

На правах рукописи

Коломиец Наталья Эдуардовна

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ХИМИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА EQUISETUM**

15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Томск-2003

Работа выполнена на кафедре фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Сибирского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор фармацевтических наук, профессор
Дмитрук С.Е.

Официальные оппоненты: доктор фармацевтических наук, профессор
Куркин В.А.
доктор биологических наук, профессор
Березовская Т.П.

Ведущая организация: Иркутский государственный медицинский университет

Защита состоится “ ” _____ 2003 г. в ____ час. на заседании Диссертационного совета Д 208.096.04 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г.Томск, Московский тракт, 2/7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (г.Томск, пр.Ленина,107).

Автореферат разослан “ ” _____ 2003 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор

М.С.Юсубов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Растения рода *Equisetum*, как лекарственные, издавна пользуются большой популярностью у народов мира. Они широко используются в ветеринарии, сельском хозяйстве и промышленности. На территории РФ по разным оценкам описано от 11 до 18 видов рода *Equisetum*, из которых в Западной Сибири встречаются 8. ГФ XI разрешает заготовку только одного вида – хвоща полевого, считая другие виды возможными примесями. Однако заготовители допускают сбор неофициальных видов хвощей, затрудняясь в их распознавании. Это объясняется морфологическим сходством и совмещенными ареалами различных видов хвоща. В связи с этим представляет интерес и необходимость сравнительного химического и фармакологического изучения растений рода хвощ для обоснования возможности их использования в медицинской практике. Кроме того, учитывая многовековой опыт использования травы хвоща полевого в медицинской практике в виде водного настоя представляло интерес разработать рациональную лекарственную форму в виде жидкого экстракта.

Цель работы. На основании результатов сравнительного химико-фармакологического исследования доказать возможность практического использования видов рода хвощ флоры Западной Сибири в медицине и предложить рациональный способ получения экстракционных препаратов из травы хвоща полевого.

Для достижения поставленной цели предусматривалось решение следующих задач:

- провести сравнительное изучение химического состава, фармакологических свойств растений рода хвощ, с целью определения перспективных видов;
- провести углубленное химическое исследование основных групп БАВ, содержащихся в растениях рода хвощ;
- разработать рациональную технологию получения жидкого экстракта из травы хвоща полевого и дать оценку его фармакологических свойств;
- получить на основе жидкого экстракта хвоща полевого гранулы и разработать показатели качества для предложенных лекарственных форм;
- разработать проект ФС "Трава хвоща полевого" с дополнительными показателями качества сырья по содержанию действующих веществ.

Научная новизна. Впервые проведен сравнительный химико-фармакологический анализ биологически активных комплексов 6 видов рода хвощ, широко распространенных в Сибирском регионе.

Впервые установлено содержание полисахаридов, витамина К, макро- и микроэлементов, в том числе тяжелых металлов; для хвоща лесного, х.лугового, х.зимующего, х.болотного и х.речного впервые изучено содержание сапонинов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, каротиноидов и выявлено различие в их составе.

В число признаков научной новизны выполненной работы следует отнести и то, что впервые для суммарных комплексов, выделенных из 6 видов рода хвощ дана оценка противогрибковой, антибактериальной активности,

антикластогенных свойств. Экспериментально доказана безвредность их водных экстрактов, в том числе и хвоща болотного.

Теоретически обоснована технология экстракционного препарата (жидкого экстракта) из травы хвоща полевого и гранул на его основе. Установлено, что диуретическое действие жидкого экстракта не сопровождается натрийуретическим эффектом.

Впервые установлено, что жидкий экстракт хвоща полевого способен препятствовать развитию острого токсического гепатита.

Практическая значимость работы.

Углубленное химическое исследование хвоща полевого позволило усовершенствовать нормативную документацию на данный вид сырья и предложить дополнительные числовые показатели – содержание действующих и экстрактивных веществ. Предложена сквозная стандартизация сырья, субстанции и лекарственной формы хвоща полевого по содержанию флавоноидов.

Показана возможность использования этанольного экстракта хвоща полевого не только как диуретического средства, но и как гепатопротектора.

Результаты экспериментальных исследований легли в основу проекта ФС "Трава хвоща полевого".

Экспериментальные исследования показали перспективность дальнейшего фармакологического исследования хвоща полевого, х.лесного, х.лугового, х.болотного, х.речного и х.зимующего с целью их использования в медицинской практике в качестве антигрибковых, антибактериальных, антикластогенных средств.

На защиту выносятся.

- ✓ Результаты сравнительного химического изучения надземной части растений шести видов рода хвощ, произрастающих на территории Западной Сибири.
- ✓ Результаты фармакологического исследования фармакопейного и нефармакопейных видов хвоща.
- ✓ Данные экспериментальных исследований по разработке подходов к стандартизации сырья и препаратов из травы хвоща полевого.
- ✓ Данные исследований по разработке рациональной технологии получения экстракционного препарата из травы хвоща полевого и оценки его фармакологических свойств.

Апробация работы. Основные положения диссертации обсуждались: на научно-практической конференции, посвященной 80-летию фармацевтической службы Самарской области, Самарского государственного медицинского университета и Самарского аптечного склада "Современные тенденции развития фармации" (Самара, 1999); Международной научной конференции "Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности" (Томск, 2000); первой Международной юбилейной конференции, посвященной 110-летию со дня открытия проф. К.Н.Виноградовым сибирской двуустки у человека "Актуальные проблемы

инфектологии и паразитологии" (Томск, 2001); Международной конференции молодых ученых "Леса Евразии в III тысячелетии" (Москва, 2001); Всероссийской научно-технической конференции "Лекарственные средства и пищевые добавки на основе растительного сырья" (Бийск, 2001); Международной конференции молодых врачей "Young doctors on the third millennium" (Ереван, Армения, 2001); Первом съезде микологов "Современная микология в России" (Москва, 2002).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Работа "Сравнительное химико-фармакологическое исследование растений рода Equisetum" выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и экологии Сибирского Государственного медицинского университета и в рамках комплексной целевой программы СО АМН РФ "Здоровье человека в Сибири" (№ Гос.регистрации 01.9.2002479).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 1 в зарубежной печати, 2 работы приняты в редакциях к опубликованию.

Объем и структура диссертационной работы. Материалы исследования изложены на 156 страницах машинописного текста. В тексте приведена 41 таблица и 15 рисунков. Библиографический указатель включает 163 источника литературы, из них 40 зарубежной.

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка использованной литературы и приложения.

В первой главе приведены сведения об ареалах, степени химической изученности исследуемых видов; их использовании в народной и официальной медицине и других отраслях; обоснована цель диссертационной работы.

Вторая глава посвящена описанию объектов исследования и методов химического и фармакологического анализа.

В третьей главе изложены материалы сравнительного фармакологического исследования суммарных комплексов, выделенных из 6 исследуемых растений по различным тестам, качественного состава и количественного содержания БАВ, содержащихся в растениях рода Equisetum; выделения и установления структуры флавоноидов и дана оценка перспективности нефармакопейных видов.

В четвертой главе приведены материалы разработки методов стандартизации травы хвоща полевого.

Пятая глава посвящена разработке рациональной технологии получения из травы хвоща полевого жидкого экстракта и гранул на его основе. Приведены материалы оценки фармакологических свойств полученной лекарственной формы.

