотность близка к плотности вещества в конденсированном состоянии. С расширением факела происходит распад конгломератов вплоть до образования отдельных молекул или их фрагментов, а также заряженных (преимущественно матричных) частиц. Ионизацию молекул, происходящую непосредственно при выбросе материала из конденсированного состояния, принято рассматривать как первичную.

В расширяющемся факеле происходят непрерывные соударения между частицами, в том числе ион-молекулярные реакции между матричными заряженными частицами и молекулами анализируемого вещества, которые приводят к ионизации последнего. Такого рода ионизацию относят к вторичной [17].

Пробу для проведения анализа методом *MALDI* готовят путем смешения исследуемого вещества (аналита) с матрицей. Вещество, используемое в качестве матрицы, должно обладать высоким коэффициентом экстинкции при длине волны лазерного излучения, быть химически инертным по отношению к анализируемому веществу, иметь низкую летучесть и термическую устойчивость. Данным требованиям отвечают производные оксикоричных (α-цианокоричная, феруловая, синаповая), некоторых ароматических кислот (2,5-дигидроксибензойная), а также ароматических карбонилов (2,6-дигидроксиацетофенон), которые в настоящее время широко используются в качестве матриц [18].

Метод *MALDI/TOF/MS* был создан с целью анализа высокомолекулярных биологических молекул (пептиды и протеины). Поэтому он в первую очередь нашёл применение в протеомном анализе. Предметом изучения протеомики являются синтез, модификация, декомпозиция и замена белков исследуемого объекта. Методы протеомного анализа позволяют проанализировать до 10 000 индивидуальных белков в одном образце и зафиксировать изменения их концентраций, что используется в диагностике и мониторинге течения заболеваний [19-21].

Решающим фактором, который влияет на качество *MALDI/TOF/MS* масс-спектров, является кристаллизация аналита во время подготовки образца и поведение матрицы при облучении лазером. *Самым простым вариантом является нанесение капли растворённого образца на мишень с помощью дозатора или микрошприца. После испарения растворителя сверху помещается капля матрицы. Возможен обратный вариант:* на мишень наносится гомогенная «плёнка» матрицы, к которой до-

бавляется образец, который абсорбируется ею. *Другой способ заключается в том, что* насыщенный раствор матрицы смешивается с раствором аналита так, чтобы соотношение матрицы к аналиту было около 5000:1. Аликвота такой смеси затем помещается на мишень, где высушивается.

Для проведения анализа можно использовать режимы образования положительных ионов (образуются катионы $[M+1]^+$) или отрицательных ионов (образуются анионы $[M-1]^-$). Если в образце присутствуют следы солей металлов, то в масс-спектрах положительных ионов появляются ионные аддукты чаще всего натрия $[M+23]^+$ и калия $[M+39]^+$, реже аддукты с водой $[M+18+1]^+$.

Поскольку с помощью *MALDI/MS* осуществляется мягкая ионизация, то в спектрах фрагментации не наблюдается или она мало выражена, поэтому масс-спектры крайне просты и в предельном случае состоят только из специфического пика молекулярного иона. Данный метод сразу приобрёл популярность благодаря сверхвысокой чувствительности порядка нескольких фемтомоль (10^{-15} моля).

MALDI/TOF/MS может измерить массу почти любой молекулы. Анализ может быть выполнен в линейном (*Linear*) или отражённом (рефлектронном) (*Reflective*) режиме. Анализ является относительно нечувствительным к сопутствующим веществам. Необходимо очень малое количество образца (пикомоли или меньше), от 1 до 2 мл образца раствора. Метод позволяет быстро обрабатывать результаты, часто требуя меньше минуты для фактического анализа после пробоподготовки.

Серьезную конкуренцию *MALDI/TOF/MS* составляют электроспрейные методы ионизации. Наиболее интересны, с точки зрения структурных исследований, ионизация термоспрея (*TSP/MS*) и ионизация при атмосферном давлении (*API/MS*), которые включают в себя электроспрейную ионизацию (*ESI/MS*) и химическую ионизацию при атмосферном давлении (*APCI/MS*).

Принцип *ESI/MS* заключается в том, что анализируемое вещество поступает в растворе через капилляр с поданным на него напряжением. Электрическое напряжение на игле приводит к большому электрическому градиенту на жидкости, который разделяет заряды на поверхности. Это вынуждает жидкость выпячиваться с иглы в форме конуса Тейлора. Верхушка конуса вытягивается в нить до тех пор, пока не достигнет предела Рэлея, при котором поверхностное натяжение и электростатическое отталкивание сравняются и сильно заряженная капля не оторвётся от нити. Капли, которые оторвались от конуса, притягиваются к входу в масс-спектрометр из-за большой разности потенциалов между иглой и входом в масс-анализатор. По мере продвижения капли к анализатору кулоновское отталкивание на поверхности превосходит поверхностное натяжение, и капля «взрывается», высвобождая ионы.

ESI/MS чаще всего используется в сочетании с квадрупольным анализатором. Квадрупольный детектор может быть заменен на ионную ловушку *Q-IT/MS* или времяпролётный детектор *TOF/MS*. В *Q-IT*, ионы захватываются в полости, образованной тремя электродами, и выбрасываются через них в зависимости от значения *м/z*. Это позволяет осуществлять последовательное дробление родительского молекулярного иона, а затем и дочерних ионов. Таким образом, он обеспечивает масс-спектры последовательной фрагментацией выбранных ионов. Анализатор *TOF/MS* отделяет ионы в силу их разного времени полета на известное расстояние. Преимуществом этого детектора является более высокая чувствительность и точность, чем квадрупольного детектора.

Растворителями для электроспрея являются протонные растворители, такие как метанол, метанол – вода (50:50) или ацетонитрил – вода (50:50). Хотя 100% вода и используется в ESI, её низкое давление пара является лимитирующим фактором чувствительности; лучшая чувствительность получается при добавлении летучего органического растворителя.

Ионизация наноэлектроспрея (*nanoESI-MS*) является вариацией *ESI-MS*, в которой игла спрея сделана очень маленькой и расположена близко ко входу в масс-анализатор. Конечным результатом является увеличение эффективности, которое включает уменьшение необходимого количества образца.

В ионизации электроспрея используется поток воздуха или азота, нагревание, вакуумирование или сольватная оболочка (часто метанольная), чтобы обеспечить десольватацию капель. Выброс ионов происходит через «конус Тейлора» (центральная капля), откуда они затем электростатически направляются в масс-анализатор.

Скорости потока для *nanoESI-MS* обычно составляют от десятков до сотен нанолитров в минуту. Чтобы получить такие малые скорости потока, *nanoESI* использует источники из вытянутого и, в некоторых случаях, металлизированного стекла или плавленого кварца с малым входным отверстием (~ 5 мкм). Растворённый образец вносится в источник, и к его концу прикладывается давление порядка 2 атм. Вытекание образца с очень малой скоростью позволяет достигать высокой чувствительности. Также источники расположены очень близко к входу в масс-анализатор, поэтому перенос ионов в масс-анализатор намного более эффективен. NanoESI менее чувствительно к солям и другим примесям, т. к. меньшее испарение означает, что примеси не будут концентрироваться так сильно, как при ESI.

Химическая ионизация при атмосферном давлении (*APCI/MS*) генерирует ионы непосредственно из раствора и способна к анализу относительно неполярных соединений. Так же, как и в электроспрее, поток жидкости для APCI вытекает непосредственно в устройство ионизации.

Однако капли не заряжаются и *APCI/MS* устройство содержит нагретый испаритель, который обеспечивает быстрое разделение/испарение капель. Молекулы образца в паре проходят через зону ионно-молекулярной реакции при атмосферном давлении.

В *APCI/MS* ионизация возникает из-за возбуждения/ионизации растворителя коронным разрядом. Т. к. ионы растворителя существуют при атмосферном давлении, химическая ионизация молекул аналита очень эффективна; при атмосферном давлении молекулы аналита сталкиваются с ионами реагента очень часто. Перенос протона (для реакций протонирования MH^+) образует положительные ионы, а перенос электрона или отщепление протона ($[M-H]^-$) даёт отрицательные. Сглаживающее влияние сольватных оболочек на ионах реагента и высокое давление газа уменьшают фрагментацию во время ионизации и ведут к образованию практически только нетронутых молекулярных ионов. Многократная зарядка обычно не наблюдается, скорее всего потому, что процесс ионизации более энергичен, чем при *ESI*.

В итоге можно констатировать, что масс-спектрометрия в настоящее время стала одним из ведущих методов химических исследований благодаря своей высокой чувствительности, точности, экспрессности, диапазону определяемых масс. На начальных этапах своего существования масс-спектрометрия имела весьма ограниченное применение, поскольку единственный существовавший метод ионизации электронным ударом, вызывая жёсткую ионизацию, позволял определять только малые, гидрофобные, термостабильные, легколетучие молекулы. Термолабильные вещества, будучи энергозависимыми, данным методом не определялись, разрушаясь в процессе перевода их в газообразное состояние. Определение молекулярных масс термолабильных, нелетучих соединений стало возможным благодаря разработке мягких толерантных методов ионизации.

За истекший 40-летний период создано большое количество различных вариантов мягких десорбционных методов ионизации. Однако из всего многообразия только два реально обеспечили возможность наиболее эффективного анализа термолабильных органических соединений: образование ионов при распылении раствора анализируемого соединения в электрическом поле (электроспрей) и десорбция ионов из органической матрицы лазерным излучением. Достоинством электроспрейных методов ионизации является их возможность совмещения с хроматографами, поэтому они служат детекторами в методах высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. Преимуществом метода *MALDI/TOF/MS* является универсальность, простота выполнения эксперимента, сверхвысокая чувствительность и экспрессность, возможность анализа смеси компонентов.

Литература

1. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2003. – 494 с.
2. Клюев, Н.А. Современные методы масс-спектрометрического анализа органических соединений / Н.А. Клюев, Е.С. Бродский // Рос. хим. ж-л. – 2002. – Т. XLVI, № 4. – С. 57-63.
3. Джонстон, Р. Руководство по масс-спектрометрии для химиков-органиков. – М. : Мир, 1975. – 236 с.
4. Macfarlane, R.D. Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy / R.D. Macfarlane, D.F. Torgerson // Science. – 1976. – № 191. – С. 920.
5. Sakushima, A. Negative ion desorption chemical ionization mass spectrometry of flavonoid glycosides / A. Sakushima, S. Nishibe, H. Brandenberger // Biomed. Environ. Mass Spectrom. – 1989. – V. 18. – P. 809.
6. Lee, M.S. Rapid screening of fermentation broths for flavones using tandem mass spectrometry / M.S. Lee // Biol. Mass Spectrom. – 1993. – V. 22. – P. 84.
7. Rocha, L. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from Hypericum brasiliense / L. Rocha // Phytochemistry. – 1995. – V. 40. – P. 1447A.
8. Benninghoven, W. Detection, Identification and Structural Investigation of Biologically Important Compounds by Secondary Ion Mass Spectrometry / W. Benninghoven, K. Slchtermann – 1978. – T.50. – P. 1180.
9. Barber, M. Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry / M. Barber, R.D. Bordori, G.J. Eliott [et al.] // Anal. Chem. – 1982. – T.54. – P. 645A.
10. Surman, D. J. Fast Atom Bombardment Quadrupole Mass-Spectrometry / D. J. Surman, J. C. Vickerman // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1981. – № 7. – P. 324.
11. Распыление под действием бомбардировки частицами : сб. статей / под ред. Р. Бериша, К. Виттмака – М. : Мир, 1988. – С. 369.
12. Sunner, J. Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry and Gas-Phase Basicities / J. Sunner, R. Kulatunga, P. Kebarle // Anal. Chem. – 1988. – № 58. – P. 1312.
13. Dass, C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry / C. Dass // New Jersey: John Wiley & Sons. – 2007. – 585 p.
14. Tanaka, K. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry / K. Tanaka [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1988. – T. 2. – P. 151.
15. Karas, M. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules / M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp // Anal. Chem. – 1985. – № 57. – P. 2935.
16. Karas, M. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds / M. Karas, D. Bachmann, D. Bahr [et al.] // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. – 1987. – № 78. – P. 53-68.
17. Knochenmuss, R.A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / R. Knochenmuss // J. Mass Spectrom. – 2002. – № 37. – P. 867.
18. Определение строения органических соединений: таблицы спектральных данных / Э. Преч, Ф. Бюльман, К. Аффольтер ; пер. с англ. – М. : Мир; Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 438 с.
19. Conrotto, P. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications / P. Conrotto, S. Souchelnytskyi // Exp. Oncol. – 2008. – № 30(3). – P. 171-180.
20. Mann, M. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry / M. Mann, R.C. Hendrickson, A. Pandey // Annu. Rev. Biochem. – 2001. – № 70. – P. 437-473.
21. Chaurand, P. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry / P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler // J Am Soc. Mass Spectrom. – 1999. – № 10(2). – P. 91-103.

CLASSICAL AND MODERN METHODS OF MASS-SPECTROMETRY

D.I. PISAREV

Belgorod National Research University

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

The mass-spectrometry method was characterized. Different kinds of ionization were described.

Key words: mass-spectrometry, ionization

УДК 615.322

ТРАНС-РЕЗВЕРАТРОЛ – ПЕРСПЕКТИВНОЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЕ СОЕДИНЕНИЕ

Д.И. ПИСАРЕВ
О.О. НОВИКОВ
Г.В. ВАСИЛЬЕВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

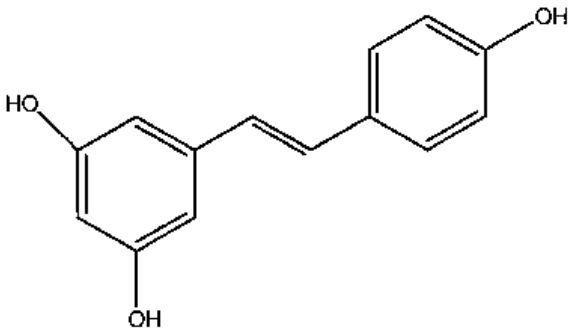
e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Авторами представлена краткая харакеристика транс-резвератрола. Данное соединение является полифенолом, обладает широким спектром биологической активности и представляет большой научный интерес.

Ключевые слова: транс-резвератрол, полифенолы, фитостильбены.

Среди природных биологически активных веществ полифенольной природы обладающих значительным физиологическим потенциалом, выделяются фитостильбены, и в первую очередь, резвератрол.

$C_{14}H_{12}O_3$ М.м. 228,25



Резвератрол (3, 5, 4'-тригидрокси-*транс*-стильбен) – это фитоалексин полифенольной природы, производное стильбена. Установлено, что в кожуре винограда он вырабатывается в ответ на эктремальные воздействия – низкие температуры, ультрафиолетовое излучение, травмы, грибковые и микробные контаминации и др. [1-3].

Для извлечения резвератрола из растительного сырья используются различные полярные органические растворители: этанол, ацетон, этилацетат, диэтиловый эфир, метанол, смесь ацетона с метанолом [4, 5].

Помимо резвератрола из растительного сырья были выделены его гликозиды (пицеид), метильные, окси-, оксиметильные производные и их гликозиды [6, 7].

Для идентификации и количественного определения 3, 5, 4'-тригидрокси-*транс*-стильбена используются в основном спектральные и хроматографические методы. Наиболее приемлемым вариантом является использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Метод ВЭЖХ был применен для определения содержания резвератрола в винах, виноградном соке и виноградных косточках. Хроматографическое разделение достигнуто на силикагеле С18 (100 х 2,0 мм), мобильной фазой служил 18%-й ацетонитрил при расходе 0,4 мл/мин. Кривая калибровки была линейна в диапазоне концентраций 5-1000 нг/мл. Этим методом определено содержание резвератрола в различных винах, виноградном соке и виноградных косточках [8].

Также было проведено определение содержания *транс*-резвератрола в экстракте кожицы арахиса с помощью ВЭЖХ на колонке, заполненной силикагелем. В качестве подвижной фазы использовали систему метанол – вода в соотношении 1:1. Скорость потока составляла 1,5 мл/мин. УФ-детекцию проводили при длине волны 320 нм. Содержание резвератрола (3, 5, 4'-тригидроксистильбена) составило 91,4±7,3 мкг/г су-

хого экстракта кожицы арахиса и 9,07±0,72 мкг/г сухой кожицы арахиса, что значительно выше содержания данного соединения в вине [9].

Португальские исследователи предложили использовать для анализа резвератрола в вине оригинальный электрохимический биосенсор. Но предложенный метод имеет ряд существенных недостатков: образцы вин необходимо было предварительно очищать, а пробы концентрировать хроматографически [10-13].

Метод хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) применялся для анализа содержания резвератрола в корнях горца змеиного (*Polygonum cuspidatum).* Разделение было выполнено на алюминиевых пластинах, покрытых силикагелем 60F-254. В качестве подвижной фазы использовалась система хлороформ-этилацетат-муравьиная кислота (2,5:1,0:0,1). После разделения пластины были высушены и просканированы с использованием сканера Camag TLC scanner III в режиме абсорбции при λ = 313 нм и обработаны Cats software версия 4.03. В результате разделения получалось компактное пятно для этого вещества (R_f = 0,40 ±0,03). Предел обнаружения резвератрола составил 27 нг/пятно [14].

ТСХ описана как способ анализа *транс*-резвератрола в растительных экстрактах и лекарственных формах методом хроматографии в тонком слое сорбента. Недостатком данного способа являются: его непригодность для анализа смеси изомеров резвератрола, эмпирический выбор подвижной фазы, длительная пробоподготовка, сложное аппаратурное оформление [15].

Биологическая активность транс-резвератрола

Для резвератрола в настоящее время доказан исключительно широкий спектр фармакологического действия.

Антиатерогенное действие резвератрола заключается в способности увеличивать содержание в крови липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и снижать содержание липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), холестерина [16, 17].

Полифенольное происхождение резвератрола обусловливает его выраженное антиоксидантное действие [18-21]. Именно с его антиоксидантным свойством связывают кардиопротективный эффект от длительного применения красного виноградного вина [22-24], а также противоопухолевое, хемопревентивное, противовоспалительное и нейропротективное действие [25, 26].

Рядом работ установлено позитивное влияние данного фитостильбена на агрегацию тромбоцитов [27].

Для резвератрола как вещества стильбеновой структуры характерно фитоэстрогенное действие. Он подавляет связывание эстрадиола эстрогеновыми рецепторами, что, в свою очередь, активирует транскрипцию эстрогензависимых генов. В некоторых типах клеток резвератрол ведет себя как суперантагонист, т. е. вызывает больший эффект, чем эстрадаол. Резвератрол также увеличивает экспрессию нативных эстрогенрегулируемых генов [28]. В целом резвератрол проявляет различные степени антагонизма по отношению к эстрогеновым рецепторам, что позволяет использовать его для коррекции различных гормональных расстройств.

С его эстрогенными свойствами ассоциируют противоопухолевую активность при раке груди [29]. Также у резвератрола выявлена собственная противоопухолевая активность, заключающаяся в подавлении пролиферации малигнизированных эпителиальных клеток [30, 31].

Эксперименты показывают, что он ингибирует рибонуклеотидредуктазу и подавляет синтез ДНК млекопитающих, напрямую блокируя размножение опухолевых клеток.

Резвератрол в комбинации с другими соединениями рекомендуют для профилактики и лечения различных новообразований [32, 33].

Установлено хемопревентивное (хемопротективное) и радиопротективное действие данного фитоалексина [34-38]. Продукты, содержащие резвератрол, рекомендованы в составе диет при комплексной химиотерапии онкозаболеваний [39, 40].

Резвератрол наряду с кверцетином вызывает индукцию апоптоза в клетках лимфомы человека линии Namalwa [41]. Это подтверждается соответствующим повы-

шением количества гиподиплоидных клеток, накоплением мобильных липидных доменов и активацией каспазы-3.

В комбинации с флюконазолом доказан синергизм резвератрола при грибковой контаминации (Candida albicans), в том числе на резистентные штаммы [42].

Существуют данные о противовоспалительном действии резвератрола [43, 44]. Установлены гепатопротекторные свойства резвератрола [45].

Резвератрол оказывает синергетическое действие на аналоги нуклеозидов при ингибировании человеческого вируса иммунодефицита.

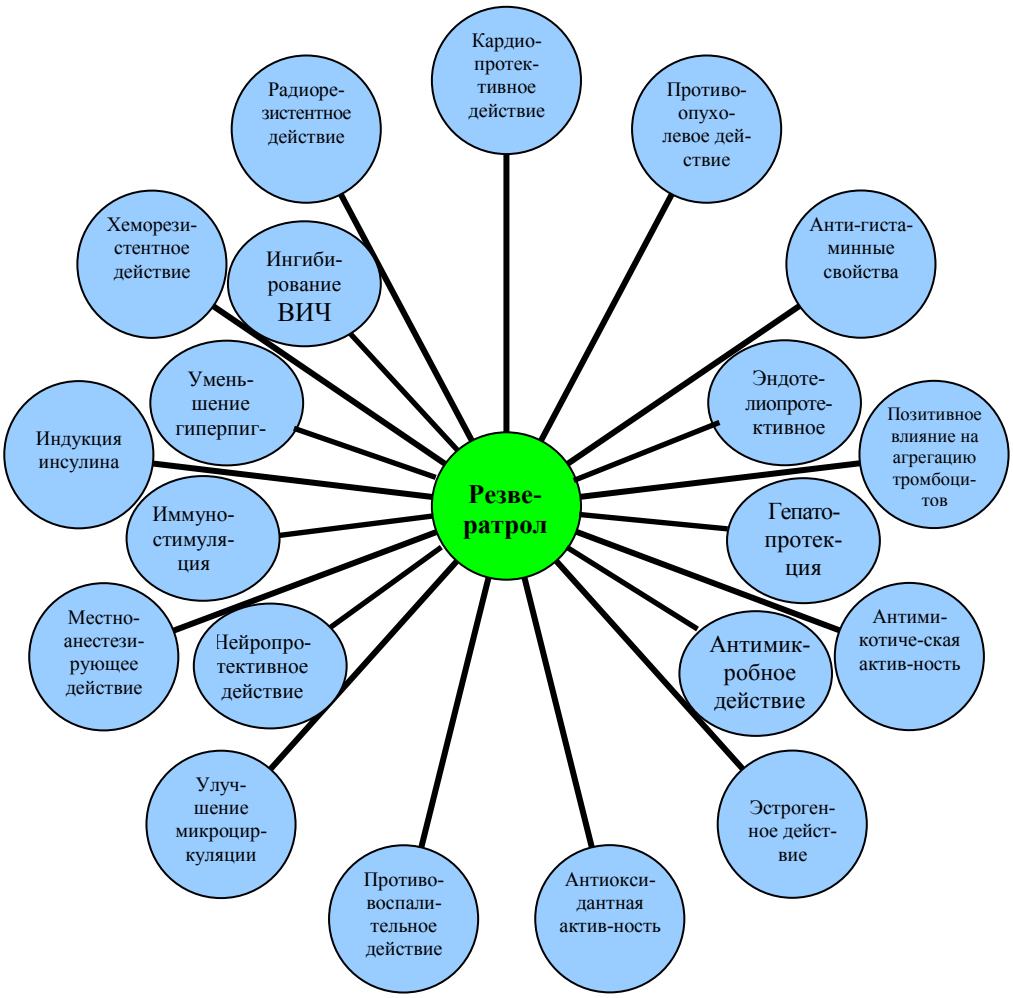


Рис. Фармакологические эффекты резвератрола

В России резвератрол известен как компонент биологически активных добавок (БАД) пище «Неогален резвератрол» (капсулы массой 500 мг) (ТУ 9197-064-75234508-08), «Ресвератрол-Форте» (капсулы по 350 мг) (ТУ 9197-001-29296174-08), «Трансверол молодые сосуды» (капсулы по 100 мг) (ТУ 9197-026-77480016-09).

На рисунке обобщены известные фармакологические эффекты резвератрола.

Итак, перспектива исследования 3, 5, 4'-тригидроксистильбена очевидна. Низкая токсичность и прогнозируемый терапевтический эффект создаваемых на его основе препаратов позволяют прогнозировать широкую возможность их применения в медицине.

Литература

1. Jeandet, P. Y. The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages / P. Y. Jeandet, R. A. Bessis, B. C. Gautheron // Am. J. Enol. Vitic. – 1991. – Vol. 42, № 1. – P. 41-46.

2. Langcake, P. C. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation / P. C. Langcake, R. J. Pryce // Phytochemistry. – 1977. – Vol. 16, № 8. – P. 1193-1196.

3. Okuda, T. C. Trans-Resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan / T. Okuda, K. Yokotsuka // Am. J. Enol. Vitic. – 1996. – Vol. 47, № 1. – P. 93-99.

4. Isolation and Identification of stilbenes in two varieties of Polygonum cuspidatum / B. C. Vastano [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, is. 2. – P. 253-256.

5. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content / A. I. Romero-Perez [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49, is. 1. – 210-215.

6. Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues / V. Cardile [et al.] // Bioorg. Chem. – 2005. – Vol. 33, № 1. – P. 22-33.

7. Vrhovsek, U. Effects of various vinification techniques on the concentration of cis- and trans-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine / U. Vrhovsek, S. Wendelin, R. Eder // Am. J. Enol. Vitic. – 1997. – Vol. 48, № 2. – P. 214-219.

8. Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography / S. Malovanáb [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2001. – Vol. 428, is. 2. – P. 245-253.

9. Development of a reversed-phase high-performance liquidchromatography method for analyzing raras-resveratrol in peanutkernels / J. J. L. Rudolf [et al.] // Food Chem. – 2005. – Vol. 89, № 4. – P. 623-638.

10. Direct HPLC analysis of cis and trans resveratrol and piceid isomers in Spanish red Vitis vinifera wines / R. M. Lamuela-Raventos [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1995. – Vol. 43, is. 2. – P. 281-283.

11. Liquid chromatography with multi-channel electrochemical detection for the determination of resveratrol in wine, grape juice and grape seed capsules with automated solid phase extraction / Y. Zhu [et al.] // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. – 2000. – Vol. 23, is. 10. – P. 1555-1564.

12. Lamuela-Raventos, R. M. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method / R. M. Lamuela-Raventos, A. L. Waterhouse // J. Agric. Food Chem. – 1993. – Vol. 41, №4. – P. 521-523.

13. Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography / S. Malovaná, F. J. G. Montelongo, J. P. Pérez [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2001. – Vol. 428, №2. – P. 245-253.

14. Isolation and Identification of stilbenes in two varieties of Polygonum cuspidatum / B. C. Vastano, Y. Chen, N. Zhu [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, № 2. – P. 253-256.

15. Babu, S.K. Estimation of trans-Resveratrol in herbal extracts and dosage forms by high-performance thin-layer-chromatography / S.K. Babu, K.V. Kumar, G.V. Subbaraju // Chem. Pharm. bull. – 2005. – 53 (6). – P. 691-693.

16. Bradamante, S. Cardiovascular protective effects of resveratrol / S. Bradamante, L. Barenghi, A. Villa // Cardiovasc. Drug, Rev. – 2004. – Fall; 22 (3). – P. 169-188.

17. Dong, H.H. New progression in the study of protective properties of resveratrol in anticardiovascular disease / H.H. Dong, H.L. Ren // Bratisl. Lek. Listy. – 2004. – 105 (5-6). – P. 225-229.

18. Olas, B. Resveratrol protects against peroxynitrite-induced thiol oxidation in blood platelets / B. Olas, P. Nowak, B. Wachowicz // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2004. – 9(4A). – P.577-587.

19. Olas, B. Resveratrol reduces oxidative stress induced by platinum compounds in blood platelets / B. Olas, B. Wachowicz // Gen. Physiol. Biophys. – 2004. – Sep, 23 (3). – P. 315-326.

20. Szewczuk, L.M. Viniferin Formation by COX-1: Evidence for Radical intermediates during Co-oxidation of Resveratrol / L.M. Szewczuk, S.H. Lee, I.A. Blair // J. Nat. Prod. – 2005. – Jan. 68(1). – P. 36-42.

21. Caruso, F. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure / F. Caruso, J. Tanski, A. Villegas-Estrada [et al.] // J. Agric, Food Chem. – 2004. – 52(24). – P. 7279-7285.

22. Caimi, G. Chronic renal failure: oxidative stress, endothelial dysfunction and wine / G. Caimi, C. Carollo, R. Lo Presii // Clin. Nephrol. – 2004. – 62(5). – P. 331-335.

23. Oak, M.H. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea / M.H. Oak, J. El Bedoui, V.B. SchM-Kerth // J, Nutr Biochem. – 2005. – 16(l). – P. 1-8.

24. Szewczuk, L.M. Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine m-hydroquinones: a structure-activity relationship study / L.M. Szewczuk, T.M. Penning // J. Nat. Prod. – 2004. – 67(11). – P. 1777-1782.

25. Schultz, J. Resveratrol may be a powerful cancer-fighting ally / J. Schultz // J. Natl Cancer Inst. – 2004. – 96 (20). – P. 1497-1498.

26. Choi, S.M. An alternative mode of action of endocrine-disrupting chemicals and chemoprevention / S.M. Choi, B.M. Lee / J. Toxicol. Environ. Health B, Crit. Rev. – 2004. – 7(6). – P. 451-463.

27. Fukao, H. Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice / H. Fukao, H. Ijiri, M. Miura [et al.] // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2004. – 15(6). – 441-446.

28. Bhat, K. P. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells / K.P. Bhat, J.M. Pezzuto // Cancer. Res. – 2001. – Vol. 61, № 16. – P. 6137-6144.

29. Kopp, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the «French paradox»? / P. Kopp // Eur. J. Endocrinol. – 1998. – Vol. 138, № 6. – P. 619-620.

30. Bhat, K. P. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells / K. P. Bhat, J. M. Pezzuto // Cancer. Res. – 2001. – Vol. 61, № 16. – P. 6137-6144.

31. Aggarwal, B.B. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies / B.B. Aggarwal [et al.] // Anticancer. Res. – 2004. – Vol. 24, № 5A. – P. 2783-2840.

32. Shi, T. Effects of resveratrol on gene expression in renal cell carcinoma / T. Shi [et al.] // Cancer Biol. Ther. – 2004. – Vol. 3, is. 9. – P. 882-888.

33. Pace-Asciak, C.R. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease / C.R. Pace-Asciak [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 1995. – Vol. 235, № 2. – P. 207-219.

34. Bhat, K.P. Cancer chemopreventive activity of resveratrol / K. P. Bhat, J. M. Pezzuto // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 957 : Alcohol and wine in health and disease. – P. 210-229.

35. Jang, M.B. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes / M. B. Jang [et al.] // Science. – 1997. – Vol. 275, № 5297. – P. 218-220.

36. Fulda, S. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol / S. Fulda , K. M. Debatin // Oncogene. – 2004. – Vol. 23, is. 40. – P. 6702-6711.

37. Lin, J.K. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol / J. K. Lin, S. H. Tsai // Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China. B. – 1999. – Vol. 23, № 3. – P. 99-106.

38. Jang, M. C. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes / M. C. Jang [et al.] // Science. – 1997. – Vol. 275, № 5297. – P. 218-220.

39. Larrosa, M. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells / M. Larrosa, F. A. Tomás-Barberán, J. C. Espín // Eur. J. Nutr. – 2004. – Vol. 43, № 5. – P. 275-284.

40. Wang, Y.A. The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells / Y. A Wang [et al.] // Toxicol. Sci. – 2006. – Vol. 92, №1. – P.71-77.

41. Su, J.L. Resveratrol induces FasL-related apoptosis through Cdc42 activation of ASK1/JNK-dependent signaling pathway in human leukemia HL-60 cells / J. L. Su [et al.] // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26, is. 1. – P. 1-10.

42. Jeandet, P. Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard / P. Jeandet [et al.] // Amer. J. Enol. Viticult. – 1995. – Vol. 46, № 1. – P. 1-4.

43. Donnelly, L.E. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms / L. E. Donnelly [et al.] // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2004. – Vol. 287, is. 4. – P. 774-783.

44. Murias, M. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship / M. Murias [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2004. – Vol. 12, is. 21. – P. 5571-5578.

45. Yang, H. Two new hepatoprotective stilbene glycosides from Acer mono leaves / H. Yang, S. H. Sung, Y. C. Kim // J. Nat. Prod. – 2005. – Vol. 68, is. 1. – P. 101-103.

TRANS-RESVERATROL – A PERSPECTIVE BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCE

D.I. PISAREV
O.O. NOVIKOV
G.V. VASILIEV

Belgorod National Research University

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

The authors gave the characteristic to trans resveratrol. This compound is a polyphenol, which has a broad spectrum of biological activity and is of great scientific interest.

Key words: trans-resveratrol, polyphenols, fitostilbeny.

УДК 615.322

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТОЦИАНОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Д.И. ПИСАРЕВ
О.О. НОВИКОВ
О.А. СЕЛЮТИН
Н.А. ПИСАРЕВА

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Авторами рассмотрены некоторые особенности биологической активности флавоноидов. Установлено, что на основе флавоноидов выпускают 140 торговых наименований препаратов.

Особое внимание авторы уделяют антоцианам как одним из перспективных биологически активных веществ (БАВ).

Ключевые слова: флавоноиды, антоцианы, биологически активные вещества.

Флавоноиды обладают выраженными антиаллергическими, антиканцерогенными, противовоспалительными и антивирусными свойствами [1]. Разнообразная биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием в их молекулах реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Превращаясь в биологических системах в различные хиноны, флавоноиды могут взаимодействовать со специфическими функциональными группами белков-ферментов, изменяя их третичную структуру и каталитические свойства.

Флавоноиды, в отличие от фенольных антиоксидантов (токоферолов), кроме прямого антирадикального действия, способны связывать ионы металлов с переменной валентностью (переходные металлы), образуя стабильные хелатные комплексы. Известно, что образование такого рода комплексов флавоноидов с ионами переходных металлов приводит к ингибированию свободнорадикальных процессов [2, 3].

Благодаря хелатирующим свойствам поступающие с пищей в организм флавоноиды способны влиять на ионный (металлов) баланс и окислительный статус клеток и тканей.

Металлокомплексы ряда флавоноидов являются значительно более эффективными перехватчиками анион-радикала кислорода, чем исходные комплексоны. При этом лиганды в составе комплекса окисляются значительно медленнее, чем свободные лиганды.

Одной из особенностей биологического действия флавоноидов является чрезвычайно широкий спектр потенциальных мишеней, на которые они могут воздействовать в организме. С одной стороны, это связано с большим разнообразием самих растительных пигментов как в отношении их структуры, так и редокс-свойств. Вместе с тем, и каждый конкретный флавоноид способен воздействовать на множество структурных и функциональных систем клетки и организма в целом. В качестве примера можно указать на кверцетин, один из наиболее распространенных и исследованных флавоноидов. Показано, что кверцетин является ингибитором протеинкиназы С [4], митоген-активируемой протеинкиназы (МАР-киназы) [4], фосфолипазы А2 [6], Mg^{2+}-АТФ-азы [7], Ca^{2+}-АТФ-азы [8], обратной транскриптазы [9], HIV-1-протеиназы [10], HIV-1-интегразы [11], орнитиндекабоксилазы [12], глутатион-S-трансферазы in vitro [13] (но активирует этот фермент in vivo [14]), глиоксалазы [15], ксантиндегидрогеназы [16], эстрогенсинтетазы [17], альдозредуктазы [18], малатдегидрогеназы [19], различных изоформ NO синтазы и продукции NO [20]. Установлено, что кверцетин влияет на процессы селекции Т-лимфоцитов [21], ингибирует образование цитотоксичных лимфоцитов [22], угнетает цитотоксическую активность натуральных киллеров [23]. В отношении клеток неспецифического иммунитета показано, что кверцетин подавляет выделение гистамина и пероксида водорода базофилами [24]. Кроме того, кверцетин ингибирует агрегацию тромбоцитов [25].

Катехины проходят через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) и оказывают хороший антиоксидантный и нейропротекторный эфект при моделировании различных нейродегенеративных заболеваний [26].

Флавоноиды ингибируют моноаминоксидазу, предотвращая окислительное дезаминирование катехоламинов и тем самым подавляя продукцию активных форм кислорода, что очень перспективно для лечения некоторых нейродегенеративных заболеваний [27].

Флавоноиды могут ингибировать процессы канцерогенеза благодаря нескольким механизмам: ингибирование процессов метаболической активации проканцерогенов в реактивные интермедиаты или собственно канцерогены, индукция и активация ферментов, катализирующих процессы детоксикации канцерогенов, и прямое химическое взаимодействие с активными канцерогенами, препятствующее повреждающему воздействию последних на важнейшие внутриклеточные мишени – молекулы ДНК, РНК и белков [28]

Окисление арахидоновой и других полинесыщенных жирных кислот (ПНЖК), катализируемое циклооксигеназами и липооксигеназами, является ключевым этапом в синтезе простагландинов и лейкотриенов. Вместе с тем, образующиеся в этом случае гидро- и эндопероксиды способны при определенных условиях вовлекаться в различные патологические процессы, включая и канцерогенез. Поэтому способность флаван-3-олов (катехинов) ингибировать ферменты циклооксигеназа 1 и 2 может иметь следствием не только противовоспалительное, но и антиканцерогенное действие [29].

Флавоноиды обладают спазмолитическим действием. Считается, что действие на гладкомышечные волокна имеет папаверинoподобный механизм. Спазмолитическое действие на коронарные сосуды и сосуды внутренних органов немного уступает по силе действия кумаринам.

Доказано, что флавоноиды осуществляют регулирующее влияние на процессы, связанные с обменом ионов Ca^{2+} в организме. Отсюда – способность флавоноидов проявлять гипотензивную активность. В этой цепи биохимических процессов не обходится и без циклических нуклеотидов-ц-АМФ и ц-ГМФ. Последние, как известно, тесно взаимосвязаны с ферментом фосфодиэстеразой (ФДЭ): флавоноиды ингибируют ФДЭ, что в свою очередь объясняет столь широкий спектр их фармакологической активности.

Будучи ингибиторами ферментных систем, тормозят процессы активации клеток различных видов, включая секрецию, митогенез, контрактуру гладкомышечных органов и др. Примером регуляции секреторных процессов является ингибирование высвобождения гистамина (медиатор воспаления) из тучных клеток и базофилов. Поэтому флавоноиды проявляют антиаллергическую активность. Одной из причин такой активности является то, что флавоноиды ингибируют фермент Ca^{2+} – АТФ-азу, которая в свою очередь регулирует поступление ионов Ca^{2+} в тучные клетки после воздействия на них антигена. Таким образом, блокируя поступление ионов Ca^{2+} в тучные клетки и базофилы, флавоноиды опосредованно ингибируют высвобождение гистамина.

Выраженность желчегонного действия возрастает в ряду: флавоны — халконы — флаваноны. Флавонолы в основном оказывают влияние на обезвреживающую функцию печени, механизм действия связан с изменением окислительно-восстановительных процессов в митохондриях клеток печени.

Большинство флавоноидов обладает умеренным диуретическим эффектом, в механизме которого основная роль принадлежит расширяющему действию на сосуды почек. Противоязвенное действие наиболее выражено у гликозидов флавонолов и халконов.

Изофлавоноидам присуще умеренное эстрогеноподобное действие, их иногда относят к группе фитоэстрогенов, поэтому они могут быть перспективными при различных гормональных нарушениях.

При анализе официальных источников, таких как Государственный реестр лекарственных средств (ЛС) (2010 г. издания), Регистр ЛС (2010 г.), Справочник Видаль (2009 г.), Энциклопедия лекарств (2008 г.), установлено, что препаратов на основе флавоноидов насчитывается 140 торговых наименований (ТН).

Согласно АТХ-классификации среди вышеуказанной группы препаратов выделены: ангиопротекторы – 26% (15 ТН), средства, применяемые при заболеваниях печени и желчевыводящих путей – 21% (12 ТН), снотворные и седативные средства – 14% (8 ТН), кардиотонические средства – 12% (7 ТН), препараты, снижающие проницаемость капилляров – 9% (5 ТН), препараты для лечения урологических заболеваний – 7% (4 ТН), препараты, улучшающие мозговое и периферическое кровообращение – 5% (3 ТН), противовирусные средства – 4% (2 ТН), венотонизирующие и венопротекторные средства – 2% (1 ТН) (рис. 1).

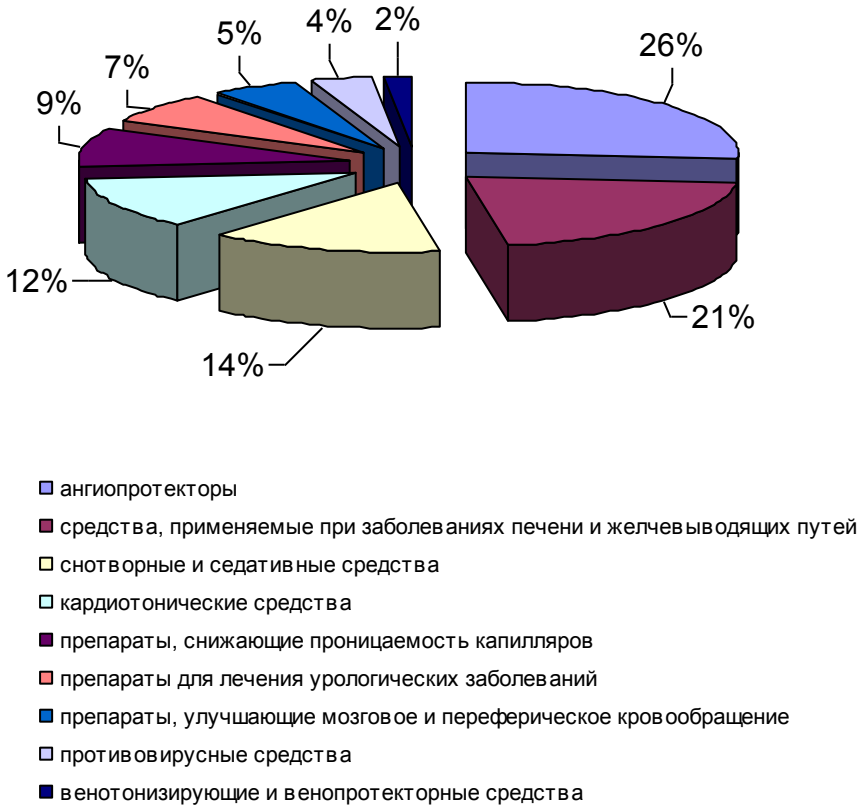


Рис. 1. Структура российского рынка препаратов флавоноидов согласно классификации по фармакотерапевтическому признаку, %

Также среди лекарственных средств на основе флавоноидов выявлено: лекарственных препаратов – 67 наименований, биологически активные добавки (БАД) – 73 наименования (рис. 2).

БАД, содержащие флавоноиды подразделяются на три группы:

а) БАД — полифенольные соединения;

б) БАД — продукты растительного, животного или минерального происхождения;

в) другие БАД.

При изучении структуры ассортимента лекарственных средств на основе флавоноидов по видам лекарственных форм установлено, что преимущественную долю в группе занимают твёрдые ЛФ (таблетки, капсулы, драже, порошки – субстанции, гранулы) – 52% (474 ЛП) и жидкие ЛФ (настойки, экстракты, капли, растворы для приёма внутрь, сиропы) – 45% (411 ЛП); мягкие ЛФ (мази, гели, пасты) составляют 3% (25 ЛП) (рис. 3).

Одной из важнейших групп флавоноидов, которым в настоящее время уделено много внимания по причине разносторонней фармакологической активности являются антоцианы.

Антоцианидины — это производные катиона *флавилия* (2-фенилбензопирилия). Особенностью строения антоцианидинов является наличие в гетероцикли-

ческом кольце четырехвалентного кислорода (оксония) и свободной положительной валентности.

Антоцианы отвечают за окраску плодов, цветков и других частей растений в цвета от оранжевого до синего [30].

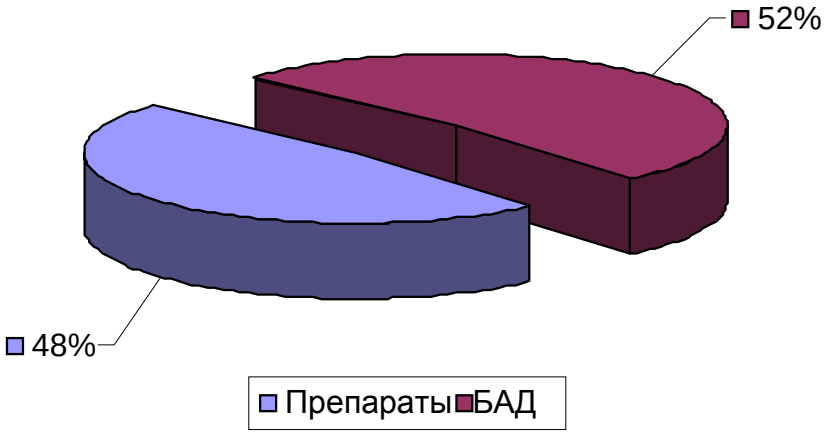


Рис. 2. Структура ассортимента препаратов на основе флавоноидов, %

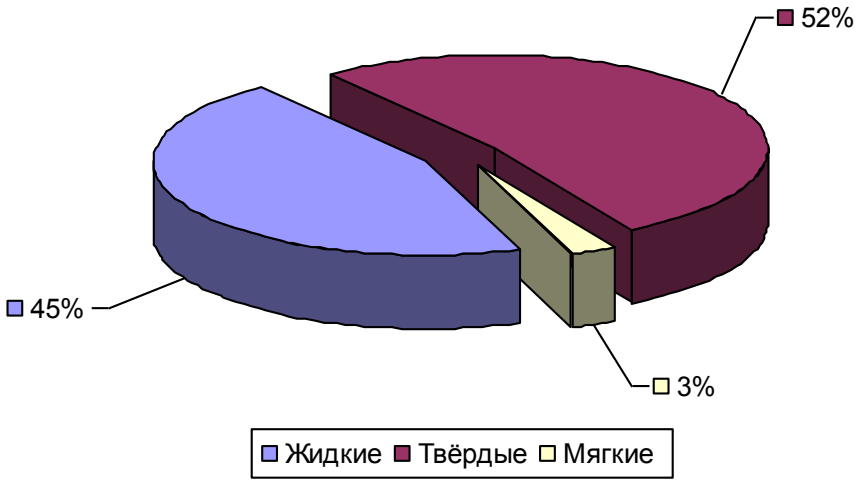


Рис. 3. Структура ассортимента лекарственных препаратов на основе флавоноидов по видам лекарственных форм, %

На окраску антоцианидинов влияет число и природа заместителей: гидроксильные группы, несущие свободные электронные пары, обусловливают батохромный сдвиг при увеличении их числа. Так, пеларгонидин, цианидин и дельфинидин, несущие в 2-фенильном кольце соответственно одну, две и три гидроксильные группы, окрашены в оранжевый, красный и пурпурный цвета. Гликозилирование, метилирование или ацилирование гидроксильных групп антоцианидинов приводит к уменьшению или исчезновению батохромного эффекта [31].

Большие различия между природными антоцианами связаны с разнообразием углеводных фрагментов, присоединенных к остову по гидроксильным радикалам, как правило, в положении 3, реже одновременно в двух положениях – 3 и 5. Известны со-

единения, в которых заняты оба эти положения. Среди моносахаридов, входящих в состав антоцианов, можно выделить глюкозу (Glu), галактозу (Gala), арабинозу (Ara), рамнозу (Rham), реже – ксилозу (Xyl). Нередки дисахаридные заместители: рутиноза (Rut), софороза (Sopho) и др. а также и более сложные фрагменты. Кроме того, большей частью разнообразие антоцианов обусловлено различием производных, в которых некоторые из гидроксильных групп углеводного фрагмента ацилированы уксусной, малоновой, кумаровыми, кофейной и др. кислотами [32].

Для антоцианов в настоящее время доказаны следующие виды фармакологической активности:

– *вазопротекторная* – уменьшают ломкость и проницаемость капилляров, улучшая функцию эндотелия. В частности, экстракт черники при оральном или инъекционном введении уменьшет проницаемость капилляров [33];

– *антиоксидантная* – интересным является факт аномально высокой антирадикальной активности антоцианов, которая во много раз превышает таковую других классов флавоноидов. Антоцианы ингибируют перекисное окисление липидов (защищают от окислительного стресса), тем самым предотвращая сердечно-сосудистые заболевания, что подтверждено экспериментально. Например, дельфинидин (в отличие от цианидина и мальвидина) способствует определяемой эндотелием вазорелаксации аорты крыс [34]. По данным работы [35] антоцианы ингибируют окисление липопротеинов низкой плотности;

– *противовоспалительная* – способствуют стабилизации выработки коллагена, ингибируют агрегацию тромбоцитов и стимулируют выработку эндотелием простагландинов, которые в свою очередь приводят к вазодилятации. Кроме того, установлена способность антоцианов гасить воспалительные процессы в легких, снижая активность соответствующих ферментов [36, 37];

– *противоопухолевая* – в опытах in vitro и in vivo установлено, что антоцианы уменьшают скорость деления раковых клеток [38];

– *защита зрительного аппарата* – как следует из ряда экспериментов, в этом направлении хорошо зарекомендовали себя антоцианы плодов черники и черной смородины [39-41]. Показано, что три основных антоциана плодов черной смородины стимулировали регенерацию родопсина; образование соответствующих интермедиатов ускорялось под действием цианидин-3-рутинозида [42, 43]. Следовательно, именно ускорение регенерации родопсина является причиной усиления ночного видения. Впрочем, в работе [44] предлагается версия об активации антоцианами ретинальных ферментов;

– *фунгицидная и антимикробная активность* – антоцианы способны ингибировать биосинтез афлатоксинов [45], антоцианы плодов черники (*Vaccinium)* применяли при лечении микробных инфекций, диареи и в целом ряде иных заболеваний [46].

Антоцианы потенциальные колоранты для пищевой и медицинской промышленности благодаря высокой и разнообразной биологической активности этих соединений [47-49].

Известны защитные функции фенольных соединений по отношению к повреждающему действию ультрафиолетовых (УФ) лучей на растительные ткани. Антоцианы защищают фотосинтетическую систему и геном клетки, в частности ДНК и хлоропласты [50].

Таким образом, природные соединения класса полифенолов обладают целым спектром биологической активности. Особенно выделяется среди них группа антоцианов.

На фоне растущей популярности лекарственных средств и БАД растительного происхождения перспективность данных соединений как объектов изучения не вызывает сомнения.

Работа выполнена в рамках задания Министерства образования и науки РФ НИУ «БелГУ» №4.959.2011 по теме «Разработка оригинальной малостадийной технологии получения субстанций биологически активных соединений класса антоцианов в виде стабильных металлорганических комплексов».

Литература

1. Антиоксидантные свойства природных фенолов / А. Д. Гордиенко, Н. Ф. Комиссаренко, В. В. Левченко [и др.] // Тезисы докладов пятого всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям, Таллин, 22-24 сент. 1987 г. / Науч. совет по пробл. физиологии и биохимии растений АН СССР, Эст. респ. совет по пробл. физиологии и биохимии растений, Ин-т эксперим. биологии АН ЭССР. – Таллин, 1987. – С. 32-33.

2. Afanas'ev, I.B. Chelating and Free Radical Scavenging Mechanisms of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation / I.B. Afanas'ev, A.I. Dorozhko, A.V. Brodskii, V.A. Kostyuk, A.I. Potapovitch // Biochem Pharmacol. – 1989. – Vol. 38. – P. 1763-1769.

3. Afanas'ev, I.B. Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats / I.B. Afanas'ev, E.A. Ostrachovich, N.E. Abramova, L.G. Korkina // Biochem Pharmacol. – 1995. – Vol. 50. – P. 627-635.

4. Ferriola, P.C. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids, kinetic mechanism and structure-activity relationships / P.C. Ferriola, V. Cody, E. Middleton // Biochem Pharmacol. – 1989. – Vol. 38. – P. 1617-1624.

5. Bird, T.A. Evidence that MAP (mitogen-activated protein) kinase activation may be a necessary but not suffi-cient signal for a restricted subset of responses in IL-1-treated epidermoid cells / T.A. Bird, H.D. Schule, P.B. Delaney, J.E. Sims, B. Thoma, S.K. Dower // Cytokine. – 1992. – Vol. 4. – P. 429-440.

6. Lee, T-P. Effect of quercetin on human polymor-phonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism / T-P. Lee, M.L. Matteliano, E. Middleton // Life Sci. – 1982. – Vol.31. – P. 2765-2774.

7. Long, G.D. Effects of quercetin on magnesium-dependent adenosine triphosphatase and the metabolism of human polymorphonuclear leukocytes / G.D. Long, L.R. DeChatelet, J.T. O'Flaherty, C.E. McCall, D.A. Blass, P.S. Shirley, J.W. Parce // Blood. – 1981. – Vol.57. –P. 561-566.

8. Shoshan, V. Quercetin interaction with the (Ca2++Mg2+) ATPase of sarcoplasmic reticulum / V. Shoshan, D.H. MacLennan // J Biol Chem. – 1981. – Vol. 256. – P. 887-892.

9. Spedding, G. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids / G. Spedding, A. Ratty, E. Middleton // Antiviral Res. – 1989. – Vol. 12. –P. 99-110.

10. Brinkworth, R.I. Flavones are inhibitors of HIV-1 pro-teinase / R.I. Brinkworth, M.J. Stoermer, D.P. Fairlie // Biochem Biophys Res Commun. – 1992. – Vol. 2. – P. 631-637.

11. Fesen, M.R. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase / M.R. Fesen, K.W. Kohn, F. Leteurtre, Y. Pommier // Proc Natl Acad Sci USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 2399-2403.

12. Kato, R. Inhibition of 12-O- tet-radecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: Possible involvement of lipoxygenase inhibition / R. Kato, T. Nakadate, S. Yamamoto, T. Sugimura // Carcinogene-sis. – 1983. – Vol. 4. – P. 1301-1305.

13. Das, N.P. Effects of flavonoids on induced non-enzymic lipid peroxidation / N.P. Das, A.K. Ratty // In Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships (Cody V., Middleton E., Harborne J.B. eds). – New York : Alan R.Liss, Inc., 1986. – P. 243-248.

14. Trela, B.A. Effect of flavanone on mixed-function oxidase and conjugation reactions in rats / B.A. Trela, G.P. Carlson // Xenobiotica. – 1987. – Vol. 17. – P. 11-16.

15. Klopman, G. Computer-automated structure evaluation of flavonoids and other structurally related compounds as glyoxalase I enzyme inhibitors / G. Klopman, M.L. Dimayuga // Mol Pharmacol. – 1988. – Vol. 34. – P. 218-222.

16. Bindoli, A. Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase / A. Bindoli, M. Valente, L. Cavallini // Pharmacol Res Commun. – 1985. – Vol. 17. – P. 831-839.

17. Kellis, J.T. Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by fla-vones / J.T. Kellis, L.E. Vickery // Science. – 1984. – Vol. 225. – P. 1032-1034.

18. Varma, S.D. Inhibition of aldose reductase by flavonoids: Possible attenuation of dia-betic complications / S.D. Varma // In Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships (Cody V., Middleton E., Harborne J.B. eds). – New York : Alan R.Liss, Inc., 1986. – P. 343-358.

19. Seddon, A.P. Photo-induced covalent labelling of malate dehydrogenase by quercetin / A.P. Seddon, K.T. Douglas // Biochem Biophys Res Commun. – 1981. – Vol. 102. – P. 15-21.

20. Soliman, K.F. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astro-cyte cell culture by various dietary compounds / K.F. Soliman, E.A. Mazzio // Proc Exp Biol Med. – 1998. – Vol. 218. – P. 390-397.

21. Glossmann, H. Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase pp60src / H. Glossmann, P. Presek, E. Eigenbrodt // Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. – 1981. – Vol. 217. – P. 100-102.

22. Schwartz, L.B. Mediators of human mast cells and human mast cell subsets / L.B. Schwartz // Ann Al-lergy. – 1987. – Vol. 58. – P. 226-235.

23. Ng, J. Studies on the calcium dependence of human cell killing / J. Ng, B.B. Fredholm,

24. \M. Jondal // Biochem Pharmacol. – 1987. – Vol. 36. – P. 3943-3949.

25. Middleton, E. Quercetin: An inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release / E. Middleton, G. Drzewiecki, D.Krishnarao // J Immunol. – 1981. – Vol. 127. – P. 546-550.

26. Tomasiak, M. The effect of quercetin and lithium ions on platelet aggregation / M. Tomasiak / Ann Med Univ Biatystok. – 1992. – Vol. 37. – P. 38-45.

27. Inanami, O. Oral admini-stration of (-)catechin protects against ischemia-reperfusion-induced neuronal death in the gerbil / O. Inanami, Y. Watanabe, B. Syuto, M. Nakano, M. Tsuji, M. Kuwabara // Free Radic Res. – 1998. – Vol. 29. – P. 359-365.

28. Mazzio, E.A. Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells / E.A. Mazzio, N. Harris, K.F. Soliman // Planta Med. – 998. – Vol.64. – P.603-606.

29. Wattenberg, L.W. Chemoprevention of cancer / L.W. Wattenberg // Cancer Res. – 1985. – Vol. 45. – P. 1-8.

30. Noreen, Y. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis / Y. Noreen, G. Serrano, P. Perera, L. Bohlin, Y. Noreen, G. Serrano, P. Perera, L. Bohlin // Planta Med. – 1998. – Vol. 64. – P. 520-524.

31. Wheldale, M. The anthocyanin pigments of plants / M. Wheldale – Cambridge : University Press, 1916. – 320 p.

32. Гейссман, Т. Антоцианы, халконы, ауроны и родственные им водорастворимые пигменты / Т. Гейссман // Биохимические методы анализа растений. – М. : Изд. ИЛ, 1960. – С. 453.

33. Antal, D.-S. The anthocyans: biologically-active substances of food and pharmaceutic interest / D.-S. Antal, G. Gârban, Z. Gârban // The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati – Food Technology. – 2003. – VI. – P. 106-115.

34. Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R. // Phytochemistry. – 2003. – V. 64. – P. 923-933.

35. Andiambeloson, E. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta / E. Andiambeloson, C. Magnier, G. Haan-Archipoff, A. Lobstein, R. Anton, A. Beretz, J. Stoclet, R. Andrantsitohaina // J. Nutr. – 1998. – V. 128. – P. 2324-2333.

36. Satuc-Garcia, M.T. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems / M.T. Satuc-Garcia, M. Heinonen, F.N. Frankel // J. Agric. Food Chem. – 1997. – Vol. 45. – P. 3362-3367.

37. Rossi, A. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation / A. Rossi, I. Serraino, P. Dugo, R. Di Paola, L. Mondello, T. Genovese, D. Morabito,

38. \G. Dugo, L. Sautebin, A. Caputi, S. Cuzzocrea // Free Radical Research. – 2003. – Vol.37. – P. 891-900.

39. Smith, M. B. Bioactive properties of wild blueberry fruits / M. Smith, K. Marley, D. Seigler, K. Singletary, B. Meline // J.Food Sci. – 2000. – Vol. 65. – P. 352-356.

40. Hou, D.-X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins / D.-X. Hou // Current Molec. Med. – 2003. – Vol. 3. – P. 149-159.

41. Virmaux, N. Modulation of rod cyclic GMP-phosphodiesterase activity by anthocyanin derivatives / N. Virmaux, P. Bizec, G. Nullans et al. // Biochem. Soc. Trans. – 1990. – Vol. 339. – P. 1532-1526.

42. Nakaishi, H. Effect of black currant anthocyaniside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans / H. Nakaishi, H. Matsumoto, S. Tominaga, M. Hirayama // Altern. Med. Rev. – 2000. – V. 5. – P. 553-562.

43. Matsumoto, H. Orally administrated delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms / H. Matsumoto, H. Inaba, M. Kishi, S. Tominanga, M. Hirayama, T. Tsuda // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49. – P. 1546-1551.

44. Wang, H. Antioxidant activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from tart cherries / H. Wang, M.G. Nair, G.M. Strasburg, Y-C. Chang, A.M. Booren, J.I. Gray, D.L. DeWitt // J. Nutr. Prod. – 1999. – Vol. 62. – P. 294-296.

45. Nakaishi, H. Effect of black currant anthocyaniside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans / H. Nakaishi, H. Matsumoto, S. Tominaga, M. Hirayama // Altern. Med. Rev. – 2000. – V.5. – P. 553-562.

46. Norton, R. Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in Aspergillus favus by anthocyanidins and related flavonoids / R. Norton // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47. – P. 1230-1235.

47. Smith, M. Bioactive properties of wild blueberry fruits / M. Smith, K. Marley, D. Seigler, K. Singletary, B. Meline // J.Food Sci. – 2000. – Vol. 65. – P. 352-356.

48. Wang, H. Antioxidant activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from tart cherries / H. Wang, M.G. Nair, G.M. Strasburg, Y-C. Chang, A.M. Booren, J.I. Gray, D.L. DeWitt // J. Nutr. Prod. – 1999. – Vol. 62. – P. 294-296.

49. Болотов, В.М. Химические пути расширения эксплуатационных свойств природных красителей из растительного сырья России / В.М. Болотов, О.Б. Рудаков // Химия растительного сырья. – 1999. – № 4. – С. 35-40.

50. Kowalczyk, E. Anthocyanins in medicine / E. Kowalczyk, P. Krzeliński, M. Kura, B. Szmigiel, J. Błaszczyk // Polish J. Pharmacol. – 2003. – Vol. 55. – P. 699–702.

51. Lila, M.A. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach / M.A. Lila // J. Biomed. Biotechnol. – 2004. – № 5. – P. 306–313.

52. Gould, K.S. Functional role of anthocianins in the leaves of Quintinia serrata A. Cunn / K.S. Gould, K.R. Markham, R.H. Smith, J.J. Goris // J. Exp. Bot. – 2000. – V. 51, № 347. – P. 1107-1115.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLYPHENOLS OF PLANT ORIGIN. PROSPECTS OF MEDICAL PRACTICE OF ANTHOCYANINS

D.I. PISAREV
O.O. NOVIKOV
O.A. SELJUTIN
N.A. PISAREVA

Belgorod National Research University

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

The authors discuss some features of the biological activity of flavonoids. It was established that 140 brand names of drugs are released on the basis of flavonoids.

Particular attention is paid to anthocyanins as one of the most promising biologically active substances.

Key words: flavonoids, anthocyanins, biologically active substances.

УДК 547.913:543.2

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Д.И. ПИСАРЕВ
О.О. НОВИКОВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

В результате проведенного обзора установлено, что основным методом анализа эфирных масел является использование газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. В качестве способа ионизации наиболее оптимален электронный удар, позволяющий по характеру образовавшихся осколочных ионов надежно охарактеризовать структуру анализируемых компонентов.

Ключевые слова: эфирные масла, хромато-масс-спектрометрия, ионизация.

Эфирномасличная флора насчитывает около 3000 видов растений, большая часть которых приходится на сухие субтропики. Промышленное значение имеют 150-200 эфирных масел, используемых в косметике, парфюмерии, пищевой и фармацевтической промышленности [1].

Эфирные масла содержатся в растениях, как правило, в небольших количествах – 0,01-1,0%, хотя встречаются виды, содержащие до 10,0% и даже 20-22% (бутоны гвоздики). Первым шагом, предшествующим анализу эфирных масел, является их выделение. Обычными методами выделения эфирных масел из природных источников для последующего анализа являются: перегонка с водяным паром, экстракция, концентрирование на твёрдых сорбентах и криоловушках, анфлераж [2, 3].

Для выделения эфирных масел из растительного материала наиболее широко используют перегонку с водяным паром. В фармакопее XI издания приводятся 4 метода выделения эфирных масел из растительного материала с помощью гидродистилляции. В этих методах используют стеклянные приборы различной конструкции, позволяющие с точностью до ±0,02 мл измерить объём выделенного масла [4].

На выход и состав эфирного масла влияют подготовка растительного сырья и продолжительность перегонки. Кроме того, имеют значение температура и давление пара. При перегонке с перегретым паром продолжительность процесса сокращается и обеспечивается наиболее полный выход масла, поэтому многие из лабораторных методов определения содержания эфирных масел страдают неточностью и несовместимостью с производственными принципами переработки растительного сырья.

Преимущество метода гидродистилляции – возможность получения эфирного масла в чистом виде, недостаток – разложение термолабильных компонентов эфирного масла и различные химические превращения под воздействием высоких температур.

Существует комбинированный метод выделения эфирных масел с помощью сочетания перегонки с паром и экстракции их из дистиллята органическими соединениями.

Другим методом выделения и концентрирования эфирных масел является улавливание летучих веществ сорбентами (тенакс, полисорб) или криоловушками. Этот метод удобен в тех случаях, когда необходимо исследовать легколетучие вещества в газовых образцах. Определённый объём газа, содержащего летучие вещества, пропускают через трубку с сорбентом или капилляр, охлаждаемый жидким азотом. После этого с помощью быстрого нагревания до 200-250°С сорбента или криоловушки в токе газа-носителя эфирные масла переводятся в колонку хроматографа. Эта процедура связана с риском разложения и изомеризации лабильных соединений.

Экстракцию эфирных масел проводят в тех случаях, когда их компоненты термолабильны и подвергаются деструкции при перегонке с водяным паром. Экстракцию проводят органическими растворителями с низкими температурами кипения (эфир петролейный, эфир диэтиловый, ацетон и др.). Часто экстракцию осуществляют в течение определённого времени (иногда до нескольких суток) в аппарате типа Сокслета. Полученный экстракт концентрируют упариванием в токе инертного газа или пони-

женном давлении при низких температурах. К преимуществам этого метода можно отнести возможность выделения из образца термолабильных и малолетучих соединений, к недостаткам – необходимость концентрирования извлечения (может привести к потерям легколетучих веществ), возможность загрязнения испарителя колонки газового хроматографа нелетучими соединениями и продуктами их разложения.

Анфлеражом извлекают эфирные масла, содержащиеся в очень малых количествах в сырье (цветки розы, ландыша и др.).

Выжимание – способ, применимый к сырью, богатому эфирным маслом, заключённым в крупных вместилищах. Этот метод разработан для добывания масла из кожуры плодов цитрусовых – лимонов, апельсинов, померанцев, бергамотов; полученные эфирные масла имеют более высокое качество, чем добытые перегонкой [2].

Главной особенностью анализа большинства эфирных масел и терпеновых соединений как их составных частей является то, что в растениях они чаще всего встречаются в составе сложных смесей, насчитывающих до нескольких десятков индивидуальных веществ, находящихся в широком диапазоне концентраций.

Подлинность эфирных масел устанавливают по их физико-химическим свойствам. Определяют цвет, запах, вкус, плотность, удельное вращение, показатель преломления, растворимость в спирте, кислотное и эфирное число, состав действующих веществ [5].

Плотность эфирных масел колеблется в пределах 0,69-1,188. Угол вращения плоскости поляризации отражает состав оптически активных веществ, а так как эфирные масла представляют собой смесь оптически активных веществ, то угол вращения плоскости поляризации – это сумма углов вращения, входящих в смесь ингредиентов, свидетельствует о качестве эфирного масла. Растворимость эфирного масла в спирте (96% или 70%) даёт представление о его подлинности и качестве. Большинство углеводородов плохо растворимо в спирте, особенно в разведённом. Отклонение от норм растворимости служит критерием недоброкачественности эфирного масла.

Для установления качественных характеристик эфирных масел определяют кислотное, эфирное число (до и после ацетилирования). Количество свободных спиртов в эфирных маслах устанавливают путём ацетилирования и определения эфирного числа (до и после ацетилирования) [2, 5].

На начальных этапах эфирные масла изучали так называемыми классическими методами: определялись физические свойства (плотность, угол вращения поляризованного света, показатель преломления, температуры замерзания, плавления, кипения) и химические показатели (эфирное и кислотное число, эфирное число после ацетилирования). Количество главных компонентов эфирных масел определяли химическими методами (ацетилирование спиртов, омыление эфиров, экстракция фенолов водными растворами щелочей). Для изучения качественного состава эфирных масел их подвергали фракционированию с помощью групповых химических реакций или перегонки с целью выделения индивидуальных соединений, которые идентифицировали по температурам их кристаллических производных и характерным химическим реакциям.

