

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи
УДК 615.014:581.43.615:07

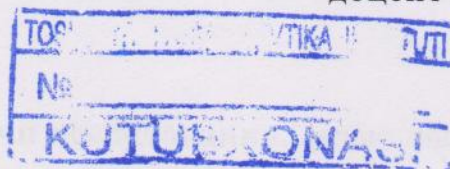
САМЕДИНОВ РУСТЕМ СЕЛЯМЕТОВИЧ

**Разработка и стандартизация суммарного препарата на основе
листьев подорожника большого и шелковицы белой**

**на соискание академической степени магистра 5A510501 –
фармацевтическая химия и фармакогнозия**

ДИССЕРТАЦИЯ

**Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук,
доцент Н.Т.Фарманова**



Ташкент – 2016

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Факультет – Фармация
Кафедра – Фармакогнозия

Учебный год – 2014 -2016

Магистрант – Самединов Р.С.
Научный руководитель –
к.ф.н., доцент Фарманова Н.Т.
Специальность – 5А510501 –
фармацевтическая химия и
фармакогнозия

АННОТАЦИЯ К МАГИСТЕРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

Обоснованность и актуальность работы. Охрана здоровья населения, улучшение лекарственного обеспечения является одной из главных задач нашего государства в области социальной политики. Решение этой задачи в большей степени зависит от разработки и внедрения в практику здравоохранения новых эффективных лекарственных средств, в том числе растительного происхождения. В этой связи выявление, изучение и внедрение новых перспективных растений отечественной флоры представляется актуальной проблемой фармацевтической науки.

Лекарственные растения, используемые в терапии сахарного диабета, помимо гипогликемического действия, оказывают положительное влияние на функции других органов и тканей.

А также, в результате исследований последних лет показана целесообразность перевода лекарственного растительного сырья и сборов приготовленных на основе водорастворимых сухих экстрактов.

Объекты и предмет исследования. Объектом исследования служили образцы сбора и сухого экстракта гипогликемического сбора. Предметом исследования было решение вопросов, связанных со стандартизацией и внедрением в медицинскую практику предлагаемого сбора и сухого экстракта.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является получение, изучение химического состава и стандартизация сухого экстракта

нового растительного гипогликемического сбора для введения его в медицинскую практику.

Научная новизна. Впервые получен сухой экстракт гипогликемического сбора, включающего листья шелковицы белой и подорожника большого и изучен его химический состав, определены природа и количественное содержание основных групп его биологически активных веществ.

Степень изученности проблемы. Настоящая магистерская диссертационная работа является первым научным исследованием по получению, изучению химического состава и стандартизации сухого экстракта нового растительного гипогликемического сбора, предлагаемого для лечения сахарного диабета.

Методы исследований. При выполнении работы использованы современные физико – химические методы анализа (хроматография на бумаге, в тонком слое сорбента, УФ- спектроскопия) природных соединений, традиционные методы фармакогностического анализа, а также доклинические исследования.

Практическая и теоритическая значимость результатов исследования. В результате проведенных исследований предложена научная обоснованная система стандартизации гипогликемического сбора, на основе местного лекарственного растительного сырья, рекомендованного для лечения сахарного диабета.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 82 страницах компьютерного текста и состоит из введения, одной главы обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, списка использованной литературы и приложений. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 3 рисунками. Библиографический указатель включает 57 источника.

Научный руководитель:

Магистрант:



Н.Т. Фарманова

Р.С. Самединов

MINISTRY OF HEALTHCARE OF THE REPUBLIC OF UZBEKISTAN

THE TASHKENT PHARMACEUTICAL INSTITUTE

Faculty – Pharmacy

Master Degree student – R.S. Samedinov

Chair – Pharmacognozy

Scientific tutor: N.T. Farmanova

Academic year - 2014-2016

**Specialty- 5A510501– Pharmaceutical
Chemistry and Pharmacognozy**

ANNOTATION TO MASTER'S DISSERTATION

Work actuality: Public health services, improving the drug supply are one of the main problems of our government in the field of social policy. The solution of this problem mainly depends on the development and implementation of new effective medicines into the health practice, including herbal origin. In this regard, the identification, study and implementation of new perspective plants of the native flora seem urgent issue of pharmaceutical science.

Medicinal plants used in the treatment of diabetes, in addition to the hypoglycemic action, have a positive effect on the function of other organs and tissues.