В приложении представлен проект ФС "Трава хвоща полевого", предлагаемый взамен ст-50 ГФ XI издания.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методики исследования

Объектами исследования являлись надземные части дикорастущих растений рода *Equisetum* (*Equisetum arvense*, *Equisetum sylvaticum*, *Equisetum pratense*, *Equisetum palustre*, *Equisetum hiemale*, *Equisetum fluviatile*), собранные в различных районах сибирского региона (Томская, Кемеровская, Новосибирская области, Республика Алтай) в течение лета 1998-2000 гг., а также отдельные образцы промышленных партий травы хвоща полевого.

Фитохимическое исследование было проведено с помощью методов избирательной жидкостной экстракции, хроматографии, колоночной хроматографии, фотоэлектроколориметрии и УФ-спектрофотометрии.

Для оценки перспективности выбранных объектов исследования были проведены фармакологические испытания по таким тестам как безвредность, диуретическая, антикластогенная, гепатопротекторная, противогрибковая и антибактериальная активность.

Исследование диуретического действия проводили на кафедре фармакологии Алтайского государственного медицинского университета (г.Барнаул) под руководством проф.Зверева Я.Ф., за что выражаем ему искреннюю благодарность.

Фармакологические исследования по вышеуказанным тестам проводили с использованием принятых для этих целей методик и моделей. В экспериментах использовали 190 мышей и 67 крыс.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили общепринятым методом с определением средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической (m). Достоверность результатов оценивали параметрически по t -критерию Стьюдента. Кроме того, использовали пакет статистических программ "Statistica for Windows 7,0".

Сравнительное химическое исследование хвощей флоры Сибири

Сравнительный химический анализ 6 видов растений рода хвощ проведен на содержание флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, полисахаридов, каротиноидов, витамина К, сапонинов, аминокислот, химических элементов, соединений кремния.

Результаты выполненных исследований показали (табл.1), что существуют межвидовые различия в содержании отдельных групп БАВ. По накоплению основных групп БАВ в большинстве случаев выделяются хвощ полевой и хвощ зимующий. В первом из них накапливается больше всего полисахаридов (11,42%), витамина К (0,34%), аминокислот (0,53%), флавоноидов (1,39%); в другом соответственно меньше всех перечисленных групп БАВ (см.табл1), однако на фоне других видов хвощ зимующий значительно отличается по накоплению кремния (4,04%). Следует отметить и хвощ болотный, как вид, накапливающий более всех других сапонины (8,92%); каротиноиды (5,75мг/%) и фенолоксилоксины (0,72%).

Таблица 1 - Результаты количественного определения основных групп БАВ в растениях рода *Equisetum* (% на абс.-сухое сырье)

Группы БАВ/ Виды	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Equisetum sylvaticum</i>	<i>Equisetum pratense</i>	<i>Equisetum palustre</i>	<i>Equisetum hiemale</i>	<i>Equisetum fluviatile</i>
Полисахариды	11,42±0,19	5,96±0,26	6,33±0,20	5,98±0,22	4,19±0,07	6,08±0,14
Фенольные соединения (окисляемые в-ва)	2,58±0,51	2,17±0,21	2,56±0,53	2,54±0,20	0,71±0,19	2,27±0,20
Флавоноиды	1,39±0,04	0,91±0,005	0,99±0,018	1,11±0,01	0,16±0,009	1,21±0,004
Фенолкарбоновые кислоты	0,57±0,02	0,59±0,07	0,53±0,05	0,72±0,01	0,062±0,00	0,71±0,02
Каротиноиды мг/%	4,78±0,72	3,89±0,24	2,63±0,11	5,75±0,31	0,54±0,04	4,83±0,21
Витамин К	0,22±0,006	0,27±0,01	0,32±0,01	0,28±0,01	0,29±0,01	0,34±0,02
Сапонины	7,37±0,31	7,20±0,24	7,28±0,21	8,92±0,17	6,75±0,25	7,86±0,19
Аминокислоты	0,53±0,02	0,38±0,02	0,43±0,009	0,46±0,01	0,26±0,01	0,32±0,01
Соединения кремния	1,31±0,15	1,16±0,05	1,55±0,08	2,00±0,06	4,04±0,11	2,59±0,11

Естественно, что для обоснования фармакологических свойств, проведения стандартизации сырья и полученных препаратов интерес представлял компонентный состав БАВ.

В результате выполненных исследований установлено, что полисахаридный комплекс представлен водорастворимыми полисахаридами (0,13-4,41%), пектиновыми веществами (0,17-1,25%), гемицеллюлозой А (1,82-4,92%), гемицеллюлозой Б (0,39-1,40%), мономерными единицами которых являются глюкоза, арабиноза, ксилоза, галактоза и глюкоуроновая кислота.

Установленный хроматографически качественный аминокислотный состав показал, что в исследуемых видах присутствуют глутаминовая кислота, аргинин, валин, фенилаланин, аланин, пролин.

Минеральный состав растений рода хвощ выполненный двумя методами (рентгено-флуоресцентным и нейтронно-активационным) позволил установить, что элементный состав исследуемых видов представлен 33 химическими элементами. При этом у всех видов

преобладали Br, Zn, Ni, Co, Ba, Ca, Na, Fe, Zn. Остальные химические элементы содержались в концентрации менее 1,5 мг/кг.

Сравнительный анализ хроматограмм исследуемых видов хвощей показал их различие в составе флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. Так, например, при исследовании экстрактов методами одномерной и двумерной хроматографии было установлено, что число фенольных соединений у хвоща полевого составляет не менее 18 веществ; у хвоща лугового и хвоща болотного не менее 11; у хвоща речного не менее 12 веществ; и у хвощей зимующего и лесного не менее 10. По характерному свечению в УФ-свете до и после проявления соответствующими реактивами к веществам флавоноидной природы можно отнести 11 веществ для хвоща полевого; 6-для хвоща болотного; 5-для других видов. Остальные пятна нами отнесены к фенолокислотам.

Для уточнения природы флавоноидов использовали хроматографию в тонком слое сорбента (рис.1). При этом подтверждено, что 3 вещества по характерному хроматографическому поведению (окраске пятен в УФ-свете до и после проявления хроматограммы спиртовым раствором алюминия хлорида) можно отнести к 5-оксифлавонам. Данные флавоноиды в достаточном количестве обнаружены только в хвоще полевом. В других видах они содержатся в следовых количествах, что противоречит данным литературы (Saleh,1972; Сырчина,1974; Пинеев и др.,1998), по которым в неофициальных видах 5-оксифлавоны отсутствуют.

По нашим данным наиболее близким по химическому составу к хвощу полевому является хвощ речной. При исследовании некоторых образцов хвоща полевого и хвоща речного, собранных в местах совместного произрастания были получены идентичные хроматограммы. Данный факт можно объяснить тем, что в природе эти виды образуют гибрид *Equisetum x litorale* Kuhlewein, чем возможно и объясняется его сходство с хвощом полевым.

Таким образом, на основании хроматографического исследования был сделан вывод о значительных различиях в составе флавоноидов исследуемых видов хвоща. Для подтверждения данного предположения нами было предпринято их выделение методом колоночной хроматографии по общепринятой схеме. Для этого исследуемое сырье трижды экстрагировали 70% этанолом. Затем подвергали дифференциальной экстракции хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом. Полученные фракции использовали для выделения индивидуальных веществ на колонках с полиамидом (рис.2).