Период 1940-1960 гг. характеризуется введением в анализ эфирных масел новых физико-химических методов разделения и анализа: хроматографии – тонкослойной, бумажной, колоночной и газожидкостной для разделения смесей терпеновых соединений с использованием спектроскопических методов (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного метода).

Тонкослойная и бумажная хроматография сыграли большую роль в исследовании смесей терпенов. Эти методы позволяют проводить качественное и полуколичественное определение основных компонентов. Для разделения эфирных масел методом тонкослойной хроматографии в качестве сорбента чаще используют силикагель и алюминия оксид. Подвижной фазой при разделении служат н-гексан, бензол, хлороформ, их смеси с этилацетатом, эфиром петролейным. Спирты можно разделять в смеси спирта метилового и воды (7:3) на слоях, обработанных парафином или маслом силиконовым. Карбонильные соединения разделяют в системах, содержащих этилаце-

тат: этилацетат – н-гексан (3:17), этилацетат – хлороформ (1:9), этилацетат – бензол (3:17). Детектирование проводят облучением хроматограмм в УФ-свете или с помощью реагентов-проявителей (кислота серная 50%, иногда с добавлением ванилина или альдегида анисового, сурьма (III) хлорид, кислота фосфорномолибденовая). Недостатками метода являются большая длительность анализа, малая эффективность разделения, невозможность точного количественного определения компонентов смеси [2, 6, 7].

Применение спектроскопических методов (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии) возможно только после выделения терпеноидов в индивидуальном виде из эфирных масел. Их использование в настоящее время оправдано чаще всего для установления структуры впервые выделенных веществ [8].

Ультрафиолетовая спектроскопия иногда используется для определения наличия и характера сопряжения химической связи в структурах терпеноидов. Эмпирические правила, предложенные Вудвордом и видоизменённые Физером, позволяют предсказывать положение максимума полосы поглощения с высокой интенсивностью в таких системах, как сопряжённые диены, триены, кетоны. Положение максимума поглощения определяется природой основного хромофора и степенью его замещения.

Инфракрасная спектроскопия существенно дополняет УФ-спектроскопию. Для химии терпенов наиболее важны два участка спектра. Полосы поглощения в области приблизительно 3650-2650 $см^{-1}$ (не считая колебаний С-Н) в случае терпеноидов почти всегда характерны для колебаний связей О-Н. При правильной интерпретации полосы поглощения в этой области могут служить доказательством наличия гидрокси- или родственной ей групп. Поглощение во втором и более важном участке спектра (приблизительно 1820-1640 $см^{-1}$), если оно достаточно интенсивное, обычно отвечает колебаниям С=О. По положению максимума поглощения в этой области можно определить, является ли соединение насыщенным или сопряжённым эфиром, альдегидом, кетоном, кислотой, лактоном или ангидридом. Важными, но менее общими являются данные по поглощению в других участках спектра. Так, слабая полоса поглощения в области 3050 $см^{-1}$ свидетельствует о наличии метиленовой группы в циклопропановом кольце.

Ранее использование метода ядерно-магнитного резонанса в химии терпенов ограничивалось применением протонного резонанса (ПМР), который применялся для установления структур некоторых соединений, например, φ-сантонина. В настоящее время ПМР широко применяется для установления структур терпеноидов [5, 9].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) ограниченно применяется при анализе эфирных масел, что связано, во-первых, с невысокой эффективностью хроматографических колонок, не применимых для разделения многокомпонентных смесей близких по свойствам веществ, и, во вторых, с большой селективностью чаще всего применяемых УФ-спектрометрических детекторов. ВЭЖХ иногда применяют для предварительного фракционирования образцов. Однако важным преимуществом ВЭЖХ является возможность анализа малолетучих и термолабильных соединений [10].

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) очень широко используется для изучения сложных смесей терпеновых соединений. Это обусловлено следующим: терпеноиды имеют температуры кипения от 150 до 350°С и достаточное парциальное давление для проведения анализа этим методом; ГЖХ в настоящее время является наиболее эффективным методом разделения сложных смесей, она может использоваться в сочетании со спектроскопическими методами идентификации. Для анализа смесей терпенов используют различные неподвижные жидкие фазы широкого диапазона полярности – от неполярных (SE-30, OV-101) до полярных (карбовакс 20 М). На колонках с неполярными неподвижными фазами соединения элюируются в соответствии с их температурами кипения: сначала монотерпены, далее сескви-, ди- и тритерпены. Кислородсодержащие соединения удерживаются дольше, чем соответствующие углеводороды. Анализ смесей терпеновых соединений осуществляется как на набивных, так и на капиллярных колонках. Так как капиллярные колонки более эффективно разделяют смеси, то тенденция к их применению постепенно возрастает. Чувствительность мето-

да ГЖХ определяется типом используемого детектора. Для проведения хроматографии с помощью микрошприца в испаритель хроматографа вводят небольшую пробу (0,001 мкл) эфирного масла и испаряют при температуре 250°С. Под действием постоянно протекающего через эту трубку газа-носителя (обычно гелия, водорода или азота) эфирное масло в виде пара движется по трубке. Одновременно температура колонки повышается от 50°С до 220°С со скоростью 3-4 градуса/мин. Внутренняя поверхность трубки (колонки) покрыта тонким слоем (0,25 микрон) нейтральной жидкости полимерной природы (жидкая фаза, имеющая свое кодовое название, например, SE-30 или Carbowax 20M, отражающее хроматографические свойства фазы). Компоненты эфирного масла имеют различное адсорбционное сродство к жидкой фазе, из-за чего скорость продвижения вдоль колонки веществ, составляющих эфирное масло, различна. В результате компоненты выходят из колонки в виде отдельных веществ. Обычное время анализа эфирного масла – не более 30-40 мин. В современных методиках отдельное вещество может выходить в течение 3-7 секунд. Таким образом, за время анализа можно обнаружить сотни веществ. Эти вещества различными методами детектируются. Основным методом обнаружения веществ, выходящих из колонки, является ионизационно-пламенное детектирование. С этой целью выходной конец колонки вставляется в детектор, представляющий собой тонкое сопло с непрерывно горящим пламенем водорода. Поступающие в пламя вещества ионизируются под действием высокой температуры и обнаруживаются по появлению этих ионов. Количество ионов пропорционально количеству вещества в пламени. В результате проведения хроматографического анализа получают хроматограмму в виде пиков. Размеры пика указывают на количество вещества в пробе. Количественные соотношения (обычно в виде процентного соотношения) рассчитываются автоматически с помощью компьютера [2, 11-13].

Обычным методом анализа легколетучих и ограниченно летучих терпеноидов (моно-, сескви-, дитерпенов) является газожидкостная хроматография. Хотя газожидкостной хроматографией возможно с очень высокой эффективностью разделять сложные смеси летучих органических соединений, однако, к сожалению, она даёт недостаточно информации о строении веществ. К тому же идентификация терпеноидов, основанная только на данных ГЖХ-удерживания, является весьма ненадёжной. Поэтому необходимым оказался детектор, который может с большей степенью вероятности идентифицировать вещества на выходе из газохроматографической колонки. Наиболее приемлемым детектором для этого является масс-спектрометр, так как он удовлетворяет важнейшим характеристикам метода газожидкостной хроматографии – скорости и чувствительности метода. К тому же масс-спектрометрия даёт уникальную информацию об исследуемом веществе и может быть использована для идентификации веществ и изучения их строения [2, 12, 14-17].

В настоящее время основными методами изучения эфирных масел является сочетание газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, которые не требуют предварительного выделения индивидуальных веществ и наличия их характеристики, полученной другими спектральными методами [8].

При идентификации компонентов методом хромато-масс-спектрометрии выходящие из колонки вещества не попадают в горящее пламя водорода, а направляются в поток электронов, имеющих стандартную энергию (70 эв). Но перед вводом газовой смеси в масс-детектор из неё удаляется как можно больше газа-носителя, ибо масс-спектрометр работает при низком давлении. Для его удаления смесь газа-носителя и образца поступает в молекулярный сепаратор, состоящий из соединённых между собой двух ступеней. Каждая ступень состоит из вакуумной камеры и двух сопел. В сепараторе происходит откачка молекул газа-носителя как более лёгких, в то время как более тяжёлые молекулы испытуемого образца остаются в сепараторе. Попав в масс-спектрометр, молекулы образца подвергаются электронной бомбардировке. При этом молекула теряет один электрон. Если энергия бомбардирующих электронов больше, чем энергия ионизации, то возникающий положительный ион будет обладать избытком энергии. Эта энергия вызывает распад молекулярного иона. Распад идёт по многим направлениям, и в ионном источнике образуется ряд ионов с различными масса-

ми, заряд и количество которых в стандартных условиях для каждого вещества является постоянным и уникальным. Терпеноиды под воздействием электронных ударов испытывают фрагментацию, приводящую в основном к одинаковым по массовым числам ионам (m/z), характеризующимся относительной интенсивностью ($I_{отн.}$) пиков. Такое положение в масс-спектрах монотерпенов вызвано отсутствием места локализации заряда в молекулярном пике ионов (M^+), что предполагает смещение двойной связи в цикле в более энергетически выгодное положение, что приводит к усреднённой его структуре, из которой осуществляется фрагментация. По другим представлениям, различия в интенсивности основных осколочных ионов у изомерных монотерпенов вызваны перестройкой первоначального углеводородного скелета молекулы, что требует определённых энергетических затрат и может протекать за время, большее для стереоизомеров, чем «время жизни» M^+ [14-20].

Используя базы данных (*NIST*, *WILEY-275*), содержащие масс-спектры электронной ионизации, можно с высокой точностью идентифицировать анализируемые компоненты.

Качество получаемого масс-спектра зависит от продолжительности времени сканирования интервала масс. Для хромато-масс-анализа наиболее предпочтительны приборы, обладающие возможностью быстрого сканирования, что позволяет получать достоверные масс-спектры соединений. Этому требованию отвечают квадрупольные масс-спектрометры, которые наиболее широко используются для анализа эфирных масел.

Термостабильность терпеноидов предъявляет особые требования к масс-спектрометрической части хромато-масс-спектрометра. В частности, требуется инертность переходных линий между хроматографом и ионным источником масс-спектрометра. Кварцевые капиллярные колонки, введённые через интерфейс непосредственно в ионный источник, в основном решают эту проблему [2].

Резюме

Таким образом, представленные данные позволяют утверждать, что до сих пор основным методом анализа терпеноидов остаётся использование гибридного метода – хромато-масс-спектрометрии, а именно газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. В качестве способа ионизации наиболее оптимален электронный удар, позволяющий по характеру образовавшихся осколочных ионов надежно охарактеризовать структуру анализируемых компонентов. Поэтому актуальность использования данного подхода может заключаться только в анализе малоисследованных объектов.

Литература

1. Зюков, Д.Г. Технология и оборудование эфирномасличного производства / Д.Г. Зюков, Е.Н. Андреевич, А.П. Чипига. – М. : Пищ. пром-сть, 1979. – 190 с.

2. Сур, С.В. Методы выделения, идентификации и определения терпеновых соединений / С.В. Сур // Раст. ресурсы. – 1990. – Т. 26, вып. 1. – С. 42-50.

3. Технология натуральных эфирных масел и синтетических душистых веществ / И.И. Сидоров [и др.]. – М. : Легкая и пищ. пром-сть, 1984. – 368 с.

4. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1987. – 334 с.

5. Горяев, М.И. Методы исследования эфирных масел / М.И. Горяев, И. Плива. – Алма-Ата : Изд-во АН Каз. ССР, 1962. – 739 с.

6. Растительные лекарственные средства / под ред. Н.П. Максютиной. – Киев : Здоров'я, 1985. – 102 с.

7. Хроматография в тонких слоях / под ред. Э. Шталя. – М. : Химия, 1965 – 508 с.

8. Зенкевич, И.Г. Аналитические параметры компонентов эфирных масел для их хроматографической и хромато-масс-спектрометрической идентификации. Моно- и сесквитерпеновые углеводороды / И.Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. – 1996. – Т. 32, вып. 1-2. – С. 45-58.

9. Де Майо, П. Терпеноиды растений / П. Де Майо. – М. : Изд-во иностранной литературы, 1963. – 494 с.

10. Зенкевич, И.Г. Некоторые особенности количественного анализа компонентов эфирных масел в высокоэффективной жидкостной хроматографии / И.Г. Зенкевич, В.М. Косман, К.Г. Ткаченко // Раст. ресурсы. – 1999. – Вып. 1. – С. 128-136.

11. Баффингтон, Р. Детекторы для газовой хроматографии : пер. с нем. / Р. Баффингтон, М. Уилсо. – М. : Мир, 1993. – 80 с.

12. Идентификация органических соединений : пер. с англ. / Р. Шрайнер [и др.]. – М. : Мир, 1983. – 704 с.

13. Booth, A.B. Examination of savin oil / A.B. Booth // Amer. Perfumer Aromat. – 1957. – Vol. 69. – P. 45-48.

14. Василенко, И.А. Физические методы анализа в биотехнологии, биологии, медицине / И.А. Василенко // Рос. хим. журн. – 1994. – №1. – С. 81-85.

15. Джонстон, Р. Руководство по масс-спектрометрии для химиков-органиков / Р. Джонстон : пер. с англ. – М. : Мир, 1975. – 236 с.

16. Карасек, Ф. Введение в хромато-масс-спектрометрию : пер. с англ. / Ф. Карасек, Р. Клемент – М. : Мир, 1993. – 237 с.

17. Новые физические и физико-химические методы исследования органических соединений / Б.В. Иоффе [и др.]. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1984. – 240 с.

18. Клюев, Н.А. Использование масс-спектрометрии в структурном анализе компонентов эфирных масел / Н.А. Клюев, В.А. Замуреенко, Н.С. Евтушенко // Фармация. – 1987. – № 5. – С. 69-75.

19. Клюев, Н.А. Применение хромато-масс-спектрометрии для определения компонентного состава эфирных масел / Н.А. Клюев, В.А. Замуреенко, Н.С. Евтушенко // Фармация. – 1986. – № 5. – С. 70-76.

20. Полякова, А.А. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений / А.А. Полякова. – М. : Химия, 1983. – 248 с.

METHODS OF ISOLATION AND ANALYSIS OF ESSENTIAL OILS

D.I. PISAREV
O.O. NOVIKOV

Belgorod National Research University

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

The review proved that the primary method of analysis of essential oils is the use of gas-liquid chromatography with mass spectrometric detection. As a method of ionization the electron impact is viewed as optimal , which allows to characterize the structure of the analyzed components reliably regarding the nature of fragmented ions formed.

Ke words: essential oils, gas chromatography-mass spectrometry, ionization.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ФАРМАЦИЯ

УДК 615.45:615.012

АПТЕЧНОЕ ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ: ИЗУЧЕНИЕ СОВРЕМЕННОЙ НОМЕНКЛАТУРЫ

Р.Р. САБИРЖАН
С.Н. ЕГОРОВА

Казанский государственный медицинский университет

e-mail: zimsve@yandex.ru

Проведен анализ современной номенклатуры лекарственных форм, изготавливаемых в аптеках для нужд лечебно-профилактических учреждений. Установлены составы экстемпоральных лекарственных форм, перспективные для перевода в промышленное производство

Ключевые слова: аптека, лекарственные формы, фармацевтическое производство

В настоящее время номенклатура лекарственных форм, изготавливаемых в аптеке, претерпевает существенные изменения, поскольку Федеральный закон № 61 «Об обращении лекарственных средств» [1] ограничивает возможность аптечного изготовления лекарственных форм, не выпускающихся промышленными фармацевтическими предприятиями.

Целью данного исследования являлось изучение современной номенклатуры лекарственных форм, изготавливаемых в аптеках для нужд лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ).

Объектами исследования являлись данные котировок муниципальных закупок, размещенные в сети Интернет, по состоянию на 2010 г. и декабрь 2011-2012 гг. Исследование проводили методом контент-анализа в поисковой системе Яндекс по ключевым словам: «аптечное изготовление для нужд ЛПУ», «поставка экстемпоральных», «закуп экстемпоральных».

Экспериментальная часть. В результате исследования найдено 43 котировки, из них 31 – по состоянию на 2010 г. и 12 – на декабрь 2011-2012 гг.

Установлено, что количество используемых лекарственных субстанций уменьшилось после выхода Федерального закона № 61 «Об обращении лекарственных средств» с 73 (2010 г.) до 46 (2011-2012 гг.).

Структура ассортимента экстемпорального изготовления по видам лекарственных форм представлена на рис. 1 (2010 г.) и рис. 2 (2011-2012 гг.).

Как следует из данных, представленных на рис. 1 и 2, структура ассортимента экстемпоральных лекарственных форм изменилась: доля растворов уменьшилась с 81 до 59% (за счет сокращения аптечного изготовления инфузионных растворов), порошков – с 5 до 2%, масел – с 13 до 6%, и выросла доля мазей – с 1 до 33%.

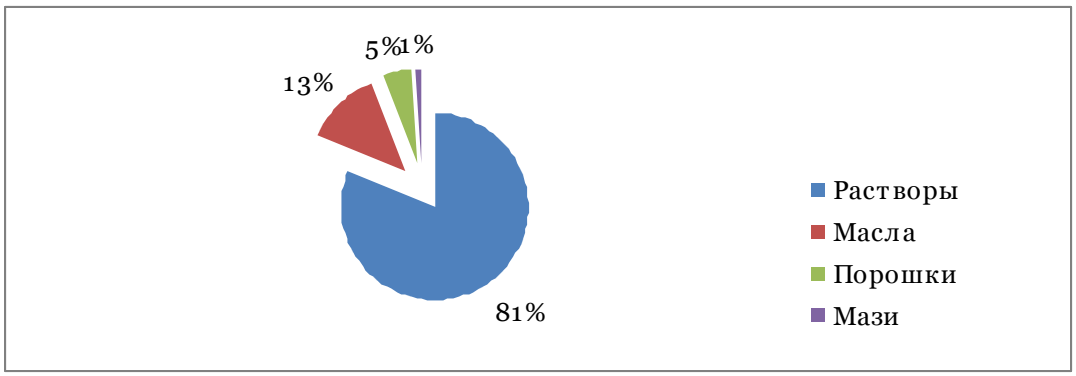


Рис. 1. Структура ассортимента экстемпорального изготовления для ЛПУ по видам лекарственных форм (2010 г.)

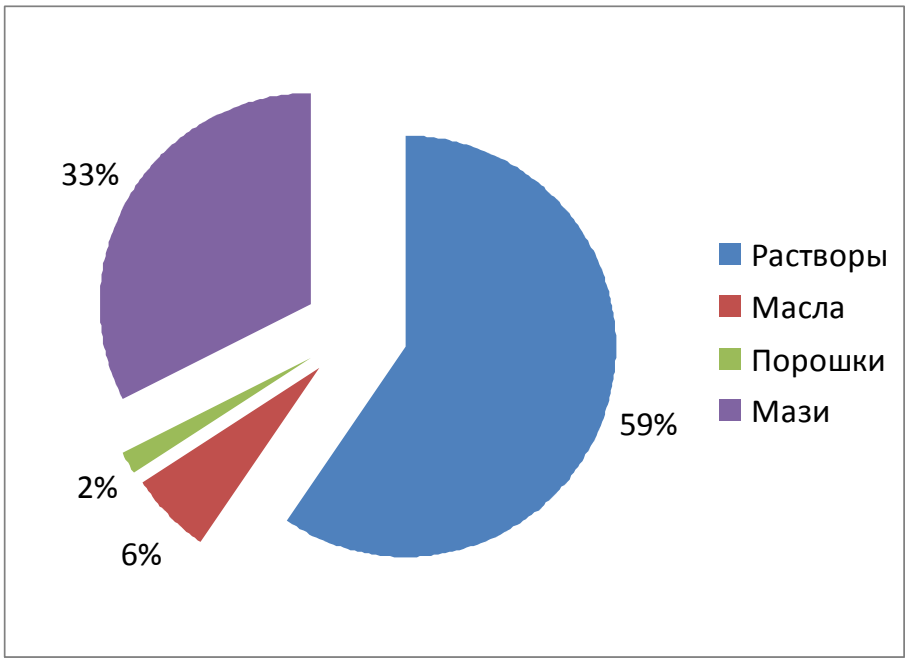


Рис. 2. Структура ассортимента экстемпорального изготовления для ЛПУ по видам лекарственных форм (2011-2012 гг.).

Представляло интерес исследование ассортимента наиболее широко изготовляемых в настоящее время экстемпоральных лекарственных форм с целью решения вопроса о возможности внедрения их в промышленное производство.

В ассортименте порошков широко представлена глюкоза по 30-50 г для приема внутрь при исследовании «сахарной кривой». Имеются также порошки для внутреннего применения у детей состава: димедрола 0,002 г, глюкозы 0,2 г. Данные лекарственные формы могут быть освоены промышленными предприятиями: глюкоза – производиться как в виде дозированных порошков, так и в виде брикетов для растворения, а димедрол в детской дозировке – в таблетках.

В ЛПУ востребован недозированный порошок цинка окиси для наружного применения, который также может быть выпущен в виде готовой лекарственной формы (порошок для наружного применения – присыпка).

Лидером ассортимента порошков является калия перманганат в фасовке преимущественно по 0,01 г для СПИД-укладки – для приготовления раствора, использующегося с целью постэкспозиционной профилактики ВИЧ-инфекции у медицинского персонала. Экстемпоральное изготовление данной лекарственной формы нельзя признать рациональным: операция отвешивания на аптечных весочках может быть проведена с достаточной точностью только при массе навески 0,05 г и более; кроме то-

го, калия перманганат медленно растворяется в воде комнатной температуры, и это увеличивает риск ожогов слизистых кристаллами лекарственного вещества при экстренном растворении субстанции медицинским персоналом во флаконе со стерильной водой дистиллированной и применении полученного раствора. По нашему мнению, при востребованности растворов калия перманганата, более целесообразным является использование растворов аптечного изготовления.

Однако нельзя не отметить, что в котировках присутствует также фасовка калия перманганата по 0,05 г.

Установлено, что в настоящее время для нужд ЛПУ изготавливаются преимущественно нестерильные растворы (68,02% от общего количества флаконов растворов).

В номенклатуре нестерильных растворов преобладают растворы различных объемов (100-400 мл) для электрофореза: магния сульфата 3 и 5%, меди сульфата 1%, натрия бромида 3%, калия йодида 2, 3 и 5%, кальция хлорида 5%, натрия тиосульфата 3%, новокаина 2 и 5%, цинка сульфата 3%, кислоты аминокапроновой 5%, эуфиллина 1%. Данная номенклатура должна привлечь внимание производителей готовых лекарственных средств, поскольку данные о стабильности водных растворов ряда лекарственных субстанций, позволяющие производить их стерилизацию без добавления стабилизаторов, обусловливают возможность перевода в промышленное производство таких прописей как растворы кальция хлорида 5% и магния сульфата 3-5%.

Аптеки изготавливают по заявкам ЛПУ раствор натрия гидрокарбоната 4% для ванночек, натрия хлорида 0,9% – для обработки слизистой и др.

В котировках представлены также коллоидные растворы протаргола – 1-5% и колларгола 1-5%.

Анализ котировок позволил выявить широкое использование в ЛПУ экстемпоральных водных растворов антисептических средств: йодопирона 1%, водорода перекиси 3,6%, серебра нитрата 33% – 5,0; фурацилина 0,02%, хлоргексидина биглюконата 0,25%, кислоты борной 1% и 2%, и растворы калия перманганата 0,5% – 100 мл, 6% – 100 мл, 5% – 10 мл и 5% – 400 мл. Наибольшее количество вопросов практических работников вызывают сроки годности растворов калия перманганата, приготовленных в асептических условиях, в особенности раствора калия перманганата 5% – 10 мл для обработки пуповины новорожденных детей, срок годности которых составляет 2 суток согласно приказу МЗ РФ № 214 от 16.07.1997 г. «О контроле качества лекарственных средств, изготовляемых в аптеках». В современных условиях, когда во многих ЛПУ отсутствует производственная аптека и на изготовление и поставку экстемпоральных лекарственных форм объявляются конкурсные торги, соблюдение сроков годности – 2 суток – становится весьма проблематичным. Таким образом, имеется острая необходимость пересмотра сроков годности лекарственных средств, изготовленных в аптеке, и, по возможности, замена нестабильных экстемпоральных лекарственных форм в стандартах лечения готовыми лекарственными средствами.

Нестерильные экстемпоральные растворы используются в ЛПУ не только с лечебными целями, но и при проведении диагностических процедур: изготавливается коллоидный раствор, применяемый при измерении внутриглазного давления контактным методом состава: колларгола 1,2, глицерина 0,9, воды очищенной до 10 мл.

Для кольпоскопий в котировках указываются раствор Люголя водный 1% (йода 1,0, калия йодида 2,0, воды очищенной до 100,0), который, в отличие от раствора Люголя глицеринового, не имеет промышленного аналога, и раствор кислоты уксусной 3%.

Водные растворы изготавливаются также для параклинических отделений ЛПУ: раствор формалина 10% для биопсий, раствор кислоты уксусной 70% для обработки физиотерапевтического кабинета, раствор формалина 10% для дезинфекции различных объектов, раствор калия хлорида 25% (реактив), раствор натрия цитрата 5% для стабилизации крови при исследовании системы гемостаза и раствор кислоты лимонной 50% для декальцификации гемодиализного оборудования.

Несмотря на уменьшение доли растворов в общей рецептуре, они составляют более половины ассортимента экстемпоральных лекарственных форм, изготавливаемых для нужд ЛПУ. Из данных исследованных котировок, представленных на рис. 3,

видно падение количества изготавливаемых флаконов в 2011-2012 гг., обусловленное, по-видимому, закупкой в ЛПУ инфузионных растворов и других жидких лекарственных форм промышленного производства.

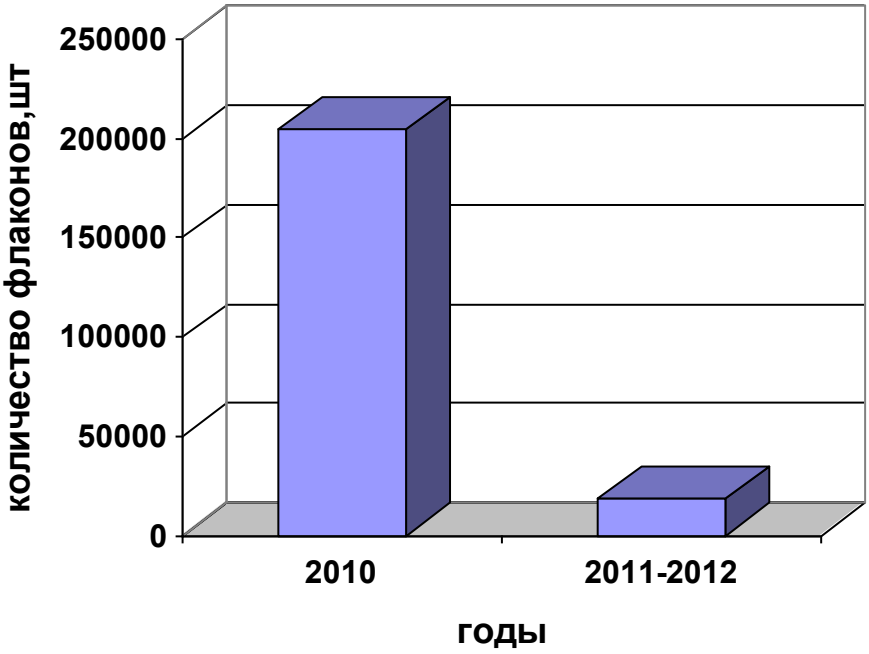


Рис.3. Динамика изготовления
экстемпоральных жидких лекарственных форм для ЛПУ

Значительную долю экстемпоральных лекарственных форм, изготавливаемых для ЛПУ, составляют инфузионные и другие стерильные растворы, не имеющие промышленных аналогов

Для питья новорожденным изготавливаются в фасовке по 10 мл стерильные растворы дибазола 0,01%, глюкозы 5%, натрия бромида 1%.

В котировках представлены вода для инъекций, а также инфузионные и инъекционные растворы различных объемов, отличающихся от имеющихся в промышленном производстве: натрия гидрокарбоната 3% и 4%, новокаина 0,5%, 1% и 2%, глюкозы 5% и 20%, калия хлорида 7,5% и 10%, кальция хлорида 1% и 3%, натрия хлорида 10%.

Изготовляются стерильные растворы для наружного применения: растворы натрия хлорида 10% и 20%, фурацилина 0,2%, хлоргексидина биглюконата 0,25% и 0,3% [3].

Ассортимент спиртовых растворов экстемпорального изготовления для ЛПУ невелик и представлен прописями антисептиков, например, раствора йода спиртового 5% – 3,5 мл, спирта этилового 70% – 50,0; раствора хлоргексидина биглюконата 20% – 1,25, спирта этилового 70% –50,0.

Весьма востребованы в ЛПУ стерильные масла и глицерин; в котировках представлены прописи: масло подсолнечное 10,0, масло вазелиновое 10,0 и 30,0 и глицерин 20,0, что свидетельствует о целесообразности промышленного производства данных лекарственных форм.

Мягкие лекарственные формы представлены мазями, содержащими дикаин, фурацилин, фурагин, гидрокортизон, трилон Б (для фонофореза). Значительное увеличение изготовления мазей для ЛПУ связано с ростом потребности в фасовке вазелина (100,0), в ряде котировок указывается «для обработки катетеров». Данная фасовка вазелина может быть внедрена в промышленное производство.

Технология изготовления экстемпоральных лекарственных форм для нужд ЛПУ не вызывает затруднений.

Представляют интерес прописи, в составе которых используются готовые лекарственные формы:

• Капли в нос (32 мл): раствора диоксидина 1% – 10,0, раствора адреналина 0,1% – 1,0, раствора димедрола 1% – 1,0, раствора ципрофлоксацина 2 мг/мл – 20,0. Данная лекарственная форма может быть изготовлена смешением стерильного раствора антисептика диоксидина, инъекционных растворов димедрола и ципрофлоксацина и раствора адреналина гидрохлорида.

• Мазь (наружно): гидрокортизона 125 мг (суспензия для инъекций 5 мл), фурагина 0,25 (5 таблеток фурагина 0,05), вазелина 100,0. Для предотвращения расслоения мази следует измельчить таблетки фурагина (в ступке, предназначенной для пахучих и красящих веществ), растереть с суспензией гидрокортизона и частями добавить вазелин. Однако проблема использования готовых лекарственных форм для экстемпорального изготовления требует правового решения.

Выводы:

1. Экстемпоральная рецептура для нужд ЛПУ представлена прописями лекарственных форм, не имеющими промышленных аналогов.

2. Установлены составы порошков, стерильных масел и глицерина, растворов для электрофореза, фасовки вазелина, перспективные для перевода в промышленное производство.

Литература

1. Об обращении лекарственных средств [Электронный ресурс] : Федер. закон от 12 апр. 2010 г. № 61-ФЗ // Консультант плюс. – Режим доступа : *http://*base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=LAW;n=107431.

2. Приказ МЗ РФ № 214 от 16.07.97 г «О контроле качества лекарственных средств, изготовляемых в аптеках».

3. Егорова, С.Н. Аптечное изготовление: лекарственные формы, не имеющие промышленных аналогов // Новая аптека. – М., 2007. – №6. – С. 39-42.

PHARMACY PRODUCTION OF DRUG FORMS FOR MEDICAL AND PREVENTIVE TREATMENT FACILITIES: STUDYING OF THE CURRENT NOMENCLATURE

R.R. SABIRJAN
S.N. EGOROVA

Kazan State Medical University

e-mail: zimsve@yandex.ru

The analysis of the current nomenclature of the drug forms made in pharmacy for needs of medical and preventive treatment facilities is carried out. Compositions of extemporal drug forms, prospective for transfer to industrial production, are established.

Key words: pharmacy, drug forms, pharmaceutical production.

УДК 615.453:615.225.2:614.27

ИНФОРМАЦИОННО-КОМПЬЮТЕРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: ИЗУЧЕНИЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИХ ПРЕДПОЧТЕНИЙ ПРОВИЗОРОВ-ТЕХНОЛОГОВ

Л.Н. МИНАПОВ
С.Н. ЕГОРОВА

Казанский государственный медицинский университет

e-mail: lnminapov@mail.ru

Исследование посвящено изучению информационно-компьютерного обеспечения аптечных организаций, потребительским предпочтениям в использовании автоматизированных систем управления фармацевтическими работниками с целью выявления потребностей в информационно-компьютерном обеспечении. Разработана анкета, содержащая 29 вопросов; респондентами выступили 112 фармацевтических работников первого стола; опрос проводился на базе Казанского государственного медицинского университета, аптек региона. Установленные предпочтения фармацевтических работников могут быть использованы фармацевтическими предприятиями, разработчиками автоматизированных системам управления (АСУ), руководителями оптовой и розничной торговли при разработке, использовании, модернизации, поиске и выборе автоматизированных систем управления.

Ключевые слова: АСУ, информационно-компьютерное обеспечение, потребительские предпочтения, анкета.

Стратегически важным направлением здравоохранения России является разработка и применение информационно-компьютерных технологий. Аптечным организациям необходимо следовать переменам и внедрять новые информационные технологии. При этом необходимо помнить, что потребительские свойства информационно-компьютерных технологий имеют стратегическое значение на всех этапах разработки и далее до позиционирования, конструирования, установления цены, поставки, рекламирования, сбыта, финансирования и технического обслуживания [1]. В условиях растущего рынка фармацевтической продукции врач, фармацевт, провизор или пациент оказывается перед различным выбором фармацевтических товаров, либо находится в полном отсутствии информации, либо не может до конца понять суть своей проблемы, и ему приходится осуществлять отбор оптимального варианта, часто основываясь на информации из электронных информационно-справочных средств [2].

Целью исследования явилось изучение потребительских предпочтений провизоров-технологов при работе с автоматизированными системами управления (АСУ) и выявление характера потребностей в информационно-компьютерных технологиях.

Материалы и методы. Для выявления потребительских предпочтений провизоров-технологов при работе АСУ и выявления потребностей в информационно-компьютерных технологиях использован метод социологических исследований – анкетирование. Для проведения данного исследования была составлена авторская анкета. Респондентами выступили провизоры-технологи, работающие за первым столом; опрос проводился на базе КГМУ и аптек региона (Республика Татарстан).

Дизайн исследования включал в себя следующие этапы:

- составление анкеты с помощью профессиональных социологов;
- формирование группы респондентов;
- анкетирование респондентов;
- обработка анкет;
- выявление потребительских предпочтений;
- выявление потребностей в информационно-компьютерных технологиях (ИКТ).

Обработка полученных результатов производилась с использованием стандартных возможностей MicrosoftOfficeExcel 2010.

Результаты и их обсуждение. В качестве основных признаков характеристики респондентов были использованы: пол, возраст, уровень образования, территориальная принадлежность, работа в сетевой или несетевой организации, должность. Большую часть респондентов составляли женщины (90% от общего числа респондентов). Среди проанкетированных потребителей превалировали люди от 20 до 25 лет – 62%. В аспекте территориальной принадлежности большая часть опрошенных принадлежала к г. Казань – 93%, к городам Татарстана и районным центрам – 7%. В опросе участвовали также руководители и владельцы аптечных организаций, их число составило 13%. Все опрошенные респонденты имели высшее образование. По общему стажу работы в аптечной организации распределение составило: до 2 лет – 75% опрошенных, от 2 до 8 лет – 11% и более 8 лет – 14% (рис. 1).

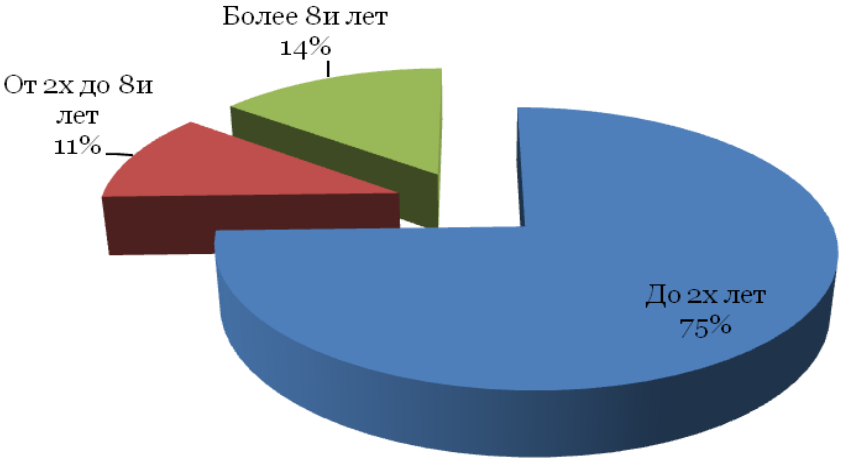


Рис. 1. Распределение респондентов по общему стажу работы в аптечной организации

Результаты опроса показали, что 56% из опрошенных провизоров считают, что организация достигла среднего успеха, 8% – не очень успешной и 28% считают организацию успешной, процветающей, лидером на рынке (рис. 2).

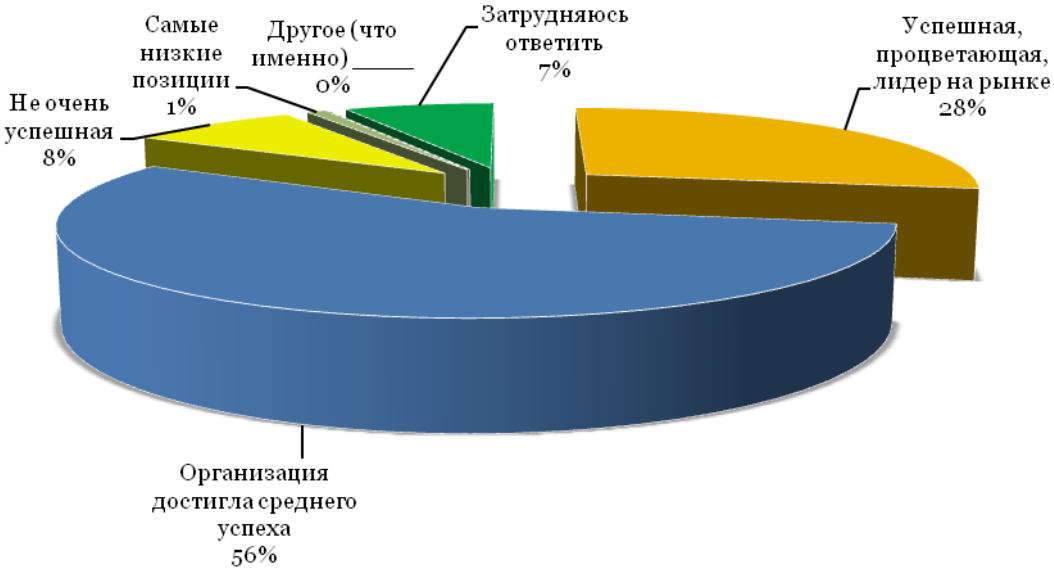


Рис. 2. Оценка конкурентоспособности аптеки на рынке фармацевтических услуг

При ответе на вопрос «Нравится ли Вам работать в данной аптечной организации?» по 7-балльной шкале оценок большинство респондентов – 36% – оценило работу в ней только на 5, 21% – на 6, 17% – на 4, 12% – на 7, 8% –на 3 (рис. 3).

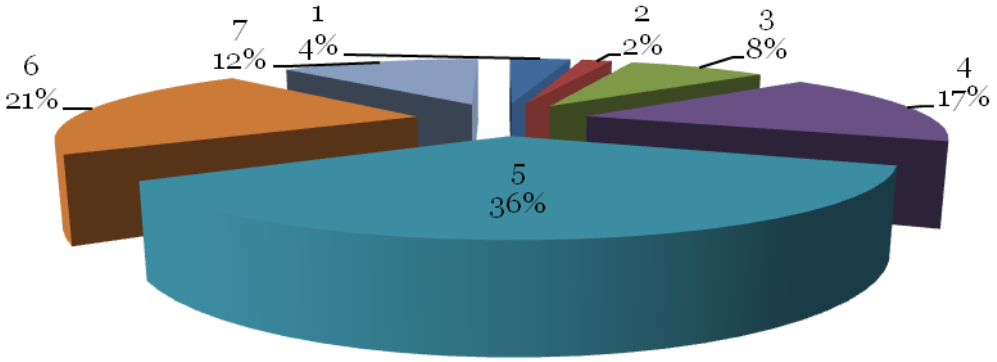


Рис. 3. Нравится ли Вам работать в данной аптечной организации?
(1 – совершенно не нравится, 7 – очень нравится)

Важным фактором в развитии социально ориентированного аптечного бизнеса в конкурентной среде являются изменения, так или иначе направленные на повышение качества работы. Установлено, что в большинстве случаев – 69% – прогрессирующие изменения касаются информационно-компьютерного оснащения аптечных организаций, 31% – изменения форм выкладки, регулярного обучения, введения независимой оценки качества работы (тайный покупатель).

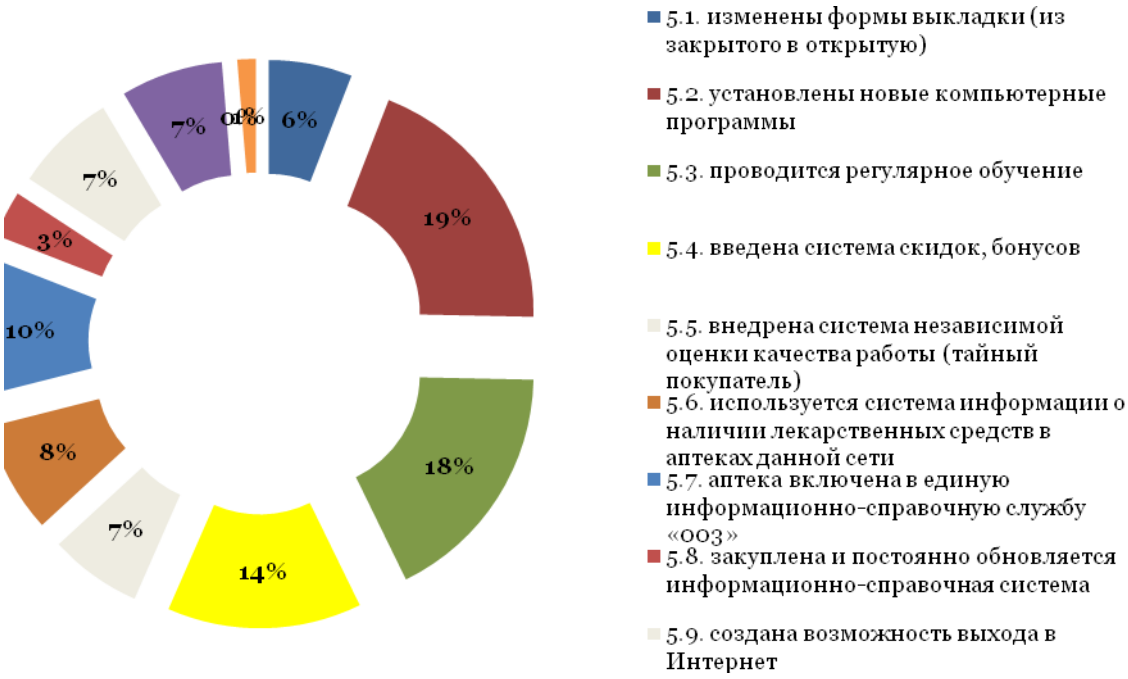


Рис. 4. Изменения в работе аптеки за последние годы,
так или иначе направленные на повышение качества работы

Выявилась положительная взаимосвязь использования компьютера в работе, предпочтения обращаться к электронному носителю при оказании фармацевтической помощи в аптеке на месте работы и предпочтения в целом электронного информационно-справочного носителя (рис. 5, 6, 7).

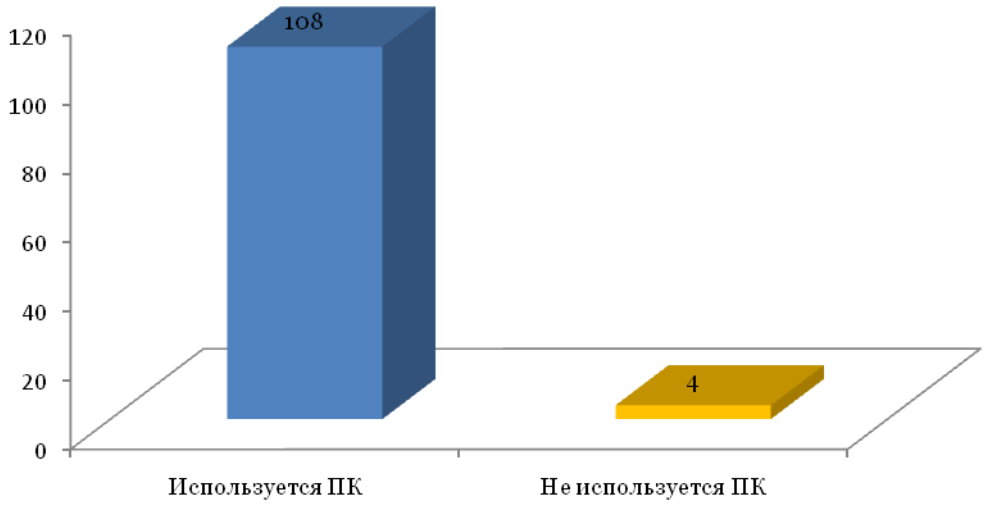


Рис. 5. Использование компьютера в работе

Рис. 6. Предпочтение носителя при фармацевтическом консультировании

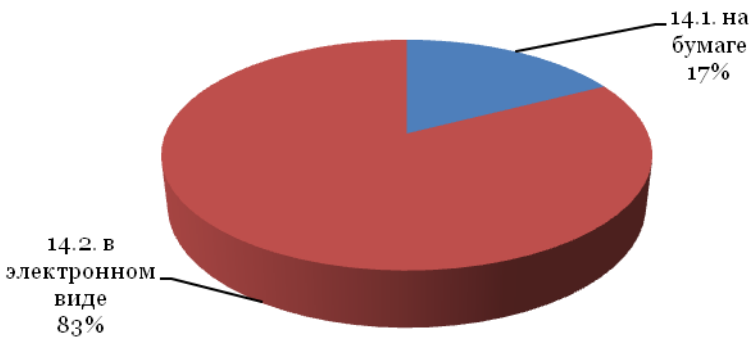


Рис. 7. Предпочтительный информационно-справочный носитель

Одной из важных задач данного исследования являлось изучение знаний работников первого стола об автоматизированных системах управления. При выявлении знания характеристики АСУ выяснилось, что более половины респондентов (56%) не знают АСУ, с которой они работают (рис. 8.).

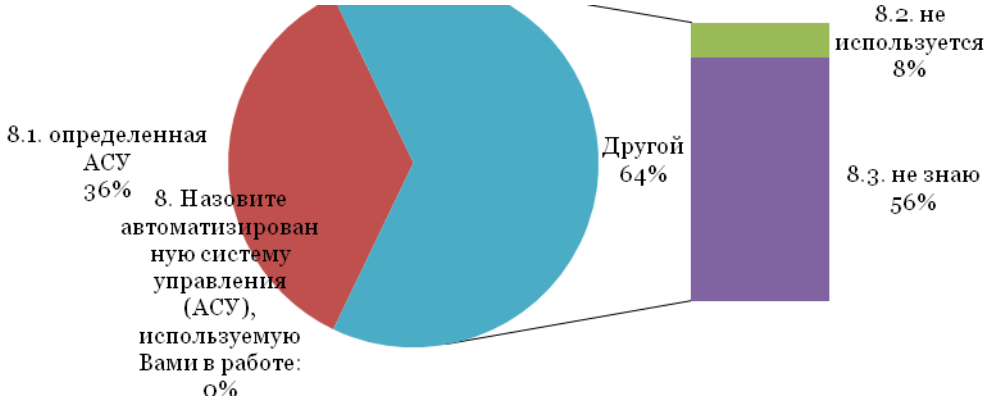


Рис. 8. Название АСУ

Следующей важной задачей было выявление необходимости использования стандартов при фармацевтическом консультировании и сопоставление возможности и желания работников первого стола при этом использовать информационно-компьютерные технологии. Выявлено, что 77% опрошенных нуждаются в стандартах и только 23% не нуждаются (рис. 9), и при этом 62% респондентов используют для лучшего консультирования уже имеющиеся свойства АСУ, которые отчасти входят в стандарты фармацевтического консультирования (рис. 10). Показательно, что только 5% респондентов не обращаются к информационно-справочным носителям (рис. 11). Установленные предпочтения фармацевтических работников можно использовать фармацевтическими предприятиями, разработчиками АСУ, руководителями оптовой и розничной торговли при разработке, использовании, модернизации, поиске и выборе автоматизированных систем управления.

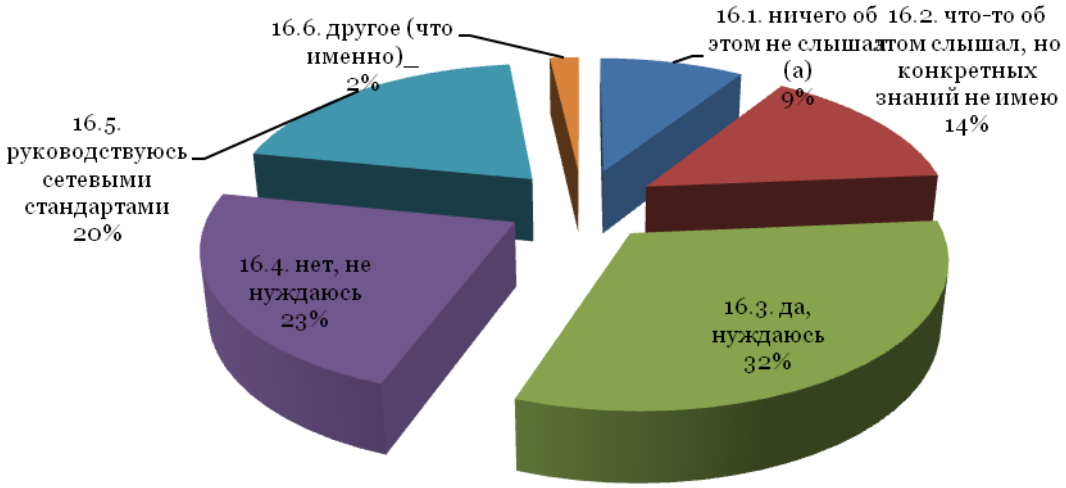


Рис. 9. Необходимость в стандартах фармацевтического консультирования

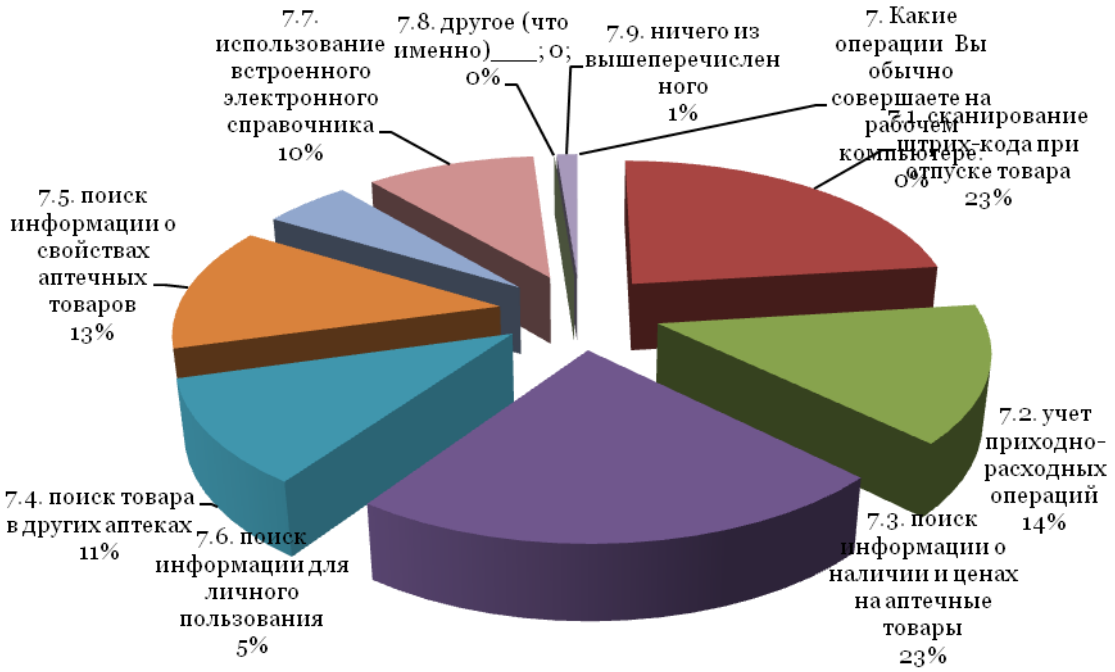


Рис. 10. Операции, совершаемые на рабочем компьютере

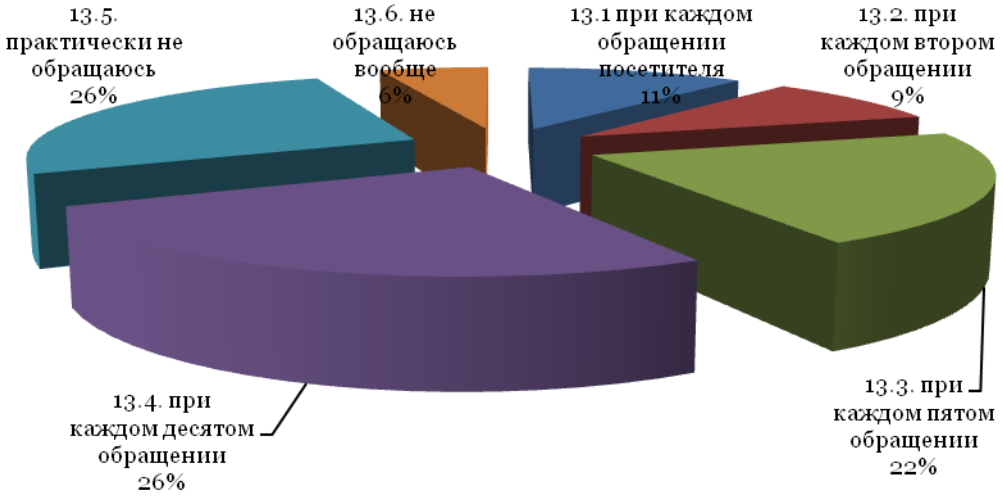


Рис. 11. Частота обращения к информационно-справочным носителям при фармацевтическом консультировании

Выводы.

1. В подавляющем большинстве аптечных организаций региона используются информационно-компьютерные технологии.

2. 70% провизоров-технологов при фармацевтическом консультировании используют электронный носитель информации и только 30% – бумажный.

3. 83% провизоров-технологов предпочитают электронный носитель информации и только 17% – бумажный.

4. Более половины провизоров-технологов нуждаются в стандартах фармацевтического консультирования; 23% считают, что не нуждаются.

Литература

1. Кобринский, Б.А. Медицинская информатика : учебник для студ. вузов / Б.А. Кобринский, Т.В. Зарубина. – М. : Академия, 2009. – 192 с.

2. Информационные технологии в управлении здравоохранением Российской Федерации : учебное пособие / В.Ф. Мартыненко, Г.М. Вялкова, В.А. Полесский и др. ; под ред. акад. РАМН А.И. Вялкова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 248 с.

INFORMATION AND COMPUTER SOFTWARE: THE STUDY OF CONSUMER PREFERENCES OF CHEMIST-TECHNOLOGISTS

L.N. MINAPOV
S.N. EGOROVA

Kazan State Medical University

e-mail: lnminapov@mail.ru

The research is devoted to the study of information and computer providing pharmacy organizations, consumer preferences in the use of automated control systems of pharmaceutical professionals, with a view to identification of needs in information and computer security. There is a questionnaire, containing 29 questions, the respondents were 116 pharmaceutical workers of the first table, the interview was conducted on the basis of Kazan State Medical University and the pharmacies of the region. The established preferences of pharmaceutical workers can be used by pharmaceutical companies, developers of automated control systems, the managers of wholesale and retail trade in the development, use, upgrade, search and selection of automated control systems.

Key words: automated control systems, information and computer software, consumer preferences, questionnaire.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ

УДК: 615.322:577.114

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ТРАВЫ ВЕРОНИКИ АВСТРИЙСКОЙ (VERONICA AUSTRIACA L.)

В.Н. БУБЕНЧИКОВА
Ю.А. КОНДРАТОВА

Курский государственный медицинский университет

e-mail:salvia_julia@mail.ru

В статье приведены результаты исследования полисахаридного комплекса Veronica austriaca L. Установлено, что углеводный комплекс надземной части Veronica austriaca L. представлен водорастворимыми полисахаридами, пектиновыми веществами, гемицеллюлозой А и Б; установлен их моносахаридный состав.

Ключевые слова: Veronica austriaca L., водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, гемицеллюлоза А и Б.

Вероника австрийская (Veronica austriaca L.) – многолетнее травянистое растение семейства норичниковые (Scrophulariaceae). В химическом плане данное растение изучено недостаточно. Имеются сведения лишь о содержании иридоидов в надземной части растения [3].

Цель нашей работы заключалась в выделении и исследовании полисахаридного комплекса травы вероники австрийской.

Материалы и методы. Объектом исследования служила измельченная воздушно-сухая трава вероники австрийской, заготовленная в 2011 году в Курской области в период массового цветения растения.

Для выделения полисахаридного комплекса воздушно-сухое измельченное сырье предварительно обрабатывали 70% спиртом этиловым для удаления полифенольных соединений.

Из шрота, оставшегося после получения полифенольных соединений, последовательно выделяли водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПС), пектиновые вещества (ПВ) и гемицеллюлозы (Гц А, Гц Б).

Воздушно-сухой шрот экстрагировали водой в соотношении 1:20 к массе сырья при нагревании до 95° С в течение 1 часа при постоянном перемешивании. Повторное извлечение полисахаридов проводили дважды водой в соотношении 1:10. Растительный материал отделяли центрифугированием, и объединенные экстракты упаривали до 1/5 первоначального объема. Полисахариды осаждали тройным объемом 96% спирта этилового при комнатной температуре. Выпавший плотный осадок полисахаридов отделяли, промывали 70% спиртом этиловым, ацетоном. Полученные ВРПС лиофильно высушивали [1].

Из шрота, оставшегося после получения ВРПС, выделяли ПВ. Экстракцию сырья проводили смесью 0,5% растворов кислоты щавелевой и аммония оксалата (1:1) в соотношении 1:20 при 80-85° С в течение 2 часов. Повторное извлечение проводили дважды в соотношении 1:10, с последующим осаждением их 96% спиртом этиловым [1, 4].

Шрот, оставшийся после выделения ПВ, заливали пятикратным объемом 10 % водного раствора щелочи и оставляли при комнатной температуре на 12 часов. Затем отфильтровывали через четыре слоя марли. К полученному фильтрату прибавляли два объема кислоты уксусной. Образовавшийся осадок отфильтровывали через фильтр. На фильтре получился осадок Гц А в виде зеленовато-коричневой массы. К фильтрату добавляли двукратный объем 96% спирта этилового для осаждения Гц Б. Полученный осадок отфильтровывали через фильтр, промывали спиртом этиловым, высушивали [2].

Для установления моносахаридного состава ВРПС, ПВ, Гц А и Б проводили их гидролиз 2Н кислотой серной. Навески веществ (0,05) помещали в ампулу емкостью 5-10 мл, прибавляли 2,5 мл раствора кислоты серной, запаивали ампулы и гидролизовали при температуре 100-105° С в течение 6 часов (для ВРПС), 24 часов (для ПВ) и 48 часов (для Гц А, Гц Б). Гидролизат нейтрализовали бария карбонатом по универсальному индикатору до нейтральной реакции, отфильтровали и осаждали спиртом этиловым 96%. Образовавшийся осадок обрабатывали катионитом КУ-2 до кислой реакции. Разделение и идентификацию нейтральных моносахаридов проводили методом нисходящей хроматографии на бумаге в системе растворителей н-бутанол-пиридин-вода (6:4:3) параллельно со стандартными образцами сахаров. Кислые моносахара разделяли в системе этилацетат – кислота муравьиная – вода – кислота уксусная (18:1:4:3). Проявитель – анилинфталат, температура проявления 100° С, длительность проявления 10-15 минут [1, 2].

Определение количественного содержания сахаров в гидролизатах полисахаридов проводили денситометрически после хроматографии их в тонком слое сорбента [1].

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что полисахариды вероники австрийской представлены 4 фракциями: ВРПС, выход которых составил 5,72%, ПВ – 16,03 %, Гц А – 9,33%, Гц Б – 1,86% от воздушно-сухого сырья.

Методом хроматографии на бумаге параллельно с достоверными образцами сахаров в исследуемом ВРПС идентифицировали глюкозу, галактозу, арабинозу, рамнозу, ксилозу и глюкуроновую кислоту, с преобладанием галактозы, арабинозы, рамнозы. В выделенных ПВ преобладающей является галактуроновая кислота, кроме того, в них обнаружены и нейтральные моносахариды – глюкоза, ксилоза и рамноза.

В гидролизате Гц А и Гц Б обнаружены ксилоза, глюкоза, галактоза, арабиноза, рамноза. По величине пятен и интенсивности их окраски преобладающим моносахаридом является ксилоза, что указывает на наличие полисахаридов типа ксиланов.

Денситометрически в гидролизатах полисахаридных комплексов было установлено количественное содержание моносахаров (табл.).

Таблица

Содержание моносахаридов в полисахаридном комплексе травы вероники австрийской

Наименование моносахаров	Моносахаридный состав, %			
	ВРПС	ПВ	Гц А	Гц Б
арабиноза	32,4	—	1,6	1,8
галактоза	22,8	—	2,3	2,5
глюкоза	2,1	2,4	3,4	3,8
ксилоза	1,2	1,5	7,5	8,0
рамноза	3,4	1,2	1,1	1,2
галактуроновая кислота	—	85,34	—	—
глюкуроновая кислота	3,2	—	—	—

Выводы.

- Таким образом, впервые из травы вероники австрийской выделены по фракциям и изучены полисахариды.

- Установлен качественный состав ВРПС, ПВ, Гц А и Гц Б. Преобладающими моносахарами в ВРПС являются галактоза (22,8%), арабиноза (32,4%) и рамноза (3,4%), основу пектиновых веществ составляет галактуроновая кислота (85,34%), основу Гц А и Гц Б – ксилоза (7,5% и 8,0% соответственно).

Литература

1. Бубенчиков, Р.А. Изучение полисахаридного состава фиалки полевой / Р.А. Бубенчиков // 3-й Российский гомеопатический съезд : сб. науч. тр. – М., 2007. – С. 165-166.
2. Лигай, Л.В. Изучение углеводов *Malva neglecta L.* / Л.В. Лигай, Д.А. Рахимов, В.А. Бандюкова // Химия природных соединений – 1989. – № 2. – С. 280-281.
3. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Carifoliaceae – Plantaginaceae / отв. ред. П.Д. Соколов ; Академия наук СССР, Ботанический институт им. В.Л. Комарова – Л. : Наука, Ленингр. отд-е, 1990. – 173-182 с.
4. Степаненко, Б.Н. Химия и биохимия углеводов. Полисахариды / Б.Н. Степаненко. – М., 1978. – 256 с.

THE INVESTIGATION OF POLYSACCHARIDE COMPLEX ISOLATED FROM ABOVE-GROUND PART OF VERONICA AUSTRIACA L.

V. N. BUBENCHICOVA
Yu. A. KONDRATOVA

Kursk State Medical University

e-mail:salvia_julia@mail.ru

The results of investigation of polysaccharide complex of Veronica austriaca L. are viewed in the article. It has been established that the polysaccharide complex of above-ground part is presented by water-soluble polysaccharides, pectins, hemicellulose A and B, besides their monosaccharide composition has been determined.

Key words: Veronica austriaca L., water-soluble polysaccharides, pectins, hemicellulose A and B.

УДК 615.322:582.948.25

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ФЛАВОНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕДУНИЦЫ НЕЯСНОЙ

В.С. КАЗАКОВА
О.О. НОВИКОВ
Д.И. ПИСАРЕВ
Н.Н. ШЕСТОПАЛОВА
Д.А. ФАДЕЕВА

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: kazakova@bsu.edu.ru

В статье приведены результаты качественного состава флавоноидов листьев медуницы неясной методом бумажной хроматографии. С достоверными образцами, идентифицированы рутин и цинарозид. Подобраны оптимальные условия и разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях медуницы неясной спектрофотометрическим методом. Установлено, что содержание суммы флавоноидов составляет 0,33%-0,48%.

Ключевые слова: флавоноиды, медуница неясная, рутин, цинарозид.

Введение. Актуальность использования лекарственных средств на основе растительного сырья неизмеримо возросла в последние десятилетия. Лечение растениями и фитопрепаратами прошло испытание временем и в настоящее время получило признание в медицине во всем мире. Существенным преимуществом растений перед синтезированными лекарственными средствами является наличие в них естественного комплекса биологически активных веществ в наиболее доступной и усвояемой форме, а также наиболее благоприятного для организма человека соотношения основных компонентов, свойственных живой природе в целом.

Это и предопределило резкое увеличение потребности в растительном лекарственном сырье, вызвало необходимость более пристального изучения естественных ресурсов, химического состава растительного сырья и рационального использования лекарственных растений в лечебных целях.

Наиболее продуктивным способом расширения номенклатуры лекарственного растительного сырья является исследование с доказательством возможности медицинского применения малоизученных видов растений, к числу которых относится медуница неясная (Pulmonaria obscura L.).

Медуница неясная (Pulmonaria obscura L.) – многолетнее травянистое растение семейства Бурачниковые (Boraginaceae) высотой 8-30 см, с толстым бурым корневищем и многочисленными придаточными корнями. Листья цельнокрайние, заостренные, короткожестковолосистые, иногда с беловатыми пятнами. Цветки на коротких цветоножках собраны в немногоцветковые, часто парные завитки, иногда собранные на верхушке стебля в щиток. Плод – сухой, состоящий из четырех орешков, заключенных в колокольчатую чашечку. Широко распространено в областях Центральной России, является официнальной в ряде стран и используется в качестве отхаркивающего, смягчающего, вяжущего антигеморрагического средств [4, 6].

На территории Центральной России произрастают медуница неясная, медуница узколистная, химический состав которых практически не изучен [5].

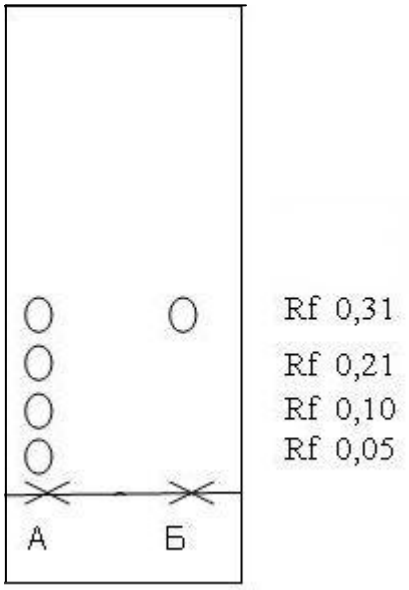
Целью настоящей работы явилось обоснование возможности использования листьев медуницы неясной в качестве перспективного источника флавоноидных соединений.

Для реализации поставленной цели необходимо было изучить качественный состав флавоноидов и определить их содержание в выбранном объекте.

Методики исследования. Объектом исследования служили прикорневые листья медуницы неясной (Pulmonaria obscura Dumort.)