And also, as a result of recent studies there have been shown the feasibility of the transferring medicinal plants and species, prepared on the base of water-soluble dry extracts.

Object and subject of research. The object of the research was species examples and dry extract of hypoglycemic species. The subject of the research was solving issues related to standardization and implementation suggested acquisition and dry extract into medical practice.

Aim and tasks of the research. The aim of this research is obtaining, studying chemical composition and standardization of dry extract of new plant hypoglycemic species for their implementation into medical practice.

Scientific novelty: For the first time there has been obtained a dry extract of hypoglycemic species, including white mulberry leaves and plantain, and there has been studied its chemical composition, there have been determined the nature and quantitative content of its main groups of biologically active substances.

Studying level of the problem. This master's dissertation is the first scientific research on the production, studying chemical composition and standardization of the dry extract of the new plant of hypoglycemic species, suggested for the treatment of diabetes.

Research Methods. In operation there have been used modern physical - chemical analysis methods (paper chromatography, thin-layer sorbent UV-spectroscopy)

natural compounds pharmacognostic traditional methods of analysis as well as pre-clinical research.

Practical and theoretical significance of the research results. As a result of made researches there has been suggested scientifically-based system of standardization of hypoglycemic species, based on local medicinal plants, recommended for the treatment of diabetes.

The structure and scope of the thesis. Thesis is presented on 82 pages of computer text and consists of introduction, literature review one chapter, three chapters of its own research, conclusions, bibliography and appendices. The work is illustrated with 14 tables and 3 figures. Bibliographic index includes 57 sources.

Scientific tutor:  **N.T. Farmanova**

Master resident  **R.S. Samedinov**

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1. Сахарный диабет и его осложнения	9
2. Лекарственные растения в терапии сахарного диабета и его осложнений.....	11
3. Характеристика нового гипогликемического растительного сбора	22
4. Современные подходы к разработке и стандартизации растительных сборов и экстрактов.....	31
Выводы	38

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА II. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА

1.Определение и идентификация основных групп биологически активных веществ сбора.....	39
2. Количественное определение основных групп биологически активных веществ.....	45
3. Стандартизация гипогликемического сбора.....	54
Выводы	59

ГЛАВА III. ПОЛУЧЕНИЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

1.Получение сухого экстракта	60
2.Изучение острой токсичности и влияния водных сухих экстрактов гипогликемического сбора и его компонентов на течение эксперименталь-	

ной алиментарной гипергликемии.....	63
3.Изучение основных групп биологически активных веществ сухого экстракта.....	65
Выводы	68
ГЛАВА IV. СТАНДАРТИЗАЦИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА	
1.Разработка характеристик подлинности	69
2.Разработка показателей качества	70
Выводы	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	77

ВВЕДЕНИЕ	4
-----------------------	----------

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
--	----------

1. Сахарный диабет и его осложнения	9
2. Лекарственные растения в терапии сахарного диабета и его осложнений.....	11
3. Характеристика нового гипогликемического растительного сбора	22
4. Современные подходы к разработке и стандартизации растительных сборов и экстрактов.....	31
Выводы	38

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА II. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА

1.Определение и идентификация основных групп биологически активных веществ сбора.....	39
2. Количественное определение основных групп биологически активных веществ.....	45
3. Стандартизация гипогликемического сбора.....	54
Выводы	59

ГЛАВА III. ПОЛУЧЕНИЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

1.Получение сухого экстракта	60
2.Изучение острой токсичности и влияния водных сухих экстрактов гипогликемического сбора и его компонентов на течение эксперименталь-	

ной алиментарной гипергликемии.....	63
3.Изучение основных групп биологически активных веществ сухого экстракта.....	65
Выводы	68
ГЛАВА IV. СТАНДАРТИЗАЦИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА	
1.Разработка характеристик подлинности	69
2.Разработка показателей качества	70
Выводы	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	77

Введение

Обоснованность и актуальность темы. За годы независимости в Узбекистане созданы такие новые отрасли промышленности, как автомобилестроение, бытовая электротехника, нефтегазохимическая отрасль, фармацевтика, полностью модернизированы и переориентированы на выпуск конкурентоспособных товаров с высокой добавленной стоимостью пищевая и легкая промышленность, химическая отрасль, производство строительных материалов и др. [1,2]. Охрана здоровья населения, улучшение лекарственного обеспечения является одной из главных задач нашего государства в области социальной политики. Решение этой задачи в большей степени зависит от разработки и внедрения в практику здравоохранения новых эффективных лекарственных средств, в том числе растительного происхождения. В этой связи выявление, изучение и внедрение новых перспективных растений отечественной флоры представляется актуальной проблемой фармацевтической науки.