Структуру выделенных соединений устанавливали спектрофотометрическим методом, с использованием комплексообразующих и ионизирующих добавок, а также сравнением с известными веществами. При этом были идентифицированы такие вещества как нарингенин, апигенин, сапонаретин, кемпферол, кверцетин, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид (табл.2). Распределение выделенных нами флавоноидов по видам хвоща представлено в таблице 3. Общими для всех видов являются 8 веществ (нарингенин,

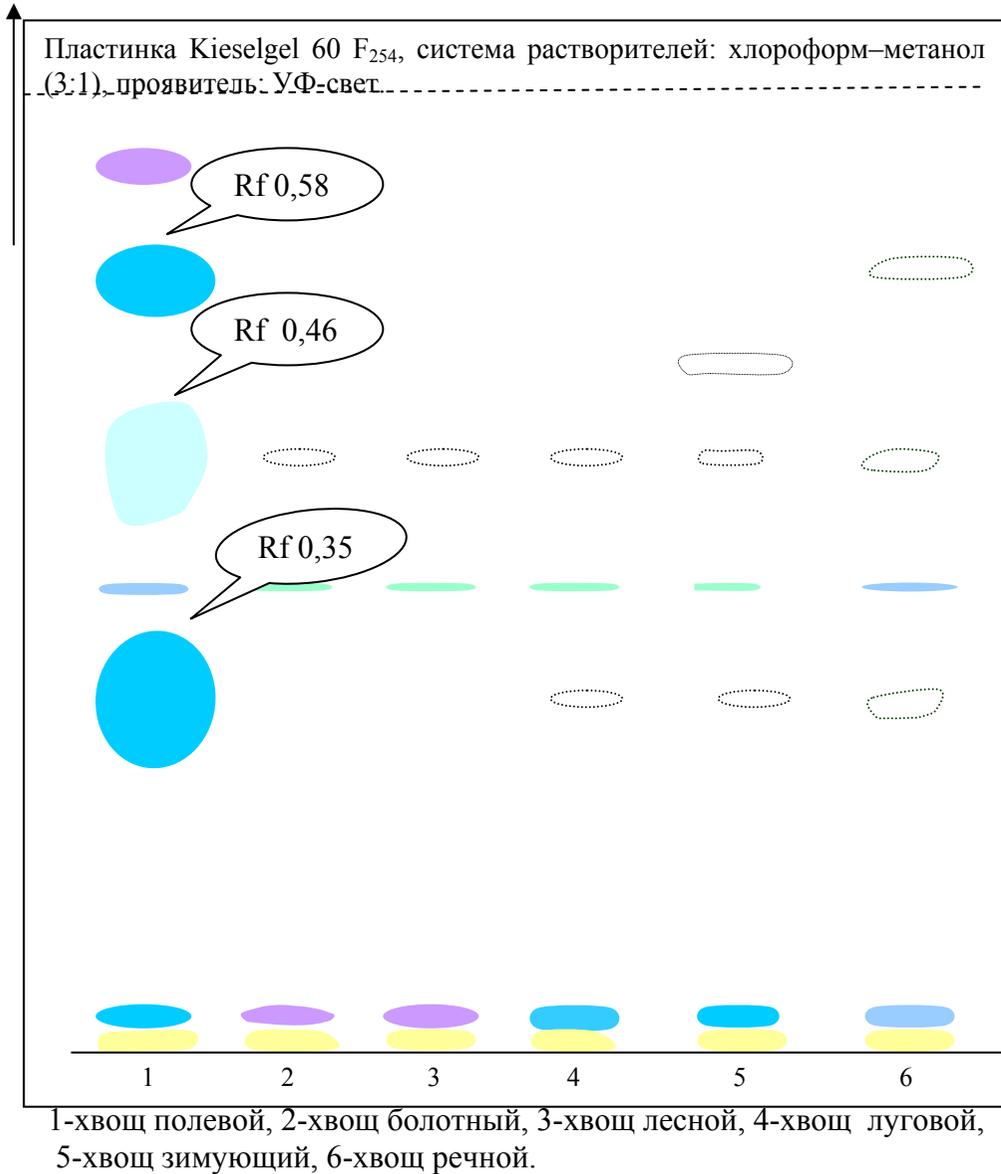


Рисунок 1- Схема хроматограммы этанольных экстрактов хвоща

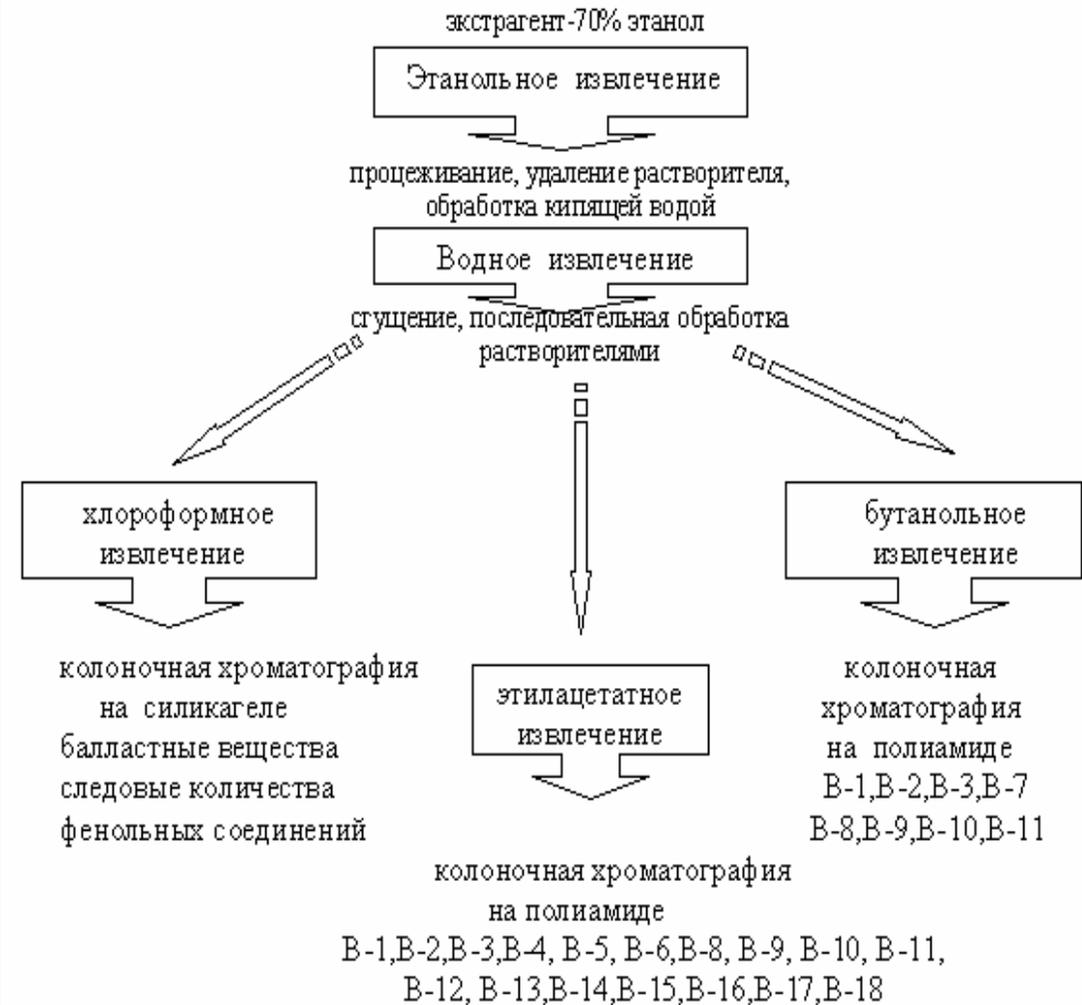


Рисунок 2–Схема выделения фенольных соединений

Таблица 2 - Спектральные характеристики флавоноидов, выделенных из видов рода хвощ