На первом этапе исследований нами было проведено изучение качественного состава флавоноидов медуницы неясной. Для выделения суммы флавоноидов измель-

чённое воздушно-сухое сырьё листьев медуницы неясной в количестве 50,0 г экстрагировали методом циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета до полного истощения сырья. Полученное извлечение сгущали под вакуумом с помощью ротационного испарителя ИР-1, остаток растворяли в 4-кратном количестве воды очищенной и оставляли в холодильнике на 72 часа. Выпавший осадок липофильных веществ, отфильтровывали и полученную сумму обрабатывали в делительной воронке хлороформом. Маточник после экстрагирования хлороформом обрабатывали этилацетатом до обесцвечивания этилацетатного слоя. В дальнейшем для изучения флавоноидного состава использовали этилацетатное извлечение, которое упаривали под вакуумом в ротационном испарителе ИР-1. Полученный остаток растворяли в минимальном количестве спирта этилового 96% и сумму флавоноидов переосаждали хлороформом. Состав флавоноидов изучали методом бумажной хроматографии. Хроматографирование проводили на бумаге хроматографической Filtrek FN-11 в системах растворителей: 15% раствор кислоты уксусной, н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2), бензол – этилацетат – кислота уксусная ледяная (50:50:1) с достоверными образцами свидетелей флавоноидов. В качестве проявителя использовали пары аммиака и 2% раствор циркония хлорокиси в спирте этиловом 96% (реактив Херхаммера). [1]. Таким образом, было установлено наличие 4 веществ с Rf 0,05, Rf 0,10, Rf 0,21, Rf 0,31 в виде пятен с желтой флуоресценцией, отнесенных к флавоноидным соединениям. С достоверными образцами идентифицировали лютеолин-7-глюкозид или цинарозид и рутин (рис. 1).



А – медуница неясная
Б – цинарозид и рутин
Система растворителей: 15% кислота уксусная

Рис. 1. Схема бумажной хроматограммы спирто-водных извлечений из листьев медуницы неясной

Присутствие данных компонентов в составе листьев медуницы неясной подтверждено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на основании совпадения времени удерживания анализируемых образцов и достоверно известных свидетелей флавоноидов.

В основу количественного определения флавоноидов в сырье в пересчете на лютеолин-7-гликозид положен метод спектрофотометрического анализа в непосредственном извлечении из сырья, основанный на химическом взаимодействии флавоноидов с алюминия хлоридом безводным в среде кислоты хлористоводородной разведенной с образованием окрашенных продуктов – хелатных комплексов. При этом максимум поглощения первой полосы смещается на 35-50 нм к видимой области (батохромный сдвиг), по сравнению с исходным флавоноидом. При добавлении кислоты хлористоводородной нестабильные комплексы в орто-дигидроксигруппах разрушаются, а

комплексы между карбонильной группой при С4 и гидроксильными группами при С3 и С5 сохраняются [3].

У спиртовых извлечений из исследуемых образцов максимум поглощения при добавлении AlCl3+HCl находился при 400 нм (рис. 2).

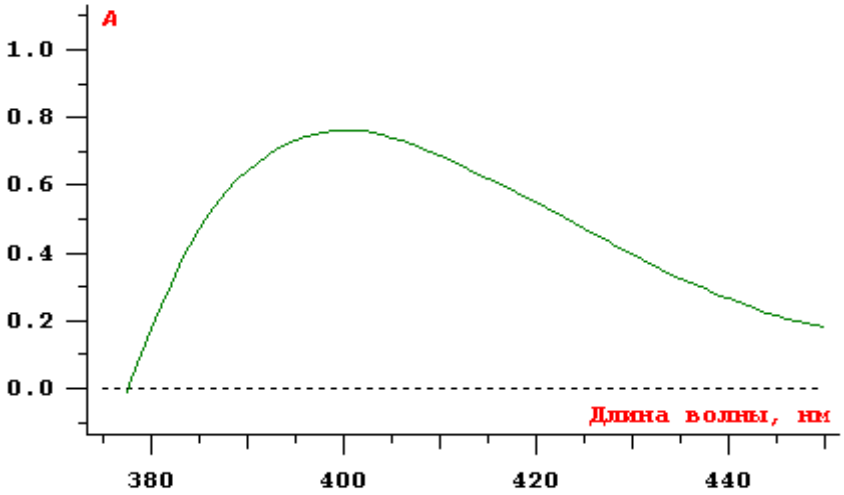


Рис. 2. УФ-спектр комплекса спиртового извлечения из листьев медуницы неясной с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида

Аналогичный максимум поглощения отмечен для комплекса ГСО лютеолин-7-гликозида (цинарозида) с AlCl3+HCl [2].

Изучены условия извлечения флавоноидов из сырья, установлено, что оптимальным экстрагентом является спирт этиловый 70%. Соотношение сырья и общего объема экстрагента 1:100, время четырехкратного извлечения на кипящей водяной бане 120 минут.

Точную навеску сырья в количестве 1,0 г, измельченного до размера частиц 1-3 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 25 мл спирта этилового 70%, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и содержимое фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Далее указанным выше способом экстракцию повторяли ещё 3 раза тем же экстрагентом. Извлечения фильтровали в ту же мерную колбу. Объем фильтрата доводили до метки 70% спиртом. Полноту извлечения флавоноидов из сырья подтверждали отрицательной цианидиновой пробой.

2,5 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 96% и 2 капли разведенной кислоты уксусной. Объем раствора доводили спиртом этиловым 96% до метки и оставляли на 45 минут. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2,5 мл извлечения, 2 капель разведенной кислоты уксусной, и доводили спиртом этиловым 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

С целью пересчета содержания суммы флавоноидов на цинарозид использован удельный показатель поглощения, заимствованный из литературных источников. Согласно найденным данным удельный показатель поглощения комплекса раствора ГСО цинарозида с алюминия хлоридом при аналитической длине волны 400 нм составляет 145,0±2,3. На этом основании в формулу расчета включено теоретическое значение Е1%1см = 145.

Расчет полученных результатов вели по формуле:

$$X = \frac{A_x \times W \times W_2}{E_{\%}^{1\tilde{n}\grave{i}} \times m \times V_a},$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; W, W2 – разведения, мл; E – удельный показатель поглощения стандартного раствора цинарозида, равный 145; m – масса навески исследуемого сырья, г; Va – объем аликвоты, мл.

Результаты исследования и обсуждение. Результаты статистической обработки данных 7 параллельных измерений показали, что содержание флавоноидов в листьях медуницы неясной в пересчете на лютеолин-7-глюкозид (цинарозид) составило 0,485±0,016%, ошибка единичного определения при доверительной вероятности 95% находилась в пределах ±3,4% (см. табл.).

Таблица

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в листьях медуницы неясной в пересчете на лютеолин-7-гликозид

X(%)	$\overline{X} - X_i$	$(\overline{X} - X_i)^2$	Метрологические характеристики
0,47	0,015	0,000225	$\overline{X} =$ 0,485%
0,49	0,005	0,000025	$\sum(\overline{X} - X)^2 =$ 0,001775
0,49	-0,005	0,000025	$S_x = \sqrt{\frac{\sum(\overline{X} - X_i)^2}{n(n-1)}} =$ 0,0065
0,51	-0,025	0,000625	$\Delta X = S_x \cdot t_x =$ 0,016
0,46	0,025	0,000625	ε = 3,44%
0,50	-0,015	0,000225	
0,48	0,005	0,000025	
X= 0,485		Σ=0,001775	

Таким образом, на данном этапе химических исследований листьев медуницы неясной удалось установить наличие двух флавоноидов – лютеолин-7-глюкозида (цинарозида) и рутина методом бумажной хроматографии, что нашло подтверждение в результатах высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определено количественное содержание флавоноидов в исследуемом сырье в пересчете на лютеолин-7-глюкозид, которое составило 0,485±0,016%.

Таким образом, на основании полученных результатов можно утверждать о перспективности данного сырья как источника флавоноидов и рекомендовать его для дальнейших химических и фармакологических испытаний.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, Государственный контракт № П425 от 12 мая 2010 г., тема проекта: «Разработка методик выделения и определения полифенольных соединений классов фитоалексинов, каротиноидов и антоцианов и технологии создания лекарственных форм на их основе».

Литература

1. Бандюкова, В.А. Тонкослойная хроматография флавоноидов / В.А. Бандюкова, А.А. Шинкаренко // Химия природных соединений. – 1983. – №1. – С.20

2. Беликов, В.В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидов / В.В. Беликов, Т.В. Точкова // Фенольные соединения и их физиологические свойства. – Алма-Ата, 1973. – С. 168-172.

3. Беликов В.В. Методы анализа флавоноидных соединений / В.В. Беликов, М.С.Шрайбер // Фармация. – 1970. – № 1. – С. 68-72.

4. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И.А. Губанов, К.В. Кисилева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. – М. : Тов-во науч. изданий КМК, Ин-т технолог. исследований, 2002. – Т.3. – С.104-105.

5. Полуянов, А.В. Сосудистые растения Курской области : учебное пособие/ А.В. Полуянов, Н.А. Прудников. – Курск : КГУ, 2005. – 80 с.

6. British Herbal Pharmacopoeia – Bournemouth, BПМА, 1983. – 212 p.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF PULMONARIA OBSCURA'S FLAVONOID COMPOUNDS

V.S. KAZAKOVA
O.O. NOVIKOV
D.I. PISAREV
N.N. SHESTOPALOVA
D.A. FADEEVA

Belgorod National Research University

e-mail: kazakova@bsu.edu.ru

Qualitative composition of flavonoids of Pulmonaria obscura's leaves was studied by paper chromatography. Rutin and cinarozide were identified there. Optimum conditions and methodology to quantify the amount of flavonoids in leaves of Pulmonaria obscura by spectrophotomric method are selected. It is estimated that the amount of flavonoids is 0,33% - 0,48%.

Key words: flavonoids, Pulmonaria obscura, rutin, cinarozide.

УДК 615.015.11.07.322:582.918:577.127.4

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИСТЬЕВ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ»

Г.М. ЛАТЫПОВА[1]
В.Н. БУБЕНЧИКОВА[2]
З.Р. РОМАНОВА[1]
Д.Ф. ГАЛИМОВА[1]

[1] Башкирский государственный медицинский университет

[2] Курский государственный медицинский университет

e-mail: primula17@rambler.ru

Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета весеннего, основанная на цветной реакции аскорбиновой кислоты с фосфорно-молибденовым комплексом.

Проведена валидация методики по показателям правильности, сходимости, воспроизводимости, специфичности, линейности.

Ключевые слова: листья первоцвета весеннего, методика количественного определения аскорбиновой кислоты.

Листья первоцвета весеннего (лекарственного) (Primula veris L., или P. officinalis (L.) Hill.), семейства первоцветных (Primulaceae) разрешены к применению в качестве поливитаминного пищевого растительного сырья [4]. Существующая отечественная нормативная документация (НД) на листья первоцвета весеннего (ГОСТ 3166-76) оценивает качество сырья по содержанию аскорбиновой кислоты и числовых показателей: влажности, массовой доли общей золы, массовой доли других частей растения и посторонних примесей [2]. ГОСТ 3166-76 предусматривает количественное определение аскорбиновой кислоты титриметрическим методом с использованием 0,001 н раствора 2,6-дихлофенолиндофенолята натрия в кислой среде. Данная методика затрудняет определение аскорбиновой кислоты в связи со сложностью фиксирования точки перехода окраски титранта из-за собственного окрашивания водного извлечения из сырья. Поэтому для количественного определения аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета весеннего нами разработана спектрофотометрическая методика, основанная на цветной реакции аскорбиновой кислоты с фосфорно-молибденовым комплексом, который показал близкие результаты определения в сравнении с титриметрическим методом [3, 5, 6].

Экспериментальная часть. Для разработки методики использовали листья первоцвета весеннего, заготовленные в Курской, Белгородской областях России и в некоторых районах республики Башкорстостан.

Определение оптимальных условий экстракции кислоты аскорбиновой из листьев первоцвета проводили на одном образце сырья.

При разработке методики изучены и определены оптимальные условия экстракции аскорбиновой кислоты из листьев первоцвета: степень измельчения сырья – 1 мм, экстрагент – 40% спирт этиловый, нагревание на кипящей водяной бане – 30 мин., соотношение сырье-экстрагент – 1:100. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышала 4,48 %.

Методика количественного определения кислоты аскорбиновой. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 2,0 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 40% раствора спирта этилового, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на водяной бане в течение 30 мин. Экстракцию 40% спиртом этиловым повторяли еще два раза по 50 мл в течение 30 мин каждый раз. Полученные извлечения объединяли, фильтровали через бумажный фильтр (раствор А). В колбу вместимостью 50 мл помещали 20 мл

раствора А, прибавляли 20 мл 96% спирта этилового, перемешивали и через 10 мин фильтровали через бумажный фильтр (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мл раствора Б и доводили объем раствора до метки, перемешивали (раствор В).

В три колбы вместимостью по 50 мл помещали: в первую 10 мл раствора В, во вторую 10 мл раствора рабочего стандартного образца (РСО) кислоты аскорбиновой и в третью 10 мл воды. В каждую колбу прибавляли по 10 мл раствора натрия фосфорномолибдата, нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 10 мин и быстро охлаждали под струей холодной воды. Оптическую плотность испытуемого раствора (колба 1) и раствора РСО кислоты аскорбиновой (колба 2) измеряли на спектрофотометре при длине волны 730 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор из третьей колбы.

Содержание кислоты аскорбиновой в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 150 \cdot 40 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 20 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца (РСО) кислоты аскорбиновой; m – масса сырья в граммах; m_0 – масса РСО кислоты аскорбиновой в граммах; W – влажность сырья в процентах.

Приготовление раствора РСО кислоты аскорбиновой. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещали около 0,05 г (точная навеска) кислоты аскорбиновой (ФС 42-2668-95), высушенной до постоянной массы при температуре от 100° до 105° С, растворяли в 30 мл воды, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 1). Срок годности раствора 1–3 суток.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 5 мл раствора 1, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 2). Раствор использовали свежеприготовленным.

Приготовление раствора натрия фосфорномолибдата. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещали 0,05 г натрия фосфата двузамещенного (ГОСТ 4172-76), растворяли в 100 мл воды, прибавляли 10 мл кислоты серной концентрированной, 50 мл воды и 0,8 г аммония молибдата. Объем раствора доводили водой до метки и тщательно перемешивали. Срок годности раствора – 3 месяца.

Таблица 1

Результаты анализа модельных смесей с РСО кислоты аскорбиновой

№	Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси (кислота аскорбиновая), мг	Экспериментально найденное значение (кислота аскорбиновая)	
		абсолютная величина, мг	процент восстановления, %
1	9,00	9,08	100,89
2	9,00	9,16	101,78
3	9,00	8,94	99,33
4	12,00	11,8	98,33
5	12,00	11,89	99,08
6	12,00	11,91	99,25
7	15,00	14,86	99,07
8	15,00	15,07	100,47
9	15,00	14,81	98,73
Средний процент восстановления для 3 концентраций в трех повторностях			99,66

Валидацию методики проводили методом математической статистики по показателям: правильность, прецизионность, специфичность [1].

Правильность методики устанавливали на модельных смесях с РСО кислоты аскорбиновой. Модельные смеси готовили трех концентраций с содержанием кислоты аскорбиновой в % к исходной концентрации 75, 100, 125. Определение проводилось в трех повторностях для каждой концентрации (табл. 1).

Полученный средний процент восстановления для трех концентраций в трех повторностях составил 99,66, что соответствует критериям приемлемости (100±2%).

Таблица 2

Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)

Содержание кислоты аскорбиновой в аликвоте, мкг	Добавлено РСО кислоты аскорбиновой, мкг	Ожидаемое содержание, мкг	Полученное содержание, мкг	Ошибка, %	
				абс., мкг	отн., %
421,47 421,47 421,47	50 50 50	471,47 471,47 471,47	475,12 473,90 466,87	+ 3,65 + 2,43 –4,60	0,77 0,52 0,98
421,47 421,47 421,47	100 100 100	521,47 521,47 521,47	518,67 529,19 530,56	+2,80 +7,72 +9,09	0,54 1,48 1,74
421,47 421,47 421,47	150 150 150	571,47 571,47 571,47	563,18 582,19 560,89	–8,29 +10,72 –10,58	1,45 1,88 1,85

Достоверность методики определения подтверждена опытами с добавками РСО кислоты аскорбиновой. Испытание проводилось на одном образце листьев первоцвета весеннего в 3 концентрациях с добавками РСО кислоты аскорбиновой в трех повторностях (табл. 2).

Таблица 3

Результаты количественного определения кислоты аскорбиновой в разные дни

Образец №	Содержание кислоты аскорбиновой, %	Стандартное отклонение S	Относительное стандартное отклонение RSD, %
1-й день			
1	2,54		
2	2,58		
3	2,47		
4	2,49		
5	2,55		
6	2,59		
среднее	2,54	0,04806	1,89
2-й день			
1	2,57		
2	2,63		
3	2,61		
4	2,55		
5	2,52		
6	2,65		
среднее	2,59	0,04494	1,74

Относительная ошибка опытов с добавками находилась в пределах случайной ошибки предложенных методик, что свидетельствует об отсутствии ошибки систематической.

Испытания прецизионности (сходимости) проводились в разные дни одним и тем же специалистом на одном образце сырья листьев первоцвета весеннего в шести повторностях с использованием спектрофотометра «СФ-46» (табл. 3).

Относительное стандартное отклонение RSD не превысило 2 %.

Воспроизводимость методики количественного определения проводилась на одном образце листьев первоцвета весеннего в двух лабораториях на приборах «СФ-46» и «СФ-26» в шести повторностях (табл. 4).

Таблица 4

Результаты количественного определения кислоты аскорбиновой в разных лабораториях

Истинное значение определяемой величины			
образец №	содержание кислоты аскорбиновой, %	стандартное отклонение S	относительное стандартное отклонение RSD, %
Лаборатория № 1			
1	2,61		
2	2,65		
3	2,58		
4	2,59		
5	2,64		
6	2,71		
среднее	2,63	0,04775	1,82
Лаборатория № 2			
1	2,72		
2	2,69		
3	2,76		
4	2,70		
5	2,67		
6	2,79		
среднее	2,72	0,04538	1,67

Относительное стандартное отклонение RSD не превысило 3 %.

Специфичность определялась визуально – отсутствие отклика при отсутствии анализируемого вещества. При прибавлении дистиллированной воды (вместо раствора кислоты аскорбиновой) к раствору натрия фосфорномолибдата и нагревании на кипящей водяной бане в течение 10 мин синего окрашивания не наблюдалось.

Линейность методики исследовали в диапазоне концентраций РСО кислоты аскорбиновой от 80 до 120% от теоретического содержания кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего (табл. 5, рис.).

Установлено, что требования к параметрам линейной зависимости выполняются, т.е. линейность методики определяется в диапазоне концентраций от 80 до 120% от теоретического содержания кислоты аскорбиновой. Коэффициент корреляции составляет 0,99889.

Таблица 5

Результаты определения линейности валидируемой методики

Оптическая плотность, D	Концентрация кислоты аскорбиновой, мкг/мл	Коэффициент корреляции	y = b·x + a	
			b	a
0,289	2,4	0,99889	0,107	0,0292
0,318	2,7			
0,356	3,0			
0,395	3,3			
0,429	3,6			

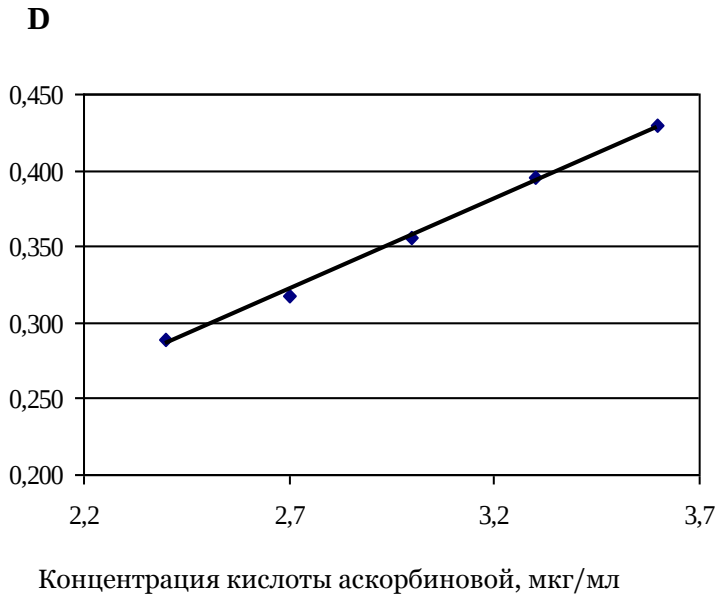


Рис. Линейная зависимость оптической плотности раствора от концентрации кислоты аскорбиновой (D – оптическая плотность)

С помощью данной методики было проанализировано 5 партий сырья по 5 образцов в каждой (табл. 6).

Таблица 6

Метрологическая характеристика метода количественного определения кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего

№ п/п	n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	E отн., %
1	5	2,12	0,00115	0,034	95	2,78	0,095	4,48
2	5	3,64	0,0005	0,022	95	2,78	0,061	1,67
3	5	2,54	0,00093	0,0305	95	2,78	0,084	3,36
4	5	2,03	0,00088	0,0296	95	2,78	0,082	4,04
5	5	2,09	0,00102	0,0319	95	2,78	0,089	4,26

Данные количественного определения показали, что в листьях первоцвета весеннего содержание аскорбиновой кислоты колеблется от 1,80 до 3,65%.

Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 4,48%.

В результате проведенных исследований стабильности листьев первоцвета весеннего при хранении (в течение 3 лет) рекомендуем установить норму содержания аскорбиновой кислоты в листьях первоцвета не менее 0,5% [5].

Полученные результаты включены в проект ФС «Первоцвета листья».

Выводы.

1. Разработана методика количественного определения кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего.

2. Проведена валидация методики по показателям правильности, сходимости, воспроизводимости, специфичности, линейности.

Литература

1. Аладышева, Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляева, В.В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9-14.

2. ГОСТ 3166-76. Листья первоцвета весеннего. Технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт. – Взамен ГОСТ 3166-46; Введ. 01.07.1977. – М., 1977. – С. 51-53.

3. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1989. – 400 с.

4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Paeoniaceae – Thimelaeaceae / отв. ред. П.Д. Соколов. – Л. : Наука, 1986. – С. 175-176.

5. Романова, З.Р. Фармакогностическое исследование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного : дис. ... канд. фарм. наук / З.Р. Романова. – Курск, 2010. – 138 с.

6. ТУ 9161-037-46865780-03. БАД таблетки «Виратон», рег. уд. 77.99.02.916.Б.000641.0803.

STANDARTIZATION OF PRIMULA OFFICINALIS LEAVES ACCORDING TO THE INDICATOR «ASCORBIC ACID CONTENT»

G.M. LATYPOVA [1]
V.N. BUBENCHIKOVA [2]
Z.R. ROMANOVA [1]
D.F. GALIMOVA [1]

[1] Bashkir State Medical University, Ufa

[2] Kursk State Medical University

e-mail: primula17@rambler.ru

Spectrophotometric technique for quantitative determination of ascorbic acid in the leaves of Primula officinalis based on the colour reaction of ascorbic acid with phosphoro-molybdenum complex has been developed. Validation of the technique according to such indications as correctness, similarity, reproducibility linearity, specificity has been performed.

Key words: leaves of Primula officinalis, the technique for quantitative determination of ascorbic acid.

УДК 615.322: 582.998.1: 543.061

ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПУЗЫРЕПЛОДНИКА КАЛИНОЛИСТНОГО (PHYSOCARPUS OPULIFOLIUS (L.) MAXIM)

И.А.САФОНОВА
В.Я. ЯЦЮК
А.В. КУЗЬМИНОВА

Курский государственный медицинский университет

e-mail: Isafon@yandex.ru

Изучен качественный и количественный аминокислотный состав листьев, плодов, цветков и стеблей пузыреплодника калинолистного (Physocarpus opulifolius (L.) Maxim.). Установлено наличие 15 аминокислот, в том числе 9 незаменимых. Сумма заменимых представлена моноаминомонокарбоновыми, моноаминодикарбоновыми алифатическими и ароматическими кислотами. Незаменимые аминокислоты представлены моноамино-монокарбоновыми и диаминомонокарбоновыми алифатическими, ароматическими и гетероциклическими кислотами. Сделан вывод о перспективности использования пузыреплодника калинолистного для создания новых лекарственных и косметических препаратов. Все соединения в данном растении идентифицированы впервые.

Ключевые слова: аминокислоты, аминокислотный состав, аминокислотный анализатор, пузыреплодник калинолистный, (Physocarpus opulifolius (L.) Maxim.), розоцветные, Rosaceae, ВЭЖХ.

Одной их актуальных проблем современной медицины в настоящее время является поиск новых отечественных источников биологически активных веществ и создание на их основе лекарственных и косметических препаратов. Известно, что аминокислоты являются не только строительным материалом в биосинтезе биологически важных соединений (специальных тканевых белков, ферментов, гормонов, нуклеиновых кислот и т. д.), но также регулируют множество физиологических функций живых организмов. Избыточное или недостаточное содержание в организме аминокислот может стать причиной возникновения различных патологий [3]. Отдельные аминокислоты применяются для профилактики и лечения многих патологических состояний [7, 9].

Источником получения аминокислот может быть растительное сырье. Биологически активные вещества в растениях находятся в легко усваиваемых организмом комплексах и в биологически доступных концентрациях [4]. Аминокислоты также обеспечивают фармакологическую безопасность и способствуют более легкому усвоению других биологически активных веществ, одновременно потенцируя их эффективность [1].

Пузыреплодник калинолистный *Physocarpus opulifolius (L.) Maxim. (*семейство розоцветных (Rosaceae)) широко распространен в Европейской части России в культуре как объект озеленения. Ранее нами были изучены фенольные соединения листьев пузыреплодника [6]. Сведения об аминокислотном составе пузыреплодника калинолистного в литературе отсутствуют.

В связи с этим **целью** нашего исследования явилось изучение качественного и количественного состава свободных и связанных аминокислот в листьях, цветках, стеблях и плодах пузыреплодника калинолистного.

Материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования были использованы листья, цветки, стебли пузыреплодника калинолистного, собранные в фазу цветения, и плоды пузыреплодника калинолистного, собранные в фазу полной зрелости на территории Курской области в 2010 г.

Качественный состав и количественное содержание аминокислот определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе «Amino Acid Analyzer T 339 M». Аминокислотный анализ проведен на колонке «Wasers AccQ Tag» 3,9×150 мм с использованием ступенчатого метода элюирования. Гидролиз водных извлечений из листьев, плодов, цветков и стеблей пузыреплодника калинолистного проводили 6 Н раствором соляной кислоты при температуре 110°С в течение 24 часов. Извлечение упаривали досуха под вакуумом. Точную навеску сухого остатка растворяли в натриево-цитратном

буфере при pH=2,2. Полученный раствор хроматографировали в следующих условиях: подвижная фаза – раствор нингидрина с добавлением буферных растворов с различными значениями pH – 3,50; 4,25 (цитратные буферные растворы) и 9,50 (боратный буферный раствор); скорость подачи элюента – 15 мл в час; цикл хроматографирования – 120 мин. Поддержание определенного значения pH среды позволило элюировать аминокислоты в различных ионных состояниях. Параллельно проводили хроматографирование растворов стандартных образцов аминокислот. Количественную оценку результатов проводили по площадям хроматографических пиков.

Результаты исследования и их обсуждение. Данные, полученные при помощи ВЭЖХ, свидетельствуют о том, что в наземной части пузыреплодника калинолистного содержится богатый набор аминокислот. Результаты анализа аминокислотного состава листьев, цветков, стеблей и плодов изучаемого растения представлены в таблице.

Таблица

Содержание аминокислот в листьях, цветках, стеблях и плодах пузыреплодника калинолистного

№	Аминокислоты	Количественное содержание, %			
		Листья	Цветки	Стебли	Плоды
1	2	3	4	5	6
1	Аспарагиновая кислота	0,73	0,94	0,29	0,21
2	Треонин*	0,59	0,40	0,10	0,07
3	Серин	0,63	0,49	0,13	0,05
4	Глутаминовая кислота	1,01	0,90	0,24	0,15
5	Глицин	0,79	0,46	0,14	0,08
6	Аланин	0,90	0,56	0,18	0,11
7	Валин*	0,25	0,23	0,07	0,07
8	Метионин*	0,08	0,03	следовые значения	следовые значения
9	Изолейцин*	0,17	0,16	0,04	0,07
10	Лейцин*	0,85	0,56	0,18	0,10
11	Тирозин	0,62	0,50	0,18	0,13
12	Фенилаланин*	0,77	0,67	0,24	0,15
13	Гистидин*	0,80	0,70	0,22	0,11
14	Лизин*	0,55	0,37	0,12	0,09
15	Аргинин*	0,90	0,95	0,50	0,45
	Сумма кислот	**9,63**	**7,92**	**2,63**	**1,85**

Примечание. * – незаменимые аминокислоты.

В результате исследования установлено, что в листьях, цветках, стеблях и плодах содержится по 15 аминокислот, в том числе – 9 незаменимых (треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин). Сумма свободных аминокислот в листьях пузыреплодника калинолистного составила 9,63 %, в цветках – 7,92%, стеблях – 2,63%, плодах – 1,85%. Эти показатели являются достаточно высокими для растений [8].

В листьях преобладающими являются глутаминовая кислота (1,01%), аргинин (0,9%) и аланин (0,9%), кроме того в значительных количествах содержатся лейцин (0,85%), гистидин (0,8%), глицин (0,79%), фенилаланин (0,77%) и аспарагиновая кислота (0,73%). В цветках преобладают аргинин, аспарагиновая, глутаминовая кислоты и гистидин (0,95; 0,94; 0,90 и 0,70% соответственно). В стеблях и плодах также преобладает аргинин (0,50 и 0,45% соответственно), однако содержание остальных аминокислот в 4-6 раз меньше по сравнению с листьями и цветками. Кроме того плоды и стебли значительно уступают по суммарному содержанию аминокислот.

Биологическая активность идентифицированных аминокислот достаточно хорошо изучена. Так, аргинин приводит к вазодилатации, усилению высвобождения различных гормонов (инсулин, соматотропин), увеличению скорости фильтрации через почки, а также обладает непрямой антиоксидантной и гепатопротекторной активностью [2, 7]. Глутаминовая кислота относится к нейромедиаторным аминокислотам,

вследствие чего используется при заболеваниях, сопровождающихся нарушениями функции ЦНС [5, 7]. Имеются данные о гепатопротекторной активности аланина, он также регулирует уровень сахара в крови и участвует в регенерации тканей [5, 7]. Для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки применяют гистидин. Обнаружена способность гистидина снижать уровень алкогольной интоксикации [7]. При заболеваниях, сопровождающихся белковой недостаточностью, с целью улучшения метаболических и репаративных процессов в послеоперационном периоде, для лечения травм, ожогов, параличей, диареи, поражений печени широко применяются суммарные препараты аминокислот для парентерального питания [7].

Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о достаточно высоком и разнообразном содержании аминокислот, позволяют предположить наличие широкого спектра фармакологической активности у листьев, цветков, стеблей и плодов пузыреплодника калинолистного. Это указывает на перспективность использования данных видов сырья (особенно листьев и цветков) в качестве источников заменимых и незаменимых аминокислот, а также служит основанием для более глубокого изучения пузыреплодника калинолистного как источника других биологически активных веществ.

Литература

1. Борисова, Д.А. Аминокислоты сырья первоцвета лекарственного / Д.А. Борисова // фармация. – 2011. – №8. – С. 11-13.
2. Граник, В.Г. Метаболизм L-аргинина (обзор) / В.Г. Граник // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 3. – С. 3-20.
3. Майстренко, В.Н. Количественный анализ α-аминокислот в моче нейрохирургических больных методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Армсорб» / В.Н. Майстренко, Р.Р. Ильясова, Ф.Х. Кудашева и др. // Вестник Башкирского университета. – 2008. – Т. 13, № 2. – С. 269.
4. Олешко, Г.И. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г.И. Олешко, Т.И. Ярыгина, Е.В. Зорина, М.Д. Решетникова // Фармация. – 2011. – № 3. – С. 14-17.
5. Парфенов, А.А. Аминокислоты травы пустырника пятилопастного / А.А. Парфенов, Н.С. Фурса // Фармация. – 2007. – № 7. – С. 6-7.
6. Сафонова, И.А. Изучение фенольных соединений листьев пузыреплодника калинолистного (Physocarpus opulifolius (L.) Maxim) методом ВЭЖХ / И.А. Сафонова, В.Я. Яцюк, А.В. Кузьминова // Человек и его здоровье. – 2009. – № 4. – С. 127-132.
7. Симонян, А.В. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α-аминокислот в различных объектах : методические рекомендации / А.В. Симонян, А.А. Саламатов, Ю.С. Покровская, А.А. Аванесян. – Волгоград, 2007. – 106 с.
8. Шилова, И.В. Аминокислотный и минеральный состав надземной части Atragene speciosa Weinm / И.В. Шилова, Е.А. Краснов, Н.В. Барановская и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36, № 11. – С. 36-38.
9. Шкроботько, П.Ю. Аминокислотный состав подземных органов валерианы фори и валерианы бузолистной / П.Ю. Шкроботько, Д.М. Попов, Н.С. Фурса // Фармация. – 2009. – №7. – С. 19-23.

STUDYING OF AMINOACIDS STRUCTURE OF PHYSOCARPUS OPULIFOLIUS (L.) MAXIM

I.A. SAFONOVA
V.Y. YATZUK
A.V. KUZMINOVA

Kursk State Medical University

e-mail: Isafon@yandex.ru

The qualitative and quantitative amino-acid structure of Physocarpus opulifolius (L.) Maxim. leaves, flowers, fruits and stemsis is studied by HPLC. 15 amino acids presence, including 9 irreplaceable, are established. The sum of replaceable aminoacids of a duckweed small is presented by monoaminocarboxylic, monoaminodicarboxylic aliphatic, aromatic and heterocyclic acids. Irreplaceable amino acids are presented by monoaminomonocarboxylic and diaminomonocarboxylic aliphatic, aromatic acids. The conclusion about the prospects of Physocarpus opulifolius (L.) Maxim. for creating new medicines and cosmetics was made. All compounds in this plant have been identified for the first time.

Key words: , amino acids, amino-acid structure, amino acid analyzer, Physocarpus opulifolius (L.) Maxim., Rosaceae, HPLC.

УДК 544.726:54.056

МЕТОД ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ АНТОЦИАНОВ ИЗ ПЛОДОВ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

Л.А. ДЕЙНЕКА, И.П. БЛИНОВА
А.Н. ЧУЛКОВ, И.И. САЕНКО
В.И. ДЕЙНЕКА
В.Н. СОРОКОПУДОВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

Плоды аронии черноплодной относятся к наиболее богатым источникам антоцианов. Основные компоненты антоцианового комплекса – цианидин-3-галактозид и цианидин-3-арабинозид. В работе предложен метод экстракции, очистки и концентрирования антоцианов из этого материала с использованием подготовленной кислотной обработкой глины. Обсуждаются особенности ключевых стадий метода. Установлено, что хранение в замороженном состоянии может быть использовано только на период не более 4 месяцев.

Ключевые слова: Aronia melanocarpa, плоды, антоцианы, экстракция, сорбция, глина, очистка, концентрирование.

К настоящему времени многочисленными исследованиями доказано, что антоцианы – синтезируемые растениями единственные водорастворимые соединения из класса флавоноидов [1], обладают не только красящей способностью (из-за чего рассматриваются как важнейшие природные колоранты [2, 3]), но и высокой биологической активностью (прежде всего из-за высокой антиоксидантной активности [3]).

Значимость антоцианов как субстанций для лекарственных препаратов признана в настоящее время и в России: выпускается, например, целый ряд готовых форм на основе антоцианов, использующих импортные составляющие. Так, в состав «Антоциан форте» входят стандартизированные растительные экстракты производства компаний «Naturex» (Франция) и «FutureCeuticals» (США). Сведения о запуске отечественных технологий получения очищенных антоцианов нами не обнаружены, хотя их внедрение в фармацевтическую и пищевую промышленность позволило бы избавиться от необходимости использования синтетических колорантов, перечень которых в числе разрешенных к употреблению в развитых странах неуклонно уменьшается.

Арония черноплодная относится к растениям, плоды которых наиболее богаты полифенольными соединениями вообще и антоцианами в частности [4]. Это растение, известное среди населения под названием «черноплодная рябина», происходит из Северной Америки. В Россию арония была ввезена лишь в тридцатые годы двадцатого века, причем как лекарственное растение (для профилактики гипертонии), и вид *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot получил широкое распространение от Сибири до Нечерноземья [5]. Арония распространена и в Центрально-Черноземном районе, включая Белгород; она дает хорошие урожаи плодов (4 ÷ 12 кг с куста), имеет длительный продуктивный период (до 30 лет) и поэтому может рассматриваться как ценный источник сырья для промышленной переработки плодов с целью получения антоцианов.

В настоящей работе предложен вариант экстракции, твердофазной очистки и концентрирования антоцианов плодов аронии черноплодной с использованием природной глины в качестве сорбента.

Материалы и методы исследования. В работе использовали плоды аронии черноплодной, выращенные в сезоне 2011 года в Ботаническом саду НИУ БелГУ. Плоды собирали в стадии технической спелости; для контроля часть плодов замораживали в морозильной камере, где и хранили до исследования.

Количественное определение суммы антоцианов в плодах аронии черноплодной и в экстрактах проводили дифференциальным спектрофотометрическим методом [6].

Для ВЭЖХ определения индивидуального состава антоцианового комплекса экстракт очищали методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах ДИАПАК С18 [7]. Условия ВЭЖХ определения: хроматограф Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором (диапазон спектра 370–600 нм, хроматограммы записывали при 515 нм); колонка 250×4 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм; подвижная фаза:

10 об.% ацетонитрила (для ВЭЖХ) и 10 об.% муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

Для экстракции антоцианов свежесобранные плоды измельчали бытовым блендером до видимой гомогенизации. Порции полученного материала смешивали с заданным объемом 0.1 М водного раствора соляной кислоты и выдерживали в течение заданного времени. После отстаивания верхний слой экстракта отфильтровывали через бумажный фильтр; при необходимости к остатку добавляли новую порцию экстрагента, повторяя процесс экстракции.

Природную глину (Маслова Пристань, Белгородская обл.) готовили кислотной обработкой и отмучиванием в 0.1 М растворе HCl; седиментированный материал высушивали в сушильном шкафу при 100°С и перед использованием растирали до порошкообразного состояния в фарфоровой ступке.

Для сорбции антоцианов экстракт смешивали с подготовленной глиной и смесь перемешивали в течение 30 мин. После отстаивания смеси фильтрат отделяли декантацией.

Для десорбции антоцианов с глин сорбент смешивали с экстрагентом: 1% раствор концентрированной HCl в этаноле. Этанол отгоняли из экстракта на вакуумном ротационном испарителе при температуре бани 35°С.

Результаты и их обсуждение. На хроматограмме антоцианового комплекса обнаруживаются два основных компонента: цианидин-3-галактозид (№ 1, рис. 1), цианидин-3-арабинозид (№ 3), и два – минорных антоциана – цианидин-3-глюкозид (№ 2) и еще одно производное цианидина – все четыре вещества имеют практически идентичные спектры, которые можно отнести к цианидин-3-моногликозидам (λ_{max} = 515 нм).

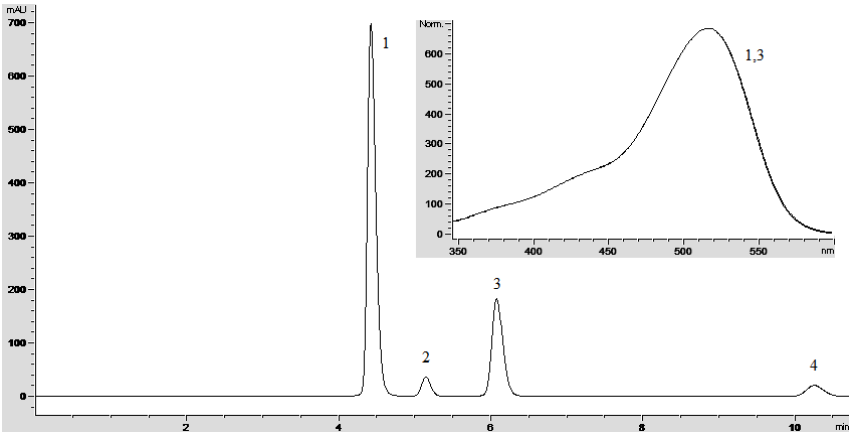


Рис. 1. Антоцианы плодов *Aronia melanocarpa*

Хроматограммы были использованы нами для качественной оценки уровня очистки антоцианов, поскольку в режиме 3D видны не только антоцианы, но и другие вещества в заданном диапазоне длин волн (рис. 2).

Экстракция антоцианов. Экстракция является важнейшим этапом в технологическом процессе выделения антоцианов из растительного сырья. Технология может быть эффективной только при максимально возможном извлечении антоцианов из сырья. На процесс экстракции влияют многие факторы: степень измельчения, количество экстрагента, использованного для экстракции, время контакта измельченного сырья с воздухом, время экстракции и др. В настоящей работе было установлено, что в случае плодов аронии черноплодной измельченное сырье можно выдерживать на воздухе до начала экстракции в течение, по крайней мере, 5 часов.

Измельченные блендером плоды аронии смешивали с водным раствором в различных соотношениях. При этом были найдены условия, при которых антоцианы извлекаются из плодов на 90-95% за одну экстракцию, но они не технологичны из-за высокого разбавления. Поэтому для реальных процессов использовали меньшие объемы

экстрагентов, но в таком случае для достижения высокой степени извлечения антоцианов применяли 3-кратное экстрагирование, которое позволяло извлекать выше 90 % этих колорантов (в пересчете на цианидин-3-глюкозид, Cy-3-Glu) (табл. 1).

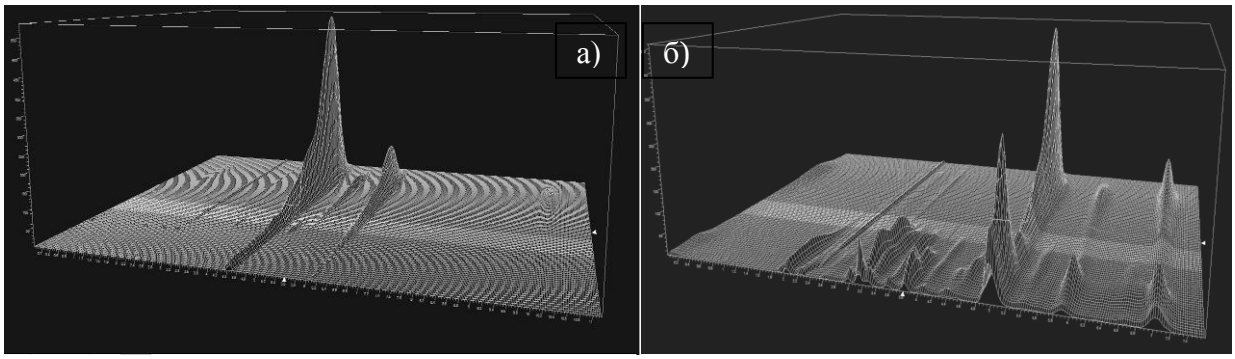


Рис. 2. 3D-Хроматограммы очищенного (а) и неочищенного экстракта плодов аронии (б)

Таблица 1

Экстракция антоцианов плодов аронии

№	Соотношение сырье:экстрагент (кг/кг)	Объем экстракта, л	Концентрация антоцианов в экстракте (на Cy-3-Glu), ± 2.5%		Масса антоцианов, г
			моль/л	г/л	
1	2.33 / 3	3.7	0.0038	1.84	6.75
2	ост. / 3	3.3	0.0015	0.73	2.42
3	ост. / 3	3.0	0.0007	0.34	1.01
				Всего:	10.18

Сорбция антоцианов из экстракта на глине. Многолетние исследования по сорбции антоцианов на глинах, выполненные нами ранее, показали, что сорбция антоцианов происходит по ионообменному механизму – за счет существования отрицательного заряда слоистого материала вследствие изоморфных замещений в (главным образом) октаэдрических и тетраэдрических слоях. Использованная в работе глина месторождения Маслова Пристань содержала большое количество карбонатов, которые были удалены при ее переводе в H^+-форму, необходимую для экстракции антоцианов, существующих в заряженном состоянии лишь в кислых средах.

Высушенную глину измельчали и просеивали через сито с диаметром пор 0.5 мм.

Предварительные исследования показали, что достижение равновесия в статическом методе сорбции происходит за 45–60 минут при постоянном перемешивании (рис. 3).

По использованному в работе методу к 200 г модифицированной глины добавляли по 400 мл приготовленных экстрактов. Смесь выдерживали при периодическом перемешивании примерно 1 час, затем смесь выдерживали до полного осаждения частиц и маточный раствор (бледно-розового цвета) сливали декантацией: потери антоцианов при этом не превышали 2-3%. Поэтому повторное извлечение антоцианов из фильтрата считали нецелесообразным.

Десорбция антоцианов. К порции глин с сорбированными антоцианами добавляли 400 мл экстрагента, составленного из 395 мл этанола и 5 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь выдерживали для десорбции в течение 30 минут для выхода на равновесие; выдерживали примерно 1 час до полного оседания частиц глины и надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр. При этом оставалась глина, окрашенная в красный цвет, что указывало на неполноту реэкстракции антоцианов. Но технологически выгодным оказалось не дальнейшая экстракция антоциа-

нов, а использование этой глины для повторной сорбции и последующей десорбции антоцианов. Через 3 цикла экстракции-реэкстракции проводили двойную обработку глины последовательными порциями экстрагента.

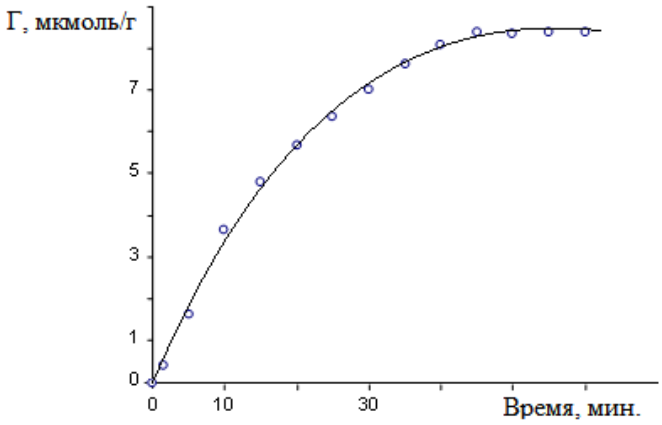


Рис. 3. Установление равновесия сорбции антоцианов на глине

Анализ материального баланса показал, что по предложенному методу удается десорбировать до 95% сорбированных антоцианов, а один и тот же подготовленный образец глины можно использовать до 20 раз.

Концентрирование и хранение антоцианов. Спиртово-солянокислые растворы концентрировали на вакуумном ротационном испарителе до полного удаления спирта. При этом для лучшей сохранности антоцианов при последующем хранении в бытовом холодильнике перед отгонкой спирта в концентрат добавляли нелетучую лимонную кислоту.

Еще один важнейший аспект касается условий хранения сырья. Хранение в замороженном состоянии в морозильной камере обычно считается достаточным приемом для сохранения антоцианов и иных биологически активных соединений в плодах растений. Однако выполненные нами предварительные исследования показали, что у аронии черноплодной примерно через год такого хранения антоцианы практически полностью разрушаются. Поэтому нами был поставлен эксперимент с ежемесячным контролем экстрагируемости антоцианов из плодов этого растения. Для этого известные навески плодов хранили в морозильной камере в пластиковых чашечках Петри и через определенный период времени определяли массу плодов и содержание в них антоцианов. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сохранность антоцианов плодов аронии черноплодной в замороженном состоянии

№	Дата	Изменение массы плодов, %	Содержание антоцианов, мг/100 г плодов	
			фактически	на исходную массу
1	24.08.2011	100	460 ± 20	460
2	24.09.2011	97	482 ± 15	468
3	24.10.2011	96	581 ± 40	558
4	24.11.2011	95	527 ± 25	500
5	23.12.2011	92	551 ± 10	507
6	20.01.2012	91	449 ± 40	409
7	28.02.2012	91	390 ± 15	355

Как видно из представленных данных, в течение первых двух месяцев хранения концентрация антоцианов не только не уменьшается, но даже и достоверно увеличивается. Причем это увеличение не является следствием вымораживания воды из плодов.

Но после четвертого месяца падение концентрации антоцианов оказывается весьма значительным, что следует учитывать как при приготовлении быстрозамороженных плодов, так и при разработке соответствующих технологических процессов.

Таким образом, в работе представлена методика использования природных слоистых материалов для очистки и концентрирования антоцианов из плодов аронии черноплодной. Можно отметить, что по предварительным наблюдениям, применение глины приводит к резкому уменьшению обсемененности экстрактов спорами грибков – в экстрактах длительное время не образуется плесень даже при хранении при комнатной температуре.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., государственный контракт № П425 от 12 мая 2010 г. «Разработка методик выделения и определения полифенольных соединений классов фитоалексинов, каротиноидов и антоцианов и технологии создания лекарственных форм на их основе».

Литература

1. Anthocyanins. Biosynthesis, Functions, and Applications Editors Kevin Gould, Kevin Davies and Chris Winefield. Springer Science+Business Media, LLC, 2009. – 332 p.

2. Bridle P., Timberlake C.F. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects // Food Chem. – 1997. – V.58. – P. 103-109.

3. He J., Giusti M.M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties // Annual Rev. Food Sci. Technol. – 2010. – V.1. – P. 163-187.

4. Oszmianski J., Wojdylo A. *Aronia melanocarpa* phenoilics and their antioxidant activity // Eur. Food Res. Technol. – 2005. – V.221. – P. 809-813.

5. Садоводство. Энциклопедия : в 3 т. Т. 1. – Кишинев : Гл. ред. Молдавской Советской Энциклопедиию, 1990. – С. 89-90.

6. Giusti M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. – F1.2.1-F1.2.13.

7. Дейнека Л.А. Антоцианы плодов вишни и родственных растений / Л.А. Дейнека, А.Н. Чулков, В.И. Дейнека и др. // Научные Ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. – 2011. – № 9(104), Вып. 15/1. – С. 364-370.

METHOD OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF CHOKEBERRY FRUIT ANTHOCYANINS

L.A. DEINEKA, I.P. BLINOVA
A.N. CHULKOV, I.I.SAENKO
V.I. DEINEKA
V.N. SOROKOPUDOV

Belgorod National Research University

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

Chokeberry fruit belong to the richest sources jf anthocyanins. The main components of the fruit anthocyanins complex are cyanidin-3-galactoside and cyanindin-3-arabinoside. In the paper a method for extraction, purification and concentration of the anthocyanins is proposed with utilization of acid activated clay. The particularities of the key stages of the method are discussed. It has been found that storage of freeze fruit may be no longer than 4 months.

Key words: Aronia melanocarpa, fruit, anthocyanins, extraction, sorption, clay, purification, concentration

УДК 615.015.11.322.074:633.791

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СОДЕРЖАНИЮ ГОРЬКИХ КИСЛОТ СЫРЬЯ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Г.М. ЛАТЫПОВА[1]
Г.В. АЮПОВА[1]
В.Н. БУБЕНЧИКОВА[2]
Д.Ф. ГАЛИМОВА[1]
Е.Д. БАТЫРОВА[1]
С.Ф. ШАФИКОВА[1]

[1] Башкирский государственный медицинский университет

[2] Курский государственный медицинский университет

e-mail: primula17@rambler.ru

Определено количественное содержание горьких кислот в листьях, соплодиях различных образцов культивируемого и дикорастущего хмеля обыкновенного методом титриметрии. Впервые в листьях хмеля культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного определено наличие ацилфлороглюцидов, их количественное содержание.

Ключевые слова: листья, соплодия хмеля обыкновенного, количественное содержание ацилфлороглюцидов.

Одним из перспективных лекарственных растений, содержащих большой комплекс биологически активных веществ (БАВ), является хмель обыкновенный (Humulus lupulus, сем. Cannabaceae) – двудомное многолетнее растение, широко применяемое в народной и научной медицине. Шишки хмеля обыкновенного используются в пищевой и пивоваренной промышленности, в пекарном производстве, в производстве биологически активных добавок к пище [3].

Широко используют культивируемый хмель. Всего в мире насчитывается более сотни сортов хмеля. Мировое производство хмеля сосредоточено в США, Германии, Чехии, Польше и Китае, именно в этих странах сосредоточено 70% мирового производства. На территории бывшего СССР основные плантации хмеля располагались в России и на Украине.

Лекарственным сырьем являются собранные в фазе начала цветения и высушенные соплодия культивируемых или дикорастущих растений. Дикорастущие растения хмеля обыкновенного имеют широкий ареал произрастания, охватывающий всю Европейскую часть России, Кавказа, Западную Сибирь, широко распространены во флоре Республики Башкортостан.

В Российской Федерации товарное производство хмеля сосредоточено в 11 административных районах. Основными производителями являются Чувашская Республика (82%), республика Марий Эл (около 6,5%) и Алтайский край (3,3% российского хмеля). Остальные регионы – Брянская, Нижегородская, Ульяновская, Омская области и Хабаровский край – производят чуть более 8%. Среди селекционных сортов выделяют 3 сортотипа хмеля: ароматический, горько-ароматический и горький. Ароматические сорта (Михайловский, Истринский, Ранний и др.) содержат от 3 до 6% альфа-кислот, высокую концентрацию эфирных масел (до 3,5%). Горько-ароматические сорта (Крылатский, Сумерь, Полесский и др.) имеют высокое содержание горьких веществ и эфирных масел. Содержание альфа-кислот в них колеблется от 5 до 10%, эфирных масел от 0,5 до 2,5%. Горькие сорта хмеля (Подвязный, Гранат, Сильный) содержат альфа-кислот более 10%. Горько-ароматические, а особенно горькие сорта хмеля используются в пивоваренной промышленности [1, 3].

Шишки хмеля обыкновенного богаты БАВ, такими как эфирные масла (более 100 компонентов), горькие гликозиды, фитогормоны, органические кислоты, флавоноиды (кверцетин, рутин, мирицетин, кемпферол и др.), витамины группы В, РР, С, Н, токоферол, аминокислоты, кумарины, дубильные вещества, пектиновые вещества, ал-

калоиды. Хмель входит в состав ряда известных препаратов и многих биологически активных добавок (БАД) к пище. Препараты хмеля оказывают седативное, нейротропное, противовоспалительное, противоязвенное, капилляроукрепляющее, антиоксидантное, болеутоляющее, снотворное действие [1].

Основными БАВ, обусловливающими фармакологическую активность шишек хмеля, являются горечи, полифенольные соединения, эфирные масла. Горечи хмеля относятся к полипептидам ацилфлороглюцинового типа, являются смесью кислых и смолистых веществ. Согласно международной номенклатуре их называют «общими смолами», в соответствии с классификацией различают твердые и мягкие смолы. Твердые смолы – фракции общих смол, не растворимых в парафиновых углеводородах, гексане, петролейном эфире с низкой температурой кипения. Мягкие смолы – фракции общих смол, растворимых в парафиновых углеводородах, гексане, петролейном эфире с низкой температурой кипения, состоящих из α- и β-кислот, α- и β-мягких смол. Неохарактеризованные мягкие смолы являются смесью α- и β-мягких смол – продуктов окисления α- и β-кислот соответственно. α- и β-кислоты имеют ациклическое строение и являются производными флороглюцина.

К α-кислотам относят гумулон, когумулон, адгумулон, прегумулон, постгумулон. β-кислоты включают в себя лупулон, колупулон, адлупулон, прелупулон, постлупулон. Содержание α- и β-кислот является сортовой особенностью хмеля и зависит от места и условий выращивания.

Количественное содержание суммы горьких кислот определяется неводным титрованием экстракта хмеля 0,01 М раствором едкого калия [5]. Количественное содержание α-кислоты определяется кондуктометрическим методом, основанным на электропроводности титруемого раствора [2]. Метод достаточно точен, но сложен в исполнении и требует специального оборудования.

По содержанию α-кислоты в соплодиях хмеля можно определить степень дозревания соплодий и определить точные сроки сбора сырья, а также старый и испорченный хмель. Но этого нельзя определить методом титрования при анализе суммы горьких кислот в сырье, т. к. при хранении общая величина горьких веществ заметно не изменяется. Тогда как количество α-кислоты уменьшается вследствие ее окисления.

Горькие кислоты нашли применение в медицинской практике. Они усиливают секрецию желудочного сока, а также обладают седативными и антибиотическими свойствами. Горькие кислоты проявляют противоопухолевую активность.

Сырьевым источником получения горечей хмеля обыкновенного являются собранные в фазе начала цветения соплодия культивируемых или дикорастущих растений. Однако перспективным представляется использование отходов после уборки соплодий – зеленой массы листьев хмеля. В связи с этим, представляет интерес определение горьких кислот в листьях хмеля обыкновенного. Это позволит в перспективе использовать их для получения новых фитопрепаратов, БАД к пище, функциональных продуктов.

Целью наших исследований явилось изучение количественного содержания горьких кислот в листьях, соплодиях различных образцов культивируемого и дикорастущего хмеля обыкновенного методом титриметрии.

Материалы и методы исследований. Объектом исследований явились образцы высушенных листьев, соплодий и гранул хмеля обыкновенного различных сортов, культивируемых на территории Чувашии («Михайловский», «Сумерь» и «Подвязный»), предоставленные ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г. Чебоксары. А также образцы листьев и соплодий дикорастущего хмеля, собранного на территории республики Башкортостан в 2010-2011 годах в Уфимском, Давлекановском, Благовещенском, Туймазинском, Белебеевском районах.

Определение качественных и количественных характеристик проводилось в аналитических пробах сырья, высушенного до воздушно-сухого состояния по методикам Государственной Фармакопеи XI издания.

Наличие ацилфлороглюцидов определяли по образующемуся осадку при добавлении 1% раствора ацетата свинца, количественное определение суммы ацилфлороглюцидов проводили титриметрическим методом [4].

Результаты и их обсуждение. Для качественного определения ацилфлороглюцидов 1 г сырья помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл воды, экстрагировали в течение 30 минут при периодическом встряхивании, доводили объем раствора до метки, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр «красная лента». К 1 мл полученного раствора прибавляли 1 мл 1% раствора ацетата свинца, образовывался белый хлопьевидный осадок.

Количественное определение суммы ацилфлороглюцидов проводили по следующей методике:

Около 0,2 г (точная навеска) сырья помещали в пробирку с плотно притертой пробкой, прибавляли 5 мл просушенного над натрием сернокислым ацетона и экстрагировали на встряхивателе в горизонтальном положении в течение 15 минут. Из отстоявшейся жидкости брали пипеткой 2 мл в другую пробирку, добавляли 2 капли спиртового раствора фенолфталеина 0,1% и титровали спиртовым раствором калия едкого 0,01М до появления красной неисчезающей окраски.

Количество суммы ацилфлороглюцидов (X) в процентах определяли по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0.004 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)} = \frac{V \cdot 200}{m \cdot (100 - W)},$$

где 0,004 – количество ацилфлороглюцидов (лупулон, гумулон, гулупон – среднее значение), соответствующее 1 мл раствора кали едкого (0,01М), г; V – объем раствора калия едкого (0,01М), пошедшего на титрование, мл; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

Приготовление 0,01М спиртового раствора калия едкого.

Ампулу фиксанала едкого калия (0,1М) разводили в мерной колбе вместимостью 1 л и доводили до метки 90% этиловым спиртом, перемешивали. Получали 0,1М основного раствора калия едкого.

100 мл основного раствора доводили до метки 95% этиловым спиртом в мерной колбе вместимостью 1 л и перемешивали.

Титр раствора проверяли раствором хлористоводородной или серной кислоты известной концентрации в присутствии фенолфталеина.

Приготовление безводного ацетона.

В 1 л ацетона добавляли 59 г прокаленного при температуре 100°С в течение 5 ч сернокислого натрия и настаивали при взбалтывании 10 часов или оставляли на ночь. Для анализа отбирали ацетон над осадком.

Результаты исследования обработаны статистически согласно ГФ-XI. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 5% для всех образцов сырья.

Содержание суммы ацилфлороглюцидов в изучаемых образцах составляет: в соплодиях – от 17,0 до 18,2 %; в листьях – от 12,4 до 13,2%; в гранулах – от 16,0 до 17,4% (табл. 1).

Таблица 1

Метрологическая характеристика метода количественного определения суммы ацилфлороглюцидов в сырье хмеля обыкновенного

Вид сырья	n	f	$X_{ср.}$	S^2	S	P,%	t (P,f)	$X_{ср.} \pm \Delta x$	E,%
Соплодия	5	4	17,6	0,2644	0,5142	95	2,57	17,6±0,591	3,36
Лист	5	4	12,8	0,1309	0,3619	95	2,57	12,8±0,416	3,25
Гранулы	5	4	16,7	0,3449	0,5873	95	2,57	16,7±0,675	4,04

С применением вышеизложенных методик были изучены все образцы сырья культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного.

Результаты исследований по содержанию горьких кислот титриметрическим методом в сырье хмеля обыкновенного представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Содержание ацилфлороглюцидов в сырье культивируемого хмеля обыкновенного

Вид сырья	Образцы сырья		
	Культивируемые сорта ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары		
	Ароматический (сорт Ранний)	Горько-ароматический (сорт Крылатский)	Горький (сорт Подвязный)
Лист	11,6±0,377	12,4±0,403	17,6±0,591
Соплодия	16,0±0,538	16,8±0,564	12,8±0,416
Гранулы	14,3±0,578	16,2±0,654	16,7±0,675

Таблица 3

Содержание ацилфлороглюцидов в сырье дикорастущего хмеля обыкновенного

Вид сырья	Образцы дикорастущего сырья, собранного на территории РБ				
	Давлекановский район	Уфимский район	Благовещенский район	Туймазинский район	Белебеевский район
Лист	11,2±0,364	12,0±0,390	11,6±0,377	11,4±0,365	11,8±0,381
Соплодия	11,4±0,382	15,9±0,534	15,3±0,514	13,5±0,432	14,8±0,476

По данным проведенного исследования, впервые в листьях хмеля культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного определено наличие ацилфлороглюцидов, их количественное содержание.

Как видно из результатов, представленных в табл. 2 и 3, содержание ацилфлороглюцидов в образцах листьев культивируемых сортов Чувашии (ОАО «Агрофирма «Ресурсы») находится в пределах от 11,6 до 12,8%. В образцах листьев дикорастущего хмеля обыкновенного, собранного на территории РБ (Давлекановский, Уфимский, Благовещенский, Туймазинский и Белебееевский районы), составляет от 11,2 до 12,0%, что сопоставимо с показателями культивируемого сырья.

Данные по содержанию ацилфлороглюцидов в соплодиях культивируемых чувашских сортов хмеля обыкновенного находятся в интервале 16,0-17,6%, в соплодиях башкирских дикорастущих видов – 11,4-15,9%. Гранулированное сырье соплодий культивируемых сортов хмеля обыкновенного содержит ацилфлороглюциды в количестве 14,3-16,7%, что на 1-2% ниже данного показателя в соплодиях. Это обусловлено технологической обработкой соплодий при гранулировании, что согласуется с литературными данными.

Выводы.

1. Сырье – лист хмеля обыкновенного, являющееся отходом производства соплодий хмеля, может быть дополнительным источником получения ацилфлороглюцидов.
2. Соплодия дикорастущих видов хмеля обыкновенного, собранные на территории РБ, не уступают по содержанию ацилфлороглюцидов культивируемым сортам ОАО «Агрофирма «Ресурсы» (Республика Чувашия).

Литература

1. Годованный, А.А. Хмель и его использование/ А.А. Годованный. – Киев, 1990. – С. 330.
2. ГОСТ «Хмель-сырец и хмель прессованный»: технические условия и методы испытаний ГОСТ 21946-76 – ГОСТ 21948-76. – 23 с.

3. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; семейство Rutaceae-Eleagnaceae. – Л.,1988. – 357 с.
4. ФСП ЛСР-001907/08 от 18.03.08 «Хмель экстракт сухой» ООО «Хармс» – Россия.
5. Шмидт, Л.Г. Горькие вещества хмеля и методы их анализа / Л.Г. Шмидт. – М.,1964. – 64 с.

STUDY FOR IDENTIFICATION OF BITTER ACIDS IN HUMULUS LUPULUS

G.M. LATYPOVA[1]
G.V. AYUPOVA[1]
V.N. BUBENCHIKOVA[2]
D.F. GALIMOVA[1]
E.D. BATYROVA[1]
S.F. SHAFIKOVA[1]

[1]Bashkir State Medical University

[1]Kursk State Medical University

e-mail: primula17@rambler.ru

The amount of bitter acids in the foliage and collective fruit in the samples of cultivated and wild Humulus lupulus by titrimetry has been quantified. For the first time the results of the study make it possible to identify the presence of acylphloroglucides and evaluate their quantity.

Key words: foliage, collective fruit of Humulus lupulus, quantification of acylphloroglucides.

УДК 615.456.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫХ К РЯДУ СТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

И.В. САКАЕВА
К.А. БИЧЕНОВА
Р.А. ЛАВРЕНЧУК
Е.И. САКАНЯН

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России)

e-mail: lavrenchuk@regmed.ru

В статье приводится анализ требований, предъявляемых к ряду стерильных лекарственных форм, таких как инфузионные растворы и глазные капли, представленных на отечественном фармацевтическом рынке. Как в инфузионных растворах, так и в глазных каплях помимо требований отсутствия механических включений и стерильности обязательными являются такие показатели как осмолярность, pH, в ряде случаев значение вязкости и плотности растворов. В монографиях зарубежных фармакопей (Европейской, США, Японской, Международной), посвященным этим лекарственным формам, содержится достаточно небольшой перечень требований, в ряде случаев не сопровождающийся конкретными нормативами. Аналогичная ситуация наблюдается и в отечественной нормативной документации (Государственная фармакопея СССР XI издания и ОСТ «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения»). Анализ показателей, закладываемых в частную нормативную документацию на лекарственные препараты, используемые в виде глазных капель или инфузионных растворов, свидетельствует о том, что отличается не только их перечень, но и нормируемые значения. В связи с этим актуальна унификация требований, предъявляемых к качеству данных лекарственных форм.

Ключевые слова: парентеральные лекарственные формы, инфузионные растворы, глазные капли, фармакопейные показатели, частные фармакопейные статьи, стандартизация.

К числу лекарственных форм (ЛФ), которые должны отвечать требованию стерильности, относят парентеральные, глазные ЛФ и ЛФ для новорожденных. При этом первые две группы ЛФ являются наиболее востребованными.

Анализ лекарственных средств (ЛС), представленных в настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке, свидетельствует о том, что число парентеральных лекарственных препаратов составляет 3132 наименования (18,7% от общего числа внесенных в Государственный реестр лекарственных средств). Они представлены в виде жидких (растворов, суспензий, эмульсий, а также концентратов для приготовления растворов и суспензий) и твердых ЛФ (порошков, лиофилизатов имплантатов).

Глазные ЛФ составляют около 1,5% от общего числа зарегистрированных лекарственных препаратов (271 наименование), из них 229 наименований выпускаются в лекарственной форме капли глазные (около 85%), из которых 114 – препараты отечественных производителей [2].

Лидирующие позиции среди парентеральных лекарственных форм занимают инъекционные ЛФ (т. е. вводимые в организм в объёме менее 100 мл) составляющие около 50% всех парентеральных лекарственных препаратов. Тем не менее, инфузионные парентеральные лекарственные препараты (вводимые в организм внутривенно объёмом более 100 мл) наиболее ярко отражают особенности требований, предъявляемых к парентеральным лекарственным формам, ввиду большого объёма введения (до 2,5-3 л в сутки). В связи с этим требования, которым должны соответствовать лекарственные препараты, применяемые инфузионно, должны быть конкретизированы.

В качестве жидких инфузионных лекарственных средств используют истинные растворы, растворы высокомолекулярных соединений (ВМС) и эмульсии. Следует отметить, что проведённый нами анализ свидетельствует об использовании ВМС не только в качестве вспомогательных веществ, обеспечивающих необходимую вязкость раствора, но и в ряде случаев как действующих, позволяющих привести в соответствие вязкость вводимого препарата вязкости плазмы крови. В последнем случае они могут быть названы условно-действующими веществами, т. к. собственной фармакологиче-

ской активностью эти ВМС не обладают. Эмульсии, вводимые внутривенно и в больших объёмах, должны соответствовать основному требованию, относящемуся к определению их типа. В данном случае допустимо применение только эмульсий первого рода (масло/вода), что регламентируется требованиями ведущих зарубежных фармакопей.