Сахарный диабет является системным эндокринным заболеванием, связанным либо с дефицитом гормона инсулина, либо его гиперпродукцией, приводящей как в первом, так и во втором случае к нарушению углеводного, жирового и белкового обмена. Это кажется парадоксом. Но в действительности, это два совершенно разных по этиопатогенезу заболевания, при которых первоначально поражаются два разных органа, но в конечном итоге, их клинические проявления становятся одинаковыми. В первом случае гибнет эндокринный аппарат поджелудочной железы (островки Лангерганса), что очень быстро приводит к развитию абсолютной инсулиновой недостаточности. Во втором случае нарушается чувствительность клеток печени и других тканей к действию инсулина, что приводит постепенно, несмотря на гиперпродукцию этого гормона, к его относительной физиологической

недостаточности. Поэтому сахарный диабет принято делить на два типа: инсулинозависимый и инсулинонезависимый. Из 100% людей, которые заболевают сахарным диабетом, сахарный диабет I типа (инсулинозависимый) выявляется у 12-15%, у остальных 85 - 88% выявляется сахарный диабет II типа (инсулинонезависимый). Инсулинозависимым диабетом заболевают чаще всего дети и подростки (поэтому его еще называют «диабетом молодых»). Его развитие бывает очень стремительным и без правильного лечения быстро приводит к смерти. Инсулинонезависимый сахарный диабет развивается, как правило, в среднем и пожилом возрасте. Ему часто предшествует избыточный вес и ожирение. Его развитие длится от 10 до 30 лет. Смертность от сахарного диабета (как I, так и II типа) составляет 6-7% от общей смертности людей и занимает, таким образом, третье место после атеросклероза (58%) и рака (17%). По частоте развития сахарного диабета I типа не выявлено достоверных половых различий. Сахарным диабетом II типа значительно чаще заболевают женщины. Сахарный диабет I типа встречается практически во всех странах мира, диабет II типа распространен преимущественно в экономически благополучных странах, прежде всего в США, Германии, Франции, Швеции, Австралии и других. В последние 10 лет в России и на Украине наблюдается заметный рост количества людей, заболевших сахарным диабетом II типа.

Лекарственные растения, используемые в терапии сахарного диабета, помимо гипогликемического действия, оказывают положительное влияние на функции других органов и тканей.

А также, в результате исследований последних лет показана целесообразность перевода лекарственного растительного сырья и сборов приготовленных на их основе в водорастворимые сухие экстракты для использования их в медицинской практике в качестве субстанций рациональных готовых лекарственных форм.

Отмеченное обстоятельство указывает на актуальность и целесообразность избранной темы.

Объекты и предмет исследования. Объектом исследования служили образцы сбора и сухого экстракта гипогликемического сбора. Предметом исследования было решение вопросов, связанных со стандартизацией и внедрением в медицинскую практику предлагаемого сбора и сухого экстракта.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является получение, изучение химического состава и стандартизация сухого экстракта нового растительного гипогликемического сбора для введения его в медицинскую практику.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучение химического состава и стандартизация гипогликемического сбора;
- получение сухого экстракта гипогликемического сбора;
- изучить химический состав сухого экстракта с целью выявления основных групп биологически активных веществ;
- предложить методики идентификации и количественного определения основных действующих веществ;
- разработать надежные критерии подлинности и доброкачественности сбора;
- обобщить результаты исследования и на их основе разработать проект нормативного документа на предлагаемый сухой экстракт.

Научная новизна. Впервые получен сухой экстракт гипогликемического сбора, включающего листья шелковицы белой и подорожника большого и изучен его химический состав, определены природа и количественное содержание основных групп его биологически

активных веществ. Проведены исследования по стандартизации сухого экстракта, позволившие установить научнообоснованные критерии подлинности и доброкачественности, необходимые для разработки соответствующей нормативной документации.

Степень изученности проблемы. Настоящая магистерская диссертационная работа является первым научным исследованием по получению, изучению химического состава и стандартизации сухого экстракта нового растительного гипогликемического сбора, предлагаемого для лечения сахарного диабета.