Вещество	Данные УФ-спектроскопии, нм					
	Абсолютный метанол	Ионизирующие и комплексообразующие добавки				
		CH ₃ COONa	CH ₃ COONa+ H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ +HCl	CH ₃ ONa
В-1-Нарингенин (4,5,7-триоксифлаванон)	289, 326 пл	284 пл, 323, 323	290, 332 пл	312, 375	311, 371	285,329
В-2- Апигенин (5,7,4'-триоксифлаванон)	267, 296 пл, 336	274, 301, 376	268, 300 пл, 338	267, 301, 348, 384	276, 300, 340, 381	275, 328, 392
В-3- Лютеолин (5,7,3',4'-тетраоксифлаванон)	254, 270 пл, 350	270, 380	263, 378	275, 430	265, 372, 300 плечо, 364, 385	272, 420
В-7- Сапонаретин (5,7,4'- тригидрокси-6-С-β-D-глюкопиранозилфлаванон)	273,335	279, 303, 385	274, 346, 408 пл	262 пл, 278, 304, 352, 382	260 пл, 280, 302, 344, 380	397, 330, 277
В- 8- Кемпферол (3,5,7,4'-тетраоксифлаванон)	259, 329 253 пл, 266, 294	274, 303, 387	267, 297 пл, 320 пл, 372	260 пл, 268, 303 пл, 350, 424	256, 260, 303, 348, 424	240, 310
В- 9- Кверцетин (3',4',5,7- тетраоксифлавонол)	255, 269 пл, 301 пл, 370	257 пл, 276, 322 пл, 382	272, 303 пл, 388	272, 304 пл, 333, 425	265, 301 пл, 359, 428	320, 240
В-10- Кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид	258, 365	275, 380	265, 383	273, 424	270, 364	275, 400

Таблица 3 - Результаты хроматографического исследования флавоноидов и фенолкарбоновых кислот растений рода хвощ

Вещество	Виды					
	<i>Equisetum arvense</i>	<i>Equisetum sylvaticum</i>	<i>Equisetum pratense</i>	<i>Equisetum palustre</i>	<i>Equisetum hiemale</i>	<i>Equisetum fluviatile</i>
В-1 нарингенин	+	+	+	+	+	+
В-2 апигенин	+	+	+	+	+	+
В-3 лютеолин	+	-	-	-	-	-
В-4 генкванин-5-О-β-D-глюкопиранозид	+	-	-	-	-	-
В-5 апигенин-5-О-β-D-глюкопиранозид	+	-	-	-	-	-
В-6 лютеолин-5-О-β-D-глюкопиранозид	+	-	-	-	-	-
В-7 сапонаретин	+	+	+	+	+	+
В-8 кемпферол	+	-	-	-	-	-
В-9 кверцетин	+	-	-	+	-	-
В-10 дигидрокемпферол	+	+	+	+	+	+
В-11 дигидрокверцетин	+	+	+	+	+	+
В-12 п-оксибензойная кислота	+	+	+	+	+	+
В-13 протокатеховая кислота	+	+	+	+	+	+
В-14 ванилиновая кислота	+	+	+	+	-	+
В-15 галловая кислота	+	-	-	-	-	+
В-16 п-кумаровая кислота	+	+	+	+	+	+
В-17 феруловая кислота	+	-	+	-	+	+
В-18 кофейная кислота	+	+	+	+	+	+

Примечание : “+” – вещество присутствует; “-” – вещество не обнаружено.

апигенин, кемпферол-3-О-β-D-софорозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, сапонаретин, протокатеховая, п-оксибензойная, кофейная кислоты). В результате проведенных хроматографических и спектральных исследований установлено, что надземная часть хвоща полевого содержит характерные вещества: нарингенин, кемпферол, кверцетин, кемпферол-3-О-β-D-софорозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, апигенин, лютеолин, сапонаретин, 5- О-β-D-глюкопиранозид апигенина, 5- О-β-D-глюкопиранозид лютеолина, 5- О-β-D-глюкопиранозид генкванина, протокатеховая, п-оксибензойная, п-кумаровая, кофейная, феруловая, ванилиновая, галловая кислоты; надземная часть травы хвоща лесного- нарингенин, кемпферол-3-О-β-D-софорозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, апигенин, сапонаретин, ванилиновая, кофейная, п-кумаровая, п-оксибензойная и протокатеховая кислоты; в хвоще луговом присутствуют нарингенин, кемпферол-3-О-β-D-софорозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, апигенин, сапонаретин, ванилиновая, кофейная, п-кумаровая, п-оксибензойная, феруловая и протокатеховая кислоты; в хвоще болотном – нарингенин, кверцетин, кемпферол-3-О-β-D-софорозид, апигенин, сапонаретин, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, ванилиновая, кофейная, п-кумаровая, п-оксибензойная и протокатеховая кислоты; в надземной части травы хвоща зимующего подтверждено присутствие нарингенина, кемпферол-3-О-β-D-софорозида, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозида, апигенина, сапонаретина, ванилиновой, кофейной, феруловой, п-оксибензойной и следовые количества п-кумаровой кислот; а в траве хвоща речного- нарингенина, кемпферол-3-О-β-D-софорозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, апигенина, сапонаретина, ванилиновой, феруловой, галловой, кофейной, п-кумаровой, п-оксибензойной и протокатеховой кислот.

Таким образом, результаты сравнительного изучения качественного состава флавоноидов и фенолокислот свидетельствуют, прежде всего, о четком различии и видовой самостоятельности исследованных таксонов, что на данном этапе исследования не позволяет рекомендовать их использование наравне с официальным видом хвощом полевым. Для этого необходимо проведение дополнительных фармакологических исследований, что может явиться задачей самостоятельного исследования.

Поэтому задачей нашего дальнейшего исследования явилось использование полученных результатов химического изучения официального вида хвоща полевого для совершенствования методик его стандартизации. Кроме того, отсутствие для него лекарственных промышленных форм побудило нас к разработке экстракционного препарата в виде этанольного экстракта и гранул на его основе, с оценкой его фармакологических свойств.

Разработка методики стандартизации травы хвоща полевого

Трава хвоща полевого является официальным лекарственным сырьем, нормативная документация на которое представлена в

Государственной Фармакопее XI издания. Однако в данной статье отсутствует методика количественного определения действующих веществ. В соответствии с современными требованиями нормативная документация на лекарственное растительное сырье должна содержать раздел “Количественное определение”.

На наш взгляд, наиболее приемлемой группой БАВ, методики определения которых наиболее достоверны и легко воспроизводимы, являются флавоноиды, которые наряду с другими БАВ по данным литературы являются ответственными за диуретическое действие хвоща полевого. В связи с этим стандартизацию травы хвоща полевого нами предложено проводить именно по данной группе биологически активных веществ.

Для разработки указанного метода использовали общепринятый в анализе флавоноидов спектрофотометрический метод с использованием ГСО кверцетина и комплексообразующей реакции с алюминия хлоридом.

Выбор кверцетина в качестве стандартного образца связан с тем, что по результатам хроматографических и спектральных исследований данный флавоноид присутствует в траве хвоща полевого.

Комплексообразующая реакция извлечения с алюминия хлоридом дает характерный максимум поглощения при длине волны 425 нм (рис.3). Данная область и была выбрана нами в качестве аналитической.