По назначению инфузионные лекарственные средства делятся на 6 основных групп – регулирующие водно-электролитный баланс (регидратирующие), регулирующие кислотно-основное равновесие, дезинтоксикационные, гемодинамические (плазмозамещающие), растворы для парентерального питания и полифункциональные растворы [4]. Однако в наибольших объёмах в человеческий организм вводятся плазмозамещающие растворы и препараты для парентерального питания (в частности, эмульсии для парентерального питания).

На отечественном фармацевтическом рынке присутствует 17 эмульсий для парентерального питания, все они зарубежного производства. Анализ частной нормативной документации на них свидетельствует о том, что показатели их качества существенно различаются. В табл. 1 приведён перечень этих показателей.

Таблица 1

Показатели качества ряда эмульсий для парентерального питания

№	Наименование показателя	Эмульсии для инфузий (17 ЛС)
1	2	2
1.	Описание	17
2.	pH	17
3.	Механические включения (видимые и невидимые/невидимые)	3/4
4.	Размер частиц эмульсии	17
5.	Средний размер частиц эмульсии	2
6.	Гомогенность	3
7.	Посторонние примеси	5
8.	Свободные жирные кислоты	4
9.	Плотность	1
1	2	3
10.	Осмоляльность	6
11.	Теоретическая осмолярность	9
12.	Извлекаемый объём	17
13.	Перекисное число	7
14.	Кислотное число	6
15.	Анизидиновое число	1
16.	Пирогенность	6
17.	Бактериальные эндотоксины	11
18.	Аномальная токсичность	12
19.	Стерильность	17

Такие показатели, как «Описание», «pH», «Извлекаемый объём», «Стерильность», «Бактериальные эндотоксины»/«Пирогенность», присутствуют в НД на все лекарственные препараты.

Характеристика размера частиц эмульсии приведена во всей изученной нормативной документации, но методика, нормативные требования и название раздела требуют унификации. Например, в НД встречаются такие названия этого показателя, как «Размер глобул», «Размер частиц», «Диаметр масляных капель». При этом методика определения показателя сводится либо к определению среднего размера частиц, либо к определению распределения частиц эмульсии по размеру. Такие показатели, как «Перекисное число, «Кислотное число», «Анизидиновое число», характеризуют качество эмульсий, однако если при этом в нормативной документации не приводятся требования к концентрации эмульсий и используемым для их получения маслам и эмульгаторам, то возникают сомнения в необходимости включения этих показателей в нормативную документацию.

Показатель «Гомогенность», встречающийся в нормативной документации только трёх лекарственных препаратов, характеризует фазовую устойчивость эмульсии

(препарат выдерживает требования, если на поверхности эмульсии отсутствуют большие капли и какие-либо признаки гетерогенности) и, на наш взгляд, целесообразно его включение в перечень обязательных показателей.

Показатели «Теоретическая осмолярность» (расчётное значение) и «Осмоляльность» приводятся для 15 из 17 лекарственных препаратов. При этом указанные показатели играют важную роль при определении качества ЛС в связи с высокими максимальными суточными дозами таких препаратов (от 2,5 л в расчёте на среднюю массу тела взрослого человека 70 кг). Однако такой показатель как «Теоретическая осмолярность» предполагает теоретический расчёт осмотического давления в расчёте на объём раствора (мОсм/л), тогда как показатель «Осмоляльность» уже выражается в других единицах, массовых (мОсм/кг). На наш взгляд, это является неким несоответствием, поскольку эмульсии обладают плотностью, отличающейся от плотности воды, и для них правомочнее использовать показатель «Осмоляльность».

При изучении нормативных документов на плазмозамещающие растворы (табл. 2) было установлено, что их перечень во многом совпадает с показателями, приводимыми в нормативной документации на эмульсии для парентерального питания.

Таблица 2

Показатели качества ряда плазмозамещающих препаратов

№	Показатель	Плазмозамещающие лекарственные препараты (46)
1	2	3
1.	Описание	46
2.	Подлинность	46
3.	Прозрачность	46
4.	Цветность	46
5.	pH	46
6.	Механические включения (видимые/невидимые)	44/18
7.	Коллоидно-осмотическое давление	3
8.	Теоретическая осмолярность	31
9.	Осмоляльность	12
10.	Удельная плотность	1
1	2	3
11.	Вязкость	1
12.	Относительная вязкость	33
13.	Характеристическая вязкость	17
14.	Молекулярно-массовое распределение (Средняя масса низкомолекулярной и высокомолекулярной фракции, Характеристическая вязкость низкомолекулярной и высокомолекулярной фракции)	34
15.	Степень молярного замещения	11
16.	Средняя молекулярная масса	23
17.	Светопропускание	1
18.	Извлекаемый объём (Номинальный объём, Объём содержимого упаковки)	46
19.	Гемолит.-дей. в-ва	4
20.	Пирогенность	29
21.	Бактериальные эндотоксины	36
22.	Аномальная токсичность	46
23.	Стерильность	46

Показатели качества, приведённые в табл., свидетельствуют, что, как и в случае с эмульсиями, показатели «Описание», «pH», «Извлекаемый объём» встречались во всех нормативных документах. Это же относится и к таким показателям, как «Пирогенность» и/или «Бактериальные эндотоксины», «Аномальная токсичность», «Стерильность». Такой показатель, как «Гемолитически-действующие вещества», также встречается в НД на ЛС, предусматривающие поливинилхлоридную упаковку. В большинстве документов также встречаются такие показатели, как «Теоретическая осмолярность» и «Осмоляльность». Как и в случае эмульсий для парентерального питания, для оценки качества плазмозамещающих растворов следует ввести показатель «Осмо-

ляльность». Однако анализ норматива этого показателя свидетельствует о том, что он существенно различается, находясь в интервале от 265 до 1290 мОсм/кг, что требует корректировки.

Характерно, что для этих растворов предусмотрено определение таких показателей, как «Вязкость», «Относительная вязкость» и «Характеристическая вязкость». Однако, как и в случае с осмолярностью, нормативы этих показателей чётко не определены, как не решён вопрос о введении одного конкретного показателя. На наш взгляд, речь может идти об определении только одного показателя – «Характеристическая вязкость», способного отразить в полной мере специфику инфузионных растворов ВМС.

Аналогичным образом вызывают вопросы ещё четыре показателя, а именно «Молекулярно-массовое распределение», «Средняя масса низкомолекулярной и высокомолекулярной фракции», «Характеристическая вязкость низкомолекулярной и высокомолекулярной фракции» и «Средняя молекулярная масса», которые могут быть представлены одним показателем – «Молекулярно-массовое распределение», для которого также должны быть определены соответствующие нормативы по содержанию высоко- и низкомолекулярных фракций.

Капли глазные в зависимости от типа дисперсной системы могут быть представлены: растворами низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений (ВМС); суспензиями; эмульсиями и комбинированными системами [4].

Таблица 3

Показатели качества, включенные в нормативную документацию на капли глазные

№ п/п	МНН действующего вещества	Показатели качества*										
		П	Ц	Осм	pH	В	Пл	Р.ч	Рес	М.в	П.п	М
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	**Истинные растворы**											
1	Латанопрост	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
2	Хлорамфеникол	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
3	Сульфацетамид	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
4	Диклофенак	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
5	Тетризолин	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
2	**Растворы ВМС (ВМС - действующее вещество)**											
1	Гипромеллоза	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
2	Гипромеллоза + Декстран	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
3	Пилокарпина г/хл + Гипромеллоза	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
4	Гипромеллоза	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
5	Гипромеллоза	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
3	**Растворы ВМС (ВМС - вспомогательное вещество)**											
1	Ципрофлоксацин	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
2	Тобрамицин	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
3	Дексаметазон	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
4	Диклофенак	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
5	Офлоксацин	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
4	**Суспензии**											
1	Фузидовая кислота	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
2	Левокабастин	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
3	Бринзоламид	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
4	Дексаметазон	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
5	Дексаметазон	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
5	**Эмульсии**											
1	Циклоспорин	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+

Условные обозначения

*Показатели: «Описание», «Подлинность», «Извлекаемый объем» или «Номинальный объем», «Стерильность», «Количественное определение» включены во все НД.
П – Прозрачность; Ц – Цветность; Осм – Осмоляльность или Осмолярность;
В – Вязкость, Динамическая вязкость; Пл – Плотность, Относительная плотность; Р.ч – Размер частиц;
Рес. - Ресуспендируемость ; М.в. – Механические включения; П.п. – Посторонние примеси; М – Мутность

Следует отметить, что в случае растворов ВМС речь может идти как о растворах, в которых ВМС являются вспомогательными веществами (пролонгаторами), так и о растворах, где ВМС являются действующими веществами.

В общей структуре капель глазных, зарегистрированных в Российской Федерации, истинные растворы составляют 68,5%, растворы ВМС – 20% (из них 4% – растворы, где ВМС являются действующими веществами), суспензии – 4,7%, на долю эмульсий приходится 0,5% [2].

Проведенный анализ зарегистрированной нормативной документации на капли глазные показал различие в показателях и нормативных требованиях для препаратов разных производителей в одной лекарственной форме (табл. 3).

Требования к каплям глазным различаются в зависимости от состава препарата (природа действующего вещества, наличие пролонгаторов и др.), способа введения действующего вещества в раствор (раствор низкомолекулярных веществ, раствор ВМС, суспензия, эмульсия и т. д.). Например, по показателю «Осмоляльность» или «Осмолярность» оценивается лишь 14 из 21 рассмотренных препаратов, растворы ВМС контролируются по показателю «Вязкость», у 5 препаратов в НД присутствует показатель «Плотность», препараты в форме суспензии контролируются по показателям «Размер частиц», «Седиментационная устойчивость» или «Ресуспендируемость», «Вязкость»; качество эмульсий оценивается по показателям «Размер частиц», «Вязкость», «Мутность».

Показатели «Осмоляльность» или «Осмолярность» вызывают такие же вопросы, как и в случае инфузионных растворов.

Вязкость капель глазных является косвенным показателем пролонгированности. Она должна превышать показатель вязкости слезной жидкости, составляющий 1,02–1,93 сПз. Однозначного мнения о том, какой должна быть вязкость глазных капель, нет. Однако в различных нормативных документах значение этого показателя оказывается неоправданно завышенным, что свидетельствует о необходимости его нормирования. Считается, что значение вязкости глазных капель должно составлять 15–30 сПз [5].

В другом источнике сообщается, что повышение проникновения лекарственного вещества через роговицу является максимальным при вязкости раствора от 15 до 150 мПа. Дальнейшее повышение вязкости приводит к снижению скорости дренажа, утолщению слезной плёнки и препятствует движению век [7]. Введение слишком большого количества пролонгатора может привести к раздражению, нечеткому зрению и кристаллизации полимера на ресницах [8].

ГФ XI и зарубежные фармакопеи не регламентируют вязкость глазных капель, однако в общих монографиях указывается, что в состав капель могут вводиться вспомогательные вещества, повышающие вязкость растворов с целью пролонгирования действия лекарственного препарата [6, 9].

В составе глазных капель могут использоваться поливиниловый спирт и полоксамер, полисахариды (гиалуроновая кислота) и производные целлюлозы (метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, карбоксиметил-целлюлоза), декстран, ксантан и др. Мукоадгезивные полимеры, например, производные полиакриловой кислоты или хитозана, могут адсорбироваться на поверхности конъюнктивы или роговицы, что является дополнительным преимуществом [7].

Показатели «Вязкость», «Мутность» и «Размер частиц» также должны быть унифицированы, как и в случае с парентеральными ЛФ.

Таким образом, выполненные исследования позволяют сделать заключение о том, что при составлении Общих фармакопейных статей «Глазные лекарственные формы» и «Лекарственные формы для парентерального применения» в них должны быть включены соответствующие показатели качества и методы их определения с обязательным указанием нормируемых значений, отражающих особенности конкретной лекарственной формы.

Литература

1. Государственная Фармакопея СССР. Изд. XI. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М. : Медицина, 1989. – 398 с.

2. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. [Электронный ресурс]. // http://grls.rosminzdrav.ru/

3. Отраслевой стандарт «91500.05.001.00 - Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения». Утверждён Приказом Министерства здравоохранения России от 01.11.2001 № 388 «О государственных стандартах качества лекарственных средств».

4. Фармацевтическая технология: технология лекарственных форм / И.И. Краснюк, С.А. Валевко, Г.В. Михайлова [и др.]. – 2-е изд., стер. – М. : Академия, 2006. – 592 с.

5. Фадеева, Д.А. Изучение физико-химических свойств пролонгаторов для глазных лекарственных форм / Д.А. Фадеева, М.А. Халикова, М.Ю. Новикова, Е.Т. Жилякова, О.О. Новиков // Кубанский научно-медицинский вестник. – 2009. – № 3 (108) – С. 132-135.

6. The Japanese Pharmacopeia 16th edition. – 2011. – P. 1-2131.

7. Rathore, K.S. An Insight into Ophthalmic Drug Delivery System / K.S. Rathore, R.K. Nema // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. – 2009. – № 1(1). – P. 1-5.

8. Ridder III, W.H. Shortterm Effects of artificial Tears on Visual Performance in Normal Subject / W.H. Ridder III, J.O. Lamotte, L. Ngo, J. Fermin // Optometry and vision science. – 2005. – Vol. 82, № 5. – P. 370-377.

9. United States Pharmacopeia 34th edition. [Электронный ресурс] // United States Pharmacopeial Convention. http://www.uspnf.com/uspnf/login.

ESTABLISHING OF QUALITY REQUIREMENTS TO SOME STERILE DOSAGE FORMS

I.V. SAKAEVA
K.A. BICHENOVA
R.A. LAVRENCHUK
E.I. SAKANJAN

Federal State Budgetary Institution «Scientific centre for expert evaluation of medical products» Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

e-mail: lavrenchuk@regmed.ru

In this review the analysis of quality requirements to such sterile dosage forms as infusions and ophthalmic drops is presented. Besides complying with requirements to particulate matter and sterility, such factors as isotonicity, pH, in some cases certain value of viscosity and density could have been obligatory. Monographs of foreign pharmacopoeias (European, USA, Japanese and International) on these finished dosage forms include no wide range of specific quality requirements and don't establish exact values of considering quality parameters. Similar situation is observed in national quality regulatory documentation (The State Pharmacopoeia of USSR 11th edition and OST "Quality standards of medicines. Main principles"). Analysis of quality requirements included in specifications shows not only difference between lists of requirements, but difference in value of considering quality parameters. In this connection, unification of quality requirements to infusions and ophthalmic drops is relevant.

Key words: parenteral preparations, infusions, ophthalmic drops, monographs, pharmacopoeial requirements, standardization

УДК 615.07

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА MALDI/TOF/MS В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Д.И. ПИСАРЕВ[1], О.О. НОВИКОВ[1]
Г.В. ВАСИЛЬЕВ[1], О.А. СЕЛЮТИН[2]

[1] Белгородский государственный национальный исследовательский университет

[2] Центр контроля качества и сертификации лекарственных средств, г.Воронеж

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

В статье представлены результаты исследований, посвящённых разработке методологии анализа некоторых тест-препаратов, относящихся к различным химическим группам, с помощью метода MALDI/TOF/MS.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, карнозин, резвератрол, флавоноиды.

Введение. В данной статье представлены результаты собственных исследований, посвящённых разработке методологии анализа некоторых тест-препаратов, относящихся к различным химическим группам, с помощью метода MALDI/TOF/MS. Выбор объектов исследования является практически случайным, так как именно такой подход, на наш взгляд, в полной мере позволил наглядно показать возможности метода масс-спектрометрии, широту его аналитических возможностей.

Кроме того, предлагаемые наборы разработанных методик имеют реальную практическую значимость, так как решают в достаточной степени весь спектр аналитических задач, связанных с конкретными объектами исследования.

Для решения задач, стоящих перед современной химией и фармацией, требуется использование методов быстрого и надежного анализа на молекулярном уровне как индивидуальных веществ, так и сложных смесей. Использование классических методов разделения (колоночная, тонкослойная, бумажная хроматография) и анализа (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопия) до сих пор широко распространено, поскольку предоставляет большой объём важной информации о строении соединения. Так, УФ-спектр указывает на тип ароматической системы или сопряжённого хромофора, ИК-спектр позволяет обнаружить наличие функциональных групп, спектр ЯМР позволяет определить атомы, входящие в молекулу, и то, как они между собой соединены химическими связями, т. е. определить или подтвердить структуру вещества (основная задача метода). Эти методы не требуют дорогостоящего аппаратурного оснащения (исключение ЯМР). Однако их использование в большинстве случаев оправдано только тогда, когда устанавливается структура нового соединения, поскольку они имеют ряд существенных недостатков. В частности, требуют наличия большого количества образца в очень чистом состоянии, сопровождаются длительной пробоподготовкой, имеют недостаточную чувствительность, экспрессность и селективность, характеризуют какой-либо один структурный элемент молекулы, что обусловливает их совокупное использование для характеристики вещества, часто сопряжены с использованием базы данных.

Поэтому для анализа биологически активных веществ в настоящее время наибольшее распространение приобрели хроматографические методы, а именно высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и газожидкостная хроматография (ГЖХ). Настоящие хроматографические методы являются многоканальными источниками информации, то есть с их помощью одновременно реализуется большое число параметров, характеризующих разделение, идентификацию, количественную оценку компонентов. Метод ВЭЖХ является более гибким, чем ГЖХ, что определяется его возможностью определения термолабильных и малолетучих веществ. Поэтому ВЭЖХ

идеально отвечает всем требованиям, предьявляемым к аналитическим методам по селективности и чувствительности. Метод ВЭЖХ, однако, не всегда удобен из-за его низкой пропускной способности и большой продолжительности исследований.

Несмотря на практически полное отсутствие слабых сторон ВЭЖХ, конкуренцию ему может составить масс-спектрометрический метод (МС).

Установлено, что с помощью МС решается большое количество аналитических задач. Качественные исследования используются для установления структуры неизвестных органических соединений различного происхождения, в том числе природных, синтетических, метаболитов лекарственных веществ. МС даёт важную информацию для определения молекулярной массы, структуры молекул. Среди масс-спектрометрических методов метод *MALDI/TOF/MS* стал мощным аналитическим инструментом в химических и биологических исследованиях за счет высокой производительности и чувствительности, мягкой и эффективной ионизации нелетучих веществ, толерантности к присутствию примесей, быстроте определения молекулярных масс, а также относительной простоте получаемых масс-спектров [1, 2].

Несмотря на это, МС до сих считается методом, дополняющим информацию, получаемую с помощью других физических методов. К тому же зачастую МС – это весьма удобный метод детекции результатов хроматографического разделения [3-5].

Существующий подчинённый характер данного метода ограничивает его применение в индивидуальном приложении для анализа таких весьма сложных объектов, как природные соединения. Имеющиеся в литературе данные [4-7] по изучению с помощью масс-спектрометрии природных соединений не имеют системного характера, поэтому требуют обобщения.

Нами выбран метод MALDI для разработки количественного определения, поскольку он имеет значительные преимущества перед другими методами масс-спектрометрии, основные из которых перечислены в таблице.

Как видно из данных таблицы, конкурентные *MALDI/TOF/MS* методы электроспрейной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении имеют исключительно вторичный характер в качестве детекторов в методе ВЭЖХ и самостоятельного применения не имеют. К тому же метод *ESI/MS* требует нахождения вещества в растворённом виде в полярном растворителе, что подходит для анализа только полярных соединений. Хотя этого недостатка лишён метод *APCI/MS*, однако при его использовании возможно термическое разложение образца.

Чтобы полностью и реалистически оценить возможности *MALDI/TOF/MS,* необходимо установить его сильные и слабые стороны.

Основные достоинства метода:

1. *Универсальность*. Метод *MALDI/TOF/MS* подходит для анализа соединений любой степени сложности, полярности и термочувствительности.

2. *Высокая чувствительность*. Замечательной особенностью МС является сверхвысокая чувствительность, недостижимая никакими другими методами. Следствием этого является возможность обойтись незначительным количеством образца для анализа.

3. *Широкий диапазон измерений масс*. Метод *MALDI/TOF/MS* позволяет определять молекулярную массу соединений от 0 до 300000 дальтон.

4. *Использование для неочищенных образцов*. Вследствие дифференцирующей возможности времяпролётного анализатора масс (*TOF/MS*), на одном спектре можно наблюдать наличие всех компонентов сложной смеси без предварительного сложного и длительного по времени её разделения и очистки на индивидуальные компоненты. Следовательно, для анализа не требуется сложной пробоподготовки.

5. *Возможность идентификации*. Поскольку *MALDI/TOF/MS* относится к методам мягкой ионизации, то в спектре можно наблюдать пик молекулярного иона, что может служить в качестве способа идентификации. Точное измерение массы с высоким разрешением является важным инструментом, наряду с другими спектральными методами для подтверждения структуры природных соединений. Он также использу-

ется в качестве структурного доказательства, когда элементный анализ не представляется возможным, например, при изучении второстепенных компонентов.

Таблица

Сравнение основных способов ионизации в масс-спектрометрии

Способ ионизации	Диапазон масс (Da)	Влияние матрицы	Разложение	Сложные смеси	Совместимость с ЖХ	Чувствительность
Ионизация электроспрея (ESI)	70000	Нет	Нет	Ограничено	Превосходно	От фемтомоль до пикомоль
Комментарии	Подходит для совмещения жидкостной хроматографии (ЖХ) и МС; устойчивость к небольшим концентрация солей (до нескольких мМ); многократная зарядка полезна, но значительно подавлена в случае смесей; низкая устойчивость к смесям; мягкая ионизация (наблюдается мало фрагментов)					
NanoESI	70000	Нет	Нет	Несколько ограничено, но лучше, чем ESI	Возможно	От зептомоль до фемтомоль
Комментарии	Очень чувствителен и очень малые скорости потока; применим для ЖХ/МС, но малые скорости потока требуют специальных систем; умеренная устойчивость к солям (до нескольких мМ); многократная зарядка полезна, но может быть подавлена в случае смесей; умеренно применим для смесей; мягкая ионизация (наблюдается мало фрагментов)					
APCI	1200	Нет	Термическое разложение	Ограничено	Превосходно	Фемтомоли
Комментарии	Превосходно для совмещения ЖХ и МС; малая устойчивость к солям (до нескольких мМ); применимо к гидрофобным образцами					
MALDI	300000	Есть	Фоторазло-жение и реакции с матрицей	Хорошо для сложных смесей	Возможно	Фемтомоли
Комментарии	Несколько устойчиво к солям; высокая чувствительность; фон матрицы может быть проблемой для ионов с малой массой; мягкая ионизация (наблюдается мало фрагментов); возможно фоторазложение; применимо к сложным смесям. Многократная зарядка весьма ограничена, так что данные не соотносятся с некоторыми другими способами.					
Комментарии	Относительно слабочувствителен; малая фрагментация; мягкая ионизация; высокая устойчивость к солям – до 0,01М; необходима растворимость в матрице					
Электронная ионизация (EI)	500	Нет	Термичес-кое разложение	Ограничено, если не используется ГЖХ/МС	Очень ограничено	Пикомоли
Комментарии	Хорошая чувствительность; уникальные данные по фрагментации с возможностью просмотра по базам данных; термическое разложение – основная проблема для биомолекул и других высокомолекулярных соединений					

6. *Возможность количественного определения.* МС является мощным методом количественного анализа, основанием к этому является факт, что масс-спектрометрический сигнал пропорционален потоку частиц.

7. *Надёжность и точность.* При использовании МС возможно получение очень точного значения молекулярной массы. Значение прямого определения молекулярной массы с точностью до 0,1 единицы трудно переоценить.

8. *Структурная информация.* По данным масс-спектра можно сделать вывод относительно размера и структуры углеродных заместителей, структурной информации, характера агликона и заместителей (сахара, ацильные группы и т. д.); межгликозидных связей и позиции замещения агликона, а также углеводной последовательности. К тому же в масс-спектрах можно наблюдать структурные изменения в молекуле (гидролиз, окисление).

9. *Экспрессность. MALDI/TOF/MS* позволяет быстро получать и обрабатывать результаты, часто требуя меньше минуты для фактического анализа после элементарной пробоподготовки. Это позволяет осуществлять быстрый скрининг веществ.

10. *Простота.* Предоставляемая *MALDI/TOF/MS* информация понятна даже непрофессионалам, поскольку интерпретация масс-спектрометрических данных не требует глубоких знаний в данной области. Также прибор не требует особого обслуживания, расходных материалов.

Недостатки метода:

1. Высокая стоимость оборудования. Стоимость оборудования некоторых приборов может достигать десятков тысяч евро, хотя имеющиеся настольные приборы позволяют компенсировать этот недостаток.

2. Влияние пиков матрицы. Наблюдению молекулярного пика иона могут мешать пики матрицы. Поскольку для регистрации спектров веществ используется матрица, она может накладываться на пики основных веществ с молекулярной массой ниже 500 Da. Но в общем случае матрица пригодна к использованию для анализа малых молекул, если она обеспечивает эффективную ионизацию, минимальную фрагментацию и не вызывает наложений сигналов в масс-спектре.

3. Невозможность определить изомеры. Поскольку изомеры имеют одиноковую молекулярную массу, следовательно, с помощью масс-спектрометрии их различить нельзя. К тому же масс-спектрометрия даёт мало информации о конфигурации гликозидной связи.

Таким образом, представленные результаты сравнительного анализа *MALDI/TOF/MS* позволяют сделать вывод о существенном преобладании достоинств настоящего метода. Большинство перечисленных недостатков может быть легко скомпенсировано.

Ниже в качестве примеров представлены результаты анализа ряда соединений различного происхождения методам *MALDI/TOF/MS*.

Экспериментальная часть

Использование *MALDI/TOF/MS* для идентификации резвератрола

Для идентификации субстанции резвератрола методом *MALDI/TOF/MS* использовали $2{,}5\times10^{-5}$ г/мл раствор в смеси спирта этилового 96% и ацетонитрила, который в количестве 0,5 μl с помощью дозатора наносили на мишень, высушивали и сверху наносили каплю матрицы, и после высушивания регистрировали масс-спектр, который приведён на рис. 1.

В масс-спектре резвератрола наблюдаются интенсивные пики молекулярных ионов с зарядом m/z = 228,347 и 229,231. Это свидетельствует о том, что резвератрол ионизируется частично (пик иона с зарядом m/z = 229,321), а часть молекулы не претерпевает ионизации и показывает пик незаряженной молекулы (пик иона с зарядом m/z = 229,321). Данное поведение резвератрола при ионизации в методе *MALDI/TOF/MS* может являтся его специфической особенностью и однозначно характеризовать его подлинность. Отсутствие других интенсивных пиков молекулярных ионов в масс-спектре даёт дополнительнительную информацию о чистоте субстанции. Чувствительность метода составляет $<1{,}2\times10^{-8}$ г/мл.

Представленный метод позволяет однозначно подтвердить подлинность и чистоту резвератрола, характеризуется минимальной пробоподготовкой, исключительно высокой чувствительностью, не достижимой другими методами, легко реализуется за весьма короткий промежуток времени (общее время анализа, включая пробоподготовку, составляет несколько минут).

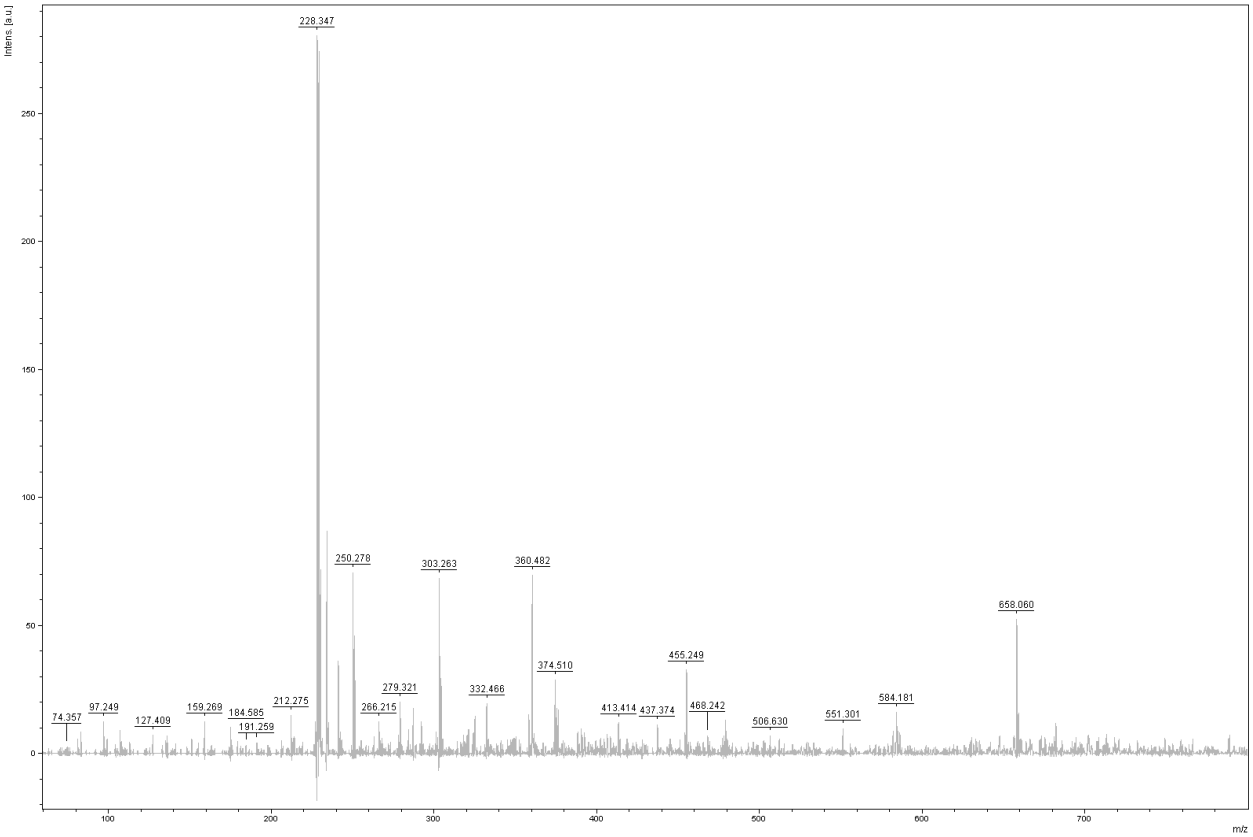


Рис. 1. Масс-спектр резвератрола, полученный *MALDI/TOF/MS*

Определение резвератрола в продуктах растительного происхождения

Для разработки идентификации резвератрола в объектах растительного происхождения использована экспресс-методика *MALDI/TOF/MS*, подтверждение правильности получаемых результатов осуществляли с помощью ВЭЖХ на обращенных фазах в градиентном режиме элюирования.

В качестве объектов исследования задействованы плоды винограда (чёрный сорт кишмиш), биологически активная добавка – пищевой концентрат полифенолов винограда «Эноант» (Украина).

Полученные результаты масс-спектрометрического определения представлены на рис. 2.

На представленном рис. 2 видно, что компонент, имеющий пик молекулярного иона m/z = 228,218, соответствует молекулярной массе резвератрола.

Таким образом, использованная методика позволяет экспрессно, достоверно подтвердить присутствие резвератрола в анализируемых образцах без предварительного хроматографического разделения. Результаты масс-спектрометрического определения подтверждали с помощью обращённофазной ВЭЖХ.

Для определения резвератрола в плодах винограда 10,0 г свежих плодов измельчали в ступке, помещали в плоскодонную колбу ёмкостью 100 мл, добавляли 25 мл спирта этилового и экстрагировали на ультразвуковой водяной бане при температуре 80°С в течении 2 часов. Полученное извлечение фильтровали и в количестве 5 μl вводили в хроматограф. Детектировали при длине волны λ = 306 нм, результаты представлены на рис. 3.

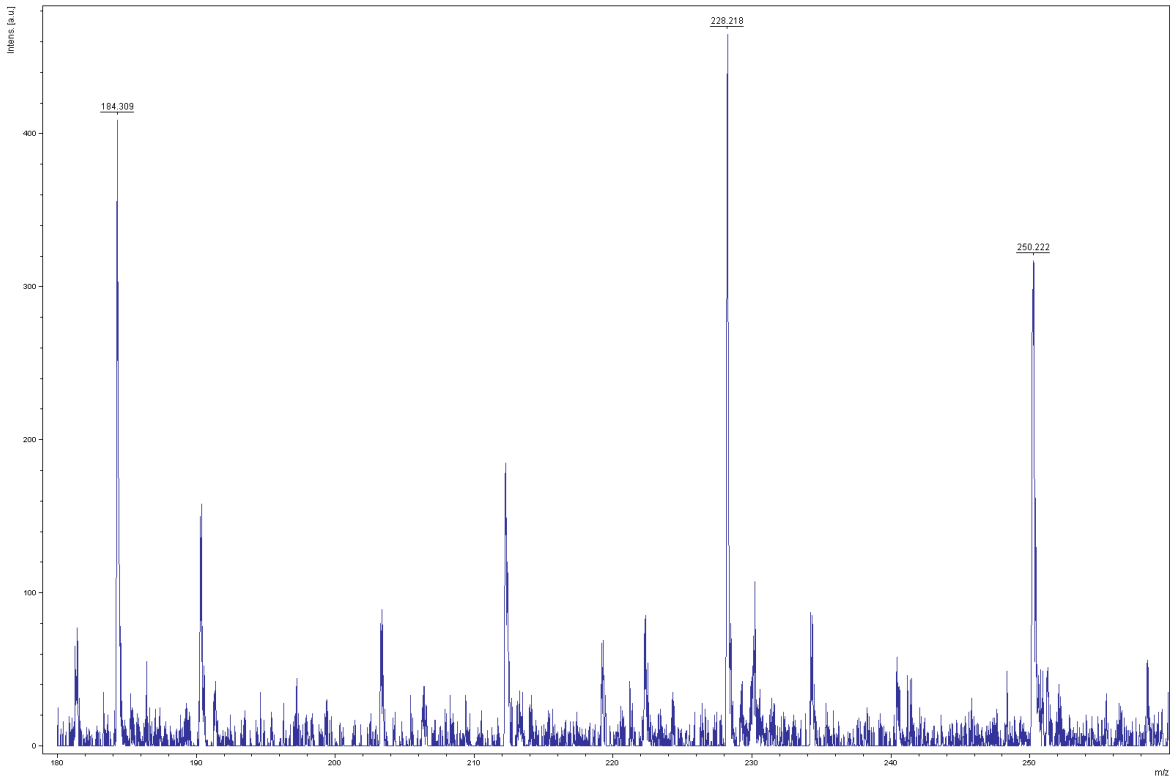


Рис. 2. Масс-спектр спиртового извлечения из плодов винограда

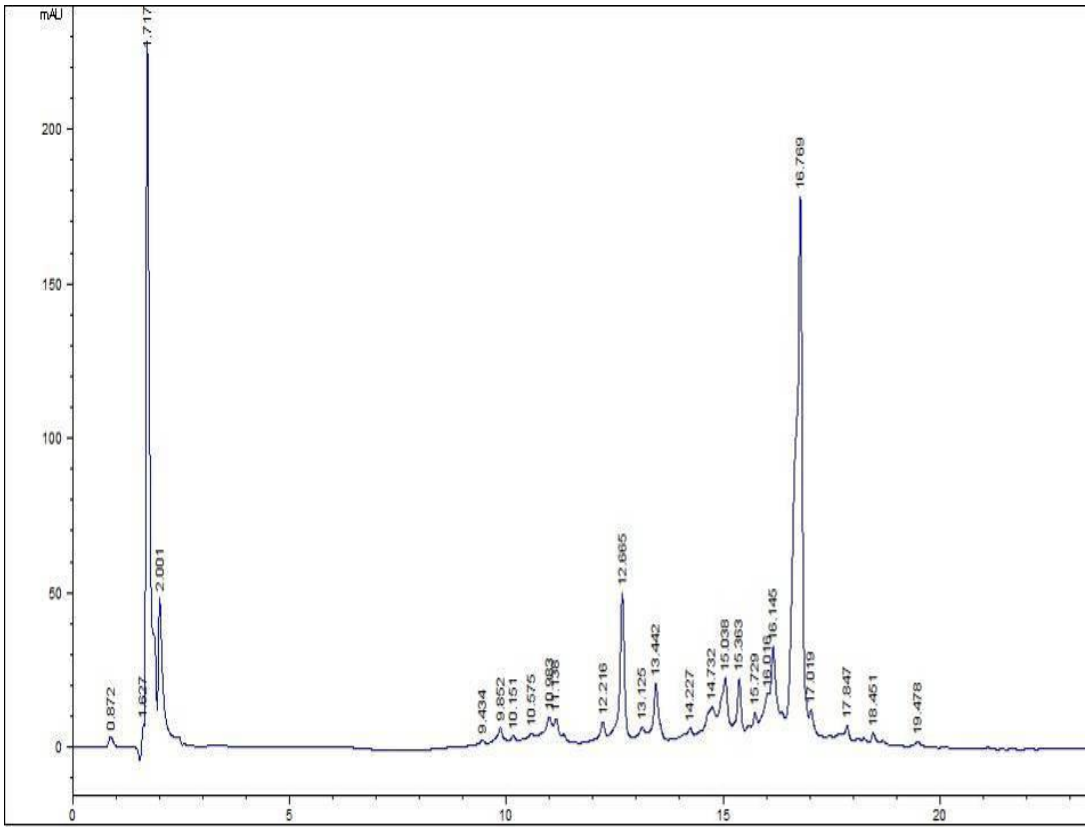


Рис. 3. Хроматограмма спиртового извлечения из плодов винограда

В образце ягод винограда, взятых на анализ, удалось обнаружить резвератрол. На представленной хроматограмме время его удерживания составило 17,847 мин.

В пищевом концентрате полифенолов винограда «Эноант» также удалось обнаружить резвератрол. Для этого вышеобозначенный объект в количестве 5 μl вводили в хроматограф. Результаты представлены на рис. 4. На хроматограмме резвератрол имел время удерживания 13,481 мин по характерному электронному спектру.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что присутствие резвератрола можно обнаружить методом *MALDI/TOF/MS* с большей экспрессностью, чем методом ВЭЖХ.

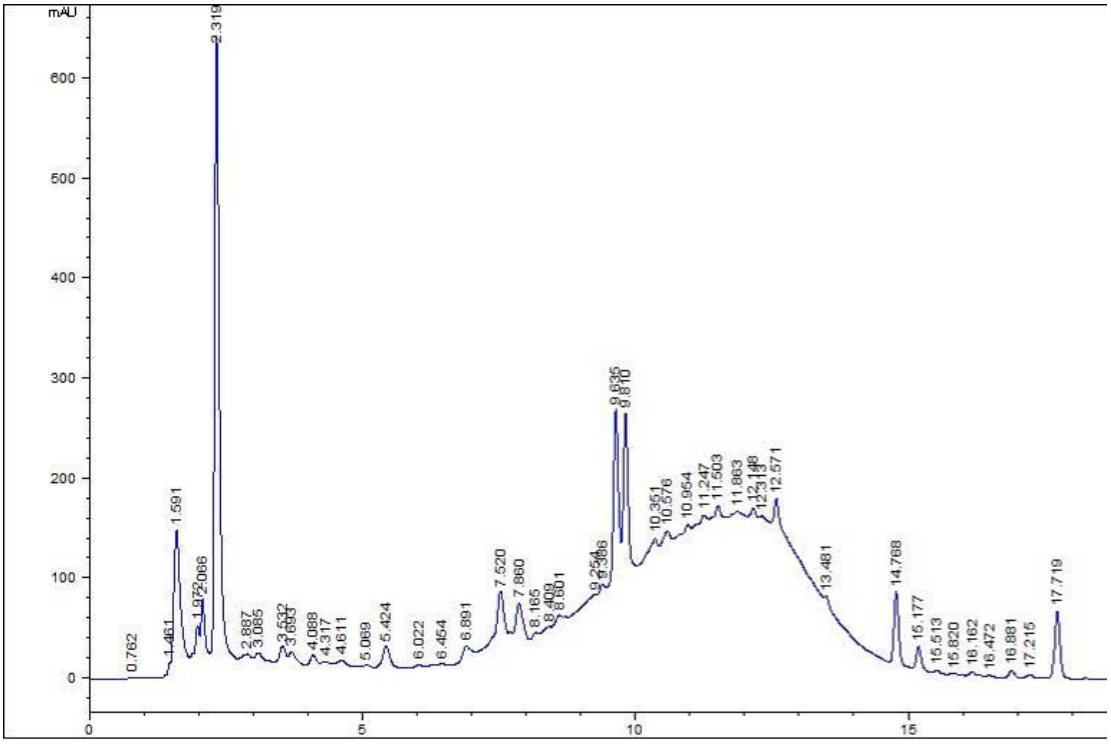


Рис. 4. Хроматограмма пищевого концентрата полифенолов винограда «Эноант»

Использование масс-спектрометрии *MALDI/TOF/MS* для идентификации карнозина

Идентификация карнозина с помощью МС разработана очень мало. В доступной нам литературе найдены ссылки на использование тандемной масс-спектрометрии и электроспрейной ионизации для характеристики карнозина в биохимических исследованиях [8-10]. Для целей фармацевтического анализа они малопригодны, поэтому нами предложена методика идентификации карнозина с помощью *MALDI/TOF/MS*.

Для масс-спектрометрического исследования получали водный раствор карнозина, который в количестве 0,5 μl наносили на мишень и после высыхания сверху капали каплю матрицы – α-цианокоричной кислоты. При регистрации масс-спектра наблюдается наиболее интенсивный пик молекулярного иона с зарядом m/z = 227,489, что соответствует протонированной форме карнозина. Кроме того, встречаются пики молекулярных ионов меньшей интенсивности с зарядами m/z = 249,485 и 265,440, свидетельствующие о нахождении карнозина в виде аддуктов с ионами натрия и калия. Весьма полезную информацию для идентификации может предоставить частичная фрагментация молекулы карнозина. Поскольку карнозин является дипептидом, построенным из остатков β-аланина и гистидина, то на спектре можно увидеть фрагментацию молекулы с образованием гистидина – пик иона с m/z = 156,492, что несомненно можно охарактиеризовать как специфический признак карнозина (рис. 5).

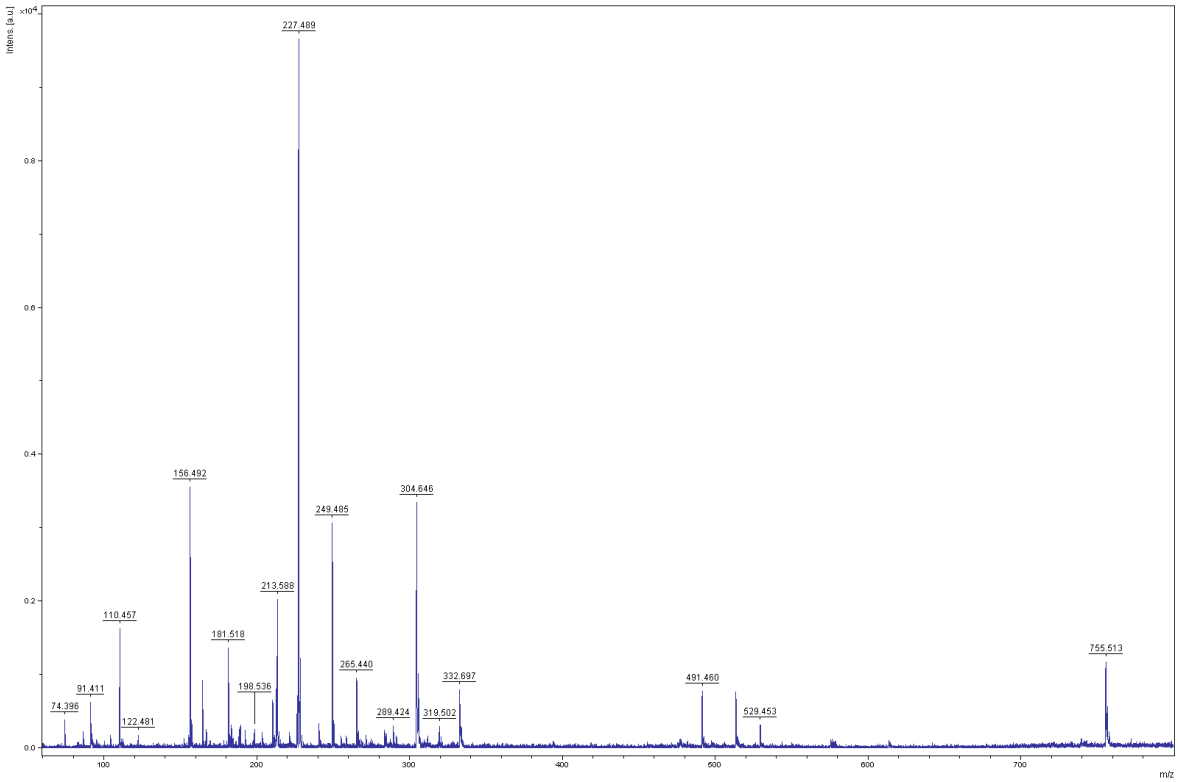


Рис. 5. Масс-спектр карнозина

Чувствительность методики составила < 0,221 пикомоль ($2{,}21\times10^{-12}$ моль), что гораздо превышает чувствительность известных способов идентификации.

Определение флавоноидов будры плющевидной

Для анализа использовали экстракт густой травы будры плющевидной, который в количестве около 0,1 г помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 10 мл спирта этилового 70%, взбалтывали до его полного растворения и доводили тем же растворителем до метки. Полученный раствор в количестве 0,5 μl наносили на мишень и после высыхания сверху капали каплю матрицы – α-цианокоричной кислоты. Результаты представлены на рис. 6.

Полученный масс-спектр позволил без предварительного фракционирования обнаружить молекулярные массы флавоноидов будры плющевидной. В частности, пики молекулярных ионов с зарядами m/z = 272,408; m/z = 287,364; и m/z =303 принадлежат молекулярным массам агликонов флавоноидов, а именно апигенину, лютеолину/кемпферолу и кверцетину соответственно. Пик молекулярного иона с зарядом m/z = 433,221 соответствует гликозидной форме апигенина, пик иона с m/z = 449 указывает на гликозидирование агликона лютеолина/кемпферола, а пик иона с m/z = 487,266 и 633,249 соответствует моно- и дигликозидной формам кверцетина.

Таким образом, можно утверждать, что метод *MALDI/TOF/MS* применим для идентификации флавоноидов будры плющевидной.

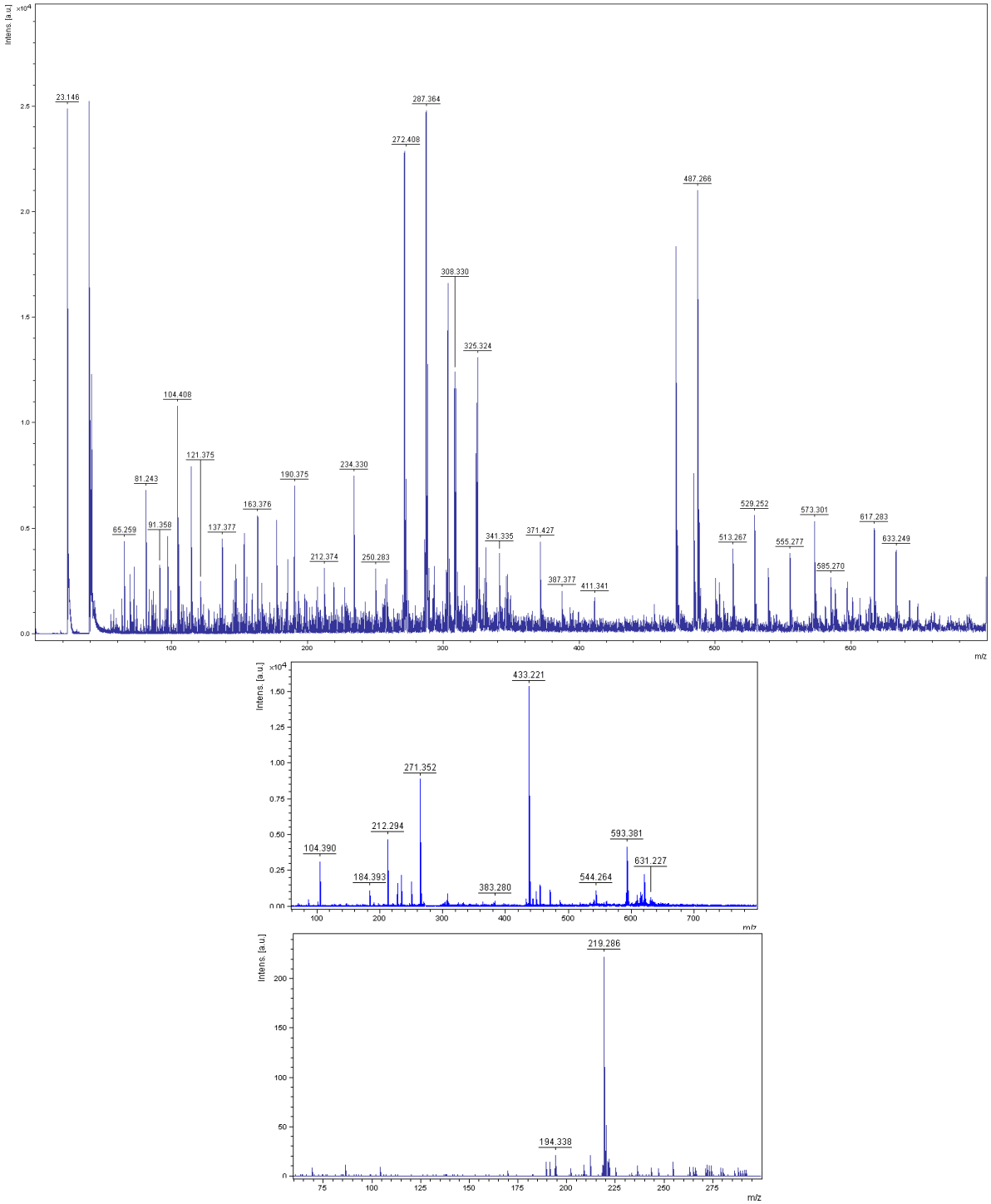


Рис. 6. Масс-спектры экстракта будры плющевидной

Резюме

В результате проведенных исследований наглядно продемонстрированы возможности метода *MALDI/TOF/MS* применительно к исследуемым объектам.

Предложенная *MALDI/TOF/MS*-методика позволила достоверно подтвердить присутствие резвератрола в нативном виде и анализируемых образцах пищевой добавки «Эноант» без ее предварительного хроматографического разделения и с большей экспрессностью, чем методом ВЭЖХ.

Чувствительность *MALDI/TOF/MS*-методики обнаружения карнозина составила < 0,221 пикомоль ($2{,}21\times10^{-12}$ моль), что значительно превышает чувствительность известных способов идентификации.

Также без предварительного фракционирования с помощью *MALDI/TOF/MS* удалось обнаружить молекулярные массы флавоноидов будры плющевидной.

Работа выполнена в рамках задания Министерства образования и науки РФ НИУ «БелГУ» № 4.959.2011 по теме «Разработка оригинальной малостадийной технологии получения субстанций биологически активных соединений класса антоцианов в виде стабильных металлорганических комплексов».

Литература

1. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2003. – 494 с.
2. Клюев, Н.А. Современные методы масс-спектрометрического анализа органических соединений / Н.А. Клюев, Е.С. Бродский // Рос. хим. ж-л. – 2002. – Т. XLVI, № 4. – С. 57-63.
3. Dass, C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry / C. Dass // New Jersey: John Wiley & Sons. – 2007. – 585 p.
4. Tanaka, K. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry / K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 1988. — Т. 2. — С. 151.
5. Karas, M. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules / M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp // Anal. Chem. — 1985. — № 57. — С. 2935.
6. Knochenmuss, R.A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / R. Knochenmuss // J. Mass Spectrom. — 2002. — № 37. — P. 867.
7. Chaurand, P. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry / P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler // J Am Soc. Mass Spectrom. – 1999. – № 10(2). – P. 91-103.
8. Aldini, G. Detoxification of cytotoxic a,b-unsaturated aldehydes by carnosine: characterization of conjugated adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry and detection by liquid chromatography/mass spectrometry in rat skeletal muscle / G.Aldini, P.Granata, M.Carini // J. Mass Spectrom. – 2002. – № 37. – P. 1219-1228.
9. Aldini, G.Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction?/ G.Aldini, M.Carini, G.Beretta et al.//Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2002. – Vol. 298. – P.699-706.
10. Yi-Hong Chen. Mass spectrometric determination of dabsyl-chloride derivatised anserine, carnosine and taurine in commercial chicken essences / Chen Yi-Hong, Lin Ya-Ping, Liou Su-Er et al./ International Journal of Food Science and Technology. – 2007. – Vol. 42. – P. 593-600.

EXPERIENCES OF MALDI / TOF / MS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

D.I. PISAREV[1]
O.O. NOVIKOV[1]
G.V. VASILIEV[1]
O.A. SELJUTIN[2]

[1] Belgorod National Research University

[2] Center for quality control and certification of medical products, Voronezh

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

The paper presents results of studies on the development of methodology for analysis of some of the test drugs belonging to different chemical groups, using theMALDI / TOF / MS.

Key words: mass spectrometry, carnosine, resveratrol, flavonoids

УДК 577.19:54.06

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАРИАНТА ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА MALDI/TOF/MS С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА РЕЗВЕРАТРОЛА

Д.И. ПИСАРЕВ
О.О. НОВИКОВ
Г.В. ВАСИЛЬЕВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

Рассмотрен вариант внутреннего стандарта MALDI/TOF/MS в сравнении с другими методами количественного анализа на примере субстанции резвератрола. Установлены очевидные методические и аналитические преимущества масс-спектрометрии при ее реализации предложенным способом.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия, титриметрия, ВЭЖХ, резвератрол.

Преимущество масс-спектрометрии перед другими методами анализа заключается, в первую очередь, в том, что данный метод на сегодняшний день является наиболее чувствительным из спектроскопических методов молекулярного анализа по сравнению с другими ныне существующими, такими как ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопия. Кроме того, масс-спектрометрия дает возможность проведения анализа за минимальное время с простой пробоподготовкой [1, 2].

Для количественного анализа данным методом можно использовать масс-спектр как таковой. Для этого следует выбрать некоторый пик, принадлежащий определяемому веществу, и измерить его интенсивность.

Однако для того чтобы нивелировать погрешности стадии пробоподготовки и погрешности выхода ионизации, по нашему мнению, необходимо использовать внутренний стандарт.

Для сравнения предлагаемого варианта масс-спектрометрии использованы методики количественного определения резвератрола методами УФ-спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и метод ацетилирования с алкалиметрическим завершением.

Экспериментальная часть

Определение резвератрола с помощью спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

Для анализа резвератрола методом УФ-спектрофотометрии использовали 0,0004% раствор субстанции резвератрола в спирте этиловом 96%. Для этого около 0,01 г (точная навеска) субстанции резвератрола, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл спирта этилового 96%, перемешивали, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивали.

1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки и перемешивали.

Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 306 нм, относительно спирта этилового. Параллельно в аналогичных условиях измеряли 0,0004% раствор стандартного образца (СО) резвератрола в спирте этиловом 96%. Количественное содержание резвератрола определяли по формуле 1:

$$X = \frac{D_x \times C_{cm} \times W_1 \times W_2}{D_{cm} \times m \times V_a}, \qquad (1)$$

где:

D_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_{cm} – оптическая плотность раствора СО резвератрола;

m_o – масса навески стандартного образца резвератрола, г.

Приготовление раствора СО резвератрола

0,01 г (точная навеска) СО резвератрола помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли небольшое количество спирта этилового 96%, перемешивали до полного растворения, объём раствора доводили до метки тем же растворителем (исходный раствор).

1 мл исходного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки и перемешивали.

Полученные спектры представлены на рис. 1.

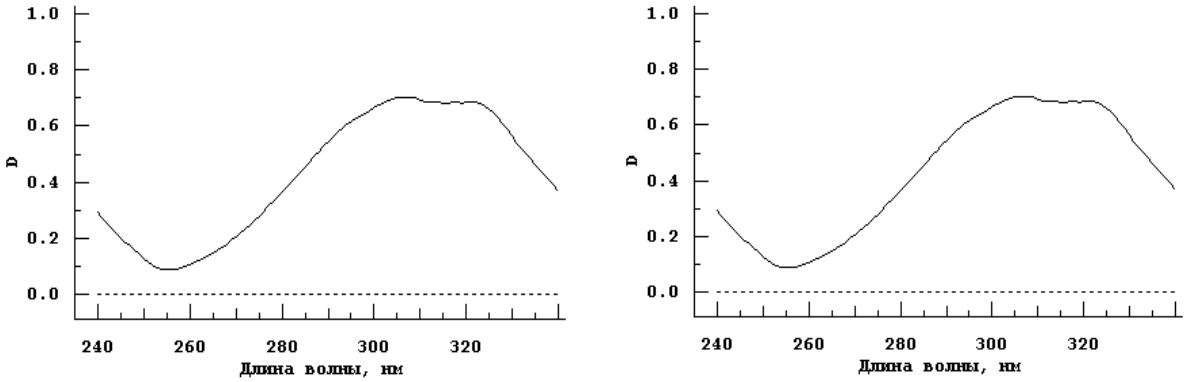


Рис. 1. Спектр поглощения резвератрола:
а – раствор СО резвератрола, б – раствор субстанции резвератрола

Было проведено 7 параллельных измерений. Результаты статистической обработки определения содержания резвератрола в субстанции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом УФ-спектрофотометрии

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X), %	S	$\overline{\Delta X}$	ε, %
1.	0,01	102,5	1,24	3,05	3,08
2.	0,0093	97,0			
3.	0,0096	96,9			
4.	0,0098	98,5			
5.	0,0094	97,5			
6.	0,0096	96,5			
7.	0,0105	105,0			
		$\overline{X}$ = 99,1%			

Как видно из данных табл. 1, содержание резвератрола в субстанции составило 99,1±3,05%, относительная ошибка единичного определения с 95% вероятностью находилась в пределах ±3,08%, что укладывается в критерий погрешности, регламентируемый ГФ.

Определение субстанции резвератрола методом ВЭЖХ

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «*Agilent Technologies 1200 Infinity*» с автоматическим пробоотборником *Agilent 1200*, вакуумным микродегазатором, градиентным насосом и термостатом той же серии. Регистрацию полученных данных осуществляли с помощью двух систем детекторов: спектрофотометрического и масс-спектрометрического. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей серии *Agilent 1200* (диапазон длин волн от 190 до 950 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм; объемом 13 мкл), шаг сканирования – 2 нм.

Для регистрации и обработки спектральных данных и хроматограмм использовали программное обеспечение «*Agilent ChemStation*».

Испытания проводили с использованием стальных хроматографических колонок, наиболее подходящей из которых оказалась: *Reprosil-Pur C18-AQ 150 мм×2 мм*, с размером частиц 3 μм.

Для приготовления подвижных фаз использовали растворители: воду сверхчистую (*HPLC*), спирт этиловый (ч.д.а.), ацетонитрил (*HPLC*), уксусную кислоту (х.ч.), ортофосфорную кислоту (х.ч.).

Количественное определение субстанции резвератрола осуществляли в градиентном режиме элюирования. В качестве подвижной фазы (А) – 4% водный раствор кислоты фосфорной, (Б) – ацетонитрил. Элюирование проводили в следующих условиях:

Скорость потока: 0,25 мл/мин.

Температура колонки: 35°С.

Давление: 168 bar.

Детекция: 306 нм.

Объём вводимой пробы: 5 μл.

Состав подвижной фазы программировали (табл. 2).

Таблица 2

Условия градиентного элюирования резвератрола

Время, мин	А,%	В,%
0	90	10
2	50	50
7	30	70

Продолжительность анализа составила 15 минут.

Расчет количественного содержания резвератрола проводили по площади полученного пика, которая должна соответствовать площади пика его стандарта по формуле 2:

$$X = \frac{S_x \times C_{cm} \times W_1 \times W_2 \times 100}{S_{cm} \times m \times V_a}, \qquad (2)$$

где S_x – площадь пика исследуемого вещества;

S_{cm} – площадь пика стандарта;

W, W_2 – разведения, мл;

m – масса навески, г;

V_a – объем аликвоты, мл.

Приготовление раствора испытуемого и СО резвератрола

Около 0,03 г (точная навеска) СО резвератрола помещали в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, прибавляли 80,0 мл спирта этилового 96%, перемешивали, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и снова перемешивали.

5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, доводили объём раствора спиртом этиловым 96% до метки и перемешивали.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы

2,0 мл раствора СО резвератрола выдерживали в течение 5,0 мин на расстоянии 10 см от УФ-ртутной лампы мощностью 250 Вт.

Проверка пригодности хроматографической системы

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пикам резвератрола на хроматограммах раствора СО резвератрола, должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;

– относительное стандартное отклонение площадей пиков резвератрола на хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО резвератрола должно быть:

для двух параллельных хроматограмм – 0,51%;
для трех – не более 1,34%;
для четырех – не более 1,92%;
для пяти – 2,37%;

– коэффициент разделения пиков *цис*- и *транс*-резвератрола на хроматограммах раствора для проверки пригодности хроматографической системы должен быть не менее 1,8.

Хроматограммы субстанции и СО резвератрола представлены на рис. 2.

Было проведено 7 параллельных измерений. Параллельно в аналогичных условиях измеряли 0,0004% раствор СО резвератрола в спирте этиловом 96%. Полученные данные обрабатывали статистически. Результаты исследования количественного определения резвератрола в субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом ВЭЖХ

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X), %	S	$\overline{\Delta X}$	ε, %
1.	0,030	101,0	1,29	3,18	3,17
2.	0,033	98,6			
3.	0,036	103,3			
4.	0,038	106,4			
5.	0,034	97,3			
6.	0,036	98,7			
7.	0,035	97,2			
		$\overline{X}$ = 100,35%			

Как видно из данных табл. 3, содержание резвератрола в субстанции составило 100,35±3,18%, ошибка единичного определения ВЭЖХ – методики определения субстанции резвератрола с 95% вероятностью находилась в пределах 3,17%, что не превышает установленного в ГФ X издания критерия погрешности.

Определение резвератрола методом ацетилирования

Для ацетилирования различных фенолов применяют ангидриды уксусной, пропионовой, стеариновой кислот, 3,5-динитробензольной и некоторые другие. Из этих ацетилирующих реагентов наибольшие распространение получил уксусный ангидрид.

Химическая структура резвератрола близка структуре диэтилстильбестрола, для которого в ГФ X издания предложена методика ацетилирования уксусным ангидридом. Взяв ее за основу и модифицировав, мы разработали и апробировали методику для количественного анализа резвератрола.

Около 0,4 г препарата (точная навеска) помещали в колбу для ацетилирования емкостью 250 мл, прибавляли пипеткой 5 мл раствора уксусного ангидрида в пиридине (3 части безводного пиридина: 1 часть уксусного ангидрида), соединяли колбу с обратным холодильником и нагревали на водяной бане при температуре 70°С в течение 45 минут. Раствор охлаждали, прибавляли через холодильник 25 мл воды очищенной и через 15 минут титровали 0,5Н раствором NaOH, точку эквивалентности фиксировали по изменению окраски индикатора фенолфталеина. Параллельно проводили контрольный опыт. Разность между количеством миллилитров 0,5Н раствора натра едкого, израсходованного на титрование контрольного опыта, и исследуемого раствора пересчитывали на резвератрол. 1 мл 0,5Н раствора NaOH соответствовал 0,038 г резвератрола.

Титр 3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбена в анализируемом растворе составил:

$$T = \frac{C_n \times M}{1000} = \frac{0{,}5 \times 228{,}25 \times 1}{1000 \times 3} = 0{,}038\ \text{г/мл}. \qquad (3)$$

Количество 3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбена в анализируемом растворе рассчитывали согласно формуле 4:

$$\frac{(V_1 - V_2) \times T}{a} \times 100\%, \qquad (4)$$

где V_1 – объем титранта, пошедшего на титрование контрольного опыта, мл;
V_2 – объем титранта, пошедшего на титрование анализируемого раствора, мл;
T – титр вещества в анализируемом растворе, г/мл;
a – масса навески, взятой на титрование, г.

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом ацетилирования с последующим алкалиметрическим завершением представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты количественного определения резвератрола методом ацетилирования

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X), %	S	$\overline{\Delta X}$	ε, %
1.	0,4013	96,26	0,81	2,0	2,04
2.	0,4057	98,84			
3.	0,3944	95,68			
4.	0,4025	99,11			
5.	0,4007	98,39			
6.	0,4017	97,04			
7.	0,4007	102,12			
		$\overline{X}$ = 98,2%			

Как видно из данных табл. 4, содержание резвератрола в субстанции, с использованием метода ацетилирования с алкалиметрическим завершением, составило 98,2±2%, ошибка единичного определения при вероятности 95% – 2,04%, что не превышает предела погрешности, регламентируемого ГФ X издания.

Определение резвератрола методом масс-спектрометрии

В качестве аналита использована субстанция природного биологически активного вещества стильбеновой структуры – резвератрола. В качестве внутреннего стандарта использовано производное бензо-γ-пирона – кверцетин. Данные вещества друг с другом не взаимодействуют, имеют чётко различающиеся молекулярные массы. Пик резвератрола (m/z = 228,342) не накладывается на пик кверцетина (m/z = 303,248), что видно на рис. 2, пики матрицы не мешают определению.

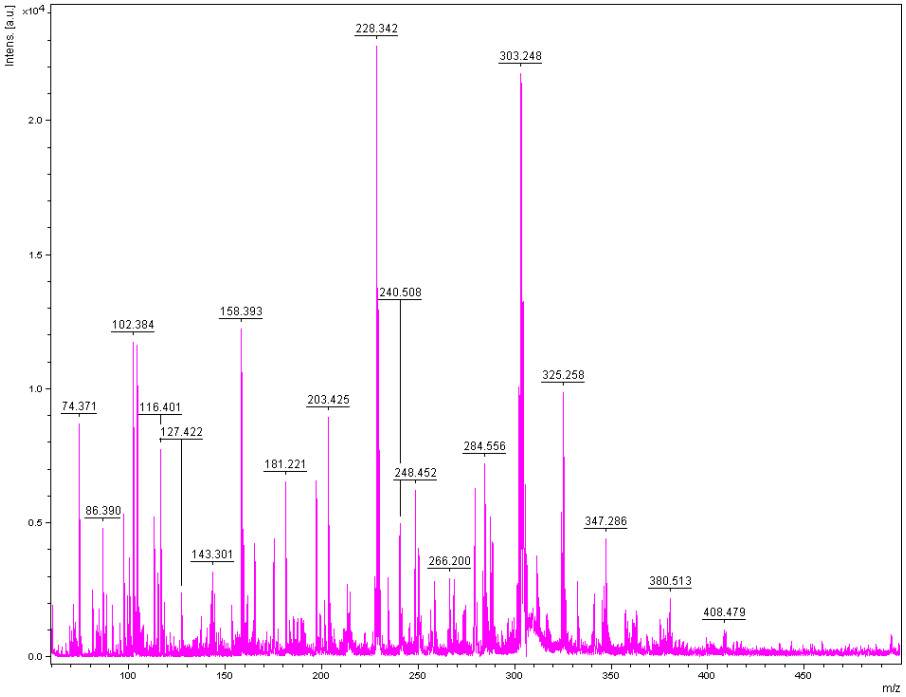


Рис. 2. Масс-спектр резвератрола и кверцетина при совместном присутствии

В результате количественного определения получены объединенные спектры, на которых наблюдаются интенсивные пики ионов аналита – резвератрола с зарядом иона m/z = 228,3 и пики внутреннего стандарта – кверцетина с зарядом иона m/z = 303,2 (рис. 3).

На приведенном рис. 3 видно, что интенсивность пика иона аналита резвератрола плавно уменьшается, а внутреннего стандарта кверцетина увеличивается по мере нарастания его концентрации.