Методы исследований. При выполнении работы использованы современные физико – химические методы анализа (хроматография на бумаге, в тонком слое сорбента, УФ- спектроскопия) природных соединений, традиционные методы фармакогностического анализа, а также доклинические исследования.

Разработку методов стандартизации проводили на пяти сериях сбора и сухого экстракта в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XI издания и отраслевого стандарта «Стандарты качества лекарственных средств» (Ташкент, 2002).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием U-критерия Вилкоксона -Манна -Уитни и t-критерия Стьюдента.

Практическая и теоритическая значимость результатов исследования. В результате проведенных исследований предложена научная обоснованная система стандартизации гипогликемического сбора, на основе местного лекарственного растительного сырья, рекомендованного для лечения сахарного диабета. Использование данного сбора расширит арсенал отечественных гипогликемических средств растительного происхождения. На основе сбора разработана технология получения сухого экстракта. Изучен химический состав и проведены

исследования по стандартизации сухого экстракта. Полученные данные будут использованы для составления проекта нормативной документации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 82 страницах компьютерного текста и состоит из введения, одной главы обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, списка использованной литературы и приложений. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 3 рисунками. Библиографический указатель включает 57 источника.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сахарный диабет и его осложнения

Сахарный диабет является системным эндокринным заболеванием, связанным либо с дефицитом гормона инсулина, либо с его гиперпродукцией, приводящей как в первом, так и во втором случае к нарушению углеводного, жирового и белкового обмена. Это кажется парадоксом. Но в действительности, это два совершенно разных этиопатогенезу заболевания, при которых первоначально поражаются два разных органа, но в конечном итоге, их клинические проявления становятся одинаковыми. В первом случае гибнет эндокринный аппарат поджелудочной железы (островки Лангерганса), что очень быстро приводит к развитию абсолютной инсулиновой недостаточности. Во втором случае нарушается чувствительность клеток печени и других тканей к действию инсулина, что приводит постепенно, несмотря на гиперпродукцию этого гормона, к его относительной физиологической недостаточности. Поэтому сахарный диабет принято делить на два типа: инсулинозависимый и инсулинонезависимый.

Сахарный диабет II типа начинается незаметно для человека. В 85% случаев ему предшествует увеличение массы тела на 20-30% от возрастной нормы. Как правило, биохимические исследования крови выявляют некоторое повышение сахара в крови. До этого в течение нескольких лет уровень глюкозы может быть даже на нижней границе нормы (глюкоза напрямую переходит в жировое депо под действием повышенного инсулина). Пациенты вспоминают, что за несколько лет до выявления болезни чувствовали повышенную слабость, утомляемость и даже подавленное настроение. У многих из них параллельно развивался атеросклероз (инсулин повышает синтез холестерина и триглицеридов) и гипертоническая болезнь (инсулин вызывает задержку

жидкости, приводя к возрастанию периферического сосудистого сопротивления). А нефросклероз приводит к активизации ренин-ангиотензинового механизма). У других больных сахарный диабет II типа развивался после перенесенного острого инфаркта или инсульта, либо после кровоизлияния в сетчатку глаза. Все дальнейшие клинические проявления были очень похожи, с той лишь разницей, что они были не так выражены, и их нарастание носило постепенный характер. При неправильном лечении на последней стадии клинические проявления сахарного диабета I и II типа одинаковы.

Сахарный диабет остается одной из важнейших медико-социальных проблем здравоохранения практически во всем мире. По данным ВОЗ, в настоящее время в мире насчитывается более 150 млн. человек, страдающих этим недугом. Из 100% людей, которые заболевают сахарным диабетом, сахарный диабет I типа (инсулинозависимый) выявляется у 12-15%, у остальных 85 - 88% выявляется сахарный диабет II типа (инсулинонезависимый). Инсулинозависимым диабетом заболевают чаще всего дети и подростки (поэтому его еще называют «диабетом молодых»). Его развитие бывает очень стремительным и без правильного лечения быстро приводит к смерти. Инсулинонезависимый сахарный диабет развивается, как правило, в среднем и пожилом возрасте. Ему часто предшествует избыточный вес и ожирение. Его развитие длится от 10 до 30 лет. Смертность от сахарного диабета (как I, так и II типа) составляет 6-7% от общей смертности людей и занимает, таким образом, третье место после атеросклероза (58%) и рака (17%). По частоте развития сахарного диабета I типа не выявлено достоверных половых различий. Сахарным диабетом II типа значительно чаще заболевают женщины. Сахарный диабет I типа встречается практически во всех странах мира, диабет II типа распространен преимущественно в экономически благополучных странах, прежде всего в США, Германии, Франции,

Швеции, Австралии и других. В последние 10 лет в России и на Украине наблюдается заметный рост количества людей, заболевших сахарным диабетом II типа.