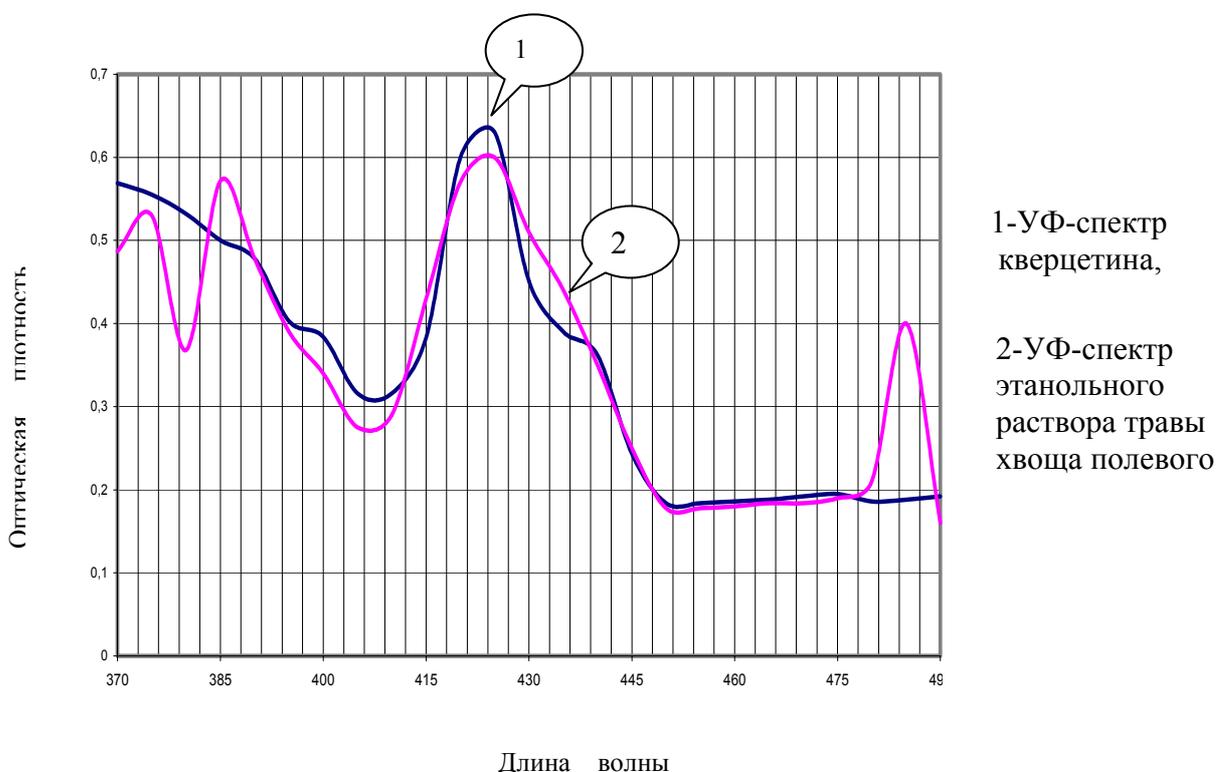


Рисунок 3 - УФ-спектры этанольного экстракта хвоща полевого и кверцетина после комплексообразующей реакции с алюминия хлоридом

При разработке методики анализа исследовали влияние на выход флавоноидов таких факторов как степень измельчения сырья, природа и концентрация экстрагента и условия экстракции. Установлено, что максимальное количество флавоноидов извлекается из сырья, при измельчении частиц до размера 1мм. Экстрагирование флавоноидов лучше проводить 95% этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1:30. Для наиболее полного извлечения флавоноидов рекомендуем проводить трехкратную экстракцию из сырья по 30 минут. В связи с тем, что флавоноиды в данном сырье содержатся как в виде агликонов, так и гликозидов проведено их извлечение этанолом, подкисленным хлороводородной кислотой, с целью гидролиза гликозидов. Проведенные эксперименты показали, что подкисление экстракта приводит к увеличению выхода флавоноидов.

Метрологическая характеристика методики, показала, что относительная ошибка определения при доверительной вероятности 95,00% находится в пределах 1,99%.

В связи с тем, что в дальнейшем из травы хвоща полевого нами предложен экстракционный препарат, то для стандартизации травы хвоща полевого наряду с содержанием флавоноидов нами предложен показатель содержания экстрактивных веществ. Предложенные нами показатели качества сырья включены в проект фармакопейной статьи «Трава хвоща полевого».

Разработка рациональной технологии получения экстракционного препарата из травы хвоща полевого

Учитывая многовековой опыт использования травы хвоща полевого в медицинской практике в виде водного настоя, а также известные недостатки указанной лекарственной формы на следующем этапе нашей работы решалась задача по разработке рациональной лекарственной формы. Для чего нами был получен жидкий экстракт и предложена твердая лекарственная форма – гранулы.

Для выбора рационального метода получения экстракта из травы хвоща полевого нами был проведен сравнительный анализ влияния на выход экстрактивных веществ и биологически активных веществ природы и концентрации экстрагента и степени измельчения сырья.

При выборе экстрагента была изучена динамика извлечения флавоноидов и экстрактивных веществ водой, 40%, 70% и 95% этанолом. Определение суммы экстрактивных проводили по методике Ю.Г.Пшукова. Экстрагирование проводили в течение 4-х часов со степенью измельчения 0,25 мм. Результаты полученных исследований показали, что наиболее рациональным экстрагентом является 40% этанол.

При изучении влияния степени измельчения на выход флавоноидов и экстрактивных веществ использовали сырье, измельченное до следующих размеров 1,3, 5 и 7мм. В ходе исследований использовали ту же методику, что и при выборе оптимального экстрагента, с той разницей, что в качестве экстрагента применяли 40% этанол, а степень измельчения варьировала в указанных пределах. Результаты проведенных исследований показали, что при разработке технологии жидкого экстрагента наиболее целесообразно использовать степень измельчения 3-5 мм.

Для изучения полноты и скорости экстрагирования, определения расходных норм сырья и экстрагента, управления процессом экстрагирования были определены следующие технологические свойства травы хвоща полевого: содержание флавоноидов, влажность, содержание экстрактивных веществ, доброкачественность сырья, насыпная масса, коэффициенты наполнения сухого и набухшего сырья, коэффициент вытеснения, коэффициент образования внутреннего сока и коэффициент поглощения. С помощью полученных коэффициентов наполнения сухого и набухшего сырья осуществляли подбор рабочего объема диффузоров. Основываясь на данных литературы и используя коэффициенты вытеснения, образования внутреннего сока, поглощения сырья и насыпную массу, определяли количество экстрагента, необходимое для настаивания и перколяции.

В результате проведенных исследований предложено получение экстракционного препарата из травы хвоща полевого методом реперколяции 40% этанолом.

Стандартизацию жидкого экстракта травы хвоща полевого проводили по внешнему виду, содержанию этанола, сухого остатка и флавоноидов в пересчете на кверцетин. При анализе пяти опытных образцов содержание флавоноидов в них составляло не менее 0,63%.

В качестве рациональной лекарственной формы на основе жидкого экстракта травы хвоща полевого нами были получены гранулы.

Для этого полученный жидкий экстракт лиофилизировали до содержания влаги не более 25%. На основе густого экстракта получали гранулы. Всего было получено 12 вариантов прописей (табл.4), содержащих в качестве вспомогательных веществ: фруктозу, сахарозу, лактозу, крахмал, поливинилпирролидон (ПВП) и метилцеллюлозу (МЦ).