Каждую пробу регистрировали 3-кратно и вычисляли среднее значение их интенсивности (I), а также отношения интенсивностей внутреннего стандарта и аналита.

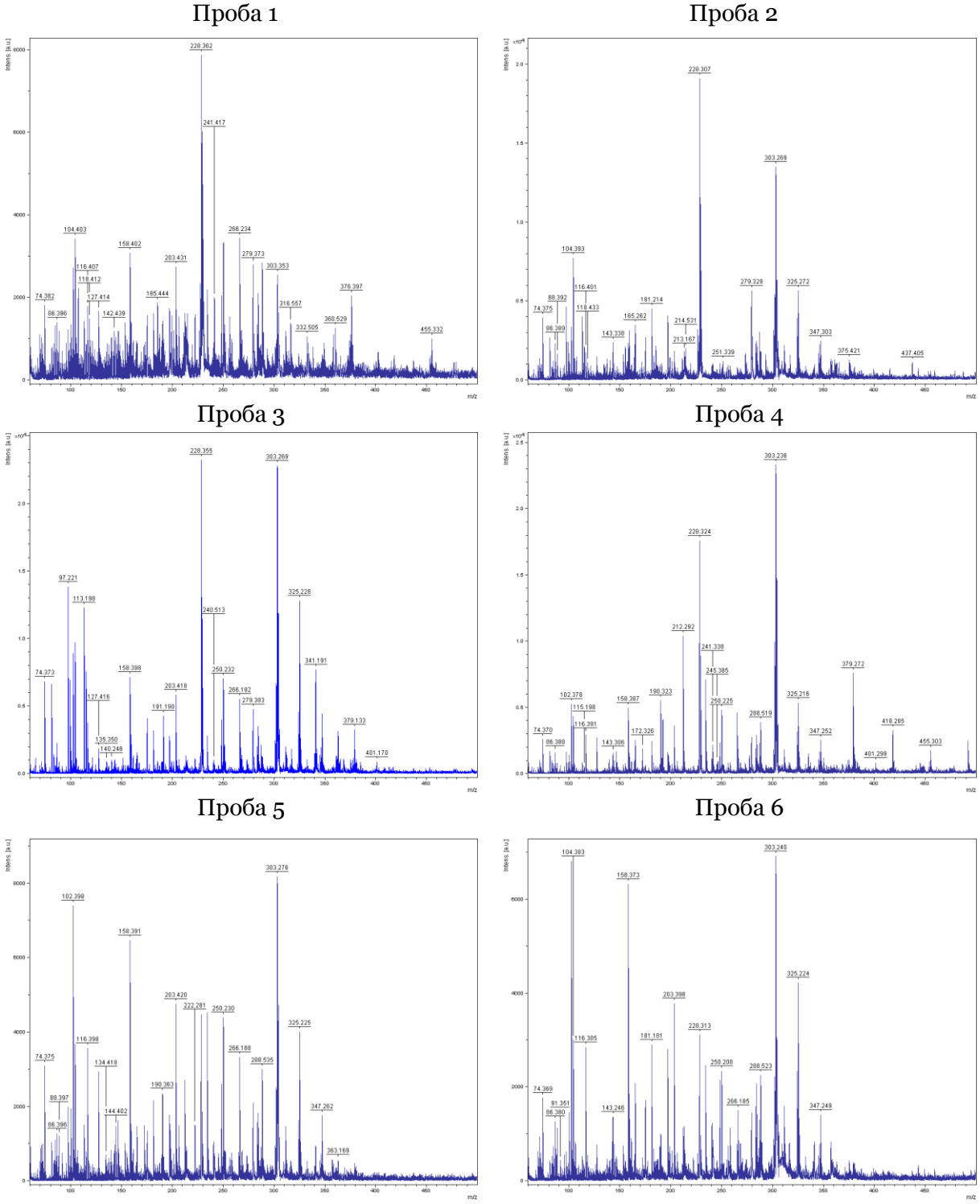


Рис. 3. Масс-спектры анализируемой смеси

При проведении калибровки также проводили вычисление фактора отклика K_x по формуле 5:

$$K_x = \left(\frac{I_{st}}{I_{an}}\right) \times \left(\frac{C_x}{C_{st}}\right), \qquad (5)$$

где I_{st} – интенсивность пика иона стандарта кверцетина;
I_{an} – интенсивность пика иона аналита резвератрола;
C_{st} – количество внутреннего стандарта, нанесённого на мишень;
C_{an} – количество аналита, нанесенного на мишень.

Интенсивности (I) пиков ионов аналита (I_{an}) и внутреннего стандарта (I_{st}), а также их отношения приведены в табл. 4.

Таблица 4

Интенсивности пиков ионов аналита и внутреннего стандарта и их отношения в субстанции

$C_{Стандарта}$, мкг/мл	*№ пробы*					
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
	0,04	*0,08*	*0,12*	*0,16*	*0,20*	*0,24*
I_{st}, интенсивность пика стандарта кверцетина, m/z 303,2	*896*	*14586*	*22819*	*24163*	*6848*	*8381*
I_{an}, интенсивность пика аналита резвератрола, m/z 228,3	*3109*	*20732*	*23359*	*21776*	*4387*	*4571*
I_{st}/I_{an}	*0,288*	*0,7035*	*0,977*	*1,2*	*1,56*	*1,833*
K_x, *фактор отклика*	*0,864*	*1,055*	*0,976*	*0,832*	*0,936*	*0,916*

Для оценки прямолинейности зависимости концентрации внутреннего стандарта от аналитического сигнала (отношение интенсивностей внутреннего стандарта и аналита) построен калибровочный график в координатах $C_{стандарта}$, мкг/мл – I_{st}/I_{an}. (рис. 4).

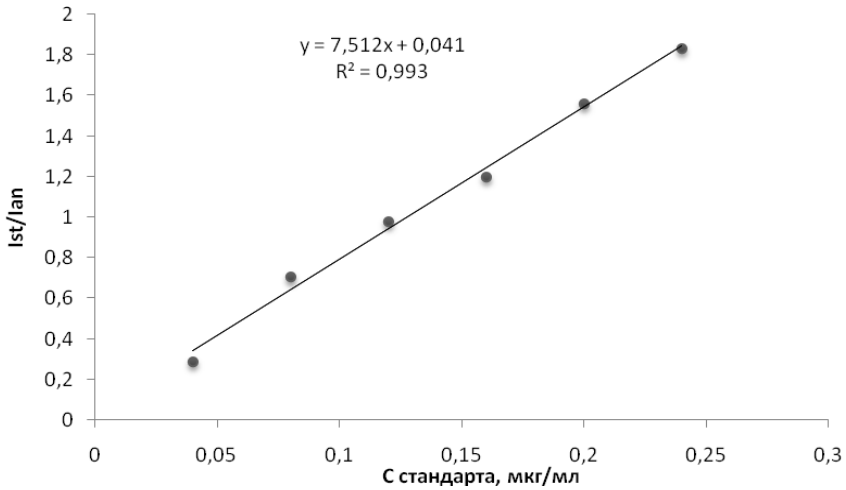


Рис. 4. Калибровочный график зависимости концентрации внутреннего стандарта кверцетина от отношения интенсивностей внутреннего стандарта и аналита (резвератрола)

Из приведенного графика следует, что отношение I_{st}/I_{an} к концентрации стандартного раствора имеет прямолинейную зависимость. Это указывает на то, что отношение площадей пиков ионов аналита и внутреннего стандарта остается постоянным.

Когда отношение I_{st}/I_{an} приближается к единице, это является свидетельством совпадения концентраций внутреннего стандарта и исследуемого вещества. Тогда содержание исследуемого вещества можно найти по приведённому калибровочному графику.

Конечная формула расчёта для аналита выглядит следующим образом:

$$C_x = K_x \times \left(\frac{C_{st}}{I_{st}}\right) \times I_{an}, \quad (6)$$

где K_x – фактор отклика;
C_{st} – количество внутреннего стандарта, нанесенного на мишень;
I_{st} – интенсивность пика иона стандарта кверцетина;
I_{an} – интенсивность пика иона аналита резвератрола.

Относительную ошибку определяли в ходе 7 параллельных измерений разных образцов анализируемой смеси. Полученные данные обрабатывали статистически. Результаты статистической обработки определения содержания резвератрола в субстанции методом масс-спектрометрии представлены в табл. 5.

Таблица 5

Результаты количественного определения резвератрола в субстанции методом масс-спектрометрии

№ п/п	Масса навески, г	Содержание резвератрола (X),%	S	$\overline{\Delta X}$	ε, %
1.	0,102	99,6	1,49	3,6	3,66
2.	0,103	105,6			
3.	0,103	105,5			
4.	0,102	98,86			
5.	0,101	96,8			
6.	0,101	96,43			
7.	0,102	97,2			
		$\overline{X}$ = 100,0%			

Как следует из данных табл. 5, относительная ошибка единичного определения методом масс-спектрометрии с вероятностью 95% не превышает 5%, что укладывается в пределы, регламентируемые государственной фармакопеей, и для резвератрола составила ±3,65% (найдено $1{,}2\times10^{-4}\pm0{,}0045$ мг/мл), что более чем в 30 раз превышает чувствительность методики УФ-спектрофотометрического определения.

Резюме

Таким образом, рассмотрен вариант внутреннего стандарта MALDI/TOF/MS в сравнении с другими методами количественного анализа на примере субстанции резвератрола. Установлены очевидные методические и аналитические преимущества масс-спектрометрии при ее реализации предложенным способом.

Литература

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы : в 2 т : пер. с англ. / под ред. Р. Кёльнера, Ж.-М. Мериме, М. Отто, М. Видмера. – М. : Мир ; Издательство АСТ, 2004. –Т. 2. – 728 с.
2. Отто, М. Современные методы аналитической химии. 2-е изд., испр. / М. Отто. – М. : Техносфера, 2006. – 416 с.

RESULTS OF COMPARATIVE STUDIES OF MALDI / TOF / MS USING I NTERNAL STANDARD WITH OTHER TECHNIQUES OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF RESVERATROL

D.I. PISAREV
O.O. NOVIKOV
G.V. VASILIEV

Belgorod National Research University

e-mail: pisarev@bsu.edu.ru

A variant of the internal standard MALDI / TOF / MS in comparison with other methods of quantitative analysis on the example of the substance resveratrol is viewed. Obvious methodological and analytical advantages of mass spectrometry in its implementation by the proposed method are identified.

Key words: mass spectrometry, UV spectrophotometry, titrimetry, HPLC, resveratrol.

УДК 634.722:631.527:631.521

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BERBERIS* L. В УСЛОВИЯХ БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

В.Ю. ЖИЛЕНКО
В.Н. СОРОКОПУДОВ
Д.А. КОЛЕСНИКОВ
О.А. СОРОКОПУДОВА
Н.И. МЯЧИКОВА

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

E-mai: sorokopudov@bsu.edu.ru

С помощью электронного ионно-растрового микроскопа Quanta 200 3D изучен элементный состав листьев 10 видов рода *Berberis* L. Исследуемые виды значительно различаются по элементному составу листьев. Данный показатель может быть использован при сравнительной межвидовой характеристике видов и для использования в фармацевтической промышленности.

Ключевые слова: элементный состав, листья, акклиматизация, микроэлементы, виды барбариса, листья.

Введение. Микроэлементы играют важную роль в процессах метаболизма у растений в крайних условиях существования, что имеет значение при интродукции и акклиматизации растений [1, 2]. Существует связь между накоплением в растениях определенных групп биологически активных веществ и концентрированием в них микроэлементов. Например, растения, содержащие алкалоиды, накапливают кобальт, марганец, цинк [1].

На долю минеральных соединений приходится около 2%. Связанные с ферментными системами, они принимают участие в окислительно- восстановительных процессах в организме, влияют на синтез органических соединений и т. д. В плодах минеральные вещества находятся в легкодоступной для человека форме, кроме того, в них содержатся микроэлементы, которые редко встречаются в других продуктах питания. Спектр минеральных элементов состоит примерно из 17-18 элементов, но роль их в жизнедеятельности организма зачастую остается невыясненной.

В листьях барбариса обыкновенного найдены алкалоиды берберин, бербамин, леонтидин и др., аскорбиновая кислота (до 150 мг%), витамин Е (до 40 мг%), каротин, фенолкарбоновые кислоты. В листьях также содержатся зола – 3,97%, макроэлементы (мг/г): K, Ca, Mg, Fe, микроэлементы (мкг/г): Mn, Cu, Zn, Co, Mo, Cr, Al, Ba, Se, Ni, Sr, Pb, B, I. Не обнаружены Cd, Li, Au, Ag [3].

По физиологическим функциям в растительном организме химические элементы делятся на три основные группы: структурные (C, H, O, N, S, B, Zn) – задействованные в конструировании молекул белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот или придающие им механическую прочность и адекватную конформацию; потенциалобразующие (K, Na, CI) – поддерживающие специфические электрохимические потенциалы и осмотические функции клетки; каталитические (Fe, Mn, Mg, Mo, Ni, Co, Cu) – участвующие в ферментативных реакциях растительного организма. Подавляющее большинство микроэлементов, а в их список включено девять (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, CI, B, Ni, Co), относятся к каталитическим [4, 5].

Объекты и методы исследования. Материалом исследования послужили листья 10 видов барбариса: *B. cretica*, *B. dielsiana*, *B. heteropoda*, *B. koreana*, *B. vulgaris*, *B. vulgaris f atropurpurea*, *B. thunbergii*, *B. thunbergii f argenteo-marginata*, *B. thunbergii f atropurpurea*, *B.* x *ottawensis* и *B. darwinii*, собранные в 2011 году в Ботаническом саду НИУ «БелГУ». Исследования элементного состава листьев видов рода *Berberis* L. проводилось при помощи электронного ионно-растрового микроскопа Quanta 200 3D в центре коллективного пользования научным оборудованием НИУ «БелГУ».

Результаты и их обсуждение. Результаты проведенных экспериментальных исследований дают представление о содержании элементов в (Wt %) – весовой процент от общего количества элементов (100 Wt %) в данном органе растений. Исследования элементного состава листьев барбариса необходимы для изучения акклиматизации и интродукции видов рода *Berberis* L. Листья видов барбариса могут использоваться как источники полезных элементов для организма человека, так как съедобные виды барбариса являются ценными пищевыми растениями (из листьев барбариса обыкновенного готовят салаты, кладут в суп вместо щавеля). Сравнительный анализ элементного состава листьев видов барбариса приведен в табл. 1.

Таблица 1

Сравнительное содержание элементов в листьях видов барбариса, (Wt %)

	B. cretica	*B. dielsiana*	*B. heteropoda*	*B. koreana*	*B. vulgaris*	*B. vulgaris f atropur-purea*	*B. thunbergii*	*B. thunbergii f argenteo-marginata*	*B. thunbergii f atro-purpurea*	*B. x ottawensis*	*B. darwinii*
C	48,27	74,24	52,53	72,38	67,36	63,63	52,87	61,44	66,70	52,84	55,24
O	29,75	23,44	45,36	24,55	24,24	34,45	44,11	37,24	31,39	44,11	41,34
Na	0,14	-	0,03	-	-	0,11	0,06	0,06	0,39	0,03	0,31
Si	0,11	0,11	0,17	-	0,25	0,19	0,71	0,07	0,32	0,71	0,14
P	0,03	-	0,09	0,11	0,29	-	0,04	0,05	0,58	-	0,03
Cl	0,37	-	0,14	0,07	0,05	0,10	0,11	0,14	0,46	0,11	1,04
K	0,47	0,40	0,50	1,26	3,27	0,14	0,48	0,53	0,16	0,52	1,60
Ca	0,87	1,67	1,08	1,33	2,78	1,00	1,39	0,18	-	1,39	0,03
Mg	-	0,13	-	-	-	0,13	0,16	0,29		0,16	0,25
S	-	-	0,10	0,12	0,19	-	0,07	-		0,07	
Fe		-		0,18	-	0,24		-			
Al		-		-	0,03			-			
Cu					0,54						

* Примечание: (Wt %) – весовой процент.

В соответствии с проведенными исследованиями элементного состава следует отметить, что основными элементами в листьях видов барбариса являются углерод – 48,3-74,2 (Wt %) и кислород 23,4-45,3 (Wt %), что свидетельствует о процессе фотосинтеза и дыхания. В листьях видов барбариса наибольшую долю от всего элементного состава также занимают калий – 0,16-1,26, (Wt %) и кальций – 0,03-0,67, (Wt %). Большое количество калия и кальция в листьях связано с тем, что листовой массе и молодым побегам для роста требуется кальций и калий. При недостатке калия растения развиваются слабо, их рост подавлен, они плохо плодоносят, в плодах мало семян.

Наличие хлора в листьях видов барбариса 0,05-0,47, (Wt %) свидетельствует о протекающем в листьях процессе фотосинтеза.

Магний – это обязательное составляющее звено хлорофилла. Он участвует в регуляции распада и превращении углеводов, активизируя ферменты. Содержание магния в листьях видов барбариса составляет 0,13-0,25 (Wt %).

Кальций необходим растениям главным образом для правильного развития листьев, в листьях видов барбариса количество кальция составляет 0,03-2,78 (Wt %).

Кремний оберегает растение от избыточной концентрации железа и марганца. Понижение уровня кремния ведет к торможению функции фотосинтеза, синтеза белка, хлорофилла, ДНК и РНК. Кремний повышает невосприимчивость растений к грибковым заболеваниям. Содержание кремния в листьях видов барбариса составляет 0,07-0,71 (Wt %).

Сера в листьях видов барбариса имеет огромное значение, так как при недостатке серы листья становятся светлыми, приостанавливается рост и развитие растения. Сера была обнаружена в листьях 4 видов барбариса: *B. heteropoda*, *B. koreana*, *B. thunbergii* и *B. darwinii*. Содержание серы в листьях данных видов составляет 0,07-0,19 (Wt %).

Железо обладает сильными каталитическими свойствами, участвует в биохимических процессах, проходящих при фотосинтезе и дыхании. Каталитическое действие железа связано с его способностью менять степень окисления. Атом железа окисляется и восстанавливается легко, поэтому атомы железа являются переносчиками электронов в биохимических процессах. В основе реакций, происходящих при дыхании растений, лежит процесс переноса электронов. Железо содержится только в листьях 2 видов барбариса: *B. koreana* и *B. vulgaris f atropurpurea*. Содержание железа в листьях данных видов 0,18-0,24 (Wt %).

Установлено, что алюминий повышает устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды: засухе, резкому понижению температуры, засоленности почв, а также влияет на фосфорный обмен: осаждая фосфор в клетках, препятствует его метаболизму. Алюминий 0,03 (Wt %) содержится только в листьях барбариса обыкновенного.

Также только в листьях барбариса обыкновенного содержится медь 0,54 (Wt %). Из литературы известно, что медь имеет большое значение в обмене фенольных соединений, в биосинтезе антоцианов [6].

Выводы.

1. Исследования элементного состава листьев видов барбариса показали, что в листьях основными элементами являются углерод и кислород. Третьим элементом по процентному содержанию для большинства видов является калий и кальций. В целом для разных видов характерно значительное варьирование содержание анализируемых элементов в разных частях растений.

2. Такой элемент, как медь, был найден только в листьях барбариса обыкновенного 0,54-0,57 (Wt %). Листья барбариса обыкновенного наиболее богаты кальцием (2,78-3,42, Wt %).

3. Алюминий выявлен только в листьях барбариса обыкновенного (0,03, Wt %).

4. Железо обнаружено только в листьях 2 видов барбариса: *B. koreana* и *B. vulgaris f atropurpurea*. Содержание железа в листьях данных видов 0,18-0,24, Wt %.

5. Сера обнаружена в листьях 4 видов барбариса: *B. heteropoda*, *B. koreana*, *B. thunbergii* и *B. darwinii*. Содержание серы составило 0,07-0,19, Wt %.

Литература

1. Вернадский, В.И. Минералогия. – 3-е изд., перераб. и доп. / В.И. Вернардский. – М. : Печатня Яковлева, 1912. – Вып. 2. – С. 345-526.

2. Вернадский, В.И. Задачи минералогии в нашей стране, 1917-1927 / В.И. Вернардский // Природа. – 1928. – № 1. – С. 21-40.

3. Вигоров, Л.И. Витамины на ветках / Л. И. Вигоров. – Свердловск, 1969. – 157 с.

4. Исаев, Ю.А. Лечение микроэлементами, металлами и минералами / Ю.А. Исаев. – Киев : Здоровье, 1992. – 118 с.

5. Ловкова, О.А. Почему растения лечат / О.А. Ловкова, А.М. Рабинович, С.М. Пономарёва. – М. : Наука, 1989. – 256 с.

6. Петрова, В.П. Биохимия дикорастущих плодово-ягодных растений / В.П. Петрова. – К. : Выща школа, 1986. – 287 с.

ELEMENT STRUCTURE OF LEAVES OF SOME REPRESENTATIVES OF SORT BERBERIS L. IN THE CONDITIONS OF THE BELGOROD REGION

V.Yu.ZHILENKO
V.N.SOROKOPUDOV
D. A.KOLESNIKOV
O.A.SOROKOPUDOVA
N.I. MYACHIKOVA

Belgorod National Research University

e-mail:sorokopudov@bsu.edu.ru

By means of an electronic ion-raster microscope of Quanta 200 3D the element structure of leaves of 10 types of sort *Berberis* L. is studied. Studied types considerably differ in element structure of leaves and this indicator can be used at the comparative interspecific characteristic.

Key words: element structure, leaves, acclimatization, microcells, types of a barberry, leaves.

УДК 615.014.22:615.454.2:615.072

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ КОМБИНИРОВАННЫХ СУППОЗИТОРИЕВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПРОСТАТИТОВ

Т.Г. ЯРНЫХ
Е.В. ТОЛОЧКО
В.Н. ЧУШЕНКО

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

e-mail: tolochko-ev@rambler.ru

В статье представлены основные показатели качества для ректальных суппозиториев под условным названием трецивит-прост. Приведены результаты исследований по изучению стабильности препарата при хранении. Исследование проводили в двух температурных режимах: при комнатной температуре и в холодном или прохладном месте. Препарат оценивали в соответствии с требованиями проекта методик контроля качества и Государственной Фармакопеи Украины.

Ключевые слова: технология лекарственных средств, суппозитории, стандартизация.

Проблема лечения хронического абактериального простатита состоит как в трудности своевременного диагностирования заболевания, так и в сложности выбора рациональной схемы лечения [8, 9].

В Украине, как и за рубежом, все большую популярность приобретают комбинированные препараты, в состав которых входят вещества синтетического и природного происхождения [7, 10]. Такое сочетание действующих веществ не только обеспечивает комплексное действие препарата, но и является экономически выгодным, поскольку общая стоимость курса лечения снижается.

Для лечения простатита в разных его формах, в том числе и хронических состояний, нами был разработан комплексный препарат трецивит-прост в форме ректальных суппозиториев. За счет сочетания веществ растительного и синтетического происхождения суппозитории обладают противовоспалительным, репаративным, диуретическим, анальгетическим действием, а также способствуют улучшению потенции и оказывают положительный эффект на всю мочеполовую систему в целом [4, 5, 6].

Одним из главных показателей качества лекарственного препарата является стабильность его физико-химических, фармакологических и потребительских свойств. Срок годности препарата зависит от множества факторов, при этом ухудшение любого из них в течение срока хранения свидетельствует о негативных процессах, происходящих в составе препарата.

Согласно требованиям Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) ректальные суппозитории контролируют по таким основным показателям качества, как внешний вид, идентификация, средняя масса, однородность массы, температура плавления, время полной деформации, микробиологическая чистота, количественное содержание действующих веществ [3].

На основании ранее проведенных исследований нами был разработан проект методик контроля качества (МКК) на препарат, с учетом всех вышеперечисленных требований.

Показатели качества и требования проекта МКК представлены в табл. 1.

Известно, что в состав экстракта коры осины сухого входят простые фенолы, фенологликозиды, производные бензойной кислоты, кумарины, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, катехины. На основании количественного содержания указанных классов соединений и их влияния на общий фармакологический эффект препарата идентификацию экстракта проводят по наличию гидроксикоричных кислот [1, 2].

Идентификацию гидроксикоричных кислот экстракта коры осины сухого в суппозиториях проводили методом тонкослойной хроматографии (ГФУ 1.2, 2.2.27) в системе растворителей: н-бутиловый спирт – уксусная кислота – вода (4:1:2).

Таблица 1

Показатели качества суппозиториев трецивит-прост

Показатель качества	*Требования проекта МКК*
Внешний вид	Суппозитории торпедовидной формы, темно-желтого цвета со слабым специфическим запахом
Идентификация: *Цинка сульфат гептагидрат:* *- цинк* *- сульфаты* *Экстракт коры осины сухой:* *- гидроксикоричные кислоты*	С *раствором калия ферроцианида Р* образуется белый осадок С кислотой *хлористоводородной разведенной Р* и *раствором бария хлорида Р* образуется белый осадок *ТСХ* Должны быть зоны на уровне зон растворов сравнения. Допускается наличие других зон
Однородность массы, г	3,00±0,15
pH	От 5,50 до 6,50
Время полной деформации, мин	Не более 30
Температура плавления, °С	Не более 37,0
Количественное содержание в одном суппозитории: *- цинка сульфат гептагидрат, г* *- сумма гидроксикоричных кислот (в пересчете на кислоту хлорогеновую), г*	 От 0,090 до 0,110 От 0,034 до 0,046
Микробиологическая чистота	Общее число жизнеспособных аэробных микроорганизмов не более 10^3 бактерий и не более 10^2 грибов в 1 г. Отсутствие бактерий рода Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus aureus в 1 г.

Испытуемый раствор готовили следующим образом: 2 суппозитория помещали в стакан, добавляли 10 мл *воды Р*, подогретой до температуры (37,0±0,5)°С, перемешивали до распадания и фильтровали в колбу вместимостью 25 мл.

Схема хроматограммы представлена на рис. 1.

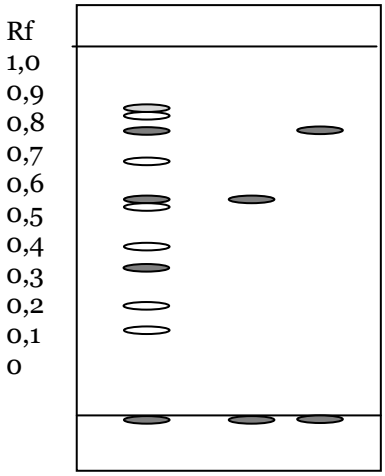


Рис. 1. Схема тонкослойной хроматографии, полученной при идентификации гидроксикоричных кислот экстракта коры осины в исследуемых суппозиториях:
1 – испытуемый раствор, 2 – хлорогеновая кислота, 3 – кофейная кислота

На хроматограмме препарата четко проявляются несколько флуоресцирующих зон голубого цвета, одна из которых расположена на уровне зоны хроматограммы сравнения с Rf около 0,62 (хлорогеновая кислота), а вторая – на уровне зоны с Rf около 0,81 (кофейная кислота).

Для проведения количественного определения действующих веществ в суппозиториях испытуемый раствор готовили следующим образом: точную навеску суппозиторной массы помещали в колбу со шлифом объемом 100 мл, добавляли 50 мл воды Р, подогретой до температуры (37,0±0,5)°С, и выдерживали при постоянной температуре в течение 15 мин. Полученное извлечение количественно переносили в мерную колбу объемом 100 мл. Экстракцию проводили еще двумя порциями по 25 мл воды Р, подогретой до температуры (37,0±0,5)°С, и выдерживали при постоянной температуре в течение 5 мин. Полученные извлечения добавляли к первой порции и доводили объем раствора до метки (раствор А).

Отбирали аликвот раствора А и в нем определяли количественное содержание цинка сульфата методом комплексонометрического титрования, ГФУ 1.0, 2.5.11. Содержание цинка сульфата гептагидрата в одном суппозитории должно находиться в пределах от 0,090 до 0,110 г.

Для количественного определения содержания суммы гидроксикоричных кислот в аликвоте раствора А нами был выбран метод абсорбционной спектрофотомерии в ультрафиолетовой области, ГФУ 1.2, 2.2.25. Спектр поглощения испытуемого раствора имеет максимум при длине 314 нм, что наиболее близко к спектру хлорогеновой кислоты, поэтому именно эта гидроксикоричная кислота была нами выбрана как доминирующая в сумме, на нее же делали перерасчет. Спектр поглощения исследуемого раствора представлен на рис. 2.

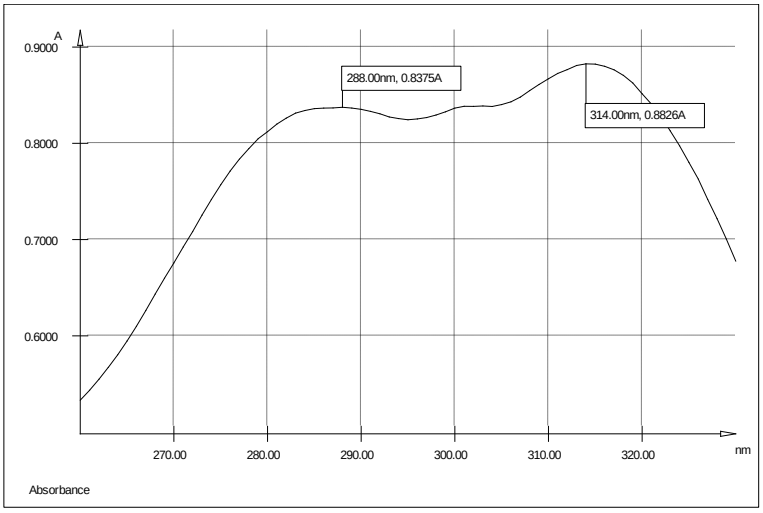


Рис. 2. УФ-спектр раствора А

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в одном суппозитории, в пересчете на хлорогеновую кислоту (удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты – 531), должно находиться в пределах от 0,034 до 0,046 г.

С целью изучения стабильности суппозиториев трецивит-прост в процессе хранения и для установления срока годности нами были приготовлены и заложены на хранение серии препарата.

Приготовленные суппозитории хранили при двух температурных режимах:

при температуре (15,0-25,0)°С – комнатная температура;

при температуре (8,0-15,0)°С – холодное или прохладное место.

Исследования на соответствие препарата требованиям проекта МКК проводили каждые 6 месяцев на протяжении 27 месяцев. Результаты анализа суппозиториев, заложенных на хранение, представлены в табл. 2.

Согласно полученным данным суппозитории трецивит-прост, заложенные на хранение в холодном или прохладном месте, соответствуют требованиям МКК по всем показателям качества в течении 27 месяцев, тогда как при хранении в условиях комнатной температуры стабильность препарата сохраняется в течение 12 месяцев (после

18 месяцев хранения наблюдается незначительное снижение количественного содержания суммы гидроксикоричных кислот экстракта коры осины сухого).

Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать следующий режим хранения суппозиториев трецивит-прост: в сухом темном месте при комнатной температуре – в течении 1 года, в сухом холодном или прохладном месте – в течение 2 лет.

Таблица 2

Результаты изучения стабильности суппозиториев трецивит-прост в процессе хранения

Показатель качества по МКК	*Срок хранения, мес.*											
	Температура хранения (8,0-15,0)°С						*Температура хранения (15,0-25,0)°С*					
	Нач.	*6 мес.*	*12 мес.*	*18 мес.*	*24 мес.*	*27 мес.*	*Нач.*	*6 мес.*	*12 мес.*	*18 мес.*	-	-
Внешний вид	Суппозитории торпедовидной формы, темно-желтого цвета, со слабым специфическим запахом						Суппозитории торпедовидной формы, темно-желтого цвета, со слабым специфическим запахом					
Идентификация Цинка сульфат гептагидрат Экстракт коры осины сухой	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует	Соответствует Соответствует		
Однородность массы, г	3,00±0,15	2,98 ±0,11	3,00 ±0,14	3,01±0,15	2,98 ±0,12	3,05±0,15	3,00 ±0,13	2,99 ±0,14	2,97±0,10	2,98 ±0,13		
pH	6,44±0,05	6,11±0,06	6,20 ±0,06	5,98 ±0,04	5,85 ±0,06	5,74±0,05	6,32±0,04	6,21±0,04	6,38±0,05	6,43 ±0,03		
Время полной деформации	7 мин 37 сек.	8 мин. 13 сек.	8 мин. 17 сек.	8 мин. 35 сек.	8 мин. 40 сек.	8 мин. 26 сек.	7 мин. 50 сек.	7 мин. 35 сек.	7 мин 19 сек.	6 мин 9 сек.		
Температура плавления, °С	34,5	35,1	35,5	35,0	34,8	34,6	34,7	34,6	34,2	33,4		
Количественное содержание в 1 суппозитории: *- цинка сульфат гептагидрат, г* *- сумма гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую кислоту), г*	0,107 ± 0,003 0,042 ± 0,002	0,105 ± 0,005 0,041 ± 0,003	0,102 ± 0,007 0,039± 0,003	0,106 ± 0,004 0,039± 0,002	0,103 ± 0,006 0,038± 0,002	0,093 ± 0,002 0,038 ± 0,003	0,105 ± 0,005 0,041 ± 0,004	0,097 ± 0,006 0,039± 0,002	0,099 ± 0,008 0,038 ± 0,002	0,094± 0,003 0,033± 0,003 (не соответствует)		
Микробиологическая чистота	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует		

Литература

1. Бородіна, Н.В. Кількісне визначення фенольних сполук Populus tremula L. / Н.В. Бородіна, В.М. Ковальов // Фармаком. – 2004. – № 1. – С. 75-78.

2. Біологічно активні речовини роду Populus L. (огляд) / Н.В. Бородіна, В.М. Ковальов, С.В. Ковальов, А.М. Рудник // Фармаком. –2006. – № 1/2. – С.110-119.

3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».—1-е вид. —Доповнення 2.—Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

4. Пат. 64802 Украина. А61К9/02, А61К36/76, А61К31/355, А61К33/30, А61Р13/08. Фармацевтична композиція у формі ректальних супозиторіїв для лікування простатиту / Ярних Т.Г., Толочко К.В., Чушенко В.М., Малоштан Л.М., Гладченко О.М., Манжура О.І.; заявл. 09.03.2011; опубл. 25.11.2011, Бюл. № 22.

5. Толочко, К.В. Вивчення специфічної активності комбінованих супозиторіїв для лікування простатиту / К.В. Толочко, Т.Г. Ярних // Український вісник психоневрології. – 2011. – Т. 19, № 2 (67). – С. 201-202.

6. Ярних, Т.Г. Доклінічне дослідження простатопротекторної активності комбінованих супозиторіїв під умовною назвою «Трецивіт-прост» на моделі скипидарного простатиту / Т.Г. Ярних, К.В.Толочко, О.М. Гладченко, О.І. Манжура // Клінічна фармація. – 2011. – Т. 15, № 3.–С. 48-50.

7. Deng, C. Clinical study of zinc for treatment of chronic prostatitis / C. Deng, B. Zheng, S. She // Zhonghus Nan Ke Xue. – 2004. – Vol. 10, №. 5. – P. 368-370.

8. Ramakrishnan, K. Prostatitis: acute and chronic / K. Ramakrishnan, R.C. Salinas // Prim. Care Clin. Office Pract. – 2010. – Vol. 37, Is. 3. – P. 547-563.

9. Sharp, V.J. Prostatitis: Diagnosis and treatment / V.J. Sharp, E.B. Takacs, C.R. Powell // Amer. Family Physician. – 2010. – Vol. 82, Is. 4. – P. 397-406.

10. Shoskes, D.A. Phytotherapy in chronic prostatitis / D.A. Shoskes // Urology. – 2002. – Vol. 60, Is. 6.– P. 36-39.

RESEARCH OF STABILITY OF COMBINED SUPPOSITORIES FOR PROSTATITIS TREATMENT DURING STORAGE

T.G. YARNYCH
K.V. TOLOCHKO
V.M. CHUSHENKO

National University o f Pharmacy, Kharkiv

e-mail: tolochko-ev@rambler.ru

Main quality factors for rectal suppositories under conditional name trezivit-prost are represented in the article. Research results of medicine's stability study during the term of storage are given. Study was conducted under 2 temperature regimes: in conditions of room temperature and in conditions of cold or cool place. Medicine's quality was controlled in accordance to methods of quality control project and requirements of State Pharmacopoeia of the Ukraine.

Key words: technology of medicines, suppositories, standardization.

УДК 584.19

ПЛОДЫ ВИДОВ РОДА *AMELANCHIER* MEDIK КАК ИСТОЧНИК АНТОЦИАНОВ В УСЛОВИЯХ БЕЛОГОРЬЯ

А.В. СТЕПАНОВА
В.Н. СОРОКОПУДОВ
О.А. СОРОКОПУДОВА
Н.И. МЯЧИКОВА
Д.В. СТЕПАНОВА

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail:sorokopudov@bsu.edu.ru

Представлены результаты определения содержания антоцианов в плодах некоторых видов рода *Amelanchier* Medik. (2010-2011 гг.) из коллекции Ботанического сада НИУ «БелГУ». Показаны результаты исследования по изучению качества замороженных ягод некоторых видов рода *Amelanchier* при хранении в течение 6 месяцев. Изучено влияние замораживания ягод 8 видов рода *Amelanchier* при температуре -18 °С и его влияние на содержание антоцианов.

Ключевые слова: *Amelanchier* Medik., плоды, виды, антоцианы.

Введение. Название антоцианам дал еще в 1835 г. немецкий ученый Л. Маркварт. Необычайно красивая и разнообразная гамма расцветки антоцианов издавна привлекала внимание естествоиспытателей, пытавшихся объяснить причину такой природной красоты, выделить из лепестков эти красящие вещества, которые, как было замечено, обладали способностью при определенных условиях изменять свой цвет. Свет – определяющее условие образования и накопления антоцианов для всех видов и форм растений. В условиях похолодания действие света на накопление антоцианов в растениях усиливается. Основой красной, фиолетовой, синей, бордовой, розовой окраски большинства плодов являются антоцианы [1].

Ирга имеет немаловажное значение в качестве лекарственного растения. Ягоды ирги, равно как и продукты её переработки, обладают лечебными свойствами. Они полезны для больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и нарушениями работы желудочно-кишечного тракта. Антоцианы, которые накапливаются в плодах некоторых видов рода *Amelanchier,* положительно влияют на зрительный аппарат человека. Известно, что антоцианы являются сильными антиоксидантами и нейтрализуют действие свободных радикалов; обладают противоотечным эффектом и уменьшают проницаемость капиляров; оказывают защитное действие на сосуды, уменьшая ломкость капилляров и оказывают положительный эффект при сосудистых поражениях; способствуют стабилизации соединительной ткани, нормализуя отток внутриглазной жидкости при глаукоме и внутриглазное давление.

Накапливаться в кожице плодов антоцианы начинают с момента появления красноватой или синеватой окраски. Плоды у *Amelanchier* – мелкие, сочные яблоки с перепончатыми энокарпиями. Созревают не одновременно, с июля по август. В полной зрелости плоды темно-фиолетовые, почти черные, с обильным восковым налетом. В начале созревания – красные. В ирге много флавоноидов, среди которых преобладают лейкоантоцианы и антоцианы, по количеству которых (1080 мг на 100 г) ирга не уступает черной смородине и вишне. Эти вещества обладают капилляроукрепляющим, противосклеротическим и противовоспалительным свойствами. Антоцианам обязаны своей окраской созревающие плоды *Amelanchier,* так как по мере образования антоцианов изменяют свой цвет [2].

Целью нашей работы явилось изучение динамики содержания антоцианов в процессе хранения плодов при заморозке.

Экспериментальная часть. Суммарное определение содержания антоцианов проводили спекрофотометрическим методом на спектрофотометре типа СФ-102. Метод основан на реакции 0,1н соляной кислоты с антоцианами плодов [5].

На содержание антоцианов был проанализирован ряд видов рода *Amelanchier*, выращенных в Ботаническом саду НИУ «БелГУ»: *Amelanchier spicata, Amelanchier ovalis, Amelanchier canadensis, Amelanchier alnifolia* (№ 2), *Amelanchier sanguinea, Amelanchier alnifolia* (№ 1), *Amelanchier florida*. Сбор плодов производили согласно «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [3].

Исследования количественного содержания антоцианов в плодах проводили в момент сбора урожая и после 6 месяцев хранения в морозильной камере согласно «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [4]. Замораживание плодов проводили согласно ГОСТ 29187-91. Замороженные плоды хранили при температуре ниже -18 °С.

Через 6 месяцев после замораживания было проведено измерение количественного содержания антоцианов в плодах *Amelanchier*.

Результаты и обсуждение. Содержание антоцианов в замороженных ягодах ирги при хранении, приведенное в таблице, изменялось в сторону уменьшения в зависимости от видовой принадлежности к роду *Amelanchier*. Согласно диаграмме, составленной по показателям содержания антоцианов у видов ирги (рис.) можно сделать заключение, что содержание антоцианов у всех видов рода *Amelanchier* после 6 месяцев хранения снижается.

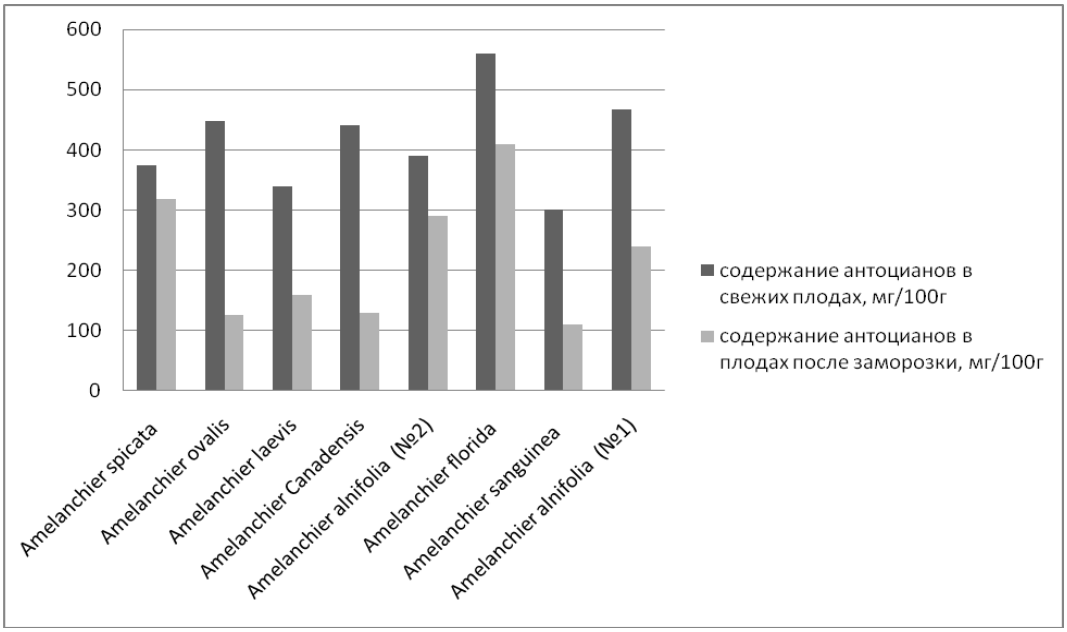


Рис. Оценка плодов *Amelanchier* по содержанию антоцианов во время сбора и после заморозки свежих плодов

Исходя из таблицы, составленной по средним показателям, можно сделать вывод, что после 6 месяцев хранения наибольшее количество антоцианов сохранилось у *Amelanchier spicata*.

У *Amelanchier ovalis* зафиксирован показатель наибольшей потери антоцианов в результате 6-месячного хранения в морозильной камере, что составило 447,40±1,34 мг/100 г и 126,34±5,17 мг/100 г соответственно.

Максимальный уровень накопления антоцианов плодах *Amelanchier alnifolia* (№ 1) (467,26±9,67 мг/100 г) заметно выше, чем в плодах других видов рода *Amelanchier,* но уступает показателям *Amelanchier florida* (558,90±3,16 мг/100 г).

Из всех изученных видов рода *Amelanchier* выделился один вид – *Amelanchier florida,* для которого характерно максимальное содержание антоцианов в свежих плодах и после заморозки (558,90±3,16 мг/100 г и 409,76±4,76 мг/100 г), соответственно. Данный вид ирги можно рекомендовать для использования в пищевой промышленности как наиболее перспективный для заморозки. Известно, что антоцианы, которые накапливаются в плодах растений рода *Amelanchier,* положительно влияют на зрительный аппарат человека [2].

Общее количество антоцианов в свежих плодах составило 300,22-558,90 мг/100 г. По содержанию антоцианов в плодах наилучшие показатели отмечены у *Amelanchier florida* и у *Amelanchier alnifolia* (№ 1) (589,90 и 467,26 мг/г), соответственно.

Изучение наличия в плодах антоцианов необходимо для оценки пригодности плодов ирги к переработке. Высокое содержание антоцианов позволяет использовать плоды ирги в качестве естественного пищевого красителя.

Таблица

Оценка плодов *Amelanchier* по содержанию антоцианов в динамике

Название вида	Содержание антоцианов, мг/100 г	
	в свежих плодах	после заморозки
Amelanchier spicata	373,51±3,39	318,42±2,17
Amelanchier ovalis	447,40±1,34	126,34±5,17
Amelanchier laevis	339,51±3,64	159,63±4,32
Amelanchier canadensis	441,60±4,34	129,20±3,56
Amelanchier alnifolia (№2)	390,39±2,76	290,32±3,42
Amelanchier sanguinea	300,22±2,14	110,69±8,36
Amelanchier alnifolia(№1)	467,26±9,67	240,35±6,73
Amelanchier florida	558,90±3,16	409,76±4,76

Заключение. В результате исследований была проведена оценка сохранности антоцианов при хранении замороженных ягод рода *Amelanchier* в условиях Белогорья и получены следующие **выводы:**

1) Для замораживания ягод *Amelanchier* при -18 °С рекомендуются *Amelanchier spicata, Amelanchier alnifolia* (№ 2), *Amelanchier florida,* сохраняющие высокий уровень антоцианов в течении 6 месяцев. У всех изученных видов рода *Amelanchier* показатель потери антоцианов в процессе заморозки составил 312,40 мг/100 г и 321,06 мг/100 г у *Amelanchier Canadensis* и *Amelanchier ovalis,* соответственно.

2) Из всех изученных видов рода *Amelanchier* выделился один вид – *Amelanchier florida,* для которого характерно максимальное содержание антоцианов в свежих плодах и после заморозки (558,90±3,16 мг/100 г и 409,76 ±4,76 мг/100 г, соответственно). Данный вид ирги можно рекомендовать для использования в пищевой и фармацевтической промышленности как наиболее перспективный.

3) Высокое накопление антоцианов обнаруживается в период созревания плодов, снижение антоцианов наблюдается по мере хранения продукции.

Литература

1. Харборн, Дж. Б. Фенольные гликозидыи их распространение в природе / Дж. Харборн // Биохимия фенол.соединений. – М., 1968. – С. 108-136.

2. Биохимия дикорастущих плодово-ягодных растений / В.П. Петрова. – К. : Вища шк. Головное изд-во, 1986. – 276 с.

3. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / под ред. Е.Н.Седова. – Орел, 1999. – 608 с.

4. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Г.А.Лобанова. – Мичуринск, 1973. – 496 с.

5. Саенко, И.И. Антоцианы Белгородской флоры – для профилактики ретинопатии / И.И. Саенко, Е.И. Шапошник, Д.А. Гостищев, Л.А. Дейнека, В.И. Дейнека // «Современный наукоемкие лечебные и фармацевтические технологии для офтальмологии» для молодых ученых : сб. материалов Всерос. школы-семинара (Белгород, 28 сент. – 1 окт. 2009 г.) – Белгород : ПОЛИТЕРРА, 2009. – С. 114-126.

FRUITS OF *AMELANCHIER MEDIK.* AS A SOURCE OF ANTHOCYANINS IN BELGOROD REGION

A.V. STEPANOVA
V.N. SOROKOPUDOV
O.A. SOROKOPUDOVA
N.I. MJACHIKOVA
D.V. STEPANOVA

Belgorod National Research University

e-mail:sorokopudov@bsu.edu.ru

Results of definition of a content anthocyanins in some types of fruit of sort *Amelanchier Medik. (*2010-2011) from a collection of Botanical garden of Belgorod National Research University are presented. Researches of the frozen berries quality studying of some types of sort Amelanchier at storage within 6 months are shown. Influence of freezing of berries of 8 types of sort Amelanchier at the temperature-18 °C and its influence on a antocians content is studied.

Key words: Amelanchier Medik., fruit, types, antocians.

УДК: 615.07:615.33:543.47

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗИТРОМИЦИНА

А.Х. ВАЛИЕВ [1]
В.А. ГЕОРГИЯНЦ [2]
А.А. ЗДОРИК [2]

[1] Таджикский национальный университет, г. Душанбе

[2] Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

e-mail: vgeor@ukr.net

В статье представлены результаты валидации предложенной поляриметрической методики количественного определения азитромицина в субстанции. Валидационная оценка методики проведена по таким параметрам, как специфичность, линейность, правильность, сходимость, внутрилабораторная точность, робастность; рассчитана неопределенность анализа.

Ключевые слова: метод поляриметрии, валидация аналитических методик, азитромицин.

Введение. Препараты фармакологической группы «макролиды и азалиды» достаточно широко применяются в медицинской практике благодаря проявлению хороших клинико-экономических результатов при наиболее распространенных инфекциях и занимают одно из ведущих мест в повседневных назначениях [1]. Азитромицин выделяется среди других препаратов данной группы большой продолжительностью действия и возможностью его использования коротким 3-дневным курсом. Известно более 40 торговых названий лекарственных препаратов азитромицина, которые зарегистрированы в странах СНГ в виде различных лекарственных форм – капсулы, таблетки, порошки для приготовления суспензий и растворов для инфузий.

Разработка и валидация методик количественного определения активного вещества в субстанциях и готовых лекарственных средствах для рутинного анализа, которые не требуют значительного расхода растворителей и реактивов, продолжительного времени проведения анализа, позволяющие получать наиболее точный результат, продолжают оставаться одними из актуальных проблем фармацевтической химии.

Цель. Исходя из актуальности темы, целью работы была разработка методики количественного определение азитромицина в субстанции методом поляриметрии с перспективой использования методики для определения азитромицина в лекарственных средствах.

Материалы и методы. В работе использовали мерную посуду класса А, аналитические весы AN 204 S/A METTLER TOLEDO, полуавтоматический поляриметр ATAGO AP-300 (относительная погрешность менее ±0,2%, точность измерения угла вращения ±0,01°). Объектом исследования была субстанция азитромицина, соответствующая ФС 42-0312-07 (содержание активного вещества 96,23%,) из которой готовили модельные растворы 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, в качестве рабочего стандартного образца использовали субстанцию азитромицина «VOEST-ALPINE INTERTRADING»(Австрия) (содержание активного вещества 97,6%).

Методика количественного определения: точную навеску субстанции азитромицина (г) помещают в мерную колбу объёмом 25,0 мл, добавляют около 10 мл этилового спирта 96%, после встряхивания и растворения субстанции доводят объём раствора тем же растворителем до метки и измеряют угол вращения полученного раствора. Параллельно определяют показатель удельного вращения $\left[\alpha_D^{20}\right]$ 2% раствора рабочего стандартного образца азитромицина в 96% этиловом спирте. Испытания проводят при температуре 20°С, рассчитывают среднее пяти измерений угла вращения. Расчет содержания активного вещества азитромицина в субстанции проводят по формуле:

$$X_{,\%} = \frac{\alpha \times 100 \times 25}{\left[\alpha_D^{20}\right] \times l \times 0.5}.$$

Результаты и обсуждение. В ходе разработки методики производили подбор

растворителя, исходя из величины угла вращения для 2% растворов и литературных данных о растворимости азитромицина в хлороформе и этиловом спирте [2]. Угол вращения растворов измеряли в одних и тех же условиях. Значения угла вращения спиртового и хлороформного растворов составили -1,85° и -1,79° соответственно. Спиртовой раствор имеет большее значение угла вращения, таким образом, использование в качестве растворителя этилового спирта позволяет уменьшить неопределенность анализа и повысить специфичность.

Показатель удельного вращения азитромицина в этиловом спирте определяли согласно фармакопейным статьям [3, 4], в результате был получен результат -48°, который соответствует пределам показателя удельного вращения (от -45° до -49°). Данное значение показателя удельного вращения использовали для расчета содержания азитромицина в растворах модельных образцов.

Перед проведением валидации разработанной методики количественного определения нами были рассчитаны критерии валидационных характеристик методики с учетом допусков содержания (В±2%) и проведен прогноз общей неопределенности анализа. Неопределенность анализа оценивали по величинам неопределенности пробоподготовки (Δ_{SP}) модельного раствора и раствора рабочего стандартного образца и неопределенности конечной аналитической операции Δ_{FAO} – относительной погрешности прибора для двух измерений стандартного и модельного образцов [4, 5, 6]. Неопределенность анализа составила 0,43%, что не превышает критерий максимально допустимой систематической погрешности 0,64%.

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 - \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0.04^2 + 0.23^2 + 0.04^2 + 0.23^2 + 0.2^2 + 0.2^2} \approx 0.43\%$$

Руководствуясь принципом параллельного определения валидационных характеристик, сходимость, правильность и линейность методики оценивали одновременно для девяти модельных образцов азитромицина в интервале концентраций 0,5-4,5%. Концентрации модельных образцов и результаты анализа рассчитывали в «нормализованных» координатах [6], что позволило наглядно представить результаты эксперимента и сопоставить их с валидационными критериями. Сходимость и правильность методики определяли по рассчитанным значениям среднего, стандартного отклонения, интервала неопределенности и систематической погрешности, которые приведены в табл. 1.

Таблица 1

Оценка сходимости и правильности

№	Раствор, %	Введено X_i, %	α,°	Найдено Y_i, %	Z_i, %
1	0,5	20,00	-0,46	19,97	99,83
2	1,0	40,00	-0,92	39,93	99,83
3	1,5	60,00	-1,38	59,90	99,83
4	2,0	80,00	-1,85	80,30	100,37
5	2,5	100,00	-2,31	100,26	100,26
6	3,0	120,00	-2,77	120,23	100,19
7	3,5	140,00	-3,21	139,32	99,52
8	4,0	160,00	-3,68	159,72	99,83
9	4,5	180,00	-4,16	180,56	100,31
				$Z_{средн.}$, %	99,99
				S_Z, %	0,29
				Δ_Z, %	0,55
				критическое значение Δ_{As}, %	2,00
				δ, %	0,01
				критерий $max\ \delta$, %	0,64

Оценка линейности методики заключалась в определении интервала концентраций, в котором показатель удельного вращения являлся бы постоянной величиной, а также в оценке величин коэффициента корреляции r, остаточного стандартного от-

клонения RSD_o и коэффициентов линейности. В результате анализа модельных образцов были получены следующие результаты: b=1,00, S_b=0,0023, a=-0,02, S_a=0,26, RSD_o=0,36, r=1,00, график линейности $Y_i=1{,}00 \cdot X_i - 0{,}02$. По результатам статистической обработки данных методом наименьших квадратов было установлено, что методика линейна во всем диапазоне концентраций (рис. 1).

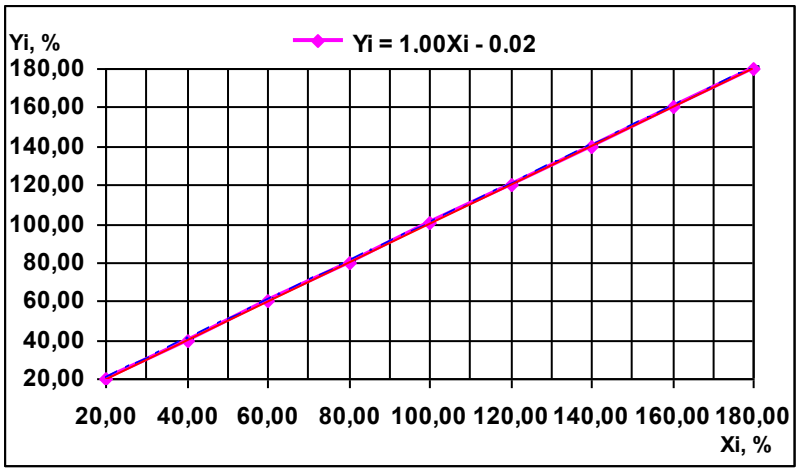


Рис. 1. График линейной зависимости величины угла вращения от концентрации

При разработке методики нами были исследованы факторы, которые влияют на результаты анализа, таким образом, проводилась оценка робастности методики. Для определения стабильности угла вращения во времени измеряли угол вращения 2% модельного раствора ($\alpha_{2\%р\text{-}ра.}$) и раствора стандартного образца в течение 1 часа. Результаты испытаний представлены в табл. 2.

Таблица 2

Оценка стабильности растворов во времени

t, мин	0	15	30	45	60	Среднее	RSD_t%	Δ_t, %	*maxδ*, %
$\alpha_{2\%\ р\text{-}ра}$	-1,85°	-1,85°	-1,83°	-1,82°	-1,80°	-1,83°	1,16	2,47	0,64
$\alpha_{р\text{-}раРСО}$	-1,92	-1,92	-1,91	-1,91	-1,89	-1,91	0,64	1,37	

Как видно, $\Delta_t \geq max\delta$=0,64%, т. е. испытуемый раствор неустойчив в течение 1 часа, устойчивость угла вращения наблюдается лишь в первые 15 минут.

Исследования внутрилабораторной прецизионности проводили на 5 пробах 2% раствора исследуемой субстанции азитромицина. Анализ проводился для каждой пробы в разные дни, разными аналитиками, с использованием разной мерной посуды. Проводили статистическую обработку полученных данных Z_i %, рассчитывали единое стандартное отклонение SD_z и относительный доверительный интервал Δ_{intra}, результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты проверки внутрилабораторной прецизионности

№ пробы	1 день	2 день	3 день
1	100,00	99,88	99,07
2	99,65	98,64	98,88
3	98,68	96,85	97,99
4	98,78	98,49	98,73
5	99,87	99,56	99,49
$Z_{средн.}$, %	99,39	98,68	98,83
$Z_{объед.средн.}$, %	98,97		
S_Z, %	0,62	1,18	0,55
SD_Z, %	0,83		
Δ_{intra}, %(k = 5)	0,66		

Выводы. Разработана и валидирована методика количественного определения субстанции азитромицина методом поляриметрии. По результатам внутрилабораторного эксперимента было установлено, что метрологические характеристики таких валидационных параметров методики, как правильность, сходимость, линейность и внутрилабораторная прецизионность, не превышают валидационные критерии. Стабильность угла вращения испытуемых образцов наблюдается в течение первых 15 минут. Методика может быть воспроизведена в условиях лаборатории, при доверительной вероятности 95% отклонение единичного значения составляет 98,97±0,66%.

Литература

1. Веселов, А.В. Азитромицин: современные аспекты клинического применения / А.В. Веселов, Р.С. Козлов // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2006. – Т. 8, № 1. – С. 18-32.

2. Clarke`s analysis of drugs and Poisons / Edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton and B. Widdop. – London : Pharmaceutical-Press, 2004. – 1632 p.

3. Государственная фармакопея Российской Федерации. – М. : «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків : РІРЕГ, 2001. – 556 с.; Доповнення 1. – Харків : РІРЕГ. – 2004. – 520 с.; Доповнення 2. – Харків : РІРЕГ. – 2008. – 608 с.

5. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности : метод. рекомендации. – М. : Спорт и Культура. – 2000», 2007. – 192 с.

6. Стандартизована процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту / О.І. Гризодуб, Д.А. Леонтьєв, Н.В. Денисенко, Ю.В. Підпружников // Фармаком. — 2004. — № 3. — С. 3-17.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF AZITHROMYCIN

A.H. VALIEV[1]
V.A. GEORGIYANTS[2]
A.A. ZDORYK[2]

[1] Tajik National University, Dushanbe

[2] National University of Pharmacy, Kharkov

e-mail: vgeor@ukr.net

The results of the validation of proposed polarimetric quantitative determination method of azithromycin in the substance are presented in the article. The validation procedure for evaluation of the parameters such as specificity, linearity, accuracy, repeatability, intra-laboratory precision, robustness was performed; uncertainty of analysis was calculated.

Key words: polarimetry method, validation of analytical methods, azithromycin.

УДК: 616.37-002:577.118:543.552.054.1

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ФРАКЦИЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ АЛКОГОЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ

А. А. ХАБАРОВ
К. А. ЛУШОВ
Е. О. ФЕДОРОВ
А. Л. ЛОКТИОНОВ

Курский государственный медицинский университет

e-mail: bioing@mail.ru

В статье изложены данные по изучению микроэлементного состава фракций крови у больных острым небилиарным панкреатитом. Анализ проводился методом инверсионной вольтамперометрии. Описывается ход исследования, обоснованы выбор реагентов и способы пробоподготовки.

Ключевые слова: острый панкреатит, инверсионная вольтамперометрия, микроэлементный состав крови.

Острый панкреатит (ОП) по-прежнему занимает третье, а в отдельных регионах первое, место в структуре экстренной хирургической патологии органов брюшной полости. Несмотря на развитие методов диагностики и лечения, летальность при тяжелых, распространенных формах этого заболевания остается высокой, достигая в отдельных клиниках 20,5%. Недостаточно изученными остаются и многие вопросы патогенеза ОП, определяющие тяжесть течения патологии и результаты его лечения. Так, рядом авторов показана зависимость тяжести ОП от активности ферментативных систем, в состав которых входят различные микроэлементы.

Цинк необходим для синтеза, секреции и промотирования действия инсулина. Он защищает от разрушения производящие инсулин бета-клетки поджелудочной железы. Медь принимает участие в построении и регенерации костной ткани, усиливает гипогликемический эффект инсулина, потенцирует окисление глюкозы и препятствует распаду гликогена в печени. Избыточное содержание меди приводит к дефициту цинка. Роль свинца в организме недостаточно изучена, однако известно его негативное влияние на состояние здоровья человека. Обладая канцерогенными свойствами и низкой экскрецией, он накапливается с возрастом, что может привести к тяжелой интоксикации. Избыток свинца приводит к дефициту цинка, так как он является его антагонистом.

В современной хирургической клинике основная масса больных ОП представлена лицами, злоупотребляющих алкоголем. Эти пациенты представляют трудности не только в диагностическом и лечебном плане, но и в прогнозировании результатов лечения. В этой связи предпринимаются попытки математического моделирования, использования лабораторной тест-системы и т.д.

Целью данного исследования было изучение микроэлементного состава фракций крови (Cu, Zn, Pb) у пациентов с острым панкреатитом методом инверсионной вольтамперометрии (ИВ).

Материалы и методы. Объектом исследования служили образцы крови пациентов, страдающих острым небилиарным панкреатитом. Ввиду важности четкого определения диапазона малых концентраций микроэлементов в крови, требования к чувствительности метода достаточно высоки.

Низкий предел обнаружения, относительно небольшое время проведения анализа, хорошая адаптация к компьютеризации и автоматизации, сравнительно низкая стоимость оборудования делает ИВ конкурентоспособным и перспективным методом для проведения повседневных массовых анализов. Химические помехи, влияющие на результаты определения элементов, устраняются в процессе пробоподготовки. Метод измерения включает предварительную подготовку проб путем «мокрой» минерализации и последующее измерение массовых концентраций в водном растворе подготовленной пробы методом ИВ. В качестве окислителей использовались концентрирован-

ные азотная и хлорная кислоты марки ЧДА. Пробу подвергали термической обработке; для поддержания температуры использовали систему пробоподготовки ТЕМОС-ЭКСПРЕСС. Исследования показали, что азотная кислота не обеспечивает полного удаления органической составляющей крови. Оптимизация метода «мокрого» озоления хлорной кислотой проводилась по следующей методике.

В 9 проб по 0,5 мл добавляли по 10 мл 60% хлорной кислоты. Озоление проводили при температуре 180-190°С. Через каждые 10 минут проводили изъятие проб и охлаждали их до комнатной температуры. Полученные растворы переносили в мерные колбы по 25 мл и доводили до метки дистиллированной водой. Измеряли оптическую плотность минерализата на СФ-26 при длине волны, равной 440 нм. В результате (рис. 1) было установлено, что оптическая плотность практически не изменяется после 50 минут термообработки, что свидетельствует о практически полном устранении органической составляющей. Доокисление проводили с помощью 30% перекиси водорода.

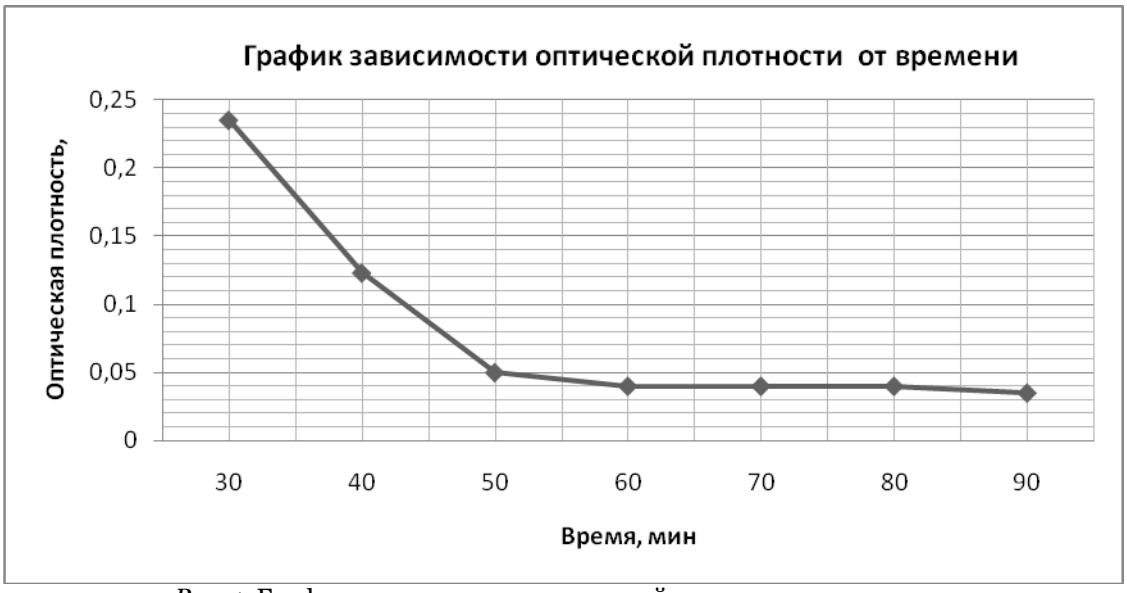


Рис. 1. График зависимости оптической плотности от времени

Отбор проб крови проводился в группе, состоящей из 15 человек, имеющих диагноз острый небилиарный панкреатит. Консервацию образцов проводили добавлением гепарина. Для изучения распределения микроэлементов кровь разделили на фракции методом центрифугирования. Полученные образцы эритроцитарной массы и плазмы озоляли, минерализат исследовали методом инверсионной вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала на анализаторе ВА-03 с трехэлектродной аналитической ячейкой. В качестве рабочего и вспомогательного использовались углеситалловые электроды с микропленочным ртутным покрытием. Электрод сравнения – хлоридсеребряный. На предварительном этапе исследований были выбраны оптимальные условия для определения цинка и свинца: потенциал накопления – 1400 мВ, время накопления – 60 секунд, скорость развертки потенциала – 500 мВ/с. При определении меди, для предотвращения образования интерметаллидов, потенциал накопления повышали до -700 мВ, уменьшив время накопления до 30 с. В качестве фонового электролита использовался хлоридно-аммонийный раствор с pH = 3-4

Выбор данного фона обусловлен: а) отсутствием образования гидроксидов и комплексных соединений, понижающих чувствительность анализа; б) предотвращением восстановления кислорода, который искажает пики; в) хорошей воспроизводимостью результатов.