Следует отметить неоднородность заболеваемости сахарным диабетом в зависимости от расы. Сахарный диабет 2-го типа наиболее распространён среди монголоидов; так, в Великобритании среди лиц монголоидной расы старше 40 лет 20 % страдают сахарным диабетом 2-го типа, на втором месте стоят люди негроидной расы, среди лиц старше 40 лет доля больных сахарным диабетом составляет 17 %. Также неоднородна частота осложнений. Принадлежность к монголоидной расе повышает риск развития диабетической нефропатии и ишемической болезни сердца, но снижает риск возникновения синдрома диабетической стопы. Для лиц негроидной расы чаще характерна тяжёлая, плохо поддающаяся лечению артериальная гипертензия и более частое развитие гестационного сахарного диабета [3,4].

Учитывая отмеченные обстоятельства, разработка новых, эффективных безопасных лекарственных средств для лечения этой болезни на основе растительного сырья представляется весьма актуальной.

1.2. Лекарственные растения в терапии сахарного диабета и его

Несмотря на появление новых эффективных сахароснижающих препаратов, лечение диабета остается нелегкой задачей для практических эндокринологов. В определенной степени это связано с наличием ряда побочных эффектов, а также противопоказаний для использования синтетических препаратов различных химических классов. В этой связи очевидна целесообразность использования лекарственных растений в комплексном лечении сахарного диабета наряду с основной медикаментозной терапией, диетой и дозированными физическими нагрузками [5,6].

Полагают, что гипогликемическое действие лекарственных растений обусловлено присутствием в них инсулиноподобных соединений, так называемых гликокинанов. Последние легко усваиваются организмом и активируют восстановительные процессы, направленные на нормализацию нарушенного метаболизма у больных диабетом, снижая уровень сахара в крови [7].

Обладающие гипогликемическим действием биологически активные вещества, обнаружены среди различных групп природных соединений: **витаминов**, полисахаридов, аминокислот, алкалоидов, сапонинов, веществ **фенольного** характера и др.. Например, выделенный из галеги **лекарственной** алкалоид галегин, оказывает выраженное **гипогликемическое** действие на углеводную гипергликемию, **восстанавливает** активность β -клеток островков Лангерганса **поджелудочной** железы. Гликозид миртиллин из листьев черники **увеличивает** толерантность к углеводам, а неомиртиллин - вызывает **снижение** уровня глюкозы у животных с экспериментальным **аллоксановым** диабетом. Гипогликемической активностью обладает сумма **элеутерозидов**, выделенных из корней элеутерококка колючего, в частности, гликозид элеутерокка - сирингин действует подобно инсулину, **препятствуя** угнетающему действию β -липопротеидов, выделенных из **плазмы** животных с диабетом, на захват глюкозы изолированной **диафрагмой** здоровых животных. Установлена также сахароснижающая **активность** гликозидов из корней женьшеня, алкалоидов пажитника, **люпина**, сесквитерпенового лактона из полыни обыкновенной [8,9].

Лекарственные растения, используемые в лечении сахарного диабета, также положительно влияют на функции других органов и тканей. Многие растения, содержащие биологически активные вещества с высокой биодоступностью и усвояемостью, проявляют противовоспалительный, желчегонный, седативный, тонизирующий эффект, обогащают организм

Полагают, что гипогликемическое действие лекарственных растений обусловлено присутствием в них инсулиноподобных соединений, так называемых гликокинанов. Последние легко усваиваются организмом и активируют восстановительные процессы, направленные на нормализацию нарушенного метаболизма у больных диабетом, снижая уровень сахара в крови [7].