Полученные гранулы подвергали контролю качества по Государственной Фармакопее XI издания. В результате проведенных исследований оптимальной признана пропись №5, содержащая в качестве наполнителя лактозу; в качестве связующей и увлажняющей 10% раствор поливинилпирролидона. Критериями качества гранул являлись: внешний вид, фракционный состав, прочность гранул на истирание, распадаемость и гигроскопичность.

Стандартизацию полученных гранул проводили по технологическим параметрам и содержанию флавоноидов. При этом использовали принцип сквозной стандартизации: лекарственное сырье – субстанция – лекарственная форма.

Таблица 4 - Варианты исследованных прописей, использованных при изготовлении гранул

№ прописи	Наполнители	Увлажняющая жидкость
1	Сахароза	5% крахмал водный
2	Сахароза	10 % ПВП водный
3	Сахароза	5 % МЦ-8 водный
4	Лактоза	5% крахмал водный
5	Лактоза	10 % ПВП водный
6	Лактоза	5 % МЦ-8 водный
7	Фруктоза	5% крахмал водный
8	Фруктоза	10 % ПВП водный
9	Фруктоза	5% МЦ-8 водный
10	Крахмал	5% крахмал водный
11	Крахмал	10 % ПВП водный
12	Крахмал	5 % МЦ-8 водный

Исследование фармакологических свойств

Изучение токсичности (безвредности)

Изучение токсичности (безвредности) проводили на белых мышах обоего пола средней массой 18-20 гр при однократном введении препаратов в желудок через зонд. Полученные результаты (табл.5) свидетельствуют о том, что введение препаратов в указанных дозах не вызывало гибель животных, в том числе и при введении экстракта хвоща болотного, известного как ядовитое растение. Следовательно, жидкий экстракт хвоща полевого и водные экстракты шести видов хвоща согласно ГОСТ 121007-76 (Государственный стандарт на вредные вещества) можно отнести к 4 классу: «вещества малоопасные».

Данный тест был проведен нами как для жидкого экстракта, так и для водных экстрактов всех шести видов хвоща для оценки перспективности использования их в медицинской практике.

Изучение диуретических свойств

Экспериментальное изучение диуретической активности жидкого экстракта хвоща полевого проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 150-200 г, находившихся в индивидуальных клетках при

Таблица 5 – Результаты определения острой токсичности жидкого экстракта и водных экстрактов шести видов рода Equisetum

Препарат	Доза мг/кг	Количество животных			Гибель	LD ₅₀
		Взятых	Погибших	Выживших		
Контроль	-	10	-	10	-	-
Жидкий экстракт хвоща полевого	5000	10	-	10	-	-
	10000	10	-	10	-	-
Водный экстракт хвоща полевого	5000	10	-	10	-	-
	10000	10	-	10	-	-
Водный экстракт хвоща лесного	5000	10	-	10	-	-
	10000	10	-	10	-	-
Водный экстракт хвоща лугового	5000	10	-	10	-	-
	10000	10	-	10	-	-
<u>Водный экстракт хвоща болотного</u>	5000	10	-	10	-	-
	10000	10	-	10	-	-
Водный экстракт хвоща зимующего	5000	10	-	10	-	-
	10000	10	-	10	-	-
Водный экстракт хвоща речного	5000	10	-	10	-	-
	10000	10	-	10	-	-

Таблица 6 - Влияние однократного введения жидкого экстракта хвоща полевого (150мг/кг) на функцию почек у крыс

	N	E _{Na} мкМ/сут.	E _K мкМ/сут	E _{Kp} мкМ/сут	Потр. H ₂ O Мл/сут.	Диурез мл/сут
Контроль	40	10,2 _± 2,54	248 _± 21,9	15,6 _± 2,02	11,5 _± 0,88	2,2 _± 0,25
Опыт	17	10,0 _± 2,18	263 _± 33,6	17,8 _± 1,74	16,8 _± 3,72	2,9 _± 0,56

Примечание - n-количество опытов; E_{Na}-экскреция натрия, E_K-экскреция калия, E_{Kp}- экскреция креатинина.

свободном доступе к воде и пище. Ежедневно измеряли количество потребляемой воды и объем выделенной мочи. В моче определяли содержание креатинина, ионов натрия и калия. Рассчитывали суточную экскрецию указанных электролитов. О величине клубочковой фильтрации судили по выделению креатинина. Экскрецию креатинина с мочой определяли унифицированным методом Поппера с помощью стандартного набора реактивов. Экскрецию ионов натрия и калия с мочой определяли на пламенном фотометре методом фотометрии в пламени.

В эксперименте исследовали влияние однократного и длительного введения экстракта хвоща на функцию почек у крыс.

Очевидно, что в условиях однократного введения экстракта хвоща, существенных изменений со стороны функции почек не происходило (табл.6). Выявлялась лишь тенденция увеличения диуреза и экскреции электролитов.

В условиях длительного применения (табл.7) был выявлен значительный диуретический эффект, последовательно нараставший вплоть до окончания введений и сохранявшийся после его отмены.

Примечательно, что диуретическое действие препарата не сопровождалось усилением выделения из организма натрия, что свойственно диуретикам синтетического происхождения (салуретикам).

Выявленное нами диуретическое действие экстракта хвоща представляется очень важным. По своему проявлению оно напоминает эффект акваретиков, довольно редкой группы лекарственных веществ. Их полезность особенно значима в клинических ситуациях, сопровождающихся развитием отеков на фоне гипонатриемии, когда следует обеспечить выделение из организма свободной воды без воздействия на содержание натрия.

К таким ситуациям, кроме идиопатической гипонатриемии, относятся отечные состояния при застойной сердечной недостаточности, циррозе печени, синдроме несостоятельности антидиуретического гормона и др.

Изучение гепатопротекторных свойств

В соответствии с поставленными целями и учитывая данные о том, что некоторые флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, каротиноиды и витамин К, играют важную роль в предупреждении нарушений структуры и функции печени при различных патологических состояниях и сведения об использовании хвоща полевого в сборах, применяемых при патологии печени, нами была изучена гепатопротекторная активность жидкого экстракта.

Было установлено, что жидкий экстракт хвоща полевого способен препятствовать развитию острого токсического гепатита, причем защитное действие на печень проявляется в сопоставимых дозах, определяющих мочегонный эффект. Полученные результаты (табл.8) доказывают целесообразность углубленного изучения гепатопротективных свойств хвоща, особенно в части влияния на систему перекисного окисления липидов.