Определение содержания металлов проводили методом многократных добавок. В качестве стандартных растворов использовали ГСО ионов определяемых металлов с концентрацией 1 г/л. Рабочие растворы готовили разведением ГСО. Для формирова-

ния микропленки на поверхности рабочего электрода применяли ГСО ионов ртути 1 г/л.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования было проведено измерение содержания исследуемых металлов во фракциях крови. Количество параллельных измерений равно 6. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание микроэлементов во фракциях крови

	N=15, P=0,95, n=6			
	Норма		Эксперимент	
	Плазма	Эритроциты	Плазма	Эритроциты
Cu, мг\л	0,86-1,0	1,2-1,4	1,12±0,29	1,34±0,55
Pb, мг\л	0,004	0,3-0,4	<0,001	0,476±0,06
Zn, мг\л	1,0-1,12	12-13	0,96±0,12	7,4±0,97

Вероятно, дефицит внутриклеточного цинка свидетельствует о снижении активности карбоангидразы, которая является основным ферментом, участвующим в обмене кислорода и углекислого газа. Следовательно, у этих пациентов можно предположить развитие тканевой гипоксии, которое, несомненно, утяжеляет течение заболевания.

Выводы.

1. Наблюдается зависимость возникновения эритроцитарного дефицита цинка у пациентов, больных острым небилиарным панкреатитом, что, вероятно, позволит прогнозировать раннее развитие осложнений.

2. Мониторинг содержания цинка в крови дает возможность оценить эффективность принимаемых препаратов в зависимости от результатов лечения.

THE STUDY OF BLOOD FRACTIONS TRACE-ELEMENT COMPOSITION OF PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS OF ALCOHOLIC ETIOLOGY

A.A. KHABAROV
K.A. LUSHOV
E.O. FEDOROV
A.L. LAKTIONOV

Kursk State Medical University

e-mail: bioing@mail.ru

Studying of blood fractions microelements composition of patients with acute pancreatitis is discussed. The techniques of sample preparation and specificity of their analysis by stripping voltammetry method are considered.

Key words: acute pancreatitis, stripping voltammetry, trace element composition of the blood.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 615.454.1.122

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ФИТОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЧАБРЕЦА, КАШТАНА, СОЛОДКИ, КРАПИВЫ, ЗВЕРОБОЯ

Т.А. ВОЛОДИНА [1]
Н.А. ПЕНЬЕВСКАЯ [1]
Э.Ф. СТЕПАНОВА [2]

[1] Омская государственная медицинская академия

[2]Пятигорская государственная фармацевтическая академия

e-mail: farmTehOMGMA@yandex.ru.

Фитопрепараты на сегодняшний день в рамках государственного реестра составляют более 40% всех действующих лекарственных средств (ЛС) в связи с их востребованностью, эффективностью и безопасностью. Особенно интересны композитные фитосоставы, которые, по мнению современных исследователей, значительно эффективнее, чем моносоставляющие. Выбор темы настоящего исследования обусловлен прежде всего тем, что ассортимент ЛС для ускорения регенерации кожных покровов при воспалительных и раневых поражениях весьма ограничен. Тогда как отечественные сырьевые ресурсы богаты растительными источниками веществ с противовоспалительным и репаративным действием. К таким источникам относятся трава чабреца, плоды каштана, корни солодки, листья крапивы, трава зверобоя.

Однако до настоящего времени в качестве ЛС эти растения преимущественно используют в виде настоев и различных экстрактов. Вместе с тем для лечения поражений кожи наиболее предпочтительными являются такие наружные лекарственные формы, как гели или мази.

Ключевые слова: фитопрепараты, фитосоставы, гели, мази.

Настоящее исследование посвящено обоснованию состава композитного фитогеля с репаративными свойствами и изучению его фармакологических свойств.

На первом этапе было сконструировано 5 композиций из густых экстрактов чабреца, каштана, солодки, крапивы, масляного экстракта зверобоя и дигидрокверцетина. Композиции отличались долевыми соотношениями каждого из компонентов.

Изучение эффективности (антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия) и безопасности (токсичности) экспериментальных фитокомпозиций проводили на биологической модели – культуре инфузорий Parametium caudatum в остром и хроническом опыте. При этом оценивали влияние исследуемых композиций на темпы роста и размножения, характер движения и время остановки инфузорий [1].

Анализ результатов хронического опыта (табл. 1) свидетельствует, что все 5 экспериментальных композиции являются экологически благоприятными для выбранной биологической модели. Клетки парамеций в опытных группах (культуральная среда: очищенная вода с добавлением испытуемой комбинации) по размеру и форме не отличались от клеток контрольной группы (культуральная среда: очищенная вода). Вместе с тем скорость размножения парамеций во всех опытных группах, особенно в четвертой, более чем в 2 раза превышала данный показатель в контроле. Кроме того,

инфузории в среде, содержащей четвертую фитокомпозицию, отличались значительно более высокой подвижностью, чем в контроле.

Таблица 1

Влияние экспериментальных фитокомпозиций на аппарат размножения и темпы роста парамеций (хронический опыт)

Объект исследования	Исходное количество парамеций в 0,05 мл	Количество парамеций в 0,05 мл, через 3 суток	Размер парамеций (мкм) и форма	Характер движения
Композиция №1	4 – 5	> 100	148 ± 11 удлинённые	активны
Композиция №2	4 – 5	> 100	142 ± 9 удлинённые	активны
Композиция №3	4 – 5	> 100	147 ± 9 удлинённые	активны
Композиция №4	4 – 5	> 200	151 ± 16 удлинённые	очень активны
Композиция №5	4 - 5	> 100	146 ± 11 удлинённые	активны
Контроль	4 - 5	40 - 50	145 ± 11 удлинённые	активны

Для изучения протективного (антиоксидантного и мембраностабилизирующего) действия исследуемых композиций оценивали их влияние на продолжительность периода активности инфузорий в среде с добавлением токсических веществ: 1% раствор водорода пероксида (токсикант, который in vivo расщепляется до перекисных радикалов и повреждает преимущественно липидную часть мембраны) и 14% этиловый спирт (токсикант, преимущественно повреждающий белковые структуры биомембраны) (табл.2).

Таблица 2

Влияние экспериментальных фитокомпозиций на продолжительность сохранения двигательной активности парамеций после добавления клеточных ядов (острый опыт)

Объект исследования	Время остановки парамеций в 14% этаноле, мин.	Время остановки парамеций в 1% растворе пероксида водорода, мин.
Композиция №1	13,32 ± 0,38	3,42 ± 0,08
Композиция №2	14,12 ± 0,12	5,20 ± 0,20
Композиция №3	15,33 ± 0,50	5,83 ± 0,32
Композиция №4	17,83 ± 0,69	7,05 ± 0,45
Композиция №5	15,98 ± 0,38	4,57 ± 0,24
Контроль	8,90 ± 0,29	2,42 ± 0,08

Установлено, что все пять фитокомпозиций существенно и статистически значимо ($p<0,05$) удлиняли период сохранения двигательной активности инфузорий от момента добавления токсиканта до их остановки.

Таким образом, по результатам хронического и острого опыта наиболее благоприятной для используемой биологической модели оказалась композиция № 4, под воздействием которой заметно повышалась двигательная активность и частота деления клеток парамеций, в результате чего к третьим суткам их количество превосходило контроль в 5 раз. Кроме того, композиция №4 оказывала максимальные мембраностабилизирующий и антиоксидантный эффекты, что проявлялось статистически значимым удлинением времени остановки движения парамеций под воздействием спирта этилового (в 2 раза) и перекиси водорода (в 3 раза).

В последующем на основе композиции № 4 был получен состав, используемый для создания фитогеля. На основании проведенных биофармацевтических исследова-

ний in vitro были выбраны следующие мазевые основы – Carbopol 940 1% и Flogel 700 0,5%+2% Flocare ET58.

Далее методом диализа через полупроницаемую мембрану (модифицированный метод В.Г. Гунько и соавт.) [3] проведено изучение осмотической активности выбранного состава (табл. 3). Этот параметр имеет значение для снятия воспаления и отека.

Таблица 3

Осмотическая активность композитного фитогеля

Время, час	Осмотическая активность
1	343%
2	428%
4	555%
6	588%
8	613%
12	642%
24	673%

Установлено, что, скорость поглощения основой воды с течением времени увеличивалась от 343% осмотической активности образца геля через 1 час до 673% через 24 часа. По этому критерию образец относятся ко 2-й группе согласно классификации, предложенной В.В. Верниковским [2], что означает наличие достаточно высокой осмотической активности. Сопоставление ее значений с данными литературы позволяет предполагать отсутствие болевых ощущений при использовании данной основы.

Фармакологические исследования выполнены на самцах крыс линии Вистар массой 180-200 г. Крыс содержали в стандартных условиях по 3-4 особи в клетке с контролируемыми режимами температуры (24оС) и освещения (в течение 12 ч), со свободным доступом к воде и пище.

В исследовании использовали фитогель оригинального состава на основе чабреца, который наносили на рану 1 раз в день ежедневно в течение 20 дней.

Изучение ранозаживляющего действия фитогеля проводилось на модели линейной кожной раны. Линейные кожные раны наносили под комбинированным наркозом – ксилазина гидрохлорид (3мг/кг), эфир диэтиловый. Кожу спины разрезали до собственной фасции. Длина разреза составила в среднем 25 мм. Затем на равном расстоянии от краев раны накладывали 1 шов, сближающий края раны. Для удобства последующего измерения размеров ран швы накладывались с таким расчетом, чтобы эпителий боковых краев раны не соприкасался, и в этом случае эпителизация происходила от конечных краев раны. Оценку ранозаживляющего действия проводили по характеру клинического течения (наличия нагноения, времени полного отторжения струпа, времени и динамике полного срастания краев раны) на 4, 8, 12, 16, 20-й дни наблюдения.

Таблица 4

Влияние разработанного фитогеля на время заживления линейной кожной раны

Исследуемый объект	Средний линейный размер раны, мм					
	исходный	на 4-й день	на 8-й день	на 12-й день	на 16-й день	на 20-й день
Контроль	26,57±1,29	22,85±0,64	17,85±1,72	5,28±0,45	3,14±0,64	1,28±0,70
Препарат сравнения	28,00±1,06	22,00±1,07	17,57±1,05	4,28±0,7	2,71±0,45	0
Фитогель	25,14±1,35	19,85±1,45	15,14±1,12	2,71±0,45	1,42±0,49	0

На 16-е сутки эксперимента очевидна тенденция уменьшения линейной кожной раны во всех группах животных. Наиболее активен в этот период фитогель, который превосходит препарат сравнения на 52,39%. К 20-м суткам эксперимента во всех груп-

пах животных наблюдали практически полное заживление ран, а в контрольной группе животных длина раны составила в среднем 1,28 мм.

Заключение.

Таким образом разработан фитогель на основе густых экстрактов чабреца, каштана, солодки, крапивы, масляного экстракта зверобоя и дигидрокверцетина. Изучение эффективности (антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия) и безопасности (токсичности) экспериментальных фитокомпозиций проводили на биологической модели – культуре инфузорий Parametium caudatum в остром и хроническом опыте. Изучение ранозаживляющего действия фитогеля проводилось на модели линейной кожной раны.

Было установлено, что разработанный композитный фитогель превосходит препарат сравнения на 52,39%.

Литература

1. Богдан, А.С. Популяция одноклеточных организмов как модель интегральной оценки воздействия вредных факторов / А.С. Богдан // Тез. докл. Всесоюзной конф. – М., 1989. – С.12-13.

2. Верниковский, В.В. Биотехнологическая разработка некролитической мази и ее исследования : дис. ... канд. биолог. наук : 03.00.23./ В.В. Верниковский. – Пятигорск, 2007. – 143 с.

3. Гунько, В.А. Изучение осмотической активности некоторых мазевых основ / В.А. Гунько, А.А. Гунько, Н.М. Мушенко // Хим.-фармац. журн. – 1982. – Т. 16, № 3. – С. 89-91.

DEVELOPMENT AND RESEARCH OF THE PLANT-BASED PREPARATION ON BASIS OF MOTHER-OF-THYME, CHESTNUT, GLYCYRRHIZA, NETTLE, ST-JOHN'S-WORT

T.A. VOLODINA [1]
N.A. PENYEVSKAYA [1]
E.F. STEPANOVA [2]

[1] The Omsk state medical academy

[2] Pyatigorsk state pharmaceutical academy

e-mail: farmTehOMGMA@yandex.ru

The plant-based preparations within the framework of state register make more 40 % of operating drugs, in connection with their highly sought, efficiency and safety. Composite phytostructures in opinion of modern researchers, considerably more effective, than monoconstituents. The choice of theme of the given research is conditioned, foremost, that the assortment of drugs for the acceleration of regeneration of the cutaneous covering at inflammatory and wound defeats is very limited. While the home sources of raw materials are rich in the vegetable sources of substances with anti-inflammatory action. The grass of mother-of-thyme, garden-stuffs of chestnut, roots of glycyrrhiza, leaves of nettle, grass of st-john's-wort, belong to such sources. However at present time these plants are mainly used as infusions and different extracts. At the same time for treatment of skin defeats such outward medicinal forms as gels or ointments are preferable.

Key words: the plant-based preparations, phytostructures, gels, ointments.

УДК 615.322.012.1

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СМОРОДИНЫ ЧЁРНОЙ ЛИСТЬЕВ ЭКСТРАКТА СУХОГО

Т.М. МЕДВЕДЕВА
И.Е. КАУХОВА

ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

e-mail: Tatiana.Medvedeva@pharminnotech.com

Разработана технология смородины чёрной листьев экстракта сухого, обогащённого флавоноидами и кислотой аскорбиновой, с использованием на стадии экстрагирования дробной мацерации. Показано, что использование раствора этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) в качестве экстрагента оказывает положительное влияние на стабильность БАВ смородины черной листьев, увеличивая их выход в среднем на 10%.

Ключевые слова: смородина чёрная, экстракт сухой, антиоксидантная активность, кислота аскорбиновая.

Введение. Антиоксиданты играют важную роль в регуляции протекания свободно-радикальных превращений в организме, существенно влияя на его состояние, поэтому антиоксиданты и исследование антиокислительных свойств соединений в последнее время получили широкое распространение. Наиболее перспективными для коррекции антиоксидантного статуса человеческого организма считаются продукты растительного происхождения, богатые полифенолами, витаминами, каротиноидами и другими биологически активными веществами благодаря их широкому распространению, доступности, ценным свойствам, щадящему воздействию на организм и сравнительно низкой токсичности [1, 2].

Смородины чёрной листья содержат широкий комплекс биологически активных соединений, основными из которых являются кислота аскорбиновая, флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, каротиноиды, органические кислоты, эфирные масла и др. Известно, что все вышеперечисленные соединения проявляют антиоксидантные свойства [3]. Однако несмотря на то, что смородина чёрная является перспективным лекарственным растительным сырьём, исследование современного фармацевтического рынка показало, что номенклатура лекарственных препаратов на его основе чрезвычайно мала [4]. В связи с этим актуальным является создание и внедрение в медицинскую практику лекарственных средств на основе извлечений из смородины чёрной листьев.

Цель: разработка технологии сухого экстракта на основе смородины чёрной листьев с целью его дальнейшего введения в состав общеукрепляющего и витаминного лекарственного средства.

Материалы и методы. В работе использовали сырьё, приобретённое в аптечной сети, производства ОАО «Хорст», г. Барнаул, серия 09.10. Экстракцию проводили методом мацерации при перемешивании.

При разработке технологии смородины чёрной листьев экстракта сухого об эффективности технологии судили по выходу флавоноидов, кумаринов и дубильных веществ и содержанию аскорбиновой кислоты, а также по величине антиоксидантной активности (АОА) полученных извлечений.

Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин определяли методом дифференциальной спектрофотометрии по стандартной методике. Для определения содержания кумаринов использовали метод спектрофотометрии [5]. В обоих случаях измерения проводили на спектрофотометре UV-mini-1240 (Shimadzu). Количественное определение дубильных веществ проводили методом Левенталя – Курсанова [6].

Определение антиоксидантной активности (АОА) объектов проводили по методике кулонометрического титрования электрогенерированным бромом [7, 8] на потенциометре П-5827М. В электролитическую ячейку помещали 10 мл виннокислого буфе-

ра с pH 3,56 (приготовленного из стандарт-титра), 5 мл 0,1 н серной кислоты, 5 мл 0,2 М калия бромида. К созданной среде титрования добавляли исследуемый объект в объеме 0,5 мл. После заполнения ячейки в нее помещали две пары электродов. Для равномерного протекания электрохимического взаимодействия во всем объеме ячейки в нее помещали якорь магнитной мешалки. Затем через ячейку пропускали ток постоянной величины (20 мА), величину тока фиксировали миллиамперметром с функцией стабилизации силы тока. Время конца титрования фиксировали с помощью секундомера при появлении скачка потенциала.

Определение количественного содержания кислоты аскорбиновой проводили аналогично кулонометрическим титрованием электрогенерированным йодом [8, 9].

Результаты исследования. В проведённых ранее исследованиях определены оптимальные параметры экстрагирования смородины чёрной листьев: метод экстрагирования – мацерация при перемешивании, экстрагент – вода очищенная, время экстрагирования – 45 минут, соотношение сырье:экстрагент 1:25.

В данном исследовании нами было изучено влияние температурного режима экстрагирования на выход БАВ. Установлено, что уровень АОА и содержание БАВ в извлечениях из смородины черной листьев зависят от температурного режима процесса экстрагирования. Так, АОА максимальна у извлечения, полученного при экстрагировании водой очищенной при 80°С, флавоноиды и кумарины смородины листьев лучше всего извлекаются водой очищенной при 100°С, а кислота аскорбиновая – при 20°С. При этом концентрация кислоты аскорбиновой в извлечении, полученном при 80°С, в пересчете на сухое сырье составляет всего 5,6±0,3 мг% (выход 6,6%), так как повышение температурного воздействия способствует её разрушению.

Поэтому для оптимизации выхода всех целевых БАВ и обеспечения максимальной АОА готового продукта использовали дробную мацерацию смородины черной листьев при различных режимах. С целью сохранения кислоты аскорбиновой, легко разрушающейся на воздухе в водных извлечениях, первое настаивание проводили водой очищенной.

Навеску сырья заливали водой очищенной (t=20°С) в соотношении 1:10, экстрагировали в течение 45 минут при перемешивании с помощью магнитной мешалки со частотой 300 об./мин. Извлечение отфильтровывали (извлечение 1). Шрот повторно заливали водой очищенной в соотношении 1:15, экстрагировали на водяной бане при t=100°С при постоянном перемешивании в течение 45 минут. Второе извлечение также отфильтровывали (извлечение 2).

Результаты исследования полученных извлечений приведены на рис. 1.

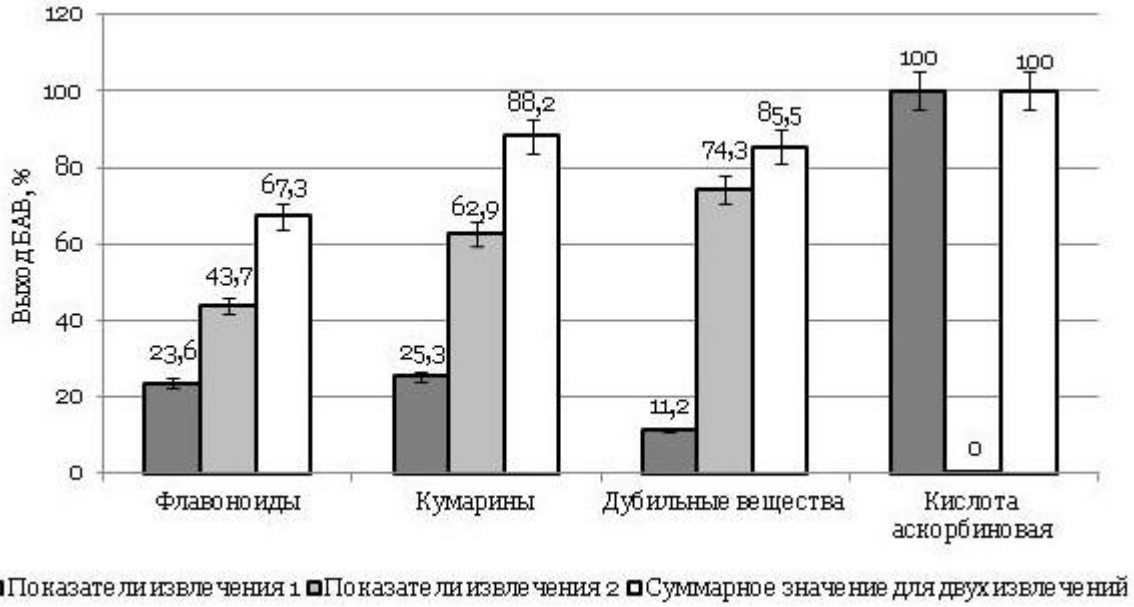


Рис. 1. Выходы БАВ из смородины черной листьев при дробной мацерации

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что при суммировании количественных показателей извлечений, полученных дробной мацерацией, увеличиваются выходы БАВ по сравнению с извлечением, приготовленным при 80°С. Концентрация кислоты аскорбиновой в извлечении 1 в пересчете на сухое сырье составляет 85±4 мг%. Значение АОА извлечения 1 составило 144 Кл/100 мл, а извлечения 2 – 107 Кл/100 мл, составляя в сумме 251 Кл/100 мл, что превышает уровень АОА извлечения, полученного при моноэкстракции (209 Кл/100 мл).

Таким образом, при дробной экстракции обеспечиваются максимальные выходы БАВ в извлечения и показатели АОА, а также оптимальный модуль экстракции (1:25).

Полученные извлечения упаривали в вакуумном сушильном шкафу при температуре, не превышающей 50°С, до остаточной влажности менее 5%. Определяли качественный и количественный состав полученных сухих экстрактов, а именно содержание кислоты аскорбиновой, флавоноидов, кумаринов и дубильных веществ.

Показано, что наибольшей АОА обладает сухой экстракт 2 за счет более высоких показателей содержания флавоноидов, кумаринов и дубильных веществ. Кислота аскорбиновая в полученных сухих экстрактах не была обнаружена.

С целью сохранения витамина С в сухом экстракте было изучено влияние этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) на его стабильность. ЭДТА был выбран в качестве стабилизатора, так как, являясь косвенным антиоксидантом, он не оказывал влияния на показатели АОА извлечений и сухого экстракта. Таким образом, в качестве экстрагента на стадии получения извлечения 3 вместо воды очищенной использовали 0,008 н водный раствор ЭДТА в соотношении 1:10. После отделения методом фильтрации извлечения 3 сырье повторно заливали водой очищенной в соотношении 1:15 (извлечение 4). Из этих извлечений были получены соответственно сухие экстракты 3 и 4. Количественные показатели сухих экстрактов, полученных без применения и с применением раствора ЭДТА, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты количественного определения биологически активных веществ и антиоксидантной активности в сухих экстрактах, полученных дробной мацерацией без применения и с применением раствора ЭДТА в качестве экстрагента

Показатель / Сухой экстракт	Концентрация флавоноидов, %	Концентрация кумаринов, %	Концентрация дубильных веществ, %	АОА, Кл/100 г сухого экстракта
Сухой экстракт 1	0,89±0,04	0,44±0,02	5,23±0,05	3,38±0,13
Сухой экстракт 2	2,10±0,05	5,01±0,05	30,17±0,81	3,54±0,15
Сухой экстракт 3	1,01±0,05	0,72±0,03	5,49±0,08	3,98±0,18
Сухой экстракт 4	2,29±0,11	5,40±0,07	31,15±0,63	3,65±0,16

Таким образом, доказано, что раствор ЭДТА не влияет на выход БАВ в извлечения, однако оказывает положительное влияние на стабильность БАВ смородины черной листьев при получении сухого экстракта. Содержание кислоты аскорбиновой в сухом экстракте 3 составило 169±9 мг%.

ЭДТА также не влияет на качественный состав сухих экстрактов, что подтверждено при сравнении электрофореграмм сухих экстрактов (рис. 2 и 3), полученных на приборе «КАПЕЛЬ 103РТ» НПФ «Люмекс».

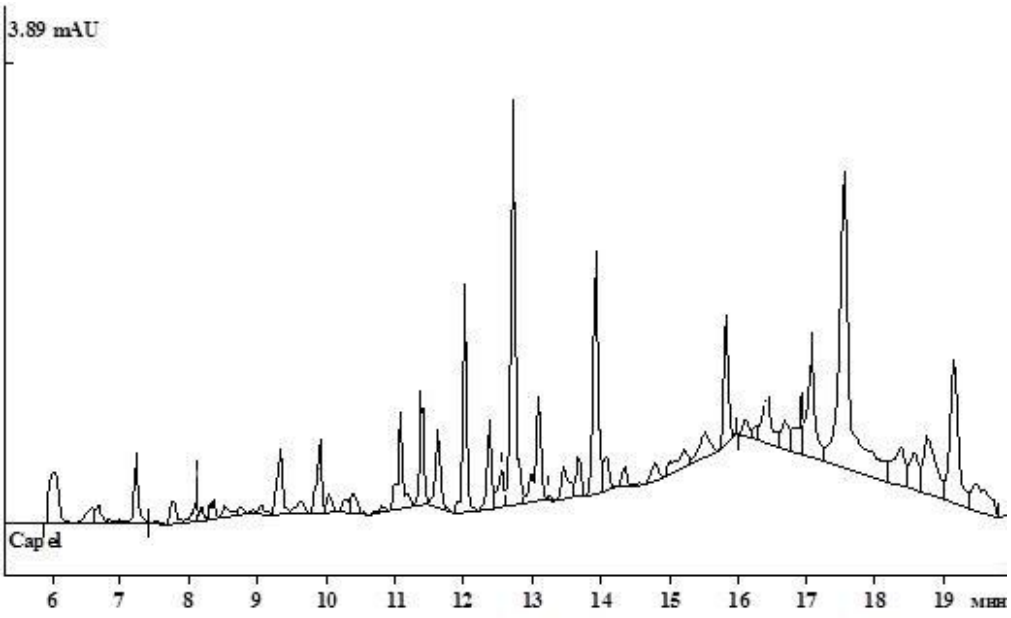


Рис. 2. Электрофореграмма сухого экстракта из извлечения, полученного без применения ЭДТА

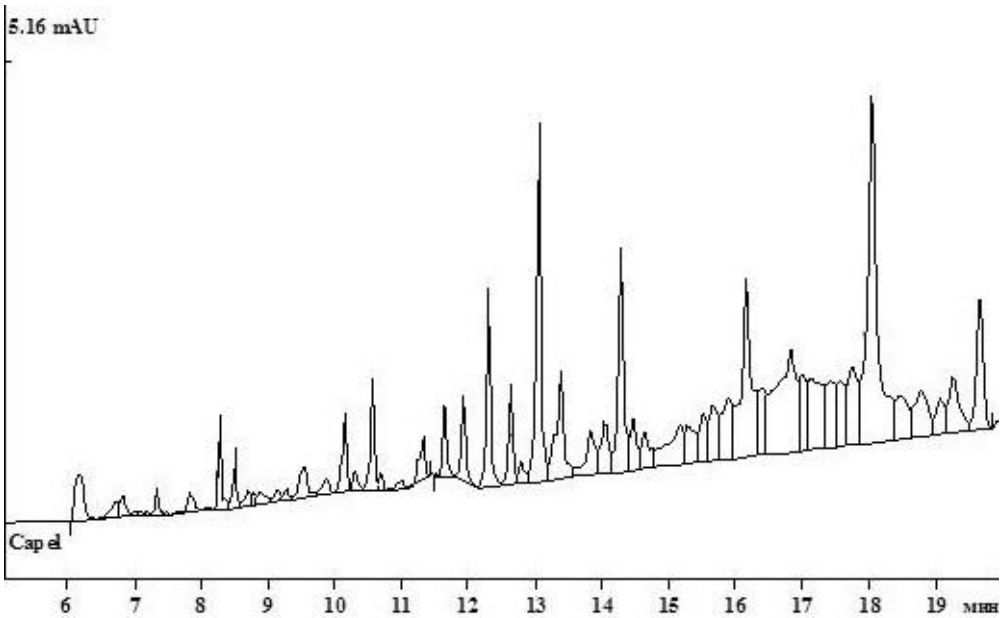


Рис. 3. Электрофореграмма сухого экстракта из извлечения, полученного с применением 0,008 н раствора ЭДТА в качестве экстрагента

При изучении физико-химических свойств полученных сухих экстрактов показано, что их смесь является гигроскопичной. Поэтому для обеспечения необходимых технологических свойств в состав конечного сухого экстракта вводили лактозу. Установлено оптимальное соотношение суммарный сухой экстракт:лактоза, равное 1:3.

Выводы. В результате исследований разработана технология сухого экстракта из смородины черной листьев, обогащенного флавоноидами, кумаринами, дубильными веществами и кислотой аскорбиновой. Показано, что концентрация БАВ максимальна в суммарном сухом экстракте, полученном методом дробной мацерации при различных температурных режимах с перемешиванием.

Доказано, что раствор ЭДТА оказывает положительное влияние на стабильность БАВ смородины черной листьев при получении сухого экстракта, увеличивая их выход в среднем на 10%. Содержание кислоты аскорбиновой в сухом экстракте составило 169±9 мг%.

Изучены технологические свойства полученных сухих экстрактов и их смеси.

Литература

1. Хавинсон, В.Х. Свободнорадикальное окисление и старение / В.Х. Хавинсон, В.А. Баринов, А.В. Арутюнян, В.В. Малинин. – СПб., 2003. – 327 с.

2. Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 63-75.

3. Федина, П.А. Определение антиоксидантов в продуктах растительного происхождения амперометрическим методом / П.А. Федина, А.Я. Яшин, Н.И. Черноусова // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 91-97.

4. Справочник лекарств РЛС [Электронный ресурс]. – URL: http://www.rlsnet.ru/ (дата обращения: 30.03.2012).

5. Болотова, В.Ц. Физико-химическое и фармакологическое изучение листьев липы сердцевидной и препаратов на их основе : дис. … канд. фарм. наук : 15.00.02 / В.Ц. Болотова. – СПб., 2002. – 194 с.

6. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – Вып.2. – М. : Медицина, 1990. – 366 с.

7. Алексеева, Г.М. Определение антиоксидантной активности водно-спиртовых экстрактов биомассы и корня женьшеня методом кулонометрического титрования / Г.М. Алексеева, А.В. Белякова, В.А. Вайнштейн // Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием : тез. докл. науч. конф. – УФА, 2004. – С. 56-57.

8. Алексеева, Г.М. Перспективы применения метода кулонометрии для определения количественного содержания биологически активных соединений в зверобоя продырявленного траве / Г.М. Алексеева, В.В. Сорокин, И.Е. Каухова, Е.В. Смола // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. – Пятигорск, 2008. – Вып. 63. – С. 201-202.

9. Екимов, А.А. Определение аскорбиновой кислоты в листьях смородины черной / А.А. Екимов, Е.А. Ломкова // Сборник тезисов научной конференции, посвященной 300-летию со дня рождения М.В. Ломоносова. – СПб., 2011. – С. 14-17.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF BLACK CURRANT LEAVES DRY EXTRACT

T.M. MEDVEDEVA
I.E. KAUKHOVA

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy

e-mail: Tatiana.Medvedeva@pharminnotech.com

We have developed the technology of black currant leaves dry extract. The method of performing the extraction procedure was fraction maceration. It was shown that using ethylenediaminetetraacetate (EDTA) water solution we can improve the stability of the biologically active substances of black currant leaves and increase their yield by 10% on average.

Key words: black currant, dry extract, antioxidant activity, ascorbic acid.

УДК 661.122+661.123+615.015.14

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ИННОВАЦИОННОГО КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ КОНЪЮНКТИВИТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Е.Т. ЖИЛЯКОВА
О.О. НОВИКОВ
М.Ю. НОВИКОВА
Н.Н. ПОПОВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: EZhilyakova@bsu.edu.ru

В статье описана разработка состава и технологии инновационного комбинированного лекарственного препарата для лечения бактериальных патологий глаз, сочетающего в себе антимикробное и антигистаминное действие и обладающего пролонгированным эффектом.

Ключевые слова: фармацевтическая технология, глазные капли, пролонгатор, механохимия, инфекционный конъюнктивит, мирамистин

Постановка проблемы. Конъюнктивиты являются одной из важнейших проблем практической офтальмологии. По данным Отдела инфекционных и аллергических заболеваний глаз Московского НИИ Глазных болезней имени Гельмгольца (2010 г.), на воспалительную патологию глаз приходится 40-60% амбулаторного приема, до 50% стационарных больных, 80% временной нетрудоспособности, связанной с глазными заболеваниями. До 10-30% слепоты составляют патологии в результате воспалительных заболеваний глаз. Кроме того, лечение конъюнктивитов по-прежнему является затруднительным и требует подбора оптимального лекарственного препарата [1].

Инфекционные конъюнктивиты являются наиболее распространенной формой воспалительных заболеваний глаз, нередко сопровождаются сопутствующими аллергическими реакциями и состоянием «синдром сухого глаза», что крайне резко снижает результативность и отягощает переносимость местной антибактериальной терапии [2].

При лечении бактериальных патологий глаз проблема заключается в использовании препаратов различных антибиотиков, основным недостатком которых является возрастающая резистентность микроорганизмов, следствием последней является осложнение клинических симптомов заболевания.

В этой связи особого внимания заслуживают препараты, действие которых направлено на ликвидацию большинства патологических проявлений заболевания.

Кроме того, необходимо учитывать тот факт, что снижению эффективности терапии бактериальных конъюнктивитов способствует недостаточная продолжительность действия большинства офтальмологических лекарственных форм, в частности глазных капель – наиболее часто используемой лекарственной формы в глазной практике. Это связано с тем, что лекарственное средство быстро вымывается слезной жидкостью из конъюнктивального мешка. Обеспечить оптимальную продолжительность нахождения лекарственного вещества в конъюнктиве позволяет использование в составе глазных капель пролонгаторов – вспомогательных веществ, создающих повышенную вязкость жидкой лекарственной формы.

Таким образом, разработка пролонгированных глазных капель для лечения инфекционных заболеваний глаз является актуальной.

Анализ литературы. Маркетинговые исследования ассортимента лекарственных препаратов на российском фармацевтическом рынке, используемых для лечения инфекционных воспалительных заболеваний глаз [3], выявили, что основную долю занимают препараты на основе антибиотиков различных групп. Однако ко всем этим веществам возникает резистентность микроорганизмов. Кроме того, большинство из них могут вызвать токсико-аллергические реакции органа зрения и организма в целом. Это обусловливает необходимость использования противомикробных веществ, не вызывающих лекарственной устойчивости микроорганизмов, т. к. лечение инфекци-

онных конъюнктивитов должно начинаться с самого эффективного препарата во избежание утяжеления клинической картины заболевания.

В качестве антимикробного агента в составе глазных капель наиболее перспективно использование лекарственных веществ, эффективно уничтожающих микроорганизмы за счет воздействия на стенки микробной клетки с минимальным резорбтивным действием. Этим условиям полностью соответствует мирамистин – катионное поверхностно-активное вещество с широким спектром антисептического действия. По данным табл. 1 видно, что мирамистин активен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, актиномицетов, простейших, грибов.

Таблица 1

Антимикробная активность мирамистина в отношении различных таксономических групп микроорганизмов [4]

Наименование микроорганизмов	Минимальная подавляющая концентрация препарата (мкг/мл)
1.Грамположительные организмы: стафилококки, стрептококки, бациллы	1-100
2. Грамотрицательные организмы: 2.1. Гонококки, эшерихии, шигеллы, сальмонеллы, вибрионы, хламидии. 2.2. Протей, псевдомонады 2.3. Коринебактерии, микобактерии	 2-100 50-500 50-200
3. Актиномицеты	50-200
4. Простейшие: трихомонады	2-50
5. Грибы: 5.1. Дрожжевые (Rhodotorula, Torulopsis); 5.2. Дрожжеподобные (Candida); 5.3. Аскомицеты (Aspergillus, Penicillium); 5.4. Дерматофиты (Trichophytoh, Epidermophyton, Microsporum и др.)	1-100

Известен один препарат в форме глазных капель на основе мирамистина – «Окомистин» ЗАО «Инфамед». Его клинические исследования показали отсутствие побочных эффектов, уменьшение выраженности симптомов воспаления, 100% восстановление трудоспособности больных. Однако «Окомистин» не является пролонгированным препаратом, и его применение требует инстилляции до 6-8 раз в сутки [6].

По литературным данным известно, что аллергическая реакция лежит в основе клиники инфекционных заболеваний глаз, и ее можно рассматривать как проявление глазной инфекции. Такой подход требует для построения эффективной терапии инфекционных конъюнктивитов включения антиаллергических лекарственных средств в состав глазных капель.

Терапевтический эффект глазных капель существенно зависит от времени нахождения лекарства в конъюнктивальной полости. Использование пролонгаторов в составе лекарственной формы позволяет увеличить время нахождения лекарственного вещества в конъюнктивальной полости, что в свою очередь позволит уменьшить частоту инстилляции глазных капель.

Следует отметить, что ГФ РФ XI и XII издания не регламентируют такой показатель качества глазных капель, как пролонгированность действия. Одним из показателей пролонгированности глазных капель является их вязкость. В настоящее время вязкость всех глазных капель, кроме препаратов искусственной слезы, находится в пределах 1 сСт. Однако рядом исследователей рекомендуется значение показателя вязкости глазных капель в пределах 15-30 мПа•с [5].

Резюмируя вышесказанное, можно констатировать, что разработка пролонгированных комбинированных глазных капель представляет значительный научно-практический интерес и обладает существенной технической значимостью в силу отсутствия на российском фармацевтическом рынке аналогов таковым.

Цель работы – разработка состава и технологии пролонгированных глазных капель для комплексного лечения инфекционных конъюнктивитов бактериальной этиологии.

Результаты и их обсуждение. В технологии офтальмологических лекарственных форм в качестве пролонгаторов используются различные высокомолекулярные соединения (натрий карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ), поливиниловый спирт (ПВС), гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) и др.). Главными критериями, допускающими применение полимера в офтальмологии, являются отсутствие аллергических реакций, низкая токсичность, фармакологическая индифферентность, а также отсутствие физико-химических взаимодействий с активным веществом и вспомогательными компонентами лекарственной формы. Использование растворов высокомолекулярных соединений различной концентрации позволяет регулировать время пролонгирования. В свою очередь использование в составе глазных капель слишком большого количества пролонгатора может привести к раздражению слизистых глаза, нарушению четкости зрения.

Решить проблему высокой вязкости глазных капель при минимальном содержании пролонгатора позволяет создание новых или модификация известных вспомогательных веществ. Одним из перспективных методов модификации является механохимическая обработка веществ, в частности твердофазная обработка в мельницах различного типа.

В ходе исследований, проводимых на кафедре фармацевтической технологии, управления и экономики здравоохранения НИУ «БелГУ» под руководством доктора фарм. наук, профессора Е.Т. Жиляковой разработана методика механохимического получения супрамикроструктурированных форм полимеров различной химической природы (Na-КМЦ, ПВС, ГЭЦ, комбинированного пролонгатора Na-КМЦ и ПВС в различных соотношениях и др.) и установлена прямопропорциональная зависимость повышения кинематической вязкости водных растворов этих пролонгаторов от продолжительности их механообработки.

Как видно из графика на рис. 1, в процессе механохимической твердофазной обработки Na-КМЦ кинематическая вязкость ее 1% водного раствора увеличивается в 2 раза с 5,54 сСт необработанного до 11,53 сСт в режиме 45 минут.

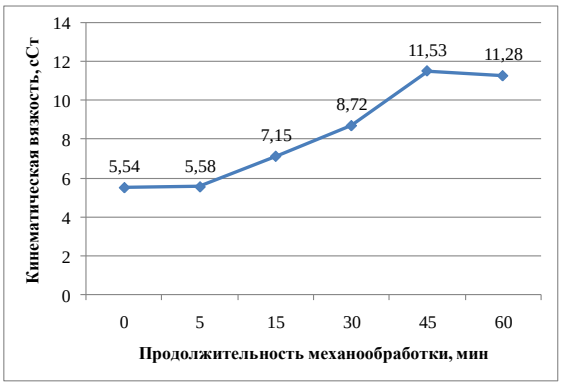


Рис. 1. Зависимость кинематической вязкости водных растворов 1% Na-КМЦ от продолжительности механообработки

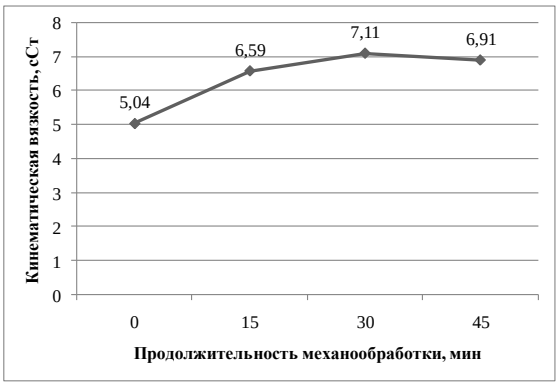


Рис. 2. Зависимость кинематической вязкости водных растворов 3% ПВС от продолжительности механообработки

Рис. 3. Зависимость кинематической вязкости водных растворов 2% комбинированного пролонгатора-загустителя Na-КМЦ и ПВС (2:5) от продолжительности механообработки

зависимости кинематической вязкости 3% раствора ПВС от режима механообработки, на котором показано увеличение показателя

вязкости на 41% с 5,04 сСт раствора незмельченного полимера до 7,11 сСт для раствора пролонгатора в режиме 45 минут.

Как видно из графика на рис. 3, кинематическая вязкость раствора комбинированного пролонгатора Na-КМЦ и ПВС в соотношении 2:5 в режиме обработки 60 минут увеличивается в 2 раза до 17,43 сСт с 7,23 сСт раствора необработанного пролонгатора.

Установлены диапазоны pH водных растворов полученных супрамикроструктурированных пролонгаторов: для растворов 1% Na-КМЦ 6,5-7,5; для растворов 3% ПВС 7,36-7,55; для комбинированного пролонгатора Na-КМЦ и ПВС 2% 4,48-6,31.

Высокая вязкость глазных капель способствует долговременной фиксации слезной пленки, предотвращает вымывание нативной слезы при условии сохранения питания и защиты роговицы. Поливиниловый спирт, входящий в состав комбинированного пролонгатора, прочно связывается со слезной пленкой, создавая ее утолщение, и обладает способностью удерживать влагу, что возможно предотвратит развитие такого сопутствующего негативного эффекта при лечении инфекционных конъюнктивитов, как синдром сухого глаза.

Поэтому, исходя из указанных выше рекомендаций оптимального значения вязкости для глазных капель [5], а также учитывая химическую природу пролонгаторов и их действие на орган зрения, рациональным является использование в составе модельной смеси глазных капель разработанного комбинированного пролонгатора Na-КМЦ и ПВС в соотношении 2:5 в режиме обработки 60 минут в мельнице МЛ-1.

Выводы. Таким образом, использование пролонгированных глазных капель глазных капель для лечения инфекционных конъюнктивитов на основе мирамистина позволяет предположить высокую терапевтическую эффективность препарата в сочетании с отсутствием резистентности микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг., государственный контракт № П865 от 25 мая 2010 г «Разработка технологии производства супрамикроструктурированных полимеров, используемых для создания пролонгированных лекарственных средств».

Литература

1. Астахов, Ю.С. Первый опыт использования Флоксала для лечения хламидийного конъюнктивита [Текст] / Ю.С. Астахов, И.А. Олисова, Г.И. Логинов // Клиническая офтальмология. – 2002. – Т. 3, № 4. – С.188-189.

2. Егоров, Е.А. Результаты исследование эффективности и безопасности препарата Окуметил® [Текст] / Е.А. Егоров, Т.Е. Егорова // Клиническая офтальмология. – 2003. – Т. 4, № 2. – С.89-92.

3. Электронный справочник ВИДАЛЬ 2011. [Электронный ресурс.] URL: http://www.vidal.ru (дата обращения 17.03.2011).

4. Кривошеин, Ю.С. Мирамистин / Ю.С. Кривошеин // Сб. трудов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2004. – С. 156.

5. Технология и стандартизация лекарств : сб. науч. трудов [Текст] Т. 2. – Харьков : ИГ «РИРЕГ», 2000. – 784 с.

6. Применение Окомистина® для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний глаз [Текст] // Terra Medica. – 2010. – № 4. – С. 20-23.

THE DEVELOPMENT OF COMPOSITION AND TECHNOLOGY OF INNOVATIONAL COMBINED MEDICINAL PREPARATION FOR TREATMENT OF INFECTIOUS CONJUNCTIVITIS BACTERIAL ETIOLOGY

E.T. ZHILYAKOVA, O.O. NOVIKOV
M.Yu. NOVIKOVA, N.N. POPOV

Belgorod National Research University

e-mail: EZhilyakova@bsu.edu.ru

This article describes the development of composition and technology of innovational combined medicinal preparation for treatment of infectious conjunctivitis bacterial etiology, combining antimicrobial and antihistamine action and having a prolonged effect.

Key words: pharmaceutical technology, eye drops, prolongator, mechanochemistry, infectious conjunctivitis, miramistin.

УДК 615.451.234.012:615.322.074:543.4`5

ТЕХНОЛОГИЯ И АНАЛИЗ СУППОЗИТОРИЕВ, СОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫЕ МАСЛЯНЫЕ ЭКСТРАКТЫ РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО И СУШЕНИЦЫ ТОПЯНОЙ

А.А. ЧАХИРОВА[1]
Н.В. БЛАГОРАЗУМНАЯ[1]
В.А. ЧАХИРОВА[1]
Е.Ю. БЛАГОРАЗУМНАЯ[1]
Ю.А. МОРОЗОВ[2]

[1] Пятигорская государственная фармацевтическая академия

[2] Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова

e-mail: annachaxirova@gmail.com

Целью исследования явилась разработка технологии масляного экстракта из плодов рябины, травы сушеницы и травы зверобоя, разработка норм качества масляного экстракта и получение на его основе суппозиториев. Было установлено, что метод репрессования позволяет наиболее полно извлечь липофильную фракцию из сырья и получить экстракт с высоким содержанием биологически активных веществ.

С целью повышения производительности труда, точности работы, снижения расхода экстрагента, сырья, вспомогательной посуды и времени нами было решено получить комплексный масляный экстракт из плодов рябины обыкновенной, травы сушеницы топяной и травы зверобоя продырявленного методом репрессования.

Следующим этапом исследований явилась разработка суппозиториев, содержащих полученный комплексный масляный экстракт. Для приготовления суппозиториев использовали липофильные и дифилиные основы: витепсол, новата, твёрдый жир типа А, В, С. В опытах in vitro установлено, что максимальное высвобождение каротиноидов наблюдалось из суппозиториев с масляным экстрактом рябины, травы сушеницы и травы зверобоя, приготовленных на основе «твёрдый жир типа С» Суппозитории получали методом выливания в полистирольные формы.

Ключевые слова: масляный экстракт рябины обыкновенной, масляный экстракт зверобоя продырявленного, масляный экстракт сушеницы топяной, суппозитории.

Введение. В настоящее время сохраняется интерес к биологически активным веществам (БАВ) природного происхождения, поэтому наше внимание привлекло лекарственное растительное сырьё: плоды рябины обыкновенной, трава сушеницы топяной, трава зверобоя продырявленного, содержащие флавоноиды, каратиноиды, токоферолы и другие вещества природного происхождения.

Плоды рябины обыкновенной широко используются: в кондитерском производстве, косметологии, в народной и официнальной медицине.

Трава сушеницы топяной используется в виде настоя при лечении язвы желудка и двенадцатиперстной кишки. Масляные извлечения из травы принимают наружно для лечения больных, страдающих гнойными, длительно не заживающими ранами, трофическими язвами, ожогами кожи.

Трава зверобоя продырявленного является сырьем одного из самых популярных лекарственных растений и широко применяется в медицинской практике. На основе травы зверобоя в настоящее время получают настои, сборы, настойку, различные эликсиры.

Поэтому актуальным представлялось разработать технологию комплексного масляного экстракта рябины обыкновенной, сушеницы топяной, зверобоя продырявленного и на основании технологических исследований показать возможные перспективы его использования.

При выделении масел или получении масляных экстрактов из растительных объектов чаще всего применяются органические растворители, используется дорогостоящее оборудование, энергоёмкие и пожароопасные технологические процессы. Применение CO_2-экстракции и экстракции сжиженными газами также требует соответствующего оборудования и не всегда позволяет извлекать весь спектр БАВ липофильной природы [6].

Использование липофильной фракции, богатой каротиноидами, токоферолами,

незаменимыми (эссенциальными) жирными кислотами, является ценным продуктом и требует для его извлечения не только подбора экстрагента, но и выбора метода экстракции.

Целью настоящего исследования явилась разработка технологии масляного экстракта из плодов рябины, травы сушеницы и травы зверобоя, разработки норм качества масляного экстракта и получение на его основе суппозиториев.

Результаты и их обсуждение. Нами установлено присутствие и спектрофотометрически определено содержание основных биологически активных веществ в исследуемых образцах сырья β-каротина, γ-каротина, α-каротина; кроме того, в плодах рябины обнаружены рубиксантин, криптоксантин, в траве сушеницы – хлорофилл, в траве зверобоя – псевдогиперицин, хлорофилл. Содержание суммы каротиноидов весьма велико: в плодах рябины доходит до 15 мг%, в траве сушеницы – до 40 мг%, в траве зверобоя – до 36 мг%. Установлено, что оптимальной степенью измельчения высушенных плодов рябины, травы сушеницы и травы зверобоя при экстракции маслом подсолнечным является размер частиц 3-5 мм.

При разработке технологии масляных экстрактов из плодов рябины обыкновенной, травы зверобоя и травы сушеницы изучены технологические характеристики сырья при экстракции подсолнечным маслом: установлена насыпная масса, коэффициент поглощения сырья и время наступления равновесия в системе сырье – экстрагент. Определена оптимальная температура экстракции, которая составила +60°С. Результаты по определению технологических характеристик исследуемых объектов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Технологические характеристики сырья

Сырьё	Насыпная масса	Коэффициент поглощения	Время наступления равновесной концентрации, час
Плоды рябины	0,20±0,01	2,07±0,13	10
Трава зверобоя	0,34±0,02	1,60±0,02	10
Трава сушеницы	0,40±0,01	2,40±0,03	10

Для получения масляных экстрактов из травы сушеницы и травы зверобоя нами были апробированы традиционный метод их получения – мацерация и метод репрессования, разработанный ранее на кафедре технологии лекарств, в следующей модификации [6, 7].

Подсолнечным маслом равномерно замачивали сырьё и настаивали смесь в массообменнике на каждой ступени экстракции при температуре 60°С, в течение 1 часа с периодическим перемешиванием. После настаивания сырье с маслом из массообменника переносили в перфорированный цилиндр, подогретый до 70°С, для принудительного отделения жидкой фазы от сырья и приступали к прессованию, при этом давление увеличивали медленно, в течение 20 минут.

Извлечение, выделяемое при отжиме мезги, собирали в сборник и использовали для очередной ступени экстракции или отбирали в качестве готового продукта, если оно было получено из головного массообменника.

Отжатую мезгу (жом), выпрессовывали из перфорированного цилиндра и направляли на очередную ступень экстракции. При таком экстрагировании выделяли 3 периода: пусковой, рабочий и заключительный

Масляные экстракты, полученные мацерационным методом и репрессованием, представляли собой маслянистые жидкости с характерным запахом и цветом, при этом экстракт, полученный прессованием, имел более интенсивную окраску, что объясняется высоким содержанием действующих веществ.

Было установлено, что метод репрессования позволяет наиболее полно извлечь липофильную фракцию из сырья и получить экстракт с высоким содержанием биоло-

гически активных веществ. При использовании метода репрессования снижается расход экстрагента (соевого масла) и время, затраченное на получение готового продукта, при этом выход извлечения заметно увеличивался от 54,2 до 71,8% при получении масляного экстракта из травы зверобоя и от 46,75 до 73,8% соответственно при получении масляного экстракта из травы сушеницы топяной.

С целью повышения производительности труда, точности работы, снижения расхода экстрагента, сырья, вспомогательной посуды и времени нами было решено получить комплексный масляный экстракт из плодов рябины обыкновенной, травы сушеницы топяной и травы зверобоя продырявленного методом репрессования.

Установлено, что оптимальным является трёхкратное прессование сырья. При увеличении этапов прессования до четырёх выход каротиноидов увеличивался незначительно (с 105,4 до 119,25 мг%), но снижается степень истощения сырья и значительно увеличивался его расход (рис. 1).

Таким образом, увеличение числа прессований в данном случае нецелесообразно.

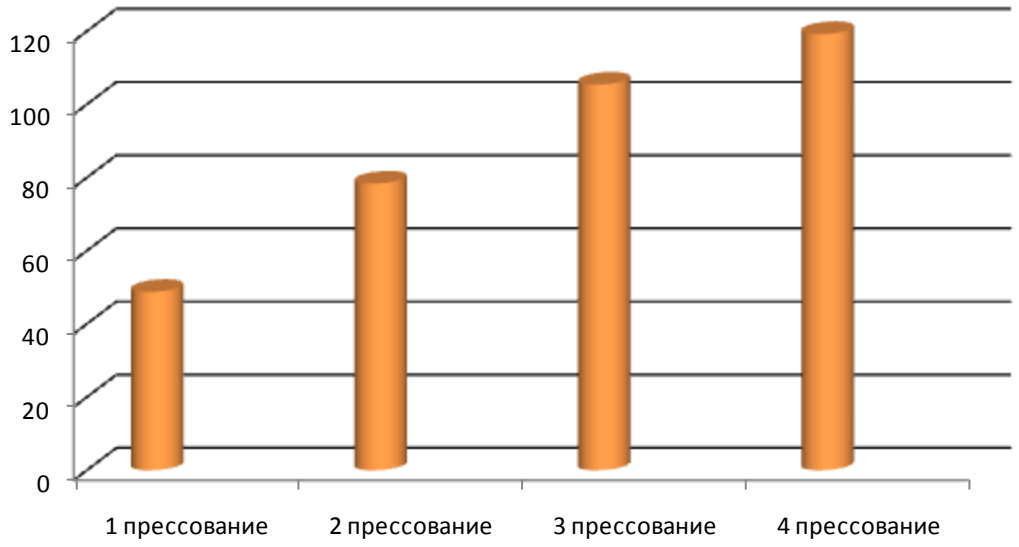


Рис. 1. Зависимость содержания каротиноидов в извлечении от числа прессований

При экстрагировании сырья существенным параметром для проведения процесса явилось содержание каротиноидов: в плодах рябины – не менее 15 мг%, траве сушеницы топяной – 40 мг%, траве зверобоя – 36 мг%; соотношение сырьё – экстрагент 1:0,7. Оптимальные параметры экстракции смеси сырья представлены в табл. 2.

Таблица 2

Оптимальные параметры технологии комплексного масляного экстракта из плодов рябины, травы зверобоя и травы сушеницы топяной репрессованием

Параметры	Репрессование
Расход сырья, г	450,0
Расход экстрагента (на одну ступень экстракции), г	100,0
Время, затраченное на процесс экстракции, ч	8
Выход экстракта, г	52,0
Содержание каротиноидов в готовом продукте, мг%	105,4
Степень истощения сырья, %	77,2

Следующим этапом исследования явилось установление состава основных жирных кислот в комплексном масляном экстракте, полученном из плодов рябины, сушеницы и зверобоя. Определение проводили методом ГЖХ на газовом хроматографе «Цвет 500» с пламенно-ионизационным детектором согласно методике ФС

42-0163339002 [3]. Компоненты идентифицировали по стандартным образцам (Sigma) метиловых эфиров жирных кислот или по ГОСТ 30418-96 [1]. Количественное определение проводили методом внутренней нормализации. Результаты исследования представлены на рис. 2.

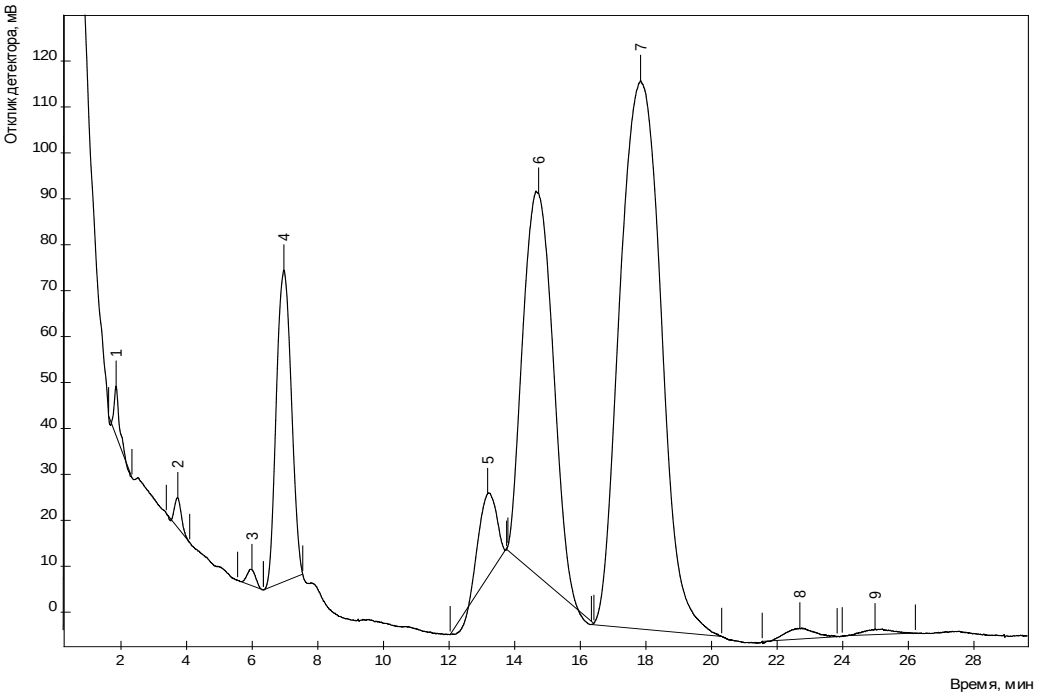


Рис. 2. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот комплексного масляного экстракта

Последовательность выхода пиков на хроматограмме: 1 – пик не идентифицирован, 2 – эфир метиловый кислоты миристиновой; 3 – эфир метиловый кислоты пентодекановой; 4 – эфир метиловый кислоты пальмитиновой; 5 – эфир метиловый кислоты стеариновой; 6 – эфир метиловый кислоты олеиновой; 7 – эфир метиловый кислоты линолевой; 8 – эфир метиловый кислоты линоленовой, 9 – эфир метиловый кислоты арахиновой.

Установлено содержание: миристиновой, пентодекановой, пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой и арахиновой кислот.

Препараты, содержащие каротиноиды, токоферолы и жирные кислоты, широко применяются для лечения трофических язв, ожогов, различных воспалительных и эрозивных процессов [5]. Эрозия шейки матки является наиболее распространенным гинекологическим заболеванием, лечение которого заключается в диатермокоагуляции, что приводит к появлению ожогов [2]. В данном случае целесообразным является использование лекарственных средств, обладающих противоожоговым действием.

Высокая фармакологическая активность масляного экстракта рябины обыкновенной, зверобоя и сушеницы, доступность и дешевизна сырья, а также дефицит растительных стимуляторов заживления ожогов и ран подтверждает актуальность проведения исследований по разработке вагинальных суппозиториев с данными объектами.

Поэтому следующим этапом наших исследований явилась разработка суппозиториев, содержащих полученный комплексный масляный экстракт. Для приготовления суппозиториев использовали липофильные и дифилиные основы: витепсол, новата, твёрдый жир типа А, В, С.

В опытах in vitro [4] установлено, что максимальное высвобождение каротиноидов наблюдалось из суппозиториев с масляным экстрактом рябины, травы сушеницы и травы зверобоя, приготовленных на основе «твёрдый жир типа С» (рис. 2).

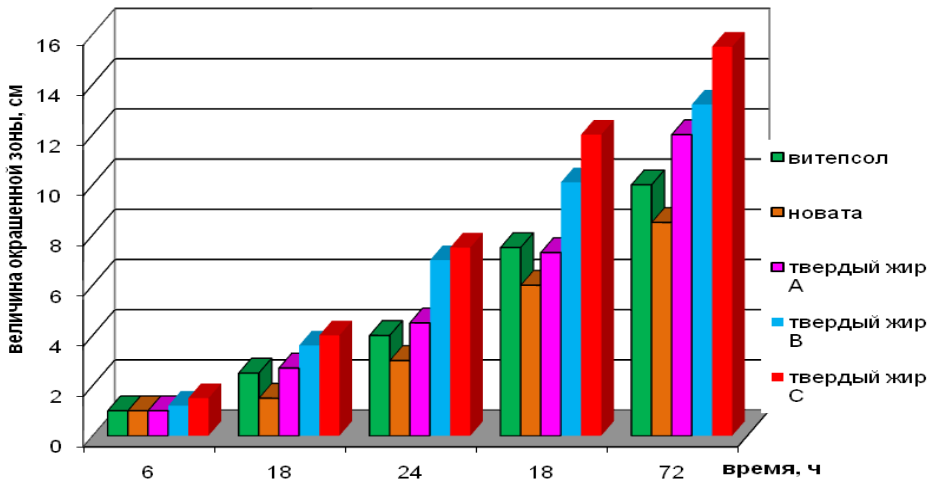


Рис. 3. Зависимость степени высвобождения каротиноидов из суппозиториев с комплексным масляным экстрактом, приготовленных на различных основах

Суппозитории получали методом выливания в полистирольные формы. Масляный экстракт в количестве 0,5 г; 1,0 г; 1,5 г и 2 г на один суппозиторий массой 3 г вводили в расплавленную основу при температуре 40-50°С по типу раствора. Критерии качества полученных суппозиториев с содержаниями масляного экстракта до 1,5 г удовлетворяли требованиям ГФ 12 издания.

В дальнейшем изучена стабильность суппозиториев методом естественного хранения. Доказано, что суппозитории с комплексным масляным экстрактом стабильны в течение 12 месяцев при температуре 3-5°С. В качестве критериев мы использовали основные показатели качества суппозиториев, представленные в табл. 3.

Таблица 3

Показатели и нормы качества суппозиториев с комплексным масляным экстрактом рябины, зверобоя и сушеницы

Показатели качества	Нормы
Описание внешнего вида и однородности суппозиториев	Суппозитории имеют одинаковую шаровидную (вагинальные) форму, светло-зелёную окраску
Время полной деформации	Не более 15 мин.
Температура плавления	Не более 37°С
Микробиологическая чистота	В 1г – не более 100 аэробных бактерий и 100 грибов суммарно при отсутствии бактерий кишечной группы, синегнойной палочки и золотистого стафилококка
Подлинность	Раствор, приготовленный для количественного определения, в области от 430 до 500 нм имеет максимумы поглощения при длинах волн 447±2 нм и 472±2 нм
Кислотное число	Не более 5,0
Содержание каротиноидов в пересчёте на β-каротин, мг	Не менее 1,5 в каждом суппозитории
Срок годности	12 мес, температура 3-5 °С

Выводы. Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований нами разработана технология получения масляного экстракта из плодов рябины, травы сушеницы и травы зверобоя, предложены нормы оценки его качества и

экспериментально доказаны перспективы использования комплексного масляного экстракта в суппозиториях.

Литература

1. ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Методы определения жирнокислотного состава. – Введ. 1998. – 01.01. – М. : Изд-во стандартов, 1998. – 7с.
2. Кудакшина, Н.В. Лекарственные формы из травы зверобоя для применения в гинекологии / Н.В. Кудакшина // Фармация. – 2004. – №3. – С. 36-38.
3. Масло облепиховое: [фармакоп. ст.] 42-1730-95. – М., 1995.-5с.
4. Муравьев, И.А. Биофармацевтические исследования вагинальных суппозиториев с микробиологическим каротином / И.А.Муравьев, Г.Н.Ковальская // Фармация. – 1989 – №6. – С. 24-26.
5. Носовская, Т.Д. Исследования в области получения каротиноидсодержащих лекарственных средств : автореф. дис. ... канд. фармац. наук : 15.00.01 / Т.Д. Носовская. – Харьков, 1990. – 21с.
6. Чахирова, А.А. Технологические исследования по разработке масляного экстракта из плодов рябины обыкновенной и перспективы ее использования : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 15.00.01 / А.А. Чахирова. – Пятигорск, 2008. – 21с.
7. Шиков, А.Н. Растительные масла и масляные экстракты: технология, стандартизация, свойства / А.Н. Шиков, В.Г. Макаров, В.Е. Рыженков. – М. : Рус. врач, 2004. – С. 8-53.

TECHNOLOGY AND ANALYSIS OF SUPPOSITORIES CONTAINING VEGETABLE OIL EXTRACTS OF MOUNTAIN ASH, ST. JOHN'S WORT AND MARSH CUDWEED

A.A. CHAHIROVA[1]
N.V. BLAGORAZUMNAIA[1]
V.A. CHAHIROVA[1]
E.Y. BLAGORAZUMNAIA[1]
Y.A. MOROZOV[2]

[1] Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy

[2] North Ossetian State University after K.L. Khetagurov

e-mail: annachaxirova@gmail.com

The aim of the study was to develop technology oil extract from the fruit of mountain ash, grasses and herbs cudweed hypericum, to develop standards of quality oil extract and get its suppositories. It was found that the repress method is the best to extract lipophilic fraction of the raw extract to obtain a high content of biologically active substances.

In order to improve productivity, accuracy of work, reduce the amount of extractant, raw materials, auxiliary vessels and time, we obtained comprehensive oil extract from the fruit of mountain ash, swamp grasses and herbs cudweed hypericum perforated by a repress method.

The next stage of our research was the development of suppositories containing the resulting integrated oil extract. For the preparation of suppositories we used lipophilic and difilinye basics: Witepsol, Novato, solid fat such as A, B, C. It was found that the maximum release of carotenoids was observed from suppositories with an oil extract of mountain ash, herb and grass hypericum, cudweed prepared on the basis of the " C-type solid fat". Suppositories were obtained by pouring into polystyrene forms.

Key words: the oil extract of mountain ash, the oil extract of Hypericum perforatum, the oil extract of cottonweed swamp suppositories.

УДК 54.03:661.12.01/.09

ПОЛУЧЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ОБРАЗЦА СУБМИКРО- И/ИЛИ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ГЛИНЫ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЕГО СТРУКТУРЫ

Е.Т. ЖИЛЯКОВА
А.В. БОНДАРЕВ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: alexbond936@yandex.ru

В статье рассмотрены результаты исследований глины до и после измельчения. Проведен выбор технологического оборудования для оптимизации процесса механохимической обработки. В работе использовались шаровая вибрационная мельница МЛ-1 с измельчающими элементами и растровый электронно-ионный микроскоп Quanta 200 3D с увеличением до 10000X. Изучены физико-химические и технологические свойства субмикро- и/или наноструктурированной глины. Образец неизмельченной глины представляет собой элементы округлой формы с ровными краями, в процессе механической активации наблюдается образование пластинчатых элементов и их слипание.

Ключевые слова: глина, субмикроструктурирование, механоактивация.

Введение. На сегодняшний день доля отечественных субстанций, использующихся в производстве лекарственных средств составляет всего 2% [1]. Необходима разработка отечественных субстанций, совершенствование методики их получения. Перспективным направлением является применение глины как субстанции с сорбционными свойствами, а также повышение ее полифункциональных свойств путем механической активации.

Развитие современных технологий, использующих процессы диспергирования, сделало весьма актуальной проблему оптимизации технологических свойств материалов, подвергнутых интенсивным механическим воздействиям. Работы в этом направлении стимулируются необходимостью получения активированных веществ с заданными свойствами. Закономерности измельчения твердых тел на основе положений физико-химической механики и сорбционной механохимии, химическое взаимодействие активированных пластинчатым деформированием поверхностных слоев частиц были рассмотрены в трудах ряда авторов [2-5].

В настоящее время глины широко используются в фармацевтической и пищевой промышленности. Введение в технологический процесс стадии механоактивации изменит реакционную активность глины. Особенности применения механохимических подходов в фармацевтической промышленности были рассмотрены российскими учеными [6-7].

Механоактивация – высокоэнергетический процесс измельчения и наноструктурирования исходных промышленных порошков в планетарных шаровых измельчителях, где обеспечивается ударное нагружение со сдвигом. Механоактивация позволяет уменьшить размеры частиц порошка в среднем от 60 до 0,250 мкм с наличием значительной доли частиц с размерами до 50 нм.