Обладающие гипогликемическим действием биологически активные вещества, обнаружены среди различных групп природных соединений: витаминов, полисахаридов, аминокислот, алкалоидов, сапонинов, веществ фенольного характера и др.. Например, выделенный из галеги лекарственной алкалоид галегин, оказывает выраженное гипогликемическое действие на углеводную гипергликемию, восстанавливает активность β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Гликозид миртиллин из листьев черники увеличивает толерантность к углеводам, а неомиртиллин - вызывает снижение уровня глюкозы у животных с экспериментальным аллоксановым диабетом. Гипогликемической активностью обладает сумма элеутерозидов, выделенных из корней элеутерококка колючего, в частности, гликозид элеутерокка - сирингин действует подобно инсулину, препятствуя угнетающему действию β -липопротеидов, выделенных из плазмы животных с диабетом, на захват глюкозы изолированной диафрагмой здоровых животных. Установлена также сахароснижающая активность гликозидов из корней женьшеня, алкалоидов пажитника, люпина, сесквитерпенового лактона из полыни обыкновенной [8,9].

Лекарственные растения, используемые в лечении сахарного диабета, также положительно влияют на функции других органов и тканей. Многие растения, содержащие биологически активные вещества с высокой биодоступностью и усвояемостью, проявляют противовоспалительный, желчегонный, седативный, тонизирующий эффект, обогащают организм

витаминами, микроэлементами, благотворно влияют не только на углеводный, но и другие виды обмена веществ, общую сопротивляемость организма, что крайне важно при сахарном диабете - заболевании с хроническим течением. Дело в том, что с продолжительностью этого заболевания возрастает риск развития серьезных осложнений. В большинстве случаев они проявляются в полной мере только через длительное время после начала болезни, поначалу вовсе не отражаясь на самочувствии. Согласно литературным данным, фитотерапия во многих случаях предохраняет больных от диабетической нейропатии и ретинопатии, поражений почек, печени, сердечно-сосудистой системы, характерных для сахарного диабета [10-12].

Использование лекарственных растений в комплексной терапии сахарного диабета максимально оправдано [9], поскольку позволяет решать следующие задачи:

- способствовать синтезу инсулина, оптимизируя его действие на уровне тканей;
- стимулировать процессы регенерации клеток поджелудочной железы;
- улучшать работу всех звеньев иммунной системы организма;
- отчасти воспроизводить или усиливать эффекты ряда антидиабетических препаратов;
- нормализовать вторичные нарушения обмена веществ в целом и гормонов, в частности;
- обеспечить профилактику осложнений со стороны сердечно - сосудистой, нервной, опорно-двигательной, мочевыделительной и других систем организма.

Сведения о растениях, используемых для решения указанных выше задач, обобщены в таблице 1.

Таблица 1

**Лекарственные растения, применяемые при терапии сахарного
диабета**

	Лекарственные растения	Препараты	Фармакологическая активность	Действующие вещества
1.	Листья подорожника большого – <i>Folia Plantaginis majoris</i> . Подорожник большой - <i>Plantago major</i> L. Подорожниковы е – <i>Planlaginaceae</i> .	Настой, настойка, грудной сбор, <i>Плантаглюц ид</i>	Противовоспалител ьное, отхаркивающее, стимулирующее, регенеративные процессы, спазмолитическое, репаративное, при понижений кислотности желудочного сока	Пектиновые вещества, аукубин, флавоноиды, полисахаридный комплекс с большим содержанием уроновых кислот [13,14].
2.	Корень аралии высокой – <i>Radix Araliae elatae</i> . Аралия маньчжурская – <i>Aralia mandshurica</i> . Аралиевые – <i>Araliaceae</i> .	Настойка, <i>Сапарал</i>	Тонизирующее, способствует нормализации обмена веществ, восстанавливает гормональный баланс, активизирует деятельность ЦНС	Аралозиды А,В, С (гликозиды олеаноловой кислоты), алкалоид аралин, эфирное масло [13,15].
3.	Корневища с корнями заманихи высокой - <i>Rhizomata cum radicibus Echinopanaxis</i> . Заманиха высокая - <i>Echinopanax elatum</i> . Аралиевые –	Настойка	Тонизирующее, способствует нормализации обмена веществ, восстанавливает гормональный баланс, активизируют деятельность ЦНС	Сапонины неустановленной структуры – эхинопсозиды, эфирное масло, фенольные гликозиды, кумарины [15,16].