Таблица 7 - Влияние длительного введения жидкого экстракта хвоща полевого (150мг/кг) на функцию почек у крыс

Показатели	Исходный уровень	Дней после введения			
		3-4 дня	5-6 дней	7-8 дней	5 дней после окончания введения препара
диурез, мл/сут	3,4±0,54	4,2±0,82*	4,0±0,68*	5,1±1,25*	2,2±0,34*
потребление воды, мл/сут	13,0±2,16	12,8±3,12*	15,3±3,06*	18,2±2,51*	11,5±2,24*
E _{Na} , мкМ/сут	10,2±1,48	13,3±2,34*	9,4±1,51*	12,8±2,23*	11,8±1,15*
E _K , мкМ/сут	267±26	299±35,00*	303±32,80*	329±4,01*	260±28,10*
E _{Kp} , мкМ/сут	15,7±3,23	13,0±3,21*	18,8±4,32*	17,4±2,62*	16,7±2,26*

Примечание - * - достоверные изменения по сравнению с исходными показателями

Таблица 8 - Влияние жидкого экстракта хвоща полевого на фоне CCl₄ – гепатита на некоторые биохимические параметры сыворотки крови

Показатели	Интактные животные	Контрольные животные – CCl ₄ – гепатит	ЭЖХП + CCl ₄ – гепатит
Экскреторная функция			
билирубин общий мкмоль/л	10,55±0,70	27,67±3,76*	18,35±1,21**
билирубин конъюгированный мкмоль/л	8,56±0,61	16,59±1,85*	11,92±0,59**
коэффициент глюкуронирования, %	81,0	42,0*	65,0**
цитоплазматические ферменты			
АСАТ, мкмоль/л	0,74±0,014	1,75±0,12*	1,0±0,07**
АЛАТ, мкмоль/л	0,56±0,013	3,10±0,27*	0,95±0,11**
АСАТ/АЛАТ	1,32	– 0,56	1,05
ЩФ, мкмоль/л	468,0±51,72	727,76±55,25*	645,75±64,70*
Белок, липиды и продукты их перекисного окисления			
Белок, г/л	65,73±2,020	69,35±2,881	66,71±1,951
липиды общие, г/л	1,69±0,31	2,15±0,28*	2,35±0,61*
ДК, УЕ/мг	3,07±0,18	3,50±0,19	3,03±0,24
МДА, мкмоль на 1 г белка за 1 мин	4,64±0,31	4,97±0,29	8,36±0,88**

Примечание - p < 0,05 * – по отношению к интактным животным, ** – по отношению к гепатиту

Таблица 9 – Антибактериальная активность жидкого экстракта и водных экстрактов шести видов рода хвощ, мкг/мл

Виды	Тест-микробактерии			
	<i>Esherichia coli</i> H-304	<i>Staphylococcus aureus</i> P-209	<i>Pseudomonas aeruginosae</i> A TCC 9027	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Жидкий экстракт хвоща полевого	62,5	125	500	125
<i>Equisetum arvense</i>	62,5	62,5	250	62,5
<i>Equisetum sylvaticum</i>	62,5	62,5	250	62,5
<i>Equisetum pratense</i>	62,5	62,5	250	62,5
<i>Equisetum palustre</i>	62,5	62,5	250	62,5
<i>Equisetum hiemale</i>	125	125	500	125
<i>Equisetum fluviatile</i>	62,5	62,5	250	62,5
Препарат сравнения: отвар листьев толокнянки	62,5	0,95	125	62,5

Таблица 10 – Антигрибковая активность жидкого экстракта и водных экстрактов шести видов рода хвощ, мкг/мл

Источник БАВ	Тест – микробактерии				
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum Canis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>
Жидкий экстракт полевого	15,6-31,2	31,2-62,5	15,6-31,2	н/а	н/а
<i>Equisetum arvense</i>	7,8-15,6	15,6-31,2	7,8-15,6	н/а	н/а
<i>Equisetum sylvaticum</i>	15,6-31,2	15,6-31,2	15,6-31,2	н/а	н/а
<i>Equisetum pratense</i>	7,8-15,6	62,5-125	31,2-62,5	н/а	н/а
<i>Equisetum fluviatile</i>	7,8-15,6	15,6-31,2	15,6-31,2	н/а	н/а
<i>Equisetum palustre</i>	15,6-31,2	15,6-31,2	15,6-31,2	н/а	н/а
<i>Equisetum hiemale</i>	15,6-31,2	7,8-15,6	7,8-15,6	н/а	н/а
Препараты сравнения: нитрофунгин	15,6 – 31,2	15,6– 31,2	7,8 – 31,2	62,5–125	250–500
Гризеофульвин	7,8 – 15,6	3,9 – 7,8	3,9 – 7,8	1000	1000

Примечание - н/а – антигрибковой активности не наблюдалось при концентрации вещества в 1000мкг/мл.

Изучение антигрибковых и антибактериальных свойств

В связи с тем, что достаточно часто заболеваниям мочевыводящих путей сопутствует инфекция, нами была изучена способность жидкого экстракта хвоща полевого и экстрактов шести исследуемых видов хвоща подавлять рост следующих штаммов: *Staphylococcus aureus* P-209, *Escherichia coli* H-304 (034 К-Н 10 №Н 304), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger* 163/3685, *Candida albicans* 4337, *Trichophyton rubrum* – 248/700, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* ВКПГ –268, *Microsporium canis*- ВКПГ- 326/316, которые были получены в Государственном НИИ контроля бактериальных препаратов им.Тарасевича, в отделе микологии центрального кожно-венерологического института Министерства Здравоохранения России (г.Москва) и во Всероссийской коллекции патогенных грибов при Всероссийском центре по глубоким микозам и микогенной аллергии (г.Санкт-Петербург).

При определении антибактериального действия параллельно исследовали активность традиционного растительного уроантисептика - отвара из листьев толокнянки.

Установлено (табл.9), что наиболее значительно вышеупомянутые объекты подавляют рост кишечной палочки, клебсиеллы пневмонийной (62,5-125мкг/мл). В отношении золотистого стафилококка антибактериальное действие значительно уступало препарату сравнения. Низкую активность все исследуемые препараты, в том числе и препарат сравнения проявили в отношении синегнойной палочки.

При определении противогрибковой активности (табл.10) препаратами сравнения служили нитрофунгин и гризеофульвин.

В отношении возбудителей кандидоза и аспергиллеза все исследуемые объекты оказались в максимальных концентрациях неэффективны.

В отношении возбудителей трихофитии и микроспории подавляющая концентрация была зафиксирована на уровне 7,8- 62,5 мкг/мл, что находится на уровне препаратов сравнения.

Изучение антикластогенных свойств

В последнее время получил актуальность поиск путей профилактики мутагенеза на основе применения природных, безвредных соединений. Связано это с тем, что в повседневной жизни человек постоянно подвергается мутагенным воздействиям: излучения рентгеновских аппаратов, осадки в результате ядерных испытаний, химических веществ, используемых в промышленности и сельском хозяйстве, мутагенов образующихся при приготовлении пищи, встречающихся в составе пищевых растений, незаменимых лекарственных средств, в результате действия стресса они могут образовываться непосредственно в организме человека. Все вышеперечисленное послужило основанием для оценки антикластогенных свойств водных экстрактов исследуемых нами видов хвоща.

Фармакологические эффекты исследуемых растений оценивали с использованием микроядерного анализа, который широко используется для оценки мутагенных влияний различных веществ и является своеобразной тест-системой применяемой для анализа представляющих потенциальный риск соединений.