Активации кристаллических минералов в процессе механоактивации экспериментально подтвердила, что их сорбционная активность увеличивается не только под влиянием прироста свободной поверхности в результате измельчения, но также и из-за измененного состояния вещества, в зоне остаточного напряжения, происходящего в следствие механического воздействия [8].

Цель исследования. Получение лабораторного образца субмикро- и/или наноструктурированной глины и экспериментальное подтверждение изменения его структуры. Для получения субмикроструктурированного образца глины были поставлены задачи: определить форму и размер частиц образца глины до и после супрамик-

роструктурирования, выбрать режим измельчения, определить показатели изменения характеристик.

Материал и методы исследования. Для исследований был взят образец глины ТУ9158-003059830731-05. В работе использовались: электронные весы BP 3100S фирмы Сартогосм, шаровая вибрационная мельница МЛ-1 с измельчающими элементами, растровый электронно-ионный микроскоп Quanta 200 3D с увеличением до 10000X. Расчет среднего размера частиц, распределение частиц по размерам и построение гистограмм осуществлялось в программе Microsoft Office Excel 2007.

Результаты исследования. Исследуемые образцы глины были высушены до постоянной массы. Подвергнуты измельчению в режимах: 5, 15, 30, 45 и 60 минут.

Электронная микроскопия образцов глины, проведенная на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Диагностика структуры и свойств наноматериалов» Белгородского государственного университета, показала изменение структуры и формы образцов глины. Для объективного анализа распределения по размерам частиц образцов были отобраны фотографии, сделанные при таком увеличении микроскопа, которое позволяло по масштабной линейке без затруднений определить минимальный и максимальный размеры исследуемого образца. В табл. 1 представлен выбор увеличения микроскопа при изучении исследуемого образца глины.

Таблица 1

Использованные варианты увеличения электронного микроскопа

Время измельчения, мин.	Неизмельченный образец	5	15	30	45	60
Кратность увеличения	1000X	2000X	2000X	5000X	5000X	5000X

На рис. 1-6 представлены электронные микрофотографии исследуемых образцов.

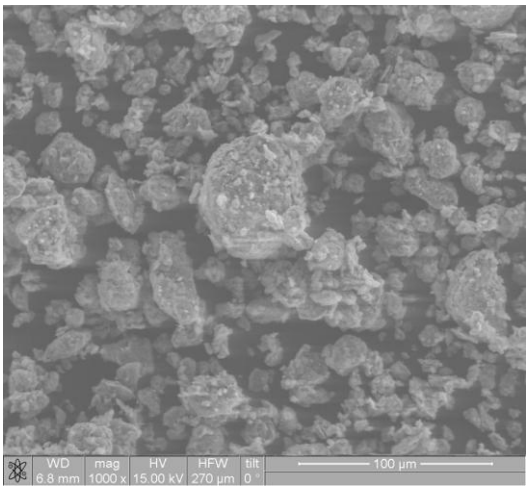


Рис. 1. Микрофотография исходного образца глины

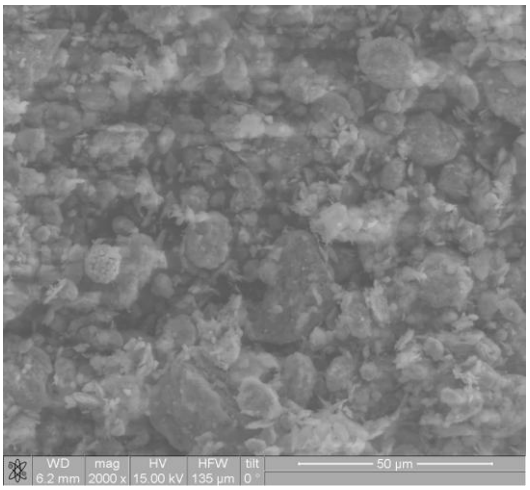


Рис. 2. Микрофотография образца глины после 5 минут измельчения

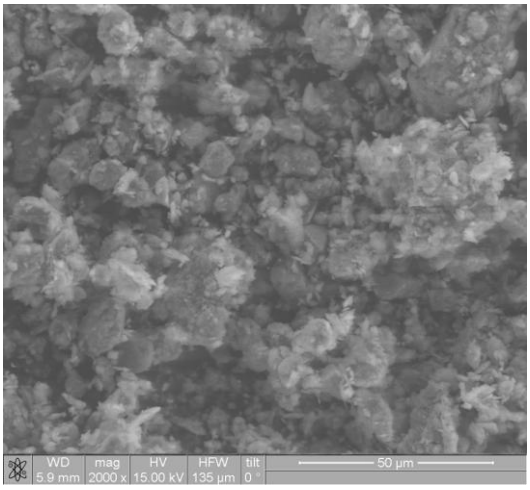


Рис. 3. Микрофотография образца глины после 15 минут измельчения

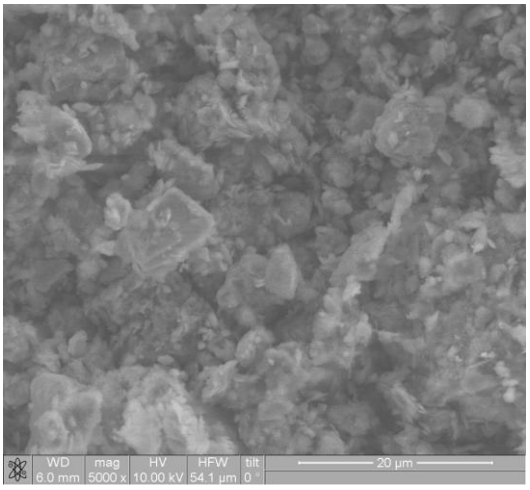


Рис. 4. Микрофотография образца глины после 30 минут измельчения

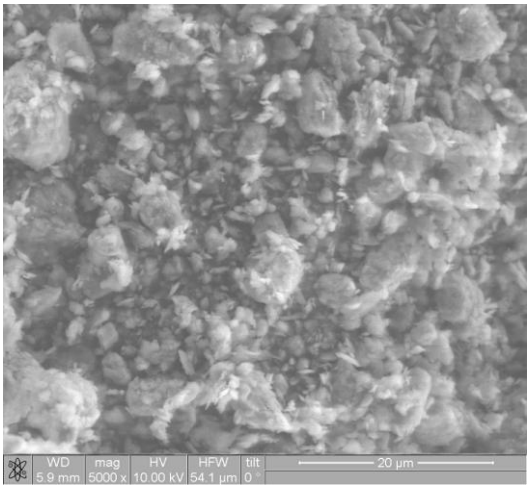


Рис. 5. Микрофотография образца глины после 45 минут измельчения

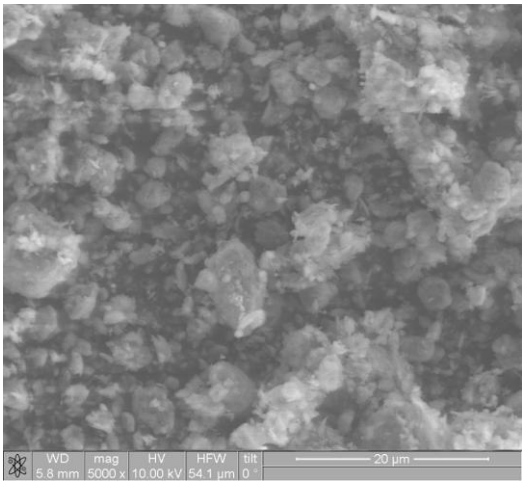


Рис. 6. Микрофотография образца глины после 60 минут измельчения

Неизмельченный образец представляет собой округлые элементы с ровными краями. В процессе измельчения наблюдается уменьшение размеров частиц и образование пластинчатых элементов размером 2-5 мкм.

Для неизмельченного образца глины характерно наличие частиц со средним размером 10-20 мкм, количество этой фракции составляет около 51%, количество фракции с размером частиц 20-30 мкм составляет около 24%. Крупные фракции с размером частиц 30-50 мкм и более 50 мкм составляют 6,5 и 1,5% соответственно.

Через 5 минут происходит диспергирование образца глины: количество частиц со средним размером 5-10 мкм увеличивается и составляет 48%, количество частиц с размером 10-20 мкм и 20-30 мкм уменьшается и составляет 32 и 15% соответственно.

Через 15 минут фракционная картина резко меняется: происходит слипание пластинчатых элементов, появление элементов с неровной поверхностью размером 10-20 мкм, увеличение количества этой фракции с 32% до 60%.

Через 30 минут появляются частицы размером 2-5 мкм, исчезают частицы размером 30-50 мкм. Количество частиц размером 5-10 мкм и 10-20 мкм составляет 49 и 31% соответственно.

Через 45 минут увеличивается содержание мелкой фракции 2-5 мкм с 28 до 63%, уменьшается количество фракции размером 5-10 мкм с 49 до 31%, исчезают фракции размером более 20 мкм.

Через 60 минут фракционная картина по сравнению с предыдущей меняется мало.

Расчет среднего размера частиц, распределение частиц по размерам представлены на рис. 7.

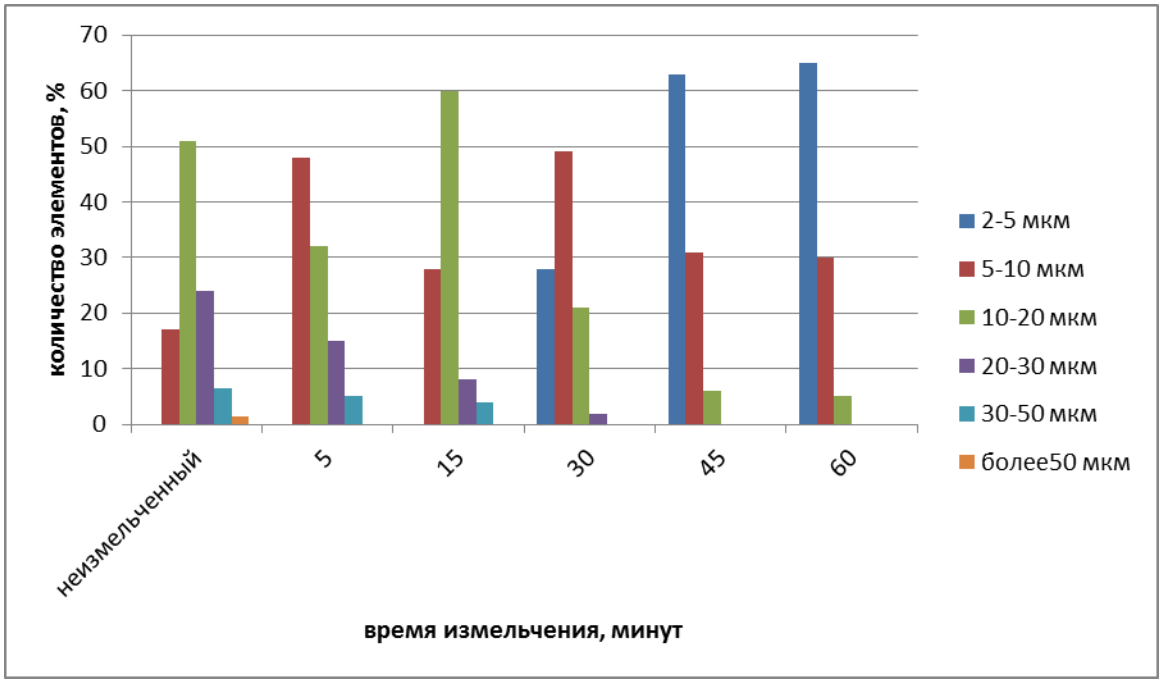


Рис. 7. Распределение по размерам микрочастиц глины в зависимости от степени измельчения

Для анализа изменения размеров частиц глины данные гистограммы сведены в табл. 2.

Таблица 2

Динамика изменения размеров частиц исследуемого образца глины

Время измельчения исследуемого образца глины, мин.	Размер частиц, мкм/% содержания фракции					
	2-5	5-10	10-20	20-30	30-50	более 50
Неизмельченный образец	-	17	51	24	6,5	1,5
5	-	48	32	15	5	-
15	-	28	60	8	4	-
30	28	49	21	2	-	-
45	63	31	6	-	-	-
60	65	30	5	-	-	-

Заключение. Проведена растровая электронная микроскопия полученных образцов глины. Доказано изменение структуры глины. Исследуемый образец неизмельченной глины состоит из элементов округлой формы, при увеличении в 10000Х заметно, что элементы состоят из соединенных между собой пластин размером 2-10 мкм.

В результате исследования установлено, что размеры частиц глины уменьшаются с 50 мкм для режима 5 минут измельчения до 2-5 мкм для режима 60 минут измельчения. После 15 минут измельчения наблюдается слипание элементов. После 30 минут измельчения образуются пластинчатые элементы и наблюдается увеличение количества частиц с рваными краями, с небольшими дефектами на поверхности.

Далее планируется исследование физико-химических и фармакологических свойств изучаемых образцов глины. Полученные результаты можно использовать в фармацевтической технологии при разработке составов и технологий новых субстанций.

Работа выполнена в рамках Задания Министерства образования и науки РФ НИУ «БелГУ» №3.2473.2011 по теме «Технологические аспекты разработки новых составов инновационных лекарственных форм на основе субмикро/наноструктурированных субстанций»

Литература

1. Кожевникова, А. Фармкластеры – вместе в будущее / А. Кожевникова. – Новости GMP. – 2011. – № 1(2). – С.10-11. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.readoz.com/publication/read?i=1040425#page4
2. Аввакумов, Е.Г. Механические методы активации химических процессов / Е.Г. Аввакумов. – Новосибирск : Наука, Сиб. отд-е, 1986. – 297 с.
3. Ребиндер, П.А. Физико-химическая механика дисперсионных структур / П.А. Ребиндер. – М. : Пищевая промышленность, 1966 – 371 с.
4. Ходаков, Г.С. Физика измельчения / Г.С. Ходаков. – М. : Наука, 1972. – 240 с.
5. Хинт, И.А. Об основных проблемах механической активации / И.А. Хинт // Материалы 5-го симпозиума по механоэмиссии и механохимии твёрдых тел. – Таллин, 1975. – Т. 1. – С. 10-14. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.tpribor.ru/hint4.html
6. Ломовский? О.И. Механохимия в решении экологических задач: аналит. обзор / О.И. Ломовский, В.В. Болдырев ; Гос. публ. науч.-техн. б-ка Сиб. отд-я Рос. акад. наук; ИХТТМ СО РАН; НГУ. – Сер. Экология. – Новосибирск, 2005. – Вып. 79. – 221 с.
7. Ломовский, О.И. Прикладная механохимия: применение в пищевой промышленности и сельском хозяйстве / О.И. Ломовский // Обработка дисперсных материалов и сред. : междунар. период. сб. научн. тр. – 2002. – Вып. 12. – С. 133-149.
8. Струнникова, Н.А. Механоактивация природных алюмосиликатов как способ повышения их сорбционной активности / Н.А. Струнникова, М.Д. Джаманбаев, С.Т. Сагиева. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://arch.kyrlibnet.kg/uploads/STRUNNIKOVA.pdf

GETTING A LABORATORY SAMPLE OF SUBMICRO- AND/OR NANOSTRUCTURED CLAYS AND EXPERIMENTAL CONFIRMATION OF ITS STRUCTURAL CHANGE

E.T. ZHILYAKOVA
A.V. BONDAREV

Belgorod National Research University

e-mail: alexbond936@yandex.ru

The article reflects the results of clay study before and after shredding. The choice of the technological equipment for optimization of the process of mechanico-chemical processing is organized. Ball vibratory mill ML-1 with reducing element and raster electronic-ion microscope Quanta 200 3D with 10000X increase were used. The physico-chemical and technological characteristics of sumicro- and/or nanostructured clays are studied. The sample of unground clay presents itself the rounded elements with even surface, the formation of plate element and their coalescence exist in process of the mechanical activation.

Key words: clay, submicrostructuging, mechanoactivation.

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 615.22-088.331.1

ТРИГГЕРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА И РЕЗВЕРАТРОЛА

Л.М. ДАНИЛЕНКО
М.В. ПОКРОВСКИЙ
О.О. НОВИКОВ
Л.В. КОРОКИНА
Д.В. ГОНЧАРОВА
А.В. ИНДЕРОВА
Е.Н. СВЕТЛИЧНАЯ

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail:Danilenkolyudmila@mail.ru

В настоящей работе проведено экспериментальное исследование влияния рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола на площадь некротизированного миокарда левого желудочка при моделировании коронарооккклюзионного инфаркта миокарда. Было выявлено, что рекомбинантный эритропоэтин и резвератрол являются триггерами ишемического прекондиционирования и могут вызывать фармакологическое прекондиционирование, а реализация их механизмов защиты от ишемии осуществляется за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов и биосинтеза оксида азота.

Ключевые слова: прекондиционирование, эритропоэтин, резвератрол.

Введение. Согласно современным представлениям, эндогенный кардиопротективный ответ, проявляющийся в росте устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии, может быть индуцирован с помощью некоторых неишемических стимулов, не требующих инвазивного вмешательства. Данное направление находится в стадии интенсивной разработки и может включать использование некоторых фармакологических препаратов, имитирующих эффекты прекондиционирования [6], и физических факторов, активирующих определенные звенья внутриклеточных сигнальных систем, ответственных за увеличение устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии [5]. В фармакологическом аспекте одним из наиболее перспективных гуморальных агентов, принимающих участие в реализации феномена прекондиционирования, является эритропоэтин, а резвератрол – природный фитоэстроген. Периоды полувыведений у эритропоэтина и резвератрола значительно выше, чем у других, в том числе и гуморальных агентов прекондиционирования (аденозин, брадикинин, опиоиды), следовательно, «временное терапевтическое окно» должно быть существенно шире.

Эритропоэтин (ЕРО) – индуцибельный гипоксией гормон, который является существенным для нормального эритропоэза в костном мозге. Введение рекомбинантного эритопоэтина – эффективный и безопасный терапевтический подход к лечению анемии, связанной с хронической почечной недостаточностью [4]. Однако рецепторы ЕРО также широко распространены в сердечно-сосудистой системе, включая эндотелиальные, гладкомышечные и другие типы клеток. Одним из плеотропных эффектов ЭПО и его аналогов рекомбинантного эритропоэтина (РЭПО) является уменьшение апоптоза. Причем даже однократное введение ЭПО при инфаркте миокарда или другом ишемическом событии (операция на сердце, острый коронарный синдром) обеспе-

чивает как немедленную, так и пролонгированную кардиопротекцию за счет сохранения жизнеспособного миокарда в период ишемии/реперфузии [7].

Многочисленные экспериментальные исследования показали, что резвератрол наряду с антиоксидантной, гиполипидемической, антиагрегантной, эндотелиопротекторной активностью обладает также и кардиопротекцией [9, 10, 11]. Одним из обсуждаемых механизмов кардиопротекции резвератрола является прекондиционирование.

Детальное изучение механизмов, лежащих в основе сердечного прекондиционирования, выявило несколько регуляторных путей ее реализации. Известно, что три важных фактора (рецептор аденозина А1, комплексные киназы, в том числе протеинкиназа С (РКС), митоген активируемая протеинкиназа (МАРК) и тирозинкиназы) и каналы калия, чувствительные к митохондрическому АТФ ($К_{АТФ}$), играют наиболее важную роль в опосредованной прекондиционированием кардиозащите. Другие эффекторы, скорее всего способствующие кардиопротекции посредством аденозина или прекондиционирования (которое вовлечено в процесс замедленного (второго) этапа кардиозащиты) включают в себя МАРК, белки теплового шока, а также iNOS и eNOS.

Интригующим с точки зрения практического использования и малоизученным является феномен дистантного прекондиционирования, суть которого состоит в том, что кратковременные эпизоды ишемии одного органа (почки, брыжейки, нижней конечности) повышают устойчивость других органов к тяжелым ишемическим повреждениям (3).

В связи с этим **целью** нашего исследования явилось изучение одного из механизмов реализации противоишемических эффектов рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола через активацию систем синтеза оксида и АТФ-зависимые калиевые каналы по механизму ишемического прекондиционирования.

Материалы и методы. Изученме влияния рекомбинантного эритропоэтина (50 МЕ/кг) и резвератрола (2 мг/кг) на размер зоны некроза при инфаркте миокарда проводили на модели коронарооккклюзионного инфаркта миокарда у кроликов. При этом инфаркт миокарда воспроизводился на наркотизированных животных (хлоралгидрат 300 мг/кг), находящихся на управляемом дыхании, путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия, с последующей регистрацией ЭКГ во II стандартном отведении в течение 20 минут. Эритропоэтин и резвератрол вводили животным за 30 минут до перевязки коронарной артерии в маргинальную вену уха кролика. Через 30 минут после коронарной окклюзии осуществляли снятие лигатуры и проведение реперфузии миокарда в течение 90 мин. После этого осуществляли забор крови из правого желудочка сердца в одноразовую вакуумную пробирку с антикоагулянтом для определения специфического маркера повреждения кардиомиоцитов Troponin I (TnI). Уровень TnI определяли на иммунофлуоресцентном приборе Triage MeterPro (Biosite, США) с использованием тест-системы Cardiac Panel. Срезы миокарда помещали в емкости, содержащие фосфатный буфер (pH 7,4) и 1 мг/мл трифенилтетразолия бромида. Соотношение масс участков ткани и буфера составляло 1:9. Бюксы помещали в термостат, инкубировали при 37°С для образования красного формазана. Подсчет площадей интактного и некротизированного миокарда левого желудочка производили на каждом из четырех произведенных срезов с помощью попиксельного анализа в программе Adobe Photoshop 9.0. Данные по размерам площади инфаркта представляли в виде отношения некротизированного миокарда к интактному (в процентах). Дистантное ишемическое прекондиционирование осуществляли путем наложения жгута на верхнюю треть бедра на 10 минут, с последующей 20-минутной реперфузией. Контролем правильности наложения жгута служило отсутствие пульса на артериях голени. С целью подтверждения гипотезы о реализации эффектов резвератрола и рекомбинантного эритропоэтина по типу ишемического прекондиционирования кроликам за полчаса до введения исследуемых препаратов вводили L-NAME в дозе 25 мг/кг/сут (блокатор эндотелиальной e-NOS синтазы), аминогуанидин в дозе 100 мг/кг (блокатор индуцибельной iNOS синтазы), глибенкламид в дозе 0,4 мг/кг (блокатор АТФ-зависимых калиевых каналов).

Результаты исследования и их обсуждение. Наложение лигатуры на нисходящую ветвь левой коронарной артерии в контрольной группе приводило к развитию некроза миокарда левого желудочка, размер которого составил 27,3±1,2%. Применение ДИП, фармакологического прекондиционирования путем в/в введения эритропоэтина и внутрибрюшинного резвератрола привело к достоверному уменьшению площади некротизированного миокарда и составило 9,4±0,5%, 13,2±0,3% 15,2±0,8% соответственно.

Блокада eNOS и iNOS на фоне моделирования инфаркта миокарда, применения эритропоэтина и резвератрола, ДИП привела к нивелированию противоишемических эффектов. Величина зоны некроза в группе животных, получавших L-NAME и эритропоэтин, составила 23,5±1,2%, у резвератрола 24,1±1,3%, получавших L-NAME и ДИП – 25,3±0,8%, аминогуанидин и эритропоэтин – 28,6±2,9%, аминогуанидин и резвератрол – 26,6±1,9%, аминогуанидин и ДИП – 22,8±2,0%. При блокаде АТФ-зависимых калиевых каналов величина зоны некроза в группе животных, получавших глибенкламид и эритропоэтин, – 21,2±1,1%, резвератрол – 28,5±1,3%, глибенкломид и ДИП – 24,2±1,5%. Уровень тропонина, как и предполагалось, изменяется с размером площади некроза миокарда левого желудочка (табл. 1)

Таблица 1

Влияние блокады NO-синтазы и АТФ-зависимых калиевых каналов на эффекты рекомбинантного эритропоэтина, резвератрола, дистантного прекондиционирования и уровень тропонина при моделировании коронарооккклюзионного инфаркта миокарда (M±m, n=6)

Группа	% некроза	Уровень тропонина I, нг/мл
Контроль (инфаркта миокарда)	27,3±1,2	16,26±1,9
ИМ + дистантное прекондиционирование	9,4±0,5*	4,9±1,3*
ИМ + эритропоэтин(50 МЕ)	13,2±0,3*	5,0±1,9*
ИМ+ резвератрол (2 мг/ кг)	15,2±0,8*	5,24±1,1*
ИМ + L-NAME + дистантное прекондиционирование	23,5±1,2	14,15±1,2
ИМ + L-NAME + эритропоэтин	25,3±0,8	16,05±1,9
ИМ + L-NAME + резвератрол	24,1±1,3	17,11±1,2
ИМ + глибенкламид + дистантное прекондиционирование	24,2±1,5	16,34±1,8
ИМ + глибенкламид + эритропоэтин	21,2±1,1	15,45±1,2
ИМ + глибенкламид + резвератрол	28,5±1,3	16,95±1,8
ИМ + аминогуанидин + дистантное прекондиционирование	22,8±2,0	14,11±1,2
ИМ + аминогуанидин + эритропоэтин	28,6±2,9	17,55±1,7
ИМ + аминогуанидин + резвератрол	26,6±1,9	15,45±1,2

Примечание: * – $p \leq 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

Исходя из результатов экпериментов, дистантное ишемическое прекондиционирование, рекомбинантноый эритропоэтин и резвератрол обладают в равной степени выраженным кардиопротекторным действием.

Кратковременная ишемия миокарда инициирует каскад определенных биохимических процессов в кардиомиоцитах. Эти процессы направлены на защиту миокарда от повреждений, связанных с его ишемизацией. Благодаря этому короткому, но эффективному «курсу закаливания» миокард становится подготовленным к последующей ишемии, в связи с чем он гораздо более успешно защищается от агрессивных факторов, обусловленных ухудшением питания и оксигенации сердца. Этот физиологический феномен, названный «ишемическим прекондиционированием», был открыт не так давно, но уже привлек к себе внимание множества ученых. В случае острой ишемии этот механизм может предотвратить развитие инфаркта миокарда, а если последний все же происходит, ишемическое прекондиционирование обеспечивает меньшие

размеры инфаркта, уменьшает вероятность появления аритмии, предохраняет от значительных нарушений функций миокарда левого желудочка, а также уменьшает повреждения миокарда, связанные с реперфузией.

Одним из препаратов, который возможно использовать для проведения фармакологического прекондиционирования, может явиться рекомбинантный эритропоэтин. Перспективы применения эритропоэтина в клинике объясняются его плеотропными эффектами.

Во многих исследованиях было показано протективное действие ЭПО на ишемию-реперфузию в различных органах и тканях, включая головной мозг [14], спинной мозг, почки [15], мышечную ткань сосудов [13], сердце [14]. В частности, доказан независимый кардиопротективный эффект ЭПО, снижение зоны инфаркта миокарда и улучшение функции сердца при ишемии-реперфузии вне зависимости от изменения гемоглобина, числа эритроцитов и напряжения кислорода в крови. В ряде исследований показано, что снижение апоптоза – один из возможных главных механизмов защитного эффекта ЭПО [12].

К механизмам реализации кардиопротективного действия резвератрола [8] можно отнести: антиоксидантный, противовасполительный, повышающий активность ферментов NOS,стимулирующих ангиогенез. Но один из самым обсуждаемым механизмов – это эффект, опосредованный через прекондиционирование.

Каким образом ишемия может сыграть прекондиционирующее, то есть «подготавливающее», действие? Во время кратковременного ишемического эпизода кардиомиоциты начинают выделять аденозин и брадикинин, что, в свою очередь, вызывает активацию универсального внутриклеточного мессенджера — протеинкиназы С. Под ее действием АТФ-зависимые калиевые каналы гладкомышечных клеток сосудов и кардиомиоцитов, закрытые в норме, открываются. За счет этого происходит защитное укорочение сердечных потенциалов действия. Такой эффект имеет энергосберегающее значение, и при возникновении в ближайшее время повторной ишемии миокарда отмечается снижение его метаболической активности, уменьшение скорости распада АТФ, замедление гликогенолиза и снижение скорости нарастания внутриклеточного ацидоза. Благодаря всему этому миокард лучше переносит ишемию, в том числе более длительную и выраженную.

Как видно из нашего исследования, АТФ-зависимые калиевые каналы являются важным эффекторным звеном в реализации цитопротекторного действия как дистантного прекондиционирования, так и рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола. Оксид азота играет важную роль в реализации кардиопротекторных эффектов рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола. И в том и другом случае синтез его осуществляется за счет активации индуцибельной No-синтазы, однако в механизме цитопротекции большое значение имеет эндотелиальная No-синтаза, выполняющая, по всей вероятности, триггерную роль. Доказанная способность эритропоэтина и резвератрола активировать протеинкиназы [2] позволяет предположить их триггерную роль в процессе реализации эффектов фармакологического прекондиционирования.

Вышеизложенное подтверждает наше предположение о том, что эритропоэтин и резвератрол являются триггерами ишемического прекондиционирования и могут вызывать фармакологическое прекондиционирование, а реализация естественных механизмов защиты от ишемии осуществляется за счет активации АТФ-зависимых калиевых каналов и биосинтеза оксида азота.

Исследование механизмов прекондиционирования будет способствовать созданию фармакологических миметиков прекондиционирования, индуцирующих воспроизводимый и стабильный кардиопротективный ответ и в то же время лишенных серьезных побочных эффектов.

Выводы.

1. Проведение дистантного ишемического прекондиционирования, введение рекомбинантнлого эритропоэтина и резвератрола достоверно, относительно контрольной группы животных, уменьшало распространенность зоны некроза миокарда левого желудочка.

2. Предварительная блокада АТФ-зависимых калиевых, эндотелиальной eNOS, индуцибельной iNOS, полностью нивелировали протекторное действие дистантного ишемического прекондиционирования, рекомбинантного эритропоэтина и резвератрола, что доказывает реализацию их противоишемических эффектов по механизму, схожему с механизмом реализации эффектов дистантного ищемического прекондиционирования.

Литература

1. Бокерия, JI.A. Природа и клиническое значение «новых ишемических синдромов» / JI.A. Бокерия, И.Н. Чичерин. – М. : НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2007. – С. 302.

2. Aird, W.C. Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease / W.C. Aird // Circ. Res. – 2006. – Vol. 98, № 2. – P. 159-162.

3. Dave, K.R. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest / K.R. Dave, I. Saul, R. Prado // Neurosci. Lett. – 2006. – Vol. 404. – P. 170-175.

4. Dirnagl, U. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection / U. Dirnagl, R.P. Simon, J.M. Hallenbeck // Trends Neurosci. – 2003. – Vol. 26. – P. 248-254.

5. Domenech, R.J. Rev Med Chil / R.J. Domenech, P. Macho. – 2008 Dec; 136(12):1582-8. Epub 2009 Mar 23. Review. Spanish.

6. Downey, J.M. Signaling pathways in ischemic preconditioning / J.M. Downey, A.M. Davis, M.V. Cohen // Heart. Fail. Rev. – 2007. – Vol. 12. – P. 181-188.

7. Guglin, M.E. Cardiovascular effects of erythropoietin: anemia and beyond / M.E. Guglin, D. Koul // Cardiol. Rev. — 2006. — 14(4). — 200-204.

8. Hung, L. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes / L. Hung, J. Chen, S.S. Huang et al. // Cardiovasc. Res. – 2000. – Vol. 47. – P. 549-555.

9.Jager, U. Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries / U. Jager, H. Nguyen-Duong // Arzneimittelforschung. – 1999. – Vol. 49 – P. 207-211.

10.Leikert, J.F. *Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells /* J. F. Leikert, T. R. Rathel, P. Wohlfart // Circulation.– 2002 – Vol. 106, № 13. – P. 1614 – 1617.

11.Naderali, E.K. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs / E.K. Naderali, P.J. Doyle, G. Williams // Clin. Sci. – 2000 – Vol. 98 – P. 537-543.

12. Penttild, H.J. Ischemic preconditioning does not improve myocardial preservation during off-pump multivessel coronary operation / H.J. Penttild, M.V.IC. Lepojarvi, IC. Paivi et al. // Circulation. – 2003. – Vol. 75. – P. 1246-1252.

13.Turley, J.E Exhaled NO is reduced at an early stage of hypoxia-induced pulmonary hypertension in * newborn piglets / J.E. Turley, L.D. Nelin, M.R. Kaplowitz et al. // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2003. – Vol. 284, № 3.-P. 489-500.

14. Chavez. J.C Expression of hypoxia inducible factor 1 in the brain of rats during chronic hypoxia / J.C. Chavez, F. Agani, P. Pichiule, J.C. LaManna // J. Appl. Physiol. – 2000. – Vol. 89. – P. 1937-1942.

15. Wikstrom D, L.G. Andersson et al. // J. Scand. Urol. Nephrol. – 1996. – Vol. 30. – P. 115.

TRIGGER MECHANISM OF ANTIISCHEMIC ACTION OF ERITHROPOIETIN AND RESVERATROL

L.M. DANILENKO
M.V. POKROVSKIY
O.O. NOVIKOV
L.V KOROKINA
D.B. GONCHAROVA
A.B. INDEROVA
E.N. SVETLICHNAYA

Belgorod National Research University

e-mail: Danilenkolyudmila@mail.ru

In this paper an experimental study of the effect of recombinant erythropoietin, and resveratrol, in the area of myocardial necrosis of the left ventricle in the simulation coronal occlusion myocardial infarction is presented. It was found that recombinant erythropoietin, and resveratrol are the triggers of ischemic preconditioning and can cause pharmacological preconditioning, and the implementation of mechanisms of protection against ischemia is due to activation of ATP-sensitive potassium channels and nitric oxide biosynthesis.

Key words: preconditioning, erythropoietin, resveratrol.

УДК 615.453.3;615.331

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ И АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БАКТЕРИЙ

А.В. КОРОЧИНСКИЙ[1]
Э.Ф. СТЕПАНОВА[1]
Ю.И. ОСТРОУМОВ[2]

[1] Пятигорская государственная фармацевтическая академия

[2] Институт инженерной иммунологии, г.Москва

e-mail: a.v.korochinskii@mail.ru

В настоящей статье экспериментально проведена и обоснована оценка биологической активности и сохранности лекарственных препаратов на основе бактерий, иммобилизованных альгинатом натрия.

Ключевые слова: иммобилизация, альгинат кальция, антагонистическая активность, биоагент, биоспорин, хитозан.

Введение. В последние годы получили распространение новые подходы к лечению, связанные с восстановлением естественной экологии организма и основанные на использовании активных биологических продуктов. Одним из аспектов такого подхода является нормализация измененного микробного пейзажа организма при помощи бактерийных и биопрепаратов. В настоящее время усилиями новых промышленных и коммерческих структур традиционно существовавший дефицит этих препаратов в основном снят. Но их применение, как правило, основано на экстенсивной схеме дозирования, заключающейся в использовании значительного количества бактерий. Это связано с необходимостью обеспечения прохождения терапевтически значимых концентраций микроорганизмов через среду желудка, ведь именно там они подвергаются губительному воздействию ряда гидролитических ферментов и кислоты [1].

Одним из вариантов решения этой проблемы стало применение различных методов защиты вводимой клеточной массы пробиотика. Наиболее простым и часто применяемым технологическим приемом является использование капсул с ацидорезистентной оболочкой. Другой, более сложный, прием заключается в использовании различных носителей, которые пространственно ограничивают клетки микроорганизмов. Данный метод был предложен Кирстеном и Бьюком и предусматривает промышленное применение [2].

Наше внимание привлекла иммобилизация клеток (адсорбционная и пространственная) с дальнейшей модификацией поверхности полученной лекарственной формы, что способствует повышению стрессоустойчивости клеток в неблагоприятных условиях.

В настоящее время увеличивается интерес к совершенствованию препаратов пробиотиков путём иммобилизации клеток микроорганизмов. Одним из наиболее перспективных и привлекательных способов иммобилизации является включение живых клеток в структуру гелей альгинатов [3, 4].

Полученная форма, состоящая из адсорбированных клеток, пространственно ограниченных гелями полимеров, имеет достаточно большие перспективы как самостоятельная форма выпуска и как промежуточный продукт, который после дополнительной относительно несложной модификации возможно использовать не только в составе твердых, но и жидких лекарственных форм, что расширит круг выпускаемых в настоящее время пробиотиков, а также значительно улучшит их потребительские свойства.

Поэтому **целью** настоящих исследований является использование методик оценки биологической и антагонистической активности для лекарственных препаратов на основе бактерий, иммобилизованных альгинатом натрия.

Материалы и методы. Возможно использование активированного угля в качестве адсорбента, а также природных биодеградируемых нетоксичных полисахари-

дов, таких как хитозан и альгинат натрия различных марок. Такая форма примечательна тем, что за счет сорбции на частицах угля удается создать микроколонии бактерий, находящиеся в особом физико-химическом окружении, что повышает их антагонистическую активность, а модификация раствором хитозана создает защиту от агрессивных факторов среды желудка.

В качестве носителя нами использовался чистый альгинат, альгинат с микрочастицами активированного угля, а также применялась обработка поверхности получаемых гранул раствором хитозана

В качестве тест-культур использовали Staphilococcus aureus штамм 209, Shigella sonnei штамм 5069, Proteus vulgaris штамм 177, Candida albicans штамм 885-653 из коллекции ГИСК им. Тарасевича.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенных исследований было показано, что обработка альгинатных капсул раствором хитозана обеспечивала улучшение качества и стабильности капсул. Это можно объяснить появлением оболочки полиэлектролитного комплекса на поверхности капсул и возможным дальнейшим распространением реакции между макромолекулами полиэлектролитов вглубь ядра гранул.

Оценку биологической активности (биологической концентрации – БК) и сохраняемости препаратов на основе бактерий, иммобилизованных альгинатом кальция, проводили путем определения биологической концентрации микроорганизмов методом высева на плотную питательную среду (среда Гаузе). Общую концентрацию микроорганизмов оценивали по счету в камере Горяева и по оптической концентрации, определенной по стандарту мутности.

Антагонистическую активность оценивали методом отсроченного антагонизма по величине зоны задержки роста тест-культур (в миллиметрах), которую считали:

- нулевой при зоне задержки роста до 5 мм;
- низкой – от 5 до 10 мм;
- средней – от 10 до 15 мм;
- высокой – от 15 до 20 мм;
- очень высокой – более 20 мм [5].

При иммобилизации клеток по указанной методике образуются сферические частицы (гранулы), имеющие одинаковый диаметр. В качестве носителя нами использовался чистый альгинат, альгинат с микрочастицами активированного угля (для дополнительной адсорбции клеток), а также применялась обработка поверхности гранул раствором хитозана.

Указанные показатели определяли для препаратов, приготовленных на основе коммерческого препарата БИОСПОРИН (образец 1) и на основе концентрированной суспензии B.subtilis шт. 3, приготовленной в лабораторных условиях на плотной питательной среде и ресуспендированной в гипертоническом растворе (ОК=7,6*10^{10} сп*$г^{-1}$, БК=7,2*1010 сп*$г^{-1}$, СО=9,2%) (образец 2). Кроме того, указанные показатели определяли для тех же препаратов на конечные сроки хранения, которые составили для образца 1 практически 4 месяца, а для образца 2 – более 1 месяца.

Таблица 1

Характеристики общей и биологической концентрации препаратов

№ п/п	Наименование препарата	Концентрация микроорганизмов, *10^9 сп*$г^{-1}$		
		Общая по стандарту мутности	Общая по счету в камере Горяева	БК
1	Образец 1	0,4	0,37	0,32± 0,06
2	Образец 1 (хр.)	0,5	0,42	0,36 ±0,07
3	Образец 2	55	52	56 ±11
4	Образец 2 (хр.)	60	54	55 ±8

Полученные результаты свидетельствуют о высокой сохраняемости микроорганизмов, входящих в состав препаративной формы как на стадии приготовления, так и в процессе хранения. Некоторая девиация показателя общей концентрации объясняется значительной методической погрешностью их определения.

Практическое отсутствие инактивации биоагента в составе препарата в процессе кратковременного хранения позволяет предположить, что препарат будет характеризоваться высокой устойчивостью при хранении в течение одного года и более.

Результаты исследования антагонистической активности препаратов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Показатели антагонистической активности препаратов в отношении регламентированных тест-штаммов

№ п/п	Наименование препарата	Зона задержки тест-культур, мм			
		S.aureus 209	Sh.sonnei 5069	P.vulgaris 177	C.albicans 885-653
1	Образец 1	32,9 ± 2,9	17,2± 1,8	20,2± 3,1	32,2± 2,3
2	Образец 1 (хр.)	31,2 ± 3,1	16,4± 2,2	20,0± 2,2	32,3± 3,1
3	Образец 2	33,6 ± 3,4	18,0± 2,1	21,3± 3,4	33,1± 3,0
4	Образец 2 (хр.)	32,5 ± 3,5	17,3 ± 2,3	21,1 ± 2,8	33,3 ± 3,5

Данные табл. 2 свидетельствуют о сохранении микроорганизмами высокой антагонистической активности по отношению к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, что позволяет сделать вывод об отсутствии в ходе приготовления препаративных форм технологических воздействий, способных существенно изменить свойства биоагента.

Выводы. Таким образом, впервые известные методики, используемые для определения биологической и антагонистической активности различных препаратов, были апробированы на моделях лекарственных препаратов, полученных на основе иммобилизованных бактерий, что позволит осуществлять контроль активности в отношении некоторых выпускаемых пробиотиков, лекарственные формы которых произведены на основе иммобилизованных бактерий

Литература

1. Демаков, В.А. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты / В.А. Демаков, Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов / Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 30.
2. Ананьева, Н.В. Совершенствование технологии пробиотических культур прямого внесения для молочных продуктов : автореф. дис. ... канд. техн. наук / Н.В. Ананьева ; ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии», 2007.
3. Anil, K.A. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery / A.K. Anil, H. Singh // Singh Trends in Food Science & Technology. – 2007. – №18. – P. 240-251.
4. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / пер. с англ. ; под ред. Дж. Вудворда.– М.: Мир, 1988. – С.22.
5. ФС 42-3476-98. Биоспорин. Фармакопейная статья.

ASSESSMENT OF BIOLOGICAL AND ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PREPARATIONS ON THE BASIS OF THE IMMOBILIZED BACTERIA

A.V. KOROCHINSKIY [1]
E.F. STEPANOVA [1]
U.I. OSTROUMOV[2]

[1] Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy

[2] Institute of engineering immunology, Moscow

e-mail: a.v.korochinskii@mail.ru

In the present article the assessment of biological activity and safety of medicines on the basis of the bacteria, immobilized alginaty sodium is carried experimentally out and proved.

Key words: immobilization, alginat calcium, antagonistic activity, bioagent, biosporin, chitosan, bioactivity, biocompatibility, bioresistibility.

УДК:618.3-06-08:577.112.385.2

КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕСТОЗА ТАДАЛАФИЛОМ

М.В. ПОКРОВСКИЙ[1]
В.В. ГУРЕЕВ[2], А.А. ДОЛЖИКОВ[1]
О.С. ПОЛЯНСКАЯ[1],
А.С. МОСТОВОЙ[3], С.А. АЛЕХИН[2]

[1] Белгородский государственный национальный исследовательский университет

[2] Курский государственный медицинский университет

[3] Лаборатория психофизиологического обеспечения филиала ОАО «Концерн Росэнергоатом» «Кольская АЭС»

e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

Введение ADMA-подобного агента – L-NAME крысам вызывает блокаду NO-синтазы и приводит к патофизиологическим изменениям, подобным гестозу. Введение фармакологического агента – ингибитора фосфодиэстеразы 5 тадалафила приводит к явной коррекции патологических изменений. Результаты исследования служат предпосылкой для проведения дальнейших исследований с целью расширения показаний для их применения.

Ключевые слова: крысы, преэклампсия, L-NAME, лечение.

Эндотелиальная дисфункция лежит в основе развития многих сосудистых нарушений во время беременности, приводящих к развитию акушерских осложнений — позднего гестоза, фетоплацентарной недостаточности, синдрома задержки развития плода. Дисфункция эндотелия, развивающаяся у беременных, связана с уменьшенным формированием сосудорасширяющих факторов (окись азота (NO) и простациклин), что приводит к нарушению микроциркуляции в плаценте и препятствует нормальному течению беременности. NO постоянно образуется из L-аргинина при участии NO-синтаз (eNOS) и выделяется из эндотелия. Пусковым моментом патогенеза преэклампсии может служить повышенное содержание в эндотелиальных клетках эндогенного ингибитора NO-синтазы ассиметричного диметиларгинина (ADMA). В последние годы обнаружено, что концентрации ADMA в материнской плазме гораздо выше у женщин с преэклампсией [6] и что повышенные концентрации ADMA являются одними из предикторов данной патологии [4, 5, 6]. NO оказывает свое действие на гладкомышечные клетки посредством активации фермента растворимой гуанилатциклазы, что сопровождается повышением уровня циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). В результате этого наблюдается снижение внутриклеточной концентрации ионов кальция и расслабление клеток. Распад цГМФ происходит под воздействием фермента фосфодиэстеразы 5 типа (ФДЭ-5). Соответственно, угнетение активности ФДЭ-5 в гладкомышечных клетках сопровождается повышением количества цГМФ, что способствует вазорелаксации. Именно на данном уровне осуществляют свой эффект ингибиторы ФДЭ-5. Данный тип ФДЭ является основным в гладкомышечной ткани сосудов. Таким образом, действие этих препаратов приводит к усилению эффектов эндогенного NO, что может приводить к улучшению эндотелиальной функции.

Целью настоящей работы явилось исследование возможности коррекции экспериментального гестоза ингибитором ФДЭ-5 тадалафилом.

Методика исследования. Эксперимент выполнен на 30 белых крысах-самках линии Wistar массой 250–300 г. Неселективный блокатор NO-синтазы N-нитро-L-аргинин-метиловый эфир (L-NAME) вводили внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг/сут. в течение 7 дней (14-20 сутки беременности). На 21-е сутки беременности под наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг) вводили катетер в правую сонную артерию для регистрации показателей артериального давления (АД), болюсное введение фармакологических агентов осуществляли в правую бедренную вену. Проводили сосудистые пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию (ЭЗВ) – внутривенное введение ацетилхолина (АХ) в дозе 40 мкг/кг – и эндотелийнезависимую вазодилатацию (ЭНЗВ) – внутривенное

введение нитропруссида натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг, с расчетом коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД) [2, 3]. Беременные самки были разделены на группы (n=10): I – интактные; II – с введением L-NAME (25 мг/кг внутрибрюшинно) ежедневно с 14 по 20-е сутки беременности; III – с введением на фоне L-NAME тадалафила (0,9 мг/кг внутрижелудочно), ежедневно с 14 суток беременности; Исследование микроциркуляции в плаценте проводили с помощью оборудования компании Biopac systems: полиграф MP100 с модулем лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) LDf100C и датчиком TSD144. Регистрация результатов ЛДФ производилась программой Acqknowledge версии 3.8.1, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ) [1]. NO-продуцирующая функция эндотелия оценивалась на основании данных содержания стабильных метаболитов NO- нитрит-ионов NOx в сыворотке крови.

Проведено морфологическое исследование плацент вместе с имплантационным участком рога матки. Гистологические срезу после стандартной заливки материала в парафин изготавливали в строго вертикальном направлении через середину плацентарного диска с захватом всех слоев плаценты и стенки рога матки. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение микропрепаратов, фотопротоколирование и морфометрию проводили на микроскопе Leica DM4000B с системой видеорегистрации и обработки изображений.

Результаты исследования. Блокада NO-синтазы, вызванная семидневным введением L-NAME, приводила к подъему систолического и диастолического артериального давления с 125,0±6,3 и 82,0±5,8 до 183,1±9,4 и 136,7±7,4 мм рт. ст. соответственно. Происходило значительное снижение показателя микроциркуляции в плаценте с 425,9±39,6 до 210,0±21,1 ПЕ ($p<0,05$), а также снижение содержания стабильных метаболитов NOx в сыворотке крови с 2,35±0,21 мкмоль/дл до 1,33±0,09 мкмоль/дл ($p<0,05$). При микроскопическом исследовании плаценты наблюдаются неравномерное кровенаполнение спонгиозного слоя, вакуольная дистрофия гигантского трофобласта, очаги некроза на границе гигантского трофобласта и децидуальной ткани, дистрофические изменения и малокровие децидуального слоя (рис. 2). Кроме этого, наблюдалось нарушение взаимоотношений вазодилатирующих и вазоконстрикторных механизмов регуляции сосудистого тонуса, о чем свидетельствует увеличение КЭД с 1,28±0,23 у интактных беременных животных до 3,06±0,32 ($p<0,05$).

Таким образом, моделирование L-NAME-индуцированного гестоза в эксперименте у крыс характеризовалось выраженным повышением АД, явлениями эндотелиальной дисфункции, снижением плацентарной микроциркуляции, NO-продуцирующей функции эндотелия и ярко выраженными деструктивными изменениями в плаценте.

Длительное, в течение 7 суток, ежедневное внутрижелудочное введение тадалафила приводило к достоверно значимому ($p<0,05$) снижению артериального давления по отношению к группе нелеченых животных (табл. 1). Отмечалось улучшение микроциркуляции в плаценте и нормализация взаимоотношения вазодилатирующих и вазоконстрикторных реакций при коррекции экспериментального гестоза в обеих группах леченых животных.

Таблица 1

Результаты коррекции L-NAME-индуцированной преэклампсии у крыс (n=10; M±m)

Показатель / Группа	САД мм рт. ст	ДАД мм рт. ст	КЭД усл. ед.	Микроциркуляция ПЕ	Концентрация нитритионов (NOx) мкмоль/дл
Интактные	125,0±6,3^{у}	82,0±5,8^{у}	1,28±0,23^{у}	425,9±39,6^{у}	2,35±0,21
L-NAME	183,1±9,4*	136,7±7,4*	3,06±0,32*	210,0±21,1*	1,33±0,09*
L-NAME + тадалафил	149,7±2,2*	97,6±3,2*	1,85±0,08^{у}	398.7±24,84^{у}	1,36±0,1^{у}

Примечание: САД, ДАД – систолическое и диастолическое артериальное давление (мм рт. ст.); КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции (у.ед.); микроциркуляция в плаценте (Пер/ед); концен-

трация нитрит-ионов (NOx); *– p < 0,05 в сравнении с группой интактных животных; у– p < 0,05 в сравнении с группой L-NAME.

При биохимическом исследовании сыворотки крови обнаружено, что тадалафил не вызывал повышения уровня нитрит-ионов (1,36±0,1 мкмоль/дл).

Положительная динамика изменений при применении тадалафила выявлена и при морфологическом исследовании. Изменения в структуре плаценты и имплантационного ложа были минимальными (рис. 3) и в целом картина была близка к интактной (рис. 1).

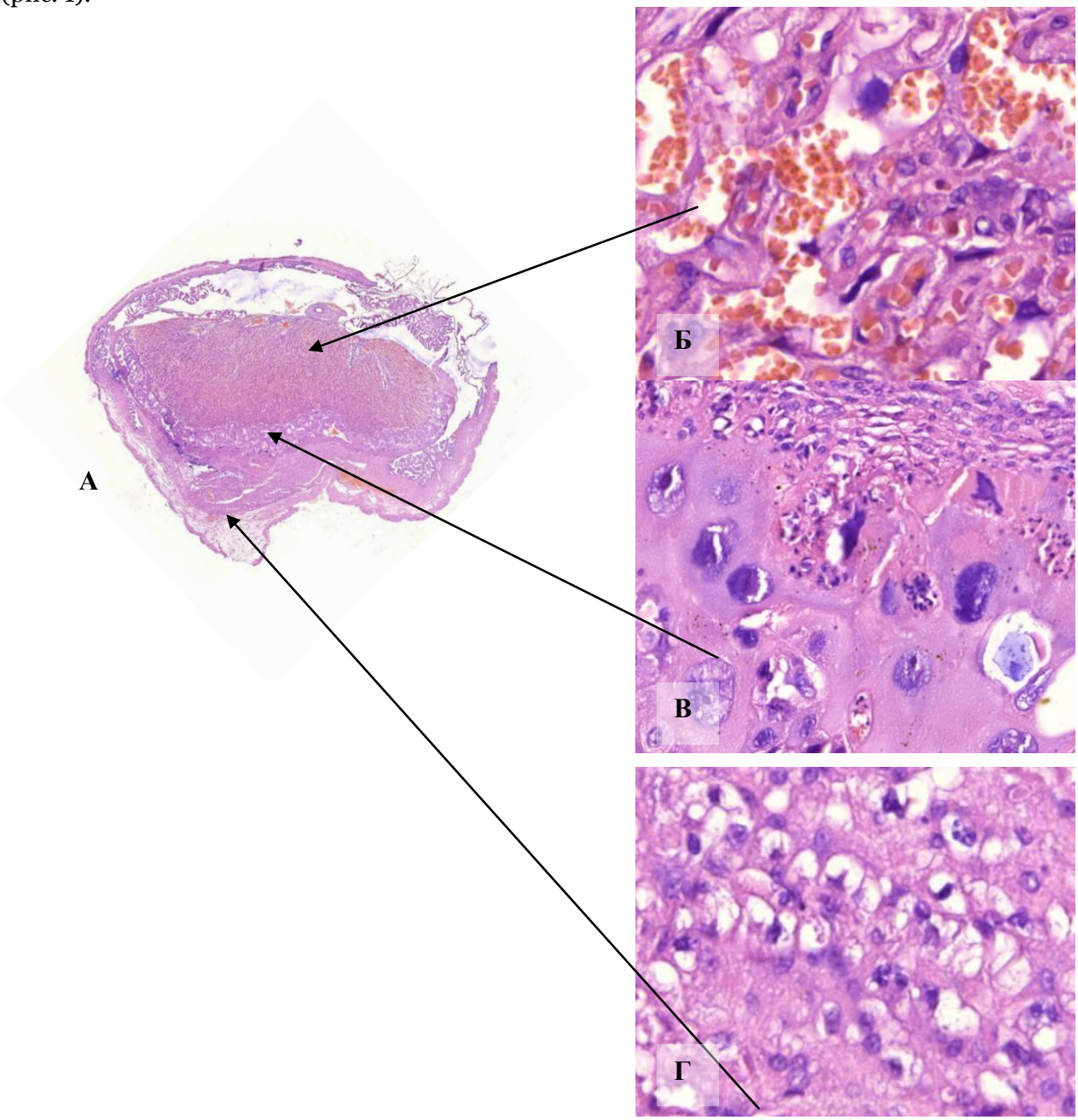


Рис. 1. Строение интактной плаценты
Примечание: А – плацента на поперечном срезе; Б – спонгиозный слой;
В – слой гигантского трофобласта; Г – децидуальная ткань;
Окр. гематоксилином и эозином; Микрофото; Х 200

Обсуждение. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что длительное, в течение 7 суток, внутрибрюшинное введение блокатора NO-синтазы L-NAME вызывает у беременных самок крыс комплекс изменений, ассоциированных с

NO-дефицитной эндотелиальной дисфункцией. На 7-е сутки развивалась выраженная гипертензия, в 3 раза увеличивался коэффициент эндотелиальной дисфункции, происходило снижение показателей плацентарной микроциркуляции и конечных метаболитов NO в плазме. Описанный симптомокомплекс можно соотнести с развитием гестоза в клинических условиях.

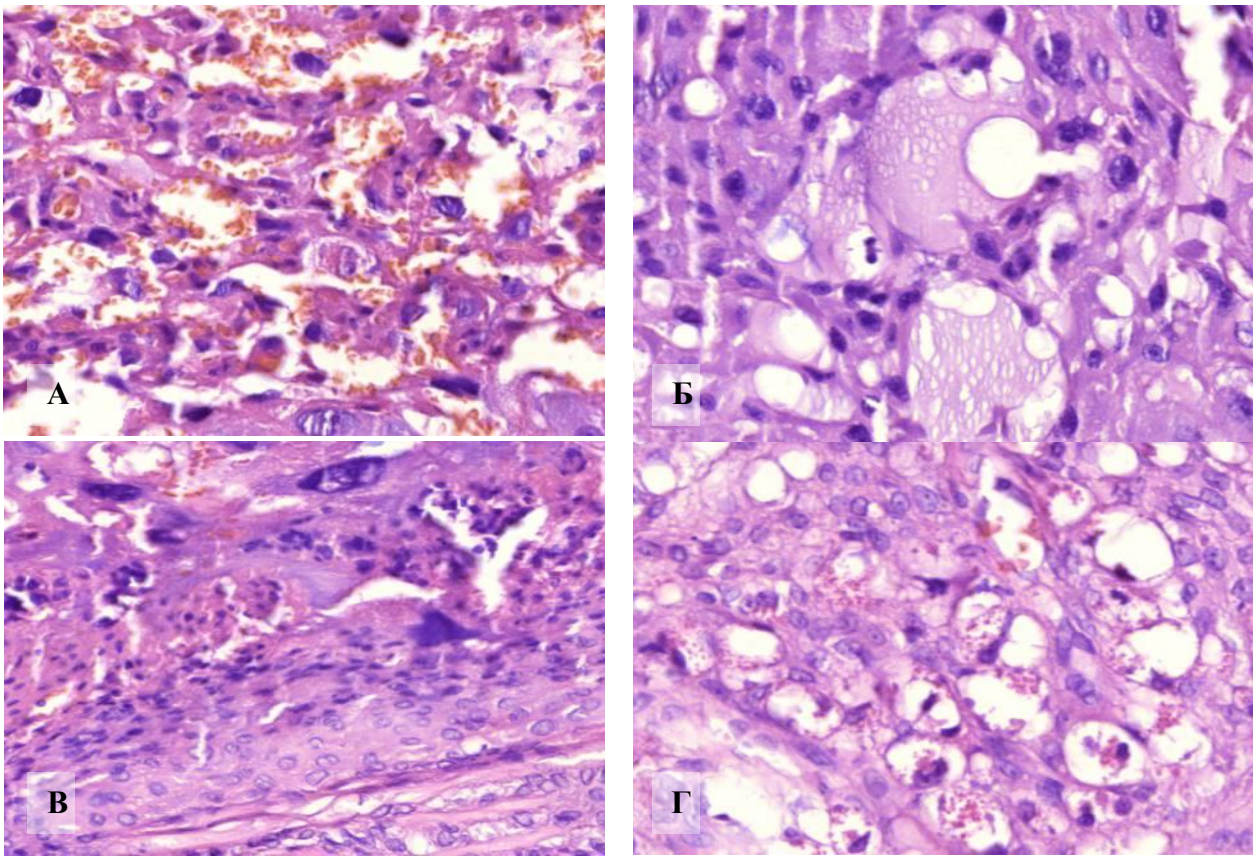


Рис. 2. Патологические изменения при моделировании экспериментального гестоза
Примечание: А – неравномерное кровенаполнение спонгиозного слоя; Б – вакуольная дистрофия гигантского трофобласта; В – очаги некроза на границе гигантского трофобласта и децидуальной ткани; Г – дДистрофические изменения, малокровие децидуального слоя; Окр. гематоксилином и эозином; Микрофото; Х 200

Использование ингибитора фосфодиэстеразы 5 типа приводило к явной коррекции моделируемого патологического состояния. Это объясняется тем, что угнетение ФДЭ–5 способствует активации растворимой гуанилатциклазы и накоплению вторичного посредника – циклического 3,5 гуанозинмонофосфата (цГМФ), с чем связано сосудорасширяющее действие NO . Накапливающийся цГМФ активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу, а также Ca^{2+}-АТФазу, что приводит в конечном итоге квазодилатации.

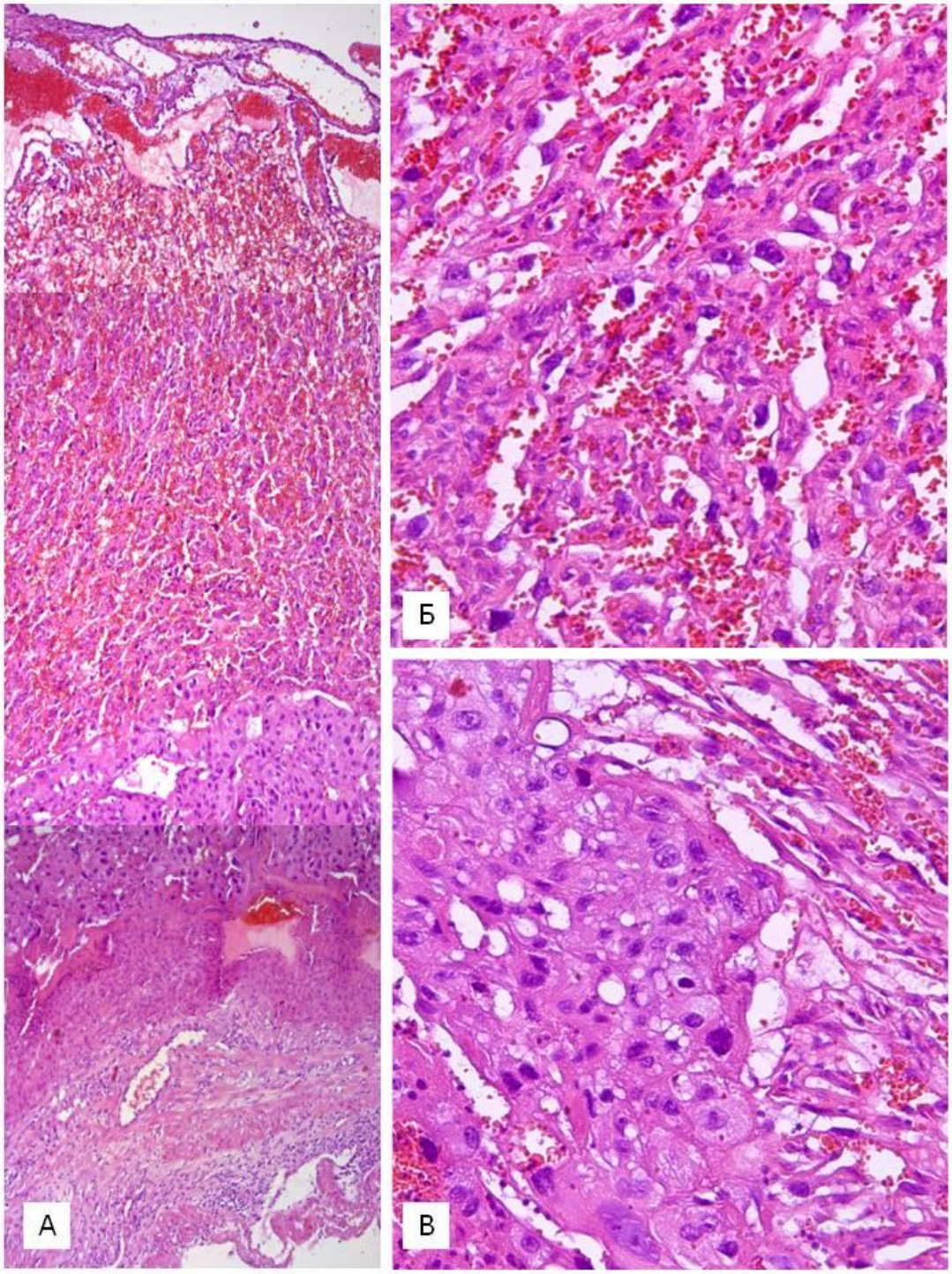


Рис. 3. Морфологические изменения плаценты при коррекции экспериментального гестоза с помощью тадалафила: на рис. А – полная реконструкция участка плаценты, однородная структура и равномерное кровенаполнение спонгиозного слоя; Б – относительно однородная структура слоя гигантского трофобласта, отсутствие дистрофических изменений в трофобласте и децидуальном слое; В – стенка рога матки (нижняя часть рис. А) также без видимых морфологических изменений. Окр. Г+Э. Микрофото. А – х 100, Б, В- х400

Литература

1. Артюшкова, Е.Б., Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте / Е.Б. Артюшкова, Д.В. Пашков, М.В. Покровский и др. // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71. № 3. – С. 23-25.

2. Покровский, М.В., Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская и др. // Кубанский науч. мед. вестн. – 2006. – № 10 (91). – С. 72-77.

3. Покровский, М.В., Фармакологическая коррекция L-аргинином «ADMA-eNOS-ассоциированных мишеней» при экспериментальной преэклампсии / М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, В.В. Гуреев и др. // Кубанский науч. мед. вестн. – 2010. – № 1. – С. 85-92.

4. Savvidou, M.D. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia / M.D. Savvidou et al. // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 1511-1517.

5. Smith, C.L. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGf expression, and cell phenotype / C.L. Smith // Biochemical & Biophysical Research Communications. – 2003. – Vol. 308. – P. 984-989.

6. Speer, P.D. Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants / P.D. Speer et al. // Am J Obstet Gynecol. – 2008. – Vol. 198. – № 1. – P. 112-117.

EXPERIMENTAL PREECLAMPSY CORRECTION BY TADALAFIL

M.V. POKROVSKY[1]
V.V. GUREEV[2], A.A. DOLGIKOV[1]
O.S. POLJANSKAJA[1]
A.S. MOSTOVOY[3], S.A. ALEHIN [2]

[1] Belgorod National Research University

[2] Kursk State Medical University

[3] Psychophysiological laboratory support branch of "Rosenergoatom", "Kol'sky NPP"

e-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

Adminisration of ADMA-like agent leads to NO-sintase blockage and pathomorphological changes similar to preeclampsia. Pharmacological agent inhibitor of phosphodiesterase 5 *tadalafil* significantly reduce pathomorphological changes, and for differently directed changes in efficacy criteria's because different pharmacokinetic features. Recent studies are background for future investigations and clinical adoption or broaden their indications.

Key words: rats, pre-eclampsy, L-NAME, treatment.

УДК 577.913:543.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУБМИКРОСТРУКТУРИРОВАННОЙ СУБСТАНЦИИ ТАУРИНА

В.И. КОЧКАРОВ
О.О. НОВИКОВ
Е.Т. ЖИЛЯКОВА
М.Ю. НОВИКОВА
О.С. ВОРОНКОВА

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

e-mail: novikov@bsu.edu.ru

Установлено, что модельные глазные капли на основе субмикроструктурированного таурина обладают выраженным защитным эффектом при визуальной оценке прозрачности хрусталика, не уступающим препарату сравнения – глазным каплям «Тауфон».

Ключевые слова: таурин, субмикроструктурирование, катаракта.

Введение. Поскольку современная медицина использует большой арсенал лекарств, но многие из них еще далеки от «идеальных средств» лечения тех или иных болезней, поиск новых веществ с фармакологической активностью чрезвычайно важен. Однако их последующее использование для лечения людей и дороговизна внедрения приводит к необходимости отсеивания небезопасных и неэффективных препаратов еще до стадии их исследования на больных людях. В этом и заключается доклиническое изучение веществ, перспективных с фармакологической точки зрения [1]. Сам подход к приобретению нового спектра лекарственных агентов за счет существующего набора биологически активных соединений представляется чрезвычайно перспективным. И это достижимо с помощью методов нанотехнологии и механохимии. Однако до настоящего времени не существует действенной системы оценки безопасности для макроорганизма применяемых в официальной медицине ксенобиотиков с измененными физико-химическими свойствами.

Возможность применения наночастиц (НЧ) для повышения эффективности воздействия фармакологических средств диагностики и терапии основана на том факте, что вещества в наноформе имеют свойства, отличные от свойств веществ в макродисперсной форме. В частности, высокая удельная поверхность наноматериалов приводит к тому, что поверхностные явления (адсорбция-десорбция, адгезия) начинают играть преобладающую роль в процессах их взаимодействия с макровеществами, с макромолекулами и биологическими объектами [1].

Лекарственные вещества (ЛВ) в виде наночастиц имеют не до конца изученные свойства, влияющие на их фармакокинетику, т. е. на всасывание, распределение в тканях, биотрансформацию и выведение из организма.

Систематическое изучение закономерностей действия ЛВ в новом агрегатном состоянии позволит определить как их терапевтический потенциал, так и возможные риски для здоровья человека.

Чтобы разработать адекватные подходы к прогнозу риска влияния НЧ различной природы на здоровье человека, необходимо обязательно изучать фундаментальные закономерности проявления биологических эффектов этих частиц. Исследование наиболее общих закономерностей проявления биологических и токсических эффектов НЧ в зависимости от их формы, размера, исходного материала, площади поверхности, заряда и других физико-химических особенностей строения считается одним из актуальнейших вопросов нанотоксикологии. Не менее важны исследования, определяющие дозы, пути введения и концентрации наночастиц в области органа-мишени, продолжительность их воздействия [2].

Кроме того, особо значимый аспект изучения токсикологии НЧ – оценка возможных отдаленных эффектов, которые не манифестируют в краткосрочной перспективе. Это прежде всего влияние на геном, иммунитет, внутриутробное и постнатальное

развитие потомства. Сведения по таким вопросам в сегодняшних научных публикациях практически отсутствуют.

Недостаток оригинальных отечественных лекарственных средств (ЛС), соответствующих современному мировому уровню, является реальной экономической и национальной проблемой России. На российскую фармацевтическую отрасль оказывают влияние негативные факторы, среди которых технологическое отставание от зарубежных производителей с соответствующими различиями в части номенклатуры производимой продукции. Сегмент, по которому отставание приобретает широкий масштаб, представлен наиболее современными лекарствами, производство которых является чрезвычайно емким в отношении использования технологий. На сегодняшний день российская фармацевтическая промышленность производит достаточно ограниченный спектр лекарств, многие из которых можно считать устаревшим. Государство на протяжении последних лет демонстрирует высокую степень интереса к перспективным рынкам. Без сомнения, рынок фармацевтики также относится к их числу. Примером государственной заинтересованности является национальная программа Стратегия Фарма 2020.

Зависимость от импортных субстанций негативно влияет на лекарственную безопасность страны [3].

Развитие современных технологий, использующих процессы диспергирования, сделало весьма актуальной проблему оптимизации технологических свойств материалов, подвергнутых интенсивным механическим воздействиям. Работы в этом направлении стимулируются необходимостью получения активированных веществ с заданными свойствами, в значительной мере оптимизированными в сравнении с таковыми в исходном состоянии.

Предварительные исследования, в том числе с использованием механохимических приемов, показали, что существующая степень решения проблемы комплексного изучения физико-химических свойств, безопасности фармакологической активности субмикро- и наноструктурированных фармацевтических субстанций требует дальнейшей разработки новых методических подходов и алгоритмов для повышения качества получаемых результатов.

Материалы и методы. Эксперименты по изучению фармакологической активности проводили на молодняке беспородных белых крыс, через 12-14 суток после рождения. Животных содержали в виварии – по 1 взрослой крысе с пометом в индивидуальной клетке площадью 1600 кв. см, при температуре воздуха 22±2°С и световом режиме 12-12, кормили сухим (крупа, зерно, хлеб) и сочным (капуста, морковь, свекла) кормом [4].

Эффективность исследуемых препаратов оценивали на модели селенитовой катаракты у крыс.

Чтобы начать исследование, молодняку крыс вводили подкожно на 13-й день после рождения селенит натрия, Na_2SeO_3 (Merck, Германия), растворенный в 0,9% NaCl, в дозе 30 нмоль/г массы тела. После селенистокислой инъекции наблюдалось быстрое прогрессирование катаракты, которая достигала зрелости к 4-5-м суткам после инъекции.

Наблюдения производились на 7-й день после инъекции селенита натрия, при этом изучалось состояние хрусталиков методом биомикроскопии с использованием фотощелевой лампы с углом 35° и микроскопа СЛ-2 с адаптером для цифрового фотоаппарата. Для этого крыс наркотизировали этаминалом натрия в дозе 30 мг/кг, с целью расширения зрачка использовалась смесь 1% раствора атропина и 10% фенилэфрина гидрохлорида в соотношении 1:1.

Животные были разделены на четыре группы: I группа – контрольная, не получавшая лечения; II группа – леченная модельными глазными каплями – 4% раствором субмикроструктурированной субстанции таурина – глазными каплями № 1; III группа – леченная модельными глазными каплями – 2% раствором субмикроструктурированной субстанции таурина – глазными каплями № 2; IV группа – леченная глазными каплями «Тауфон» (4% раствор базовой субстанции таурина).

Каждая экспериментальная группа животных состояла из десяти особей.

Исследуемые препараты вводились субконьюктивально 3 раза в день по 1 капле в каждый глаз начиная со дня инъекции селенита натрия.

Визуальная оценка степени поражения хрусталика глаза производилась при помощи фотощелевой лампы, при этом была принята следующая градация повреждений (рис. 1):

0 степень – прозрачный хрусталик, задний шов хрусталика узкий с четкими границами;

1 степень – многочисленные субкапсулярные вакуоли, мелкоточечные или в виде щеточки помутнения в области шва;

2 степень – интенсивные помутнения диффузного характера в ядерной зоне, средних и задних корковых слоях;

3 степень – сливные помутнения задних субкапсулярных слоев ядра и коры, передние субкапсулярные слои полупрозрачны;

4 степень – тотальное помутнение хрусталика.

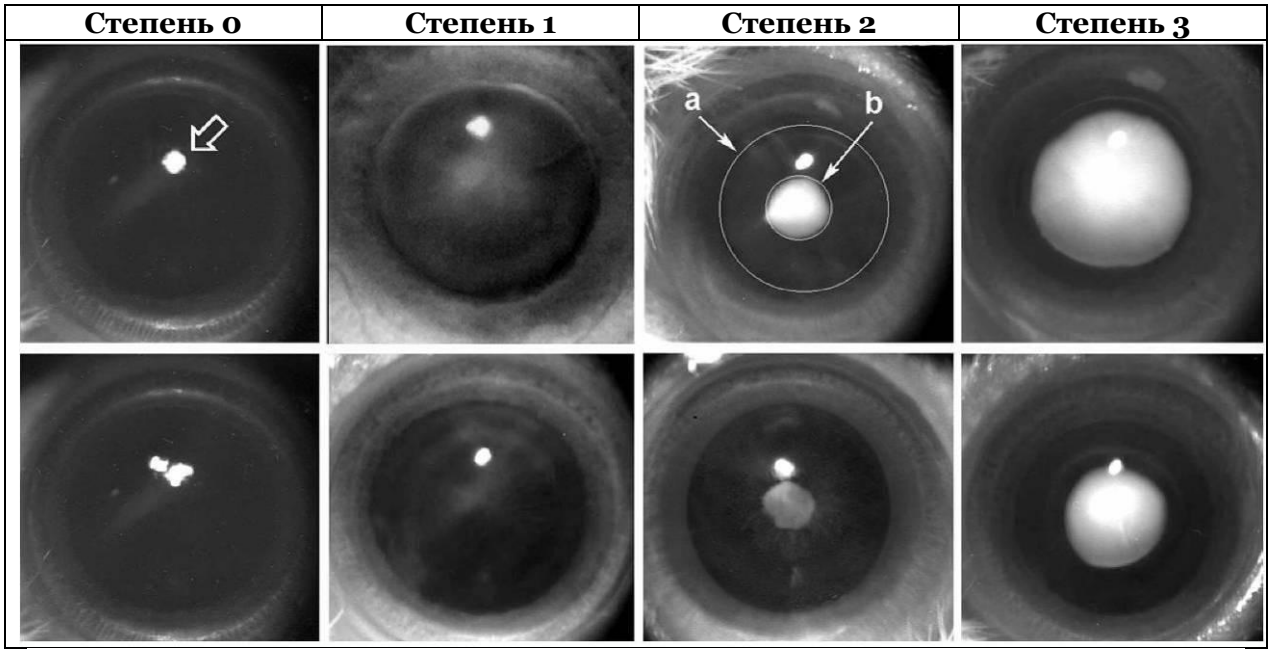


Рис. 1. Степени поражения хрусталика глаза при визуальной оценке:
1) в столбцах – степень поражения, ряды показывают верхнюю и нижнюю границу каждой степени; 2) стрелка показывает блик от фотовспышки; 3) a – граница области линзы хрусталика; b – ядерная граница непрозрачности.

Инструментальное измерение потока основывалось на анализе цифровых фотографий (256 градаций шкалы серого, 360 пикселов/дюйм.), изображения были приведены к стандартному отношению яркости/контраста и проанализированы с программным обеспечением «Видео Тест Морфология 3.0»

В качестве основного критерия при инструментальной оценке был выбран «Объем» непрозрачности линзы хрусталика, то есть интенсивность пикселов в суммарном выражении в области ядра хрусталика. Для более легкого понимания интенсивность была выражена как сумма пикселов, разделенная на 10 000.

Результаты подвергали статистической обработке путем расчета средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (±m) и оценки достоверности различий сравниваемых параметров по критерию t-test для групп с разными дисперсиями.

Результаты исследований. При моделировании селенитовой катаракты в контрольной группе животных, не получавших лечения, наблюдалось выраженное, хорошо видимое помутнение хрусталика у всех крыс.

При применении глазных капель № 1, 2 и препарата сравнения – глазных капель «Тауфон» – с первого дня после введения селенита натрия в дозе по 1 капле субконьюктивально в каждый глаз в течение всего периода наблюдения отмечался выраженный терапевтический эффект. При этом во всех группах, получавших препарат, при визуальной оценке распределение по степени поражения хрусталика достоверно не отличалось, только у одной крысы из 10 в группе леченной глазными каплями № 1 наблюдалось практически полное отсутствие помутнения хрусталика, в остальных случаях поражение соответствовало степени 2-3 (рис. 2).

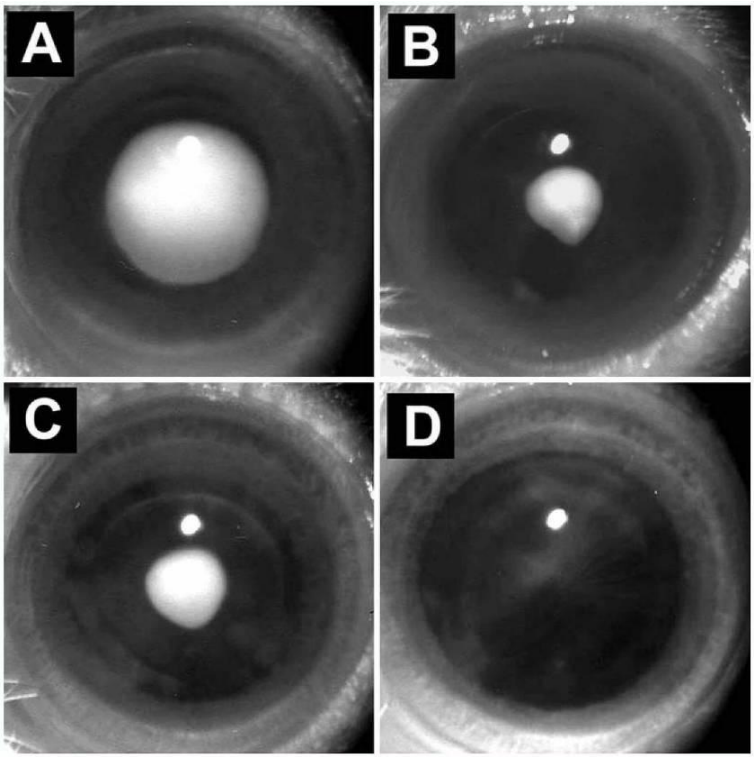


Рис.2. Результаты изучения глазных капель:
A – контрольная группа; B – группа леченная глазными каплями № 2; C – группа леченная глазными каплями «Тауфон»; D – единичный случай отсутствия помутнения хрусталика в группе, леченной глазными каплями № 1.

В табл. 1 представлены средние значения степени повреждения хрусталика в группах, получавших лечение глазными каплями № 1, 2 и препаратом сравнения – глазными каплями «Тауфон».

Таблица 1

Степень повреждения хрусталика глаза крысы при моделировании селенитовой катаракты и применении глазных капель № 1, 2 и«Тауфон» (M±m, n=10)

	Контроль	№1	№2	Тауфон
M±m	3,8±0,2	2,0±0,3*	2,3±0,3*	2,5±0,2*

Примечание: *– при p<0,05 по сравнению с контрольной группой

Для более точного определения эффективности терапии была использована морфометрия при помощи программы «Видео Тест Морфология 3.0» по критерию «Объем» помутнения хрусталика.

При морфометрическом анализе изображения было выявлено, что наибольшей активностью обладают глазные капли № 1 (рис. 3).

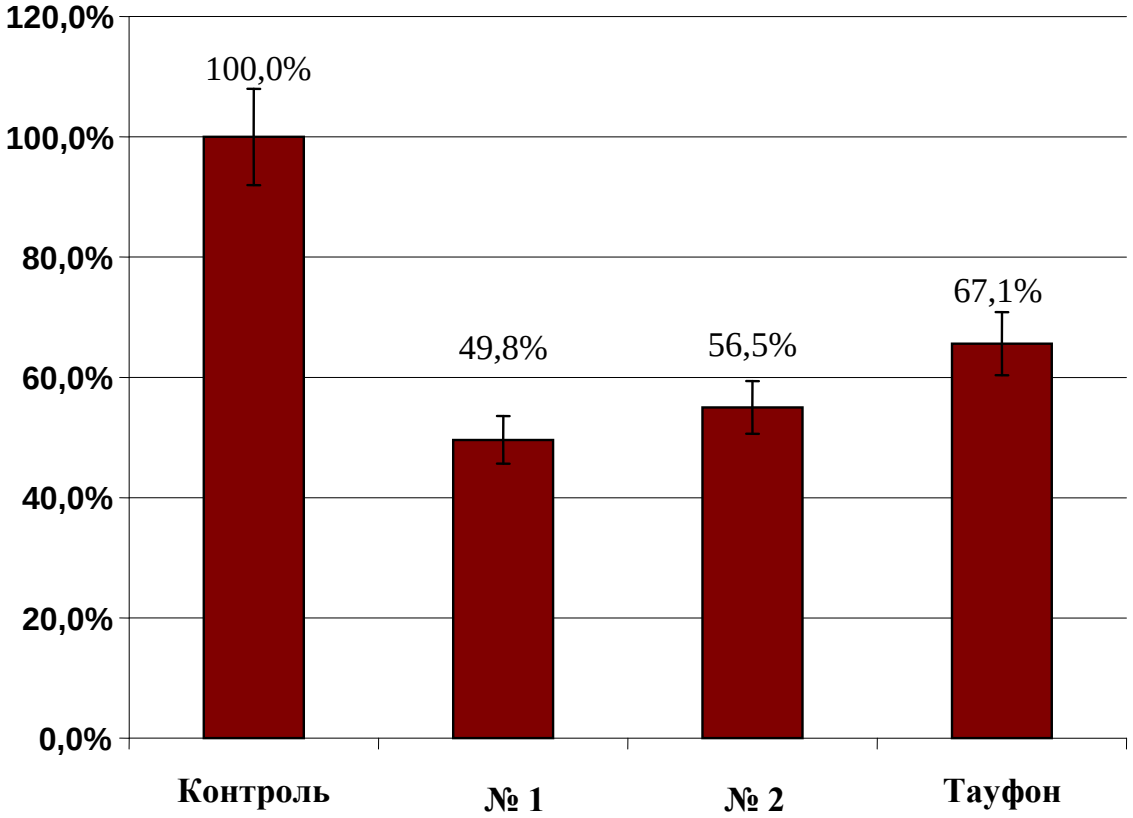


Рис. 3. Плотность помутнения в хрусталике глаза крыс при применении модельных глазных капель и глазных капель «Тауфон»

Исходя из данных, представленных на рис. 3 и в табл. 2, 3, применение глазных капель № 1 позволяет получить наиболее выраженный эффект, при этом степень помутнения хрусталика ниже, чем при применении препарата сравнения «Тауфон», примерно на 17,3% и на 6,7% ниже, чем при применении модельных глазных капель.

Таблица 2

Результаты визуального определения фармакологической активности изучаемых глазный капель

	№ животного	Контроль	№1	№2	Тауфон
			Дозировка		
			По 1 капле в каждый глаз 3 раза в день	По 1 капле в каждый глаз 3 раза в день	По 1 капле в каждый глаз 3 раза в день
Степень повреждения на 7-е сутки применения препарата	1	4	0	2	3
	2	4	2	3	2
	3	4	2	3	3
	4	3	2	2	2
	5	4	3	3	3
	6	4	3	2	3
	7	4	2	2	3
	8	4	3	2	3
	9	3	3	3	2
	10	4	3	2	2
	Среднее (M±m)	3,8±0,2	2,3±0,3*	2,4±0,2*	2,6±0,2*

Примечание: * – при $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Таким образом, исследование фармакологической активности глазных капель на основе субмикроструктурированного таурина выявило их высокую эффективность в

качестве антикатарального средства, при субконьюктивальном применении которого наиболее активен препарат № 1.

Резюме. Приведенные данные дают основание утверждать, что изучаемые модельные глазные капли на основе субмикроструктурированного таурина обладают выраженным защитным эффектом при визуальной оценке прозрачности хрусталика, не уступающим препарату сравнения – глазным каплям «Тауфон».

При анализе изображения хрусталика выявлено, что изучаемые модельные глазные капли на основе субмикроструктурированного таурина № 1 обладают наибольшей эффективностью среди представленных на исследование препаратов.

Таблица 3

Результаты анализа изображения хрусталика глаза крыс при изучении фармакологической активности изучаемых глазных капель

	№ животного	Контроль	№1	№2	Тауфон
			Дозировка		
			По 1 капле в каждый глаз 3 раза в день	По 1 капле в каждый глаз 3 раза в день	По 1 капле в каждый глаз 3 раза в день
Степень повреждения на 7-е сутки применения препарата	1	2,30	0,09	1,21	1,98
	2	2,92	1,21	1,50	1,23
	3	3,01	1,14	1,48	1,48
	4	1,98	1,18	1,07	1,57
	5	2,98	1,30	1,50	2,15
	6	2,40	1,75	1,68	2,11
	7	2,53	1,41	1,35	1,25
	8	2,12	1,94	1,55	1,67
	9	2,14	1,23	1,27	1,37
	10	2,48	1,16	1,11	1,55
	Среднее (M±m)	2,48±0,12	1,24±0,10*	1,37±0,06*	1,64±0,11*

Примечание: * – при $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., Государственный контракт № 14.740.11.0119 от 08.09.2010 г. «Комплексные фармакологические и технологические исследования ряда субмикроструктурированных (наноструктурированных) фармацевтических субстанций с доказанными измененными физико-химическими свойствами».

Литература

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.
2. Панов, С. Лечение в нанодиапазоне / С. Панов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://medstatia.ru/nanotexnologii-v-medicine/
3. Кузив, Т. Наночастицы: безопасны ли они? /Т. Кузив [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.mgzt.ru/article/844/
4. Приказ МЗ СССР № 1179 от 10 октября 1983 г. «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».

STUDYING OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF SUBMICROSTRUCTURED SUBSTANCE OF TAURINE

V.I. KOCHKAROV
O.O. NOVIKOV
E.T. ZHILYAKOVA
M.Yu. NOVIKOVA
O.S. VORONKOVA

Belgorod National Research University

e-mail: novikov@bsu.edu.ru

It is established hat the model eye drops with submicrostructured substance of taurine have a pronounced protective effect on the visual evaluation of lens transparency, not worse than the drug under comparison, eye drops, "Taufon".

Key words: taurine, submicrostructuring, cataract.

УДК 616.8-089

ЗНАЧЕНИЕ ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРИ ВЫБОРЕ ТАКТИКИ НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМАТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ

А.Г. МОГИЛЕВ

ГОУ ДПО Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования

email: rectorat@spbmapo.ru

В нейрохирургическом лечении симптоматической эпилепсии часто приходится решать, на что будет направлено оперативное вмешательство непосредственно во время операции. Интраоперационное нейрофизиологическое исследование: электрокортикография (ЭкоГ) и электросубкортикография (ЭСкоГ) позволяют определиться с выбором либо уточнением тактики проводимого оперативного вмешательства. В статье приведены данные об использовании вышеуказанных методик и их влиянии на результаты нейрохирургического лечения.

Ключевые слова: симптоматическая эпилепсия, электрокортикография, электросубкортикография, эпилептический очаг, эпилептический приступ, объемные образования головного мозга.

Введение. Симптоматическая эпилепсия часто встречается в нейрохирургической практике. Артериовенозные мальформации в 25-50% наблюдений проявляются эпилептическими припадками, при последствиях черепно-мозговой травмы эпилепсия наблюдается в 10-15% случаев [4, 5, 8], в резидуальном периоде нетравматического субарахноидального кровоизлиянии – в 3% случаев [7, 13].

После нейрохирургического лечения в 10-50% случаев остается судорожная активность [10, 21]. Использование противосудорожной терапии не всегда позволяет контролировать приступы, кроме того, часто наблюдается фармакорезистентность [2, 3, 9]. Отсутствие соответствия при анализе полученных данных дооперационной диагностики различных методов исследования в некоторых случаях затрудняет достоверное определение локализации эпилептического очага, и часто вариант оперативного лечения определяется уже по ходу самой операции. Кроме того большая нагрузка на нейрофизиологов не позволяет выполнять интраоперационную диагностику всем нуждающимся пациентам, так же редко удается выполнить ее при экстренных вмешательствах, выполняемых по жизненным показаниям [1, 5]

Вследствие этого проводится оперативное вмешательство, направленное только на патологический субстрат, либо нейрохирургическое влияние на очаг осуществляется на основе дооперационных методов диагностики. Всё это указывает на необходимость систематизации и комплексного изучения этой проблемы.

Цель исследования: определить влияние ЭЭГ, интраоперационного ЭКоГ и ЭСкоГ на тактику и дальнейшие ближайшие и отдаленные результаты нейрохирургического лечения больных симптоматической эпилепсией

Материал и методы. Приводятся данные наблюдения 69 пациентов от 18 до 78 лет с верифицированным диагнозом симптоматическая эпилепсия; находившихся на обследовании и лечении в РНХИ им. проф. А.Л. Поленова в период с 2006 по 2011 гг., подвергшихся открытому оперативному нейрохирургическому лечению (табл. 1).

Таблица 1

Возраст и пол больных симптоматической эпилепсией

Возраст	Количество больных			
	Женщины	Мужчины	Всего больных	Процент
18-28	11	16	27	39
28-38	9	12	21	30
38-48	6	7	13	19
48-58	2	3	5	8
68-78	1	2	3	4

Из табл. 1 следует, что большинство (около 80%) больных находились в трудоспособном возрасте – от 18 до 50 лет. Мужчин оказалось более 50 %. До операции всем больным провели комплексное обследование (психоневрологическое, ЭЭГ, СКТ, МРТ) [6, 10] с целью установления локализации эпилептогенных очагов. Топическую диагностику основывали на анамнестическом и клиническом изучении структуры приступа, данных неврологического осмотра, повторных ЭЭГ, в том числе с нагрузочными тестами, нейропсихологических и рентгенологических исследований.

В структуре пароксизмов наиболее часто встречались вторично генерализованные, простые парциальные припадки. Полиморфизм наблюдался у 18 больных (табл. 2).

Таблица 2

Распределение больных по виду приступов

Вид приступа	Количество наблюдений (абсолютное число), %
Парциальные простые	16-24%
Парциальные сложные	8-11%
Изолированные ауры	1-2 %
Судорожные вторично генерализованные	21-30%
Абсансы	2-3%
Миоклонии	3-4 %
Полиморфные	18-26 %
Всего	69-100%

Используемые нами предоперационные методы в разной степени позволяли выявить особенности патологического образования, латерализацию, размеры, структуру.

Широкое применение МРТ и высокопольной СКТ в различных модификациях существенно помогает в постановке диагноза, но к сожалению в полной мере не выявляет эпилептогенный очаг, который может располагаться на значительном расстоянии от патологического процесса. [15, 16] Наиболее точно установить локализацию эпилептического очага удалось в 45 случаях (65%), из них в 39 случаях локализация эпилептического очага четко совпала с локализацией патологического образования, что подтверждалось интраоперационно проведенными ЭкоГ и ЭСкоГ либо в дальнейшем при контрольных ЭЭГ исследованиях, на что указывается многими авторами [13, 11, 19].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что половина больных симптоматической эпилепсией в нашем наблюдении (52%) не нуждалась в дальнейшем интраоперационном нейрофизиологическом исследовании и была готова к оперативному лечению.

В основном это были больные с доброкачественными, четко отграниченными от мозга опухолями и патологическими сосудистыми образованиями АВМ и аневризмами. Примеры таких случаев даны на рис. 1, 2.

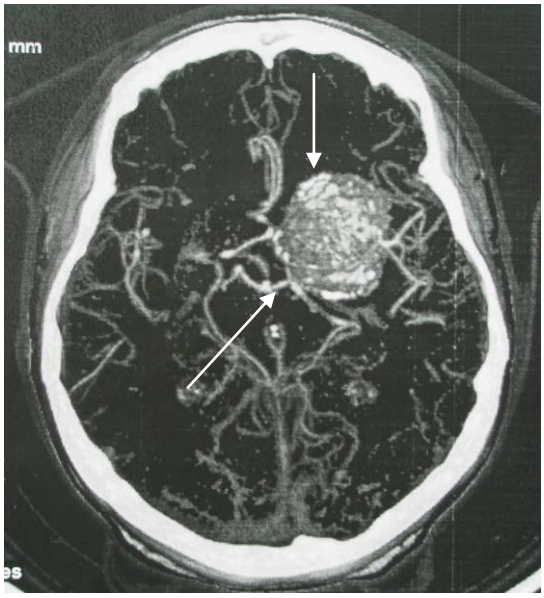


Рис. 1. МРТ ангиограмма больной М. Видна гигантская менингиома крыльев основной кости слева (указана стрелками).

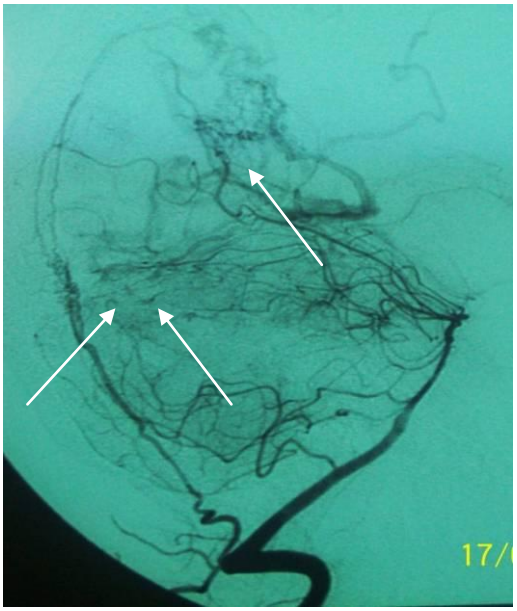


Рис. 2. СКТ ангиограмма больной К. Двумя стрелками указана АВМ в левой височной области. Стрелка вверху указывает на склерозирующий клей ONYX в сосудах АВМ.

Несмотря на достаточную информативность ЭЭГ, для более точного выявления эпилептического очага использовались ЭКоГ и ЭСкоГ.

Использование этих интраоперационных методов исследования у пациентов симптоматической эпилепсией привело у 6 (9%) пациентов к более точному установлению очага эпилептической активности. А из 24 пациентов с дооперационно не уточненным очагом эпилептической активности позволило определиться с точной локализацией в 75% случаев. При этом изменение тактики нейрохирургического лечения в процессе операции наблюдалось в 62% случаев у 15 пациентов. Это отмечают [12, 14, 20].

Клинический пример.

Больной М., 56 лет. Обратился с жалобами на частые, 5-9 раз в месяц, приступы по типу Джексоновских припадков справа.

На ЭЭГ (рис 3, 4) выявлены умеренно выраженные изменения биоэлектрической активности (БЭА). Нарушение рефлекторных реакций. Функциональная неустойчивость БЭА. Легкая ирритация стволовых структур. Диффузные дельта и тета-волны. Зональные отличия отсутствуют. Пароксизмальной активности не выявлено.

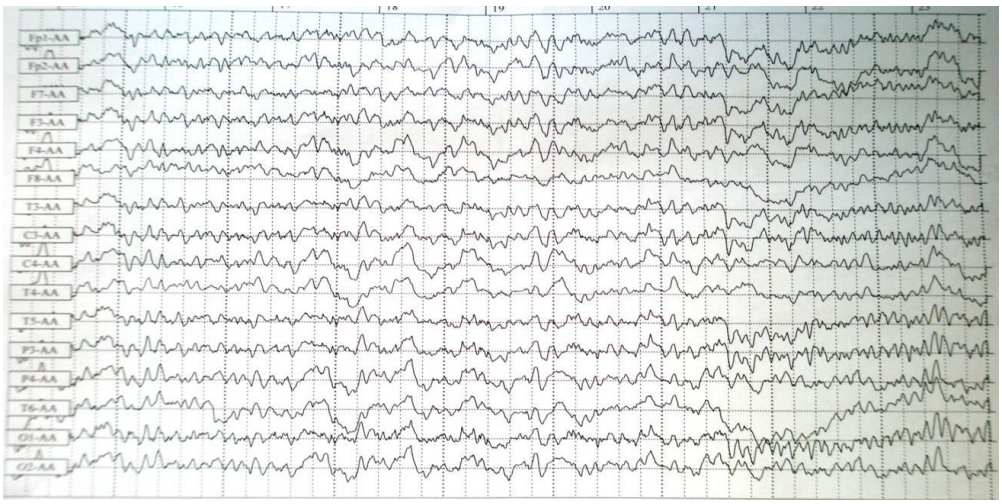


Рис. 3. Диффузные дельта и тета-волны на ЭЭГ

	Delta		Teta		Alfa		Beta1		Beta2	
	мкВ^2	Гц	мкВ^2	Гц	мкВ^2	Гц	мкВ^2	Гц	мкВ^2	Гц
Fp1-AA	27.17	2.25	18.05	7.00	10.46	7.50	2.33	17.00	1.30	20.00
Fp2-AA	42.71	1.50	16.58	5.00	13.22	8.75	2.82	16.25	1.12	20.00
F7-AA	18.85	2.25	10.53	7.00	9.04	11.25	1.65	17.00	0.79	20.50
F3-AA	24.76	2.25	16.72	7.00	10.46	8.75	2.80	17.00	1.33	20.00
Fz-AA	36.96	2.25	23.46	7.00	14.84	8.75	4.04	15.50	1.95	20.00
F4-AA	59.82	1.50	16.46	5.00	12.13	8.75	1.97	14.75	1.26	20.00
F8-AA	30.38	1.50	5.43	5.00	6.36	9.00	0.86	16.50	0.57	20.25
T3-AA	21.31	2.25	11.77	7.00	10.07	10.75	1.92	17.00	0.90	21.75
C3-AA	28.02	2.00	16.75	7.00	11.53	8.75	3.03	18.00	1.46	21.75
Cz-AA	43.20	2.00	21.42	7.25	12.85	8.75	2.66	14.50	1.41	20.00
C4-AA	76.72	1.50	13.88	7.00	10.70	8.75	1.28	14.00	0.97	20.00
T4-AA	53.38	1.50	6.68	6.25	7.30	9.00	0.93	14.00	0.57	20.00
T5-AA	21.09	2.00	9.99	5.50	12.29	10.75	1.81	18.00	1.13	22.00
P3-AA	28.60	2.00	14.11	7.00	14.94	8.75	2.46	18.00	1.46	22.00
Pz-AA	49.94	1.75	15.32	7.25	16.55	8.00	2.27	18.25	1.46	20.00
P4-AA	56.49	1.50	12.61	6.25	18.03	8.00	1.34	14.00	0.96	20.00
T6-AA	68.55	1.50	7.31	6.75	12.36	9.00	1.32	14.00	0.72	21.00
O1-AA	28.15	2.00	10.97	6.25	16.91	11.00	2.23	18.00	1.90	21.25
O2-AA	55.09	1.50	12.50	6.25	18.57	8.00	1.36	14.00	1.01	20.00

Рис. 4. Количественные характеристики волн по отведениям

На МРТ обнаружена гигантская менингиома левой теменной области.

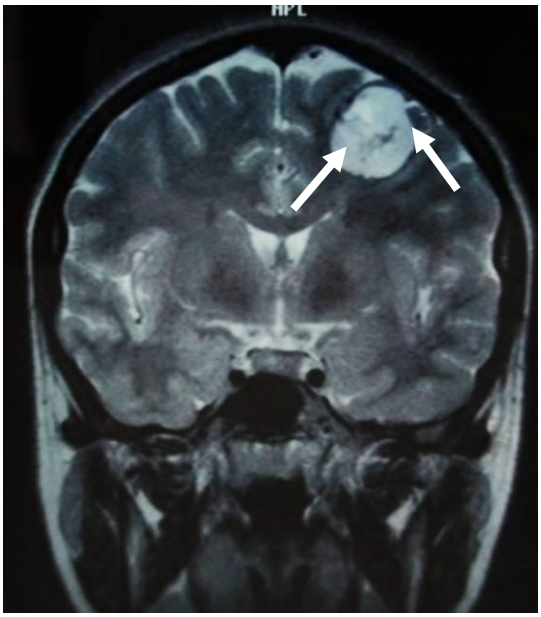


Рис .5. МРТ больного М. Видна гигантская менингиома теменной области слева (указана стрелками)

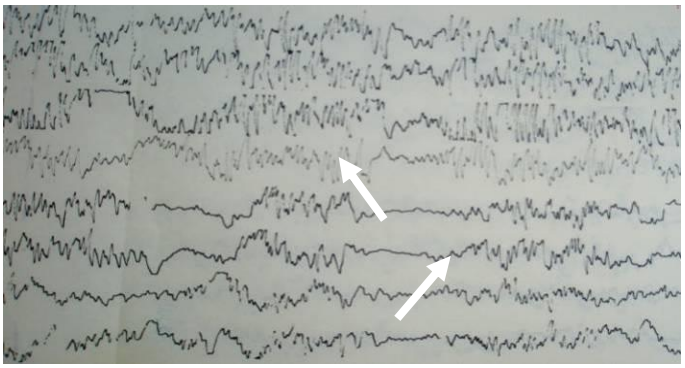


Рис. 6. На ЭКоГ выявлена медленноволновая активность в левой теменной области, при этом височная область не была затронута

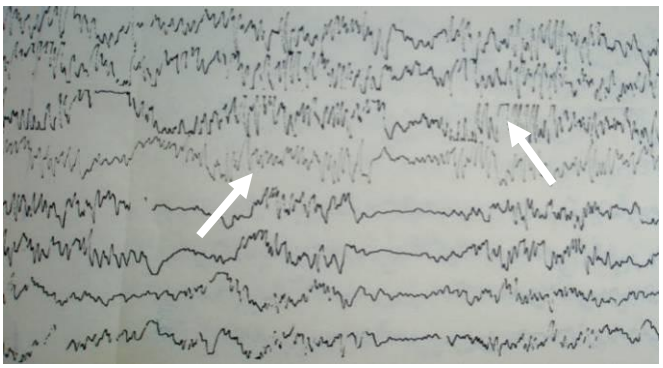


Рис. 7. На ЭСкоГ дополнительно выявлена медленноволновая активность в левой височной области, в области гиппокампа, поясной извилины, островка

В случае, описанном выше, хирурги планировали ограничиться удалением патологического образования, но во время операции, после проведения ЭКоГ и ЭСкоГ, пришлось выполнить дополнительно расширенную блок резекцию левой височной доли (рис. 8, 9, 10).

Рис. 8. Заключительный этап выделения менингиомы, освобождение транзиторно идущего сосуда (указан стрелкой)

Рис. 9. Ход височной лобэктомии

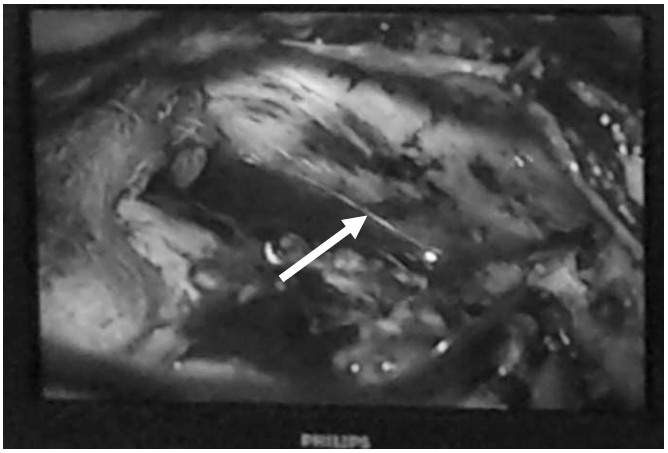


Рис. 10. Вид послеопреционной раны после расширенной микрохирургической резекции полюса левого виска (белой стрелкой указано большое крыло крыловидной кости)

На контрольной ЭКоГ во время операции эпилептической активности не выявлено.

В послеоперационном периоде больной чувствовал себя хорошо. Получал Депакин Хроно. Припадков не было. На контрольных ЭЭГ эпилептической активности так же не выявлено.

Наряду с плановыми оперативными вмешательствами у больных симптоматической эпилепсей в некоторых случаях проводятся экстренные оперативные вмешательства по жизненным показаниям. При этом в большинстве случаев не удается провести не только ЭКоГ или ЭСкоГ, но даже ЭЭГ ввиду отсутствия круглосуточного патронажа нейрофизиологическими бригадами большинства медицинских учреждений. В таких случаях нейрохирурги вынуждены полагаться только на свой опыт и самостоятельно принимать решение о типе оперативного вмешательства [3, 7]. При этом в 75-90% случаев приходится сталкиваться с тем, что нейрохирурги фокусируются только на патологическом образовании, не занимаясь поиском перифокальных эпилептических очагов, забывая о том, что в дальнейшем, при благоприятном исходе, возможно развитие эпилептического процесса [5, 6].

Результаты исследования представлены в виде алгоритма (рис. 11).

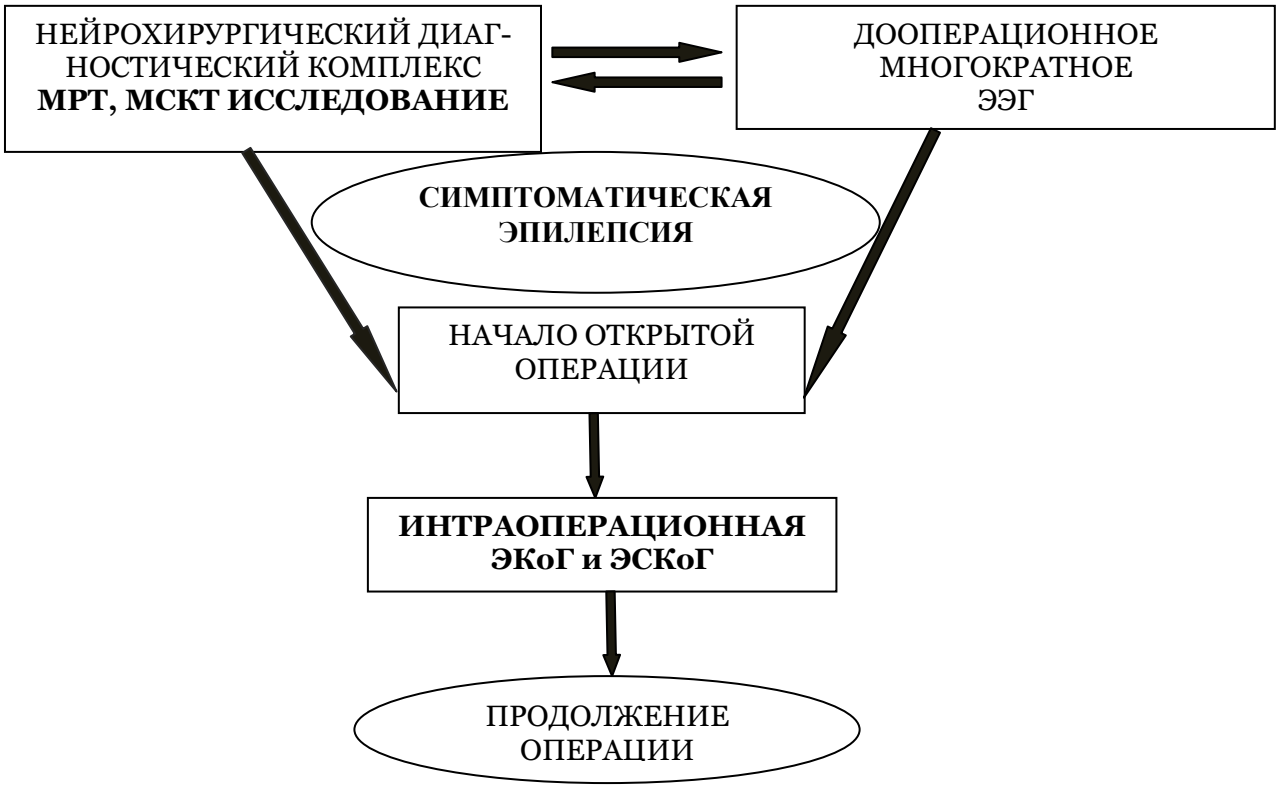


Рис. 11. Диагностические этапы, используемые в нейрохирургическом лечении симптоматической эпилепсии

Обсуждение. Все многообразие клинических пароксизмальных проявлений у каждого больного симптоматической эпилепсией должно быть систематизировано, и при подготовке к оперативному лечению должны быть выделены симптомокомплексы, представляющие очень важную информацию о локализации патологического процесса.

В комплекс обследования больных симптоматической эпилепсией для уточнения локализации эпилептического очага включаются современные электрофизиологические (электроэнцефалография, электрокортикография) и нейровизуализирующие методы исследования (магнитно-резонансная томография, компьютерная томография, однофотонная эмиссионная томография, магнитно-резонансная спектроскопия, позитронно-эмиссионная томография), уточняющие топику очага пароксизмальной активности, характер и локализацию структурных изменений в головном мозге. Только обна-

ружение устойчивого эпилептического очага при проведении клинических и электрофизиологических исследований с подтвержденно выявленными при этом различными структурными изменениями головного мозга определяют показания к хирургическому лечению.

Выводы.

1. У больных с симптоматической эпилепсией должна применяться дифференцированная тактика оперативных вмешательств, при этом выбор оптимального хирургического лечения следует производить на основании локализации эпилептического очага, выявляемого в процессе комплексного обследования.

2. Комплексный алгоритм обследования больных симптоматической эпилепсией должен быть разработан на основе общепринятых методик.

3. Отсутствие электронейрофизиологического интраоперационного мониторинга у больных симптоматической эпилепсией повышает риск возникновения эпилептических приступов после оперативного вмешательства.

4. Существуют определённые патологические образования в головном мозге, протекающие с эписиндромом и не требующие интраоперационного нейрофизиологического мониторинга.

Литература

1. Берснев, В.П. Хирургическое лечение эпилепсии / В.П. Берснев, Н.П. Рябуха [и др.] Эпилепсия / под ред. Н.Г. Незнанова. – СПб. : СПбНИПНИ им.Бехтерева, 2010. – Гл. 28. – С. 795-850.

2. Берснев, В.П. Электростимуляция как метод лечения эпилепсии / В.П. Берснев, С.Е. Карашуров, А.И. Дарвиш [и др.] // Материалы VI Междунар. конф. нейрохир. и неврол. – Хабаровск, 2004. – С. 36-38.

3. Броун, Т. Эпилепсия : клин. рук-во / Т. Броун, Г. Холмс. – М. : Изд-во БИНОМ, 2006. – 228 с.

4. Гусев, Е.И. Эпидемиология эпилепсии / Е.И. Гусев, А.Б. Гехт, Л.Б. Милчакова [и др.] // Эпилепсия / под ред. Н.Г. Незнанова. – СПб., 2010. – С. 51-64.

5. Дарвиш, А.А. Электростимуляция нервов синокаротидной рефлексогенной зоны в лечении эпилепсии : дис. ... канд. мед. наук / А.А. Дарвиш. – СПб., 2005. С. 27-89.

6. Дыскин, Д.Е. Современные аспекты диагностики и лечения посттравматической эпилепсии / Д.Е. Дыскин, М.М. Одинак [и др.] // Российский нейрохирургический журнал. – 2009. – Т. 1, № 2 – С. 76-80.

7. Касумов, В.Р. Диагностика и дифференцированная тактика хирургического лечения височной эпилепсии : дис. ... канд. мед. наук / В.Р. Касумов. – СПб., 2006. – С. 46-54.

8. Касумов, Р.Д. Каллозотомия в системе хирургического лечения сложных форм эпилепсии : пособие для врачей / Р.Д. Касумов, Т.С. Степанова, В.П. Берснев [и др.]. – СПб., 2005. – 25 с.

9. Касумов, Р.Д. Особенности диагностики и хирургического лечения лобной эпилепсии / Р.Д. Касумов, Т.С. Степанова, А.М. Мержоев [и др.] // Поленовские чтения : Материалы Всерос. науч.-практ. конф. – СПб., 2006. – С. 304-306.

10. Рябуха, Н.П. Клинико-электроэнцефалографическая диагностика и комбинированное лечение глиом головного мозга с эпилептическим синдромом : пособие для врачей / Н.П. Рябуха, В.П. Берснев, Т.С. Степанова. – СПб., 2003. – 16 с.

11. Рябуха, Н.П. Многоочаговая эпилепсия (этиопатогенез, клиника, диагностика и хирургическое лечение) / Н.П. Рябуха, В.П. Берснев. – СПб. : РНХИ им. проф. А.Л. Поленова Росмедтехнологий, 2009. – 217 с.

12. Степанова, Т.С. Каллозотомия в системе хирургического лечения сложных форм эпилепсии : псобие для врачей / Т.С. Степанова, В.П. Берснев, С.В.Кравцова [и др.]. – СПб., 2005. – 25 с.

13. Степанова, Т.С. Методы активации эпилептических очагов в ЭЭГ, ЭКоГ, ЭСКоГ перед и во время оперативного вмешательства : пособие для врачей / Т.С. Степанова, Р.Д. Касумов, В.П. Берснев [и др.]. – СПб., 2005. – 25 с.

14. Хачатрян, В.А. Диагностика и лечение прогредиентных форм эпилепсии / В.А. Хачатрян, В.П. Берснев, А.С. Шершевер [и др.]. – СПб. : Десятка, 2008 – 263 с.

15. Холин, А.В. Магнитно-резонанасная томография при заболеваниях центральной нервной системы / А.В. Холин. – СПб. : Гиппократ, 2007. – 256 с.

16. Черняк, З.В. Методы нейровизуализации в диагностике эпилепсии: по материалам журнала «Epilepsia» за 1998-2009 гг. / З.В. / Черняк / Неврол. журн. – 2009. – № 4. – С. 55-63.
17. Шершевер, А.С. Хирургическое лечение эпилепсии / А.С. Шершевер. – Екатеринбург, 2005. – 126 с.
18. Bauman, J.A. Multistage epilepsy surgery: sateti, effieaty and utility of novel approach pediatric extratemporal (epilepsy) / J.A. Bauman, E. Feoli, P. Romanelli et al. // J. Neurosurg. – 2008. – Vol. 62. – P. 489-503.
19. Epilepsy care in the word : Atlas. – World Health Organization, 2005. – P. 20-27.
20. Schramm, J. The surgery of epilepsy / J. Schramm, H. Clusman // J. Neurosurg. – 2008. – Vol. 62, № 2. – P. 469-481.

VALUE OF INTRAOPERATIVE ELECTROPHYSIOLOGICAL MONITORING FOR CHOICE TACTICS FOR NEUROSURGICAL TREATMENT OF SYMPTOMATIC EPILEPSY

A.G. MOGILEV

St-Petersburg Medical Academy of Postgraduate Studies, Russia

email: rectorat@spbmapo.ru

In neurosurgical treatment of a symptomatic epilepsy often it is necessary to solve during the operation immediately, what the operative measure will be referred to. Neurophysiological research: Electrocorticography and Electrosubcorticography allows to define the choice of tactics of the further operative measure. In the review the data of influence of using this sounded methods in neurosurgery is presented.

Key words: Symptomatic epilepsy, Electrocorticography, Electrosubcorticography, the epileptic center, an epileptic seizure, volume formations of a brain.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Аюпова Г.В.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России»
Алехин С.А.	–	кандидат медицинских наук, докторант кафедры хирургических болезней №2 Курского государственного медицинского университета
Батырова Е.Д.	–	соискатель кафедры фармации ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России»
Биченова К.А.	–	научный сотрудник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России
Благоразумная Е.Ю.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии ГОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия Росздрава»
Благоразумная Н.В.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии ГОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия Росздрава»
Блинова И.П.	–	кандидат химических наук, ассистент кафедры общей химии НИУ «БелГУ»
Бондарев А.В.	–	аспирант кафедры фармацевтической технологии, управления и экономики здравоохранения НИУ «БелГУ
Бубенчикова В.Н.	–	доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета
Васильев Г.В.	–	ассистент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Володина Т.А.	–	ассистент кафедры фармацевтической технологии с курсом фармакологии фармацевтического факультета. ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»
Галимова Д.Ф.	–	аспирант кафедры фармации ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России»
Гончарова Д.В.	–	студентка 2 курса фармацевтического факультета НИУ «БелГУ»
Гуреев В.В.	–	кандидат медицинских наук, докторант кафедры клинической фармакологии Курского государственного медицинского университета
Даниленко Л.М.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Дейнека В.И.	–	доктор химических наук, доцент, профессор кафедры общей химии НИУ «БелГУ»
Дейнека Л.А.	–	кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры общей химии НИУ «БелГУ»
Должиков А.А.	–	профессор, доктор медицинских наук, зав. кафедрой анатомии и гистологии человека НИУ «БелГУ»
Дудина А.С.	–	студентка фармацевтического факультета НИУ «БелГУ»
Егорова С.Н.	–	доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой фармации факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Казанского государственного медицинского университета
Жиленко В.Ю.	–	кандидат биологических наук, ассистент кафедры туризма и социально-культурного сервиса НИУ «БелГУ»
Жилякова Е.Т.	–	доктор фармацевтических наук, доцент, зав. кафедрой фармацевтической технологии, управления и экономики здравоохранения НИУ «БелГУ»
Индерова И.В.	–	студенка фармацевтического факультета НИУ «БелГУ»
Казакова В.С.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Каухова И.Е.	–	доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой промышленной технологии лекарственных препаратов Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии
Колесников Д.А.	–	ассистент кафедры физики НИУ «БелГУ»
Кондратова Ю.А.	–	кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета

Корокина Л.В.	–	кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренних болезней ИПМО НИУ «БелГУ»
Корочинский А.В.	–	главный технолог ООО «Витаукт-пром», г. Майкоп
Кочкаров В.И.	–	доктор биологических наук, профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Кузьминова А.В.	–	студентка фармацевтического факультета Курского государственного медицинского университета
Лавренчук Р.А.	–	научный сотрудник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России
Латыпова Г.М.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России»
Локтионов А.Л.	–	кандидат медицинских наук, докторант кафедры хирургических болезней №2 Курского государственного медицинского университета
Лушов К.А.	–	кандидат химических наук, доцент кафедры общей и биоорганической химии Курского государственного медицинского университета
Медведева Т.М.	–	аспирант кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, научный сотрудник отдела научно-исследовательских работ Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии
Минапов Л.Н.	–	аспирант кафедры фармации ФПК и ППС Казанского государственного медицинского университета
Могилев А.Г.	–	аспирант кафедры нейрохирургии Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования
Морозов Ю.А.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры технологии лекарственных форм и организации фармацевтического дела Северо-Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова
Мостовой А.С.	–	начальник лаборатории психофизиологического обеспечения филиала ОАО «Концерн Росэнергоатом» «Кольская АЭС»
Мячикова Н.И.	–	кандидат технических наук, доцент, зав. кафедрой технологии продуктов питания и сферы услуг НИУ «БелГУ»
Новиков О.О.	–	доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Новикова М.Ю. -	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии, управления и экономики здравоохранения НИУ «БелГУ»
Остроумов Ю.И.	–	научный сотрудник Института инженерной иммунологии, г. Москва
Пеньевская Н.А.	–	доктор медицинских наук, зав. кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия»
Писарев Д.И.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Писарева Н.А.	–	студентка фармацевтического факультета НИУ «БелГУ»
Полянская О.С.	–	аспирант кафедры фармакологии и фармацевтических наук ИПМО НИУ «БелГУ»
Покровский М.В.	–	доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин ИПМО НИУ «БелГУ»
Попов Н.Н.	–	студент фармацевтического факультета НИУ «БелГУ»
Романова З.В.	–	кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармации ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет
Сабиржан Р.Р.	–	аспирант кафедры фармации факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Казанского государственного медицинского университета
Саенко И.И.	–	магистрант кафедры общей химии НИУ «БелГУ»
Сакаева И.В.	–	кандидат фармацевтических наук, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Саканян Е.И.	–	доктор фармацевтических наук, профессор, директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП»

Сафонова И.А.	–	кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры общей и биоорганической химии Курского государственного медицинского университета
Светличная Е.Н.	–	студентка фармацевтического факультета НИУ «БелГУ»
Селютин О.А.	–	директор Центра контроля качества и сертификации лекарственных средств, г.Воронеж
Сорокопудов В.Н.	–	доктор сельскохозяйственных наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Сорокопудова О.А.	–	доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ»
Степанова А.В.	–	аспирант кафедры биотехнологии и микробиологии НИУ «БелГУ»
Степанова Д.В.	–	студентка геолого-географического факультета НИУ «БелГУ»
Степанова Э.Ф.	–	доктор фармацевтических наук, профессор кафедры технологии лекарств ГОУ ВПО «Пятигорская государственная фармацевтическая академия Росздрава»
Толочко Е.В.	–	аспирант кафедры технологии лекарств Национального фармацевтического университета, г. Харьков
Фадеева Д.А.	–	кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Федоров Е.О.	–	ассистент кафедры общей и биоорганической химии Курского государственного медицинского университета
Хабаров А.А.	–	доктор фармацевтических наук, профессор кафедры общей и биоорганической химии Курского государственного медицинского университета
Чахирова А.А.	–	кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры технологии лекарств Пятигорской государственной фармацевтической академии,
Чахирова В.А.	–	преподаватель кафедры технологии лекарств Пятигорской государственной фармацевтической академии
Чулков А.Н.	–	аспирант кафедры общей химии НИУ «БелГУ»
Чушенко В.Н.	–	доцент кафедры технологии лекарств Национального фармацевтического университета, Украина, г. Харьков
Шафикова С.Ф.	–	аспирант кафедры фармации ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет
Шестопалова Н.Н.	–	кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ»
Ярных Т.Г.	–	доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой технологии лекарств Национального фармацевтического университета
Яцюк В.Я.	–	доктор фармацевтических наук, профессор кафедры общей и биоорганической химии Курского государственного медицинского университета

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ

Уважаемые коллеги!

Продолжается прием статей для публикации в журнале «НАУЧНЫЕ ВЕДОМОСТИ Белгородского государственного университета» серии «Медицина. Фармация», который входит в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Материалы необходимо высылать в двух экземплярах:

- по адресу: Белгородский государственный университет. Медицинский факультет. Редакция серии журнала «Медицина. Фармация», ул. Победы, 85, г. Белгород, Россия, 308015;
- по e-mail: efremova.bgu@gmail.com или doctor_ol@bk.ru (тема – журнал).

Материалы, присланные без соблюдения настоящих требований, редколлегией не рассматриваются.

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ В ЖУРНАЛ «НАУЧНЫЕ ВЕДОМОСТИ БелГУ» СЕРИИ «МЕДИЦИНА. ФАРМАЦИЯ»

В материалы статьи включается следующая информация:

1) УДК научной статьи;
2) аннотация статьи (не более 1200 знаков);
3) ключевые слова;
4) сведения об авторах (Ф.И.О., должность с указанием места работы (без сокращений), ученая степень, ученое звание, почтовый адрес, адрес электронной почты (если имеется), контактные телефоны);

на русском и английском языках

5) внешняя рецензия доктора наук;
6) текст статьи;
7) ссылки.

на русском языке

Технические требования к оформлению текста

1. Текст набирается в Microsoft Word. Параметры станицы: лист А4, без переносов. Поля: правое – 2,0 см; левое – 3,0 см; нижнее – 2,0 см; верхнее – 2,0 см.

2. Шрифт: **Impact** (размер в УДК – 11 пт, в названии статьи – 14 пт, Ф.И.О авторов – 11 пт); текст – **Georgia** (размер в тексте – **11 пт**; в таблице – **9 пт**; в списке литературы – **10 пт)**.

3. Абзац: отступ 1,25 мм, выравнивание – по ширине; межстрочный интервал – одинарный.

4. Ссылки: номер ссылки размещается в квадратных скобках перед знаком препинания (перед запятой, точкой); нумерация – автоматическая, сквозная; текст сноски внизу каждой страницы; размер шрифта – 10 пт.

5. Объем статей: до **8 страниц.**

6. Статья должна иметь визу руководителя кафедры или института (на втором экземпляре). К текстовому варианту статьи прилагается версия в формате Word. На титульном листе статьи делается запись: «Текст вычитан, термины проверены», заверен-

ная подписями всех составителей. В конце статьи сообщаются фамилии, полные имена и отчества, места работы, должности, ученые степени, научные звания, контактные адреса и номера телефонов **всех** авторов.

7. При изложении результатов оригинальных исследований рекомендуется оформлять их по следующей схеме: введение, цель, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, выводы, список литературы.

8. При наличии большого количества ошибок текст возвращается составителям на доработку. Повторно в редакцию представляется готовый исправленный материал на диске и на бумаге, распечатанный в одном экземпляре. Для иногородних авторов возможна пересылка статьи по электронной почте.

9. Представляемый материал должен являться оригинальным, не публикованным ранее в других печатных изданиях.

10. Все буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть объяснены в тексте при первом использовании.

11. Указывать только международное название препаратов с маленькой буквы. Химические и математические формулы, дозировки, цитаты визируются автором. Единицы измерения приводятся в метрической системе СИ.

12. При написании десятичных чисел для обозначения разрядов использовать только запятые (0,5 или 25,45 и т.д.). Писать без пропуска: «%»(10%), «больше»—«меньше» (p>0,05), «±» (0,3±7). Тире между цифрами использовать без пропуска (10–20%). Сокращения года давать как: 2001 г., 1998-2005 гг.

13. Изображение графического объекта не должно выходить за пределы полей страницы и не должно превышать одной страницы.

14. Рисунки, фотографии, рентгенограммы вставляются в текст после ссылки на них, но не далее следующей страницы. Графические файлы рекомендуется сохранять в режимах TIFF, PCX, JPG; если нет возможности обработать иллюстрацию самостоятельно, следует вложить ее в текстовый оригинал с указанием номера и места в работе; она должна иметь четкое, контрастное изображение (зернистость мешает обработке и не позволяет добиться хорошего результата); обязательна последовательная нумерация иллюстраций в соответствии с расположением в тексте; рентгенограммы должны хорошо читаться на просвет и не иметь значительных повреждений в рабочей зоне.

15. Все ссылки на исследования и работы других авторов приводятся в квадратных скобках, с нумерацией согласно соответствующему документу в списке литературы.

16. Библиографический список должен содержать работы за последние 7 лет. Лишь в случае необходимости допускаются ссылки на отдельные более ранние публикации. В оригинальных статьях цитируется не более 20, а в передовых статьях и обзорах литературы – не более 40 источников. В список литературы не включаются неопубликованные работы.

17. Список литературы к статье должен соответствовать стандарту библиографического описания ГОСТ 7.1-2003 "Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления". Литературные источники необходимо перечислять в алфавитном порядке или в порядке упоминания в статье.

18. Требования к оформлению статей, таблиц, рисунков приведены в прил. 1, 2, 3.

Условия публикации. В одном номере журнала каждым автором (авторским коллективом) может быть опубликовано не более двух статей.

Приложение 1. **Оформление статьи**

УДК 616.36

ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕДИАТОРЫ СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ

А.В. ИВАНОВ[1]
Л.Н. ПЕТРОВ[2]

[1] Белгородский государственный национальный исследовательский университет

[2] МУЗ «Городская больница №2», г. Белгород

e-mail: aybolit@bk.ru

В статье изложены данные о молекулярных нарушениях при стеатозе печени и неалкогольном стеатогепатите. Синтез жирных кислот в печени регулируется инсулином и глюкозой с помощью активации липогенеза связанными с мембраной медиаторами транскрипции – белка, связывающегося с регуляторным элементом стерола-1с и белка, который связывается с карбогидрат-ответственным элементом. Третьим фактором транскрипции, причастным к развитию стеатоза печени, признан рецептор, активирующийся пролифератором пероксисом. Совокупность таких факторов можно объединить в две большие категории: факторы, которые вызывают повышение окислительного стресса, и экспрессы провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: стеатоз печени, стеатогепатит, окислительный стресс, цитокины, жирные кислоты, факторы транскрипции.

Далее идет текст статьи:

Инсулинорезистентность (ИР), ожирение, диабет, дислипопротеидемия и неалкогольная жировая печень – компоненты метаболического синдрома, комплексной болезни, приобретающей широкую распространенность [1, 3, 6].

TRANSCRIPTION FACTORS AND MOLECULAR MEDIATORS OF HEPATIC STEATOSIS

A.V. IVANOV[1]
L.N. PETROV[2]

[1] Belgorod National Research University

[2] Municipal hospital №2, Belgorod

e-mail: aybolit@bk.ru

In the review the data on molecular events contributing to hepatic steatosis and nonalcoholic steatohepatitis have been presented. Synthesis of fatty acids in liver is regulated independently by insulin and glucose with activation of lipogenesis of transcriptionally mediated by the membrane-bound transcription factors – sterol regulatory element-binding protein-1 c and carbohydrate response element-binding protein. The third transcription factor that participates in the development hepatic steatosis is peroxisome proliferator-activated receptors. A large number of these factors can be grouped into two big categories: factors causing an increase in oxidative stress and factors promoting expression of pro-inflammatory cytokines

Key words: hepatic steatosis, steatohepatitis, oxidative stress, cytokines, fatty acids, transcription factors.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванов Александр Васильевич кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренних болезней НИУ «БелГУ»
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ «БелГУ»
e-mail: aybolit@bk.ru, тел. 33-22-44

Приложение 2. **Оформление таблиц**

1. Каждая таблица должна быть пронумерована справа, иметь заголовок в полужирном наборе, расположенный по центру вверху.
2. Таблицы не должны выходить за границы полей страницы слева и справа.
3. Если таблица располагается на двух страницах, ее столбцы должны быть пронумерованы на каждой новой странице так же, как на первой.
4. Большие горизонтальные таблицы необходимо набирать в этом же файле, выбрав альбомный параметр страницы.

Таблица 1

Рейтинговая оценка ЦФО за 1999-2004 гг., баллы

Регионы	1999 г.	2000 г.	2001 г.	2002 г.	2003 г.	2004 г.	В среднем за	
							1999-2001 гг.	2002-2004 гг.
1	2	3	4	5	6	7	8	9
РФ	1,3222	1,5091	1,3470	1,4661	1,5940	1,6954	1,3928	1,5852
ЦФО	1,5028	1,9389	1,7210	1,6149	1,6888	1,6930	1,7209	1,6656

Таблица, расположенная на первой странице.

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Белгородская область	1,2620	0,4169	2,2612	1,0176	1,2012	0,6413	1,3134	0,9534
Брянская область	0,9726	0,4817	0,5612	1,8653	0,9064	1,6898	0,6718	1,4872

Таблица, расположенная на следующей странице.

Приложение 3. **Оформление графических объектов**

1. Изображение каждого графического объекта должно иметь номер и заголовок, расположенные по центру рисунка внизу.

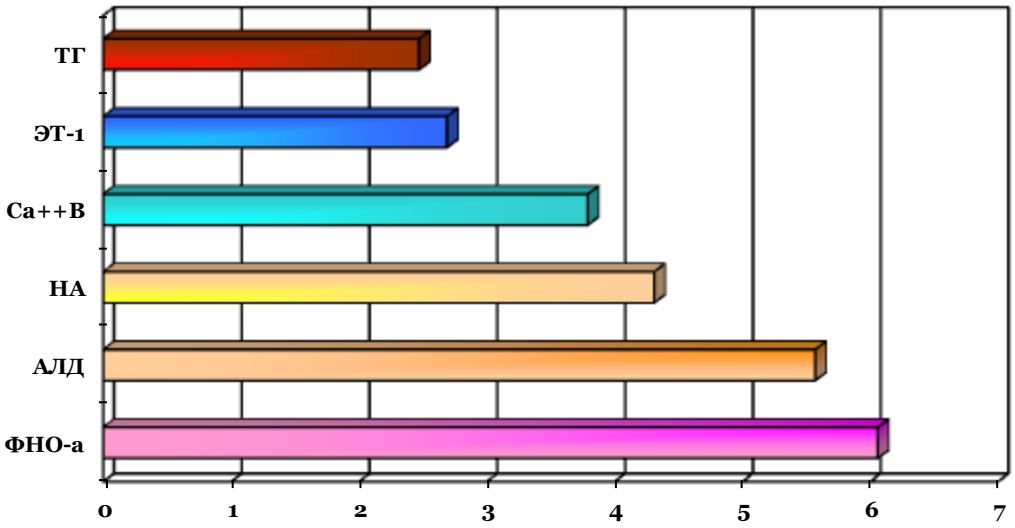


Рис. 1. Степень разницы значений гуморальных показателей между группами больных эксцентрической и концентрической ГЛЖ

2. Изображение графического объекта должно быть в виде рисунка или сгруппированных объектов.

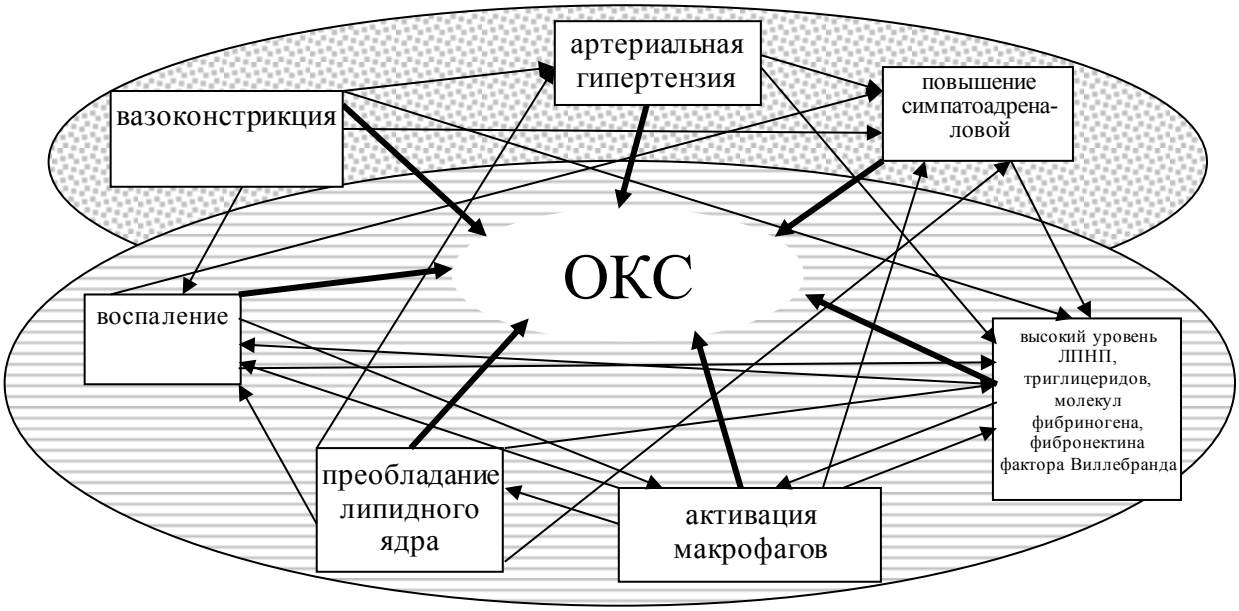


Рис. 2. Факторы, способствующие развитию ОКС

Редакция оставляет за собой право сокращения и исправления присланных статей. Статьи, отосланные авторам для доработки, должны снова поступить в редакцию не позднее, чем через 10 дней после получения. Возвращение статьи в более поздние сроки соответственно меняет и дату ее поступления в редакцию.