	<i>Araliaceae.</i>			
4.	Плод и семена лимонника – <i>Fructus et semina Schizandrae.</i> Лимонник китайский – <i>Schizandra chinensis (Turcz.) Baill.</i> Лимонниковые – <i>Schizandraceae.</i>	Настойка (из семян), настой (плодов)	Тонизирующее, адаптогенное, стимулирующее ЦНС	лигнаны: схизандрин, дезоксисхизандрин, схизандрол, γ-схизандрин, органические кислоты: лимонная, яблочная, винная, флавоноиды, антрахиноны, сапонины, витамин С, эфирное масло, жирное масло [13,15].
5.	Корневища и корни родиолы розовой – <i>Rhizomata et radices Rhodiola roseae.</i> Родиола розовая – <i>Rhodiola rosea.</i> Толстянковые – <i>Crassulaceae.</i>	Жидкий экстракт родиолы	Тонизирующее, адаптогенное, стимулирующее, антигипнотическое	Фенолоспирты: салидрозид флавоноиды: флаволигнан родиолин, монотерпеноиды, органические кислоты, сахара, дубильные вещества, эфирное масло, микроэлементы [7,15].
6.	Корневища и корни элеутерококка – <i>Rhizomata et radices Eleutherococci.</i> Элеутерококк колючий – <i>Eleutherococcus senticosus.</i> Аралиевые – <i>Araliaceae.</i>	Экстракт жидкий, входит в состав тонизирующих напитков	Тонизирующее, адаптогенное, уменьшает уровень сахара в крови.	Лигнаны сезаминового типа: сингирезинол, элеутерозиды Е, D, сезамин, фенольные соединения: элеутерозид В (сингирозид, сингин), кумарины: изофраксидин, элеутерозид В₁, эфирное масло, стероиды: ситостерин, элеутерозид А (даукостерин); углеводы: элеутерозид

				С (галактит, этил-а-D-галактозид); смолы, камедь тритерпеноиды: фриделин, элеутерозиды К, L, М (хедерасапонин В) [9,13].
7.	Кореневища и корни девясила - <i>Rhizomata et radices Inulae</i> . Девясил высокий - <i>Inula helenium</i> . Астровые - <i>Asteraceae</i> .	Алантон, Фитон СД, Пек-тосол, эфирное масло	Противовоспалительное, противоязвенное, адаптогенное, муколитическое, антисептическое, противоглистное	Алантолактон, изоалантолактон, дигидроалантолактон, инулин [7,11].
8.	Створки плодов фасоли обыкновенной - <i>Valvae fructuum Phaseoli vulgaris</i> . Фасоль обыкновенная - <i>Phaseolium vulgaris</i> L. Бобовые - <i>Fabaceae</i> .	Отвар створок плодов и шелухи	Усиливает секрецию желудочного сока и поджелудочной кислоты, стимулирует выработку инсулина, обладает гипогликемическим эффектом.	Белки, каротин, клетчатка, витамины группы В, витамин С, макро- и микроэлементы: цинк, железо, сера, фосфор, калий, натрий, магний, кальций. В ней имеются также лизин, аргинин, гистидин, тирозин, триптофан [17,18].

9.	Трава галеги - <i>Herba Galegae</i> . Галега или козлятник лекарственный <i>Galega officinalis</i> . Бобовые – <i>Fabaceae</i> .	Настой, отвар	Диабетическая ретинопатия (нарушение функций зрения), мочегонное, антигельминтное и антибактериальное, гипогликемическое.	Дубильные вещества, углеводы, алкалоиды, флавоноиды (рутин, кемпферол, кверцетин), каротин, витамин С, галегин, фенолкарбоновые кислоты, горькие вещества. Корни растения содержат тритерпеноиды. В составе семян найдены: сахароза, стахиоза, стероиды, сапонины, алкалоиды и прочие соединения, содержащие азот и жирные масла [11,19].
10.	Плоды гороха – <i>Fructus Pisi</i> . Горох посевной <i>Pisum sativum</i> — Бобовые - <i>Fabaceae</i>	Отвар, ботва	Гипогликемическое, мочегонное, антибиотическое, противодерматозное	Белки, углеводы, микроэлементы, витамины группы В, каротин (провитамин А), витамины С и РР, соли калия, марганца, железа и фосфора, аминокислота – лизин [13,20].
11.	Плоды черники - <i>Fructus Myrtylli</i> . Черника - <i>Vaccinium</i> <i>myrtillus</i> . Брусничные — <i>Vacciniaceae</i> .	Вяжущие сборы, листья черники входят в состав противодиаб етического сбора.	Вяжущее, диетическое, гипогликемическое (листья).	Дубильные вещества конденсированной природы, антоцианы (гликозиды дельфинидина и мальвидина), сахара, органические кислоты, аскорбиновая