Как видно из рисунка 4 водные экстракты хвоща полевого и лесного проявили выраженные антикластогенные свойства на фоне экспериментального радиационного воздействия. Препаратом сравнения

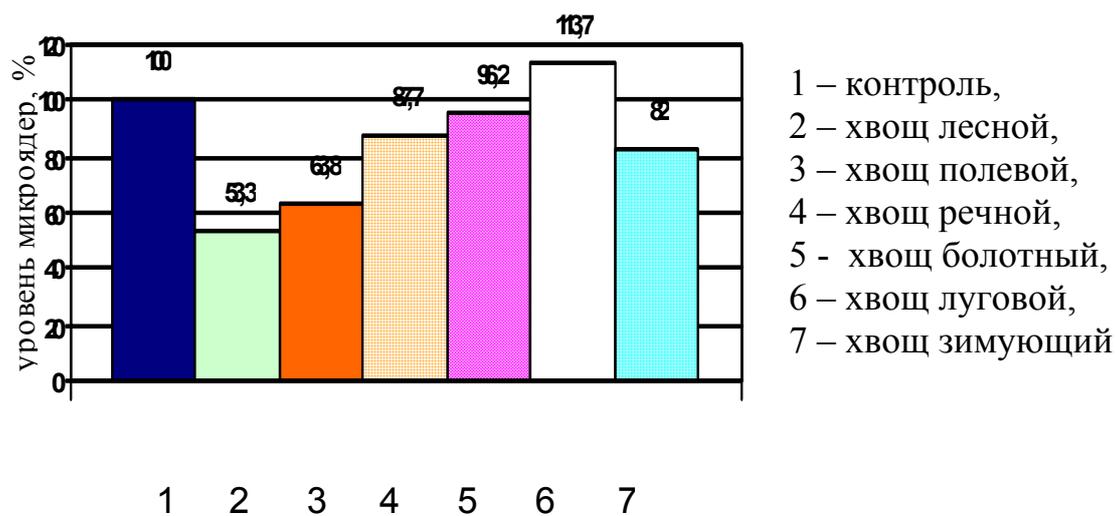


Рисунок 4– Антикластогенная активность водных экстрактов растений рода хвощ

служил известный антиоксидант - α -токоферол. Так, экстракт хвоща полевого значительно снизил количество микроядер в эритроцитах до 37%. В то же время экстракт хвоща лесного был еще активнее и снизил уровень микроядер до 46%. Менее выражены данные свойства у хвоща зимующего, хвоща речного и хвоща болотного. Таким образом, эти растения проявили достаточно высокую активность, что делает возможным их дальнейшее изучение по данному виду активности.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительное химическое исследование показало, что в траве изученных видов рода хвощ (*Equisetum arvense*, *E.sylvaticum*, *E.pratense*, *E.fluviatile*, *E.palustre*, *E.hiemale*) содержатся флавоноиды (0,16-2,07%), фенолокислоты (0,062 до 0,73 %), сапонины (6,75 – 8,92%), каротиноиды (0,54 – 5,75 мг/%), витамин К (0,22 – 0,32%), полисахариды (4,19 – 11,42 %), аминокислоты (0,26-0,53%), 33 макро- и микроэлементов.

2. Углубленное химическое изучение компонентного состава БАВ растений рода хвощ позволило установить, что:

- а) полисахаридный комплекс представлен водорастворимыми полисахаридами (0,13-4,41%), пектиновыми веществами (0,17-1,25%), гемицеллюлозой А (1,82-4,92%), гемицеллюлозой Б (0,39-1,40%) мономерными единицами которых являются глюкоза, арабиноза, ксилоза, галактоза и глюкуроновая кислота;
- б) число фенольных соединений включает 18 идентифицированных компонентов, из которых 8 (нарингенин, апигенин, кемпферол-3-О-β-D-софорозид, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид, сапонаретин, протокатеховая, п-оксибензойная, кофейная кислоты) присутствуют во всех исследуемых видах;
- в) аминокислотный состав всех шести видов хвоща определяют глутаминовая кислота, аргинин, валин, фенилаланин, аланин, пролин.

3. Впервые для травы хвоща полевого разработана методика количественного определения суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом.

4. Разработана ресурсосберегающая технология получения и нормы качества жидкого экстракта хвоща полевого и гранул на его основе.

5. Изучено диуретическое действие жидкого экстракта хвоща полевого. При этом установлено, что диуретический эффект жидкого экстракта не сопровождается натриуретическим эффектом.

6. Установлено что жидкий экстракт хвоща полевого в сопоставимых дозах (150мг/кг) для мочегонного эффекта способен задерживать развитие острого токсического гепатита.

7. Установлено, что водные экстракты исследуемых видов хвоща и жидкий экстракт хвоща полевого на фоне безвредности:

а) проявляют активность в отношении золотистого стафилококка и кишечной палочки (62,5-125 мкг/мл)

б) подавляют рост возбудителей таких грибковых инфекций как *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* (7,8-62,5 мкг/мл), не эффективны в отношении *Aspergillus niger* и *Candida albicans*;

в) проявляют на фоне α-токоферола выраженные антикластогенные свойства

8. На основании выполненных исследований разработан проект ФС “Трава хвоща полевого”, предлагаемый для Государственной Фармакопеи XII издания. Для оценки качества травы хвоща полевого разработаны дополнительные числовые показатели: содержание флавоноидов не менее 1%, содержание экстрактивных веществ не менее 30%.

ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ СЛЕДУЮЩИЕ РАБОТЫ

1. Антигрибковые свойства растений рода *Equisetum* / Н.Э.Коломиец, О.А.Мальцева, С.Е.Дмитрук // Тез.докл. научно-практической конференции, посвященной 80-летию фармацевтической службы Самарской области, Самарского государственного медицинского университета и Самарского аптечного склада, 1999.-Самара,1999.-С.99-100.
2. Возможности использования лекарственных растений для профилактики и лечения дерматомикозов / Н.Э. Коломиец, О.А.Мальцева, С.Е.Дмитрук // Тез.докл. Первого съезда микологов Современная микология в России.: Москва, 11-13 апреля 2002 г. С.229-230.
3. Грибковые поражения кожи и перспективы поиска антигрибковых средств на основе суммарных комплексов травы хвоща / Н.Э.Коломиец, С.Е.Дмитрук // Тез.докл. первой Международной юбилейной конференции, посвященной 110-летию со дня открытия проф. К.Н.Виноградовым сибирской двуустки у человека, 2-6 апреля 2001 г.-Томск,2001.- С.95.
4. Дмитрук С.Е. Грибковые заболевания и альтернативные возможности фитотерапии // С.Е.Дмитрук, Н.Э.Коломиец, В.С.Дмитрук, О.А.Мальцева // Бюллетень СО РАМН.- Новосибирск, 2001.-№3.-С.9-14.
5. Изучение элементного состава растений рода *Equisetum* и *Lemna* / Н.Э.Коломиец, О.А.Мальцева, С.Е.Дмитрук // Тез.докл. Международной конференции молодых ученых, 26-29 июня 2001 г.-Москва,2001.- т.2.-С.66-67.
6. Исследование микроэлементов, тяжелых металлов в сырье растений рода хвощ – перспективном источнике новых фитопрепаратов и биологически активных добавок / Н.Э.Коломиец, Л.Д.Агеева, С.Е.Дмитрук // Тез.докл. Всероссийской научно-технической конференции, 13-14 сентября 2001 г.-Бийск,2001.- С.22-26.
7. Коломиец Н.Э. Растения рода *Equisetum*: степень химической изученности, токсичность, применение в медицине // Н.Э.Коломиец, С.Е.Дмитрук // Объединенный медицинский журнал.- Москва, 2002.- №1(2).-С.86-89.
8. Поиск новых источников антигрибковых препаратов / Н.Э.Коломиец, О.А.Мальцева, С.Е.Дмитрук, С.Н.Ефимов // Тез.докл. международной научной конференции, 27-29 июня 2000 г.-Томск,2000г.- С.34-35.
9. Possibilities of phytotherapy in treatment of fungal diseases / Kolomiets N, Maltseva O, Dmitruk S..// “Yong doctors on the third millennium”: Materials of International Yong Medic’s Conference, 17-22 September 2001.- Yerevan, Armenia, 2001.- S. 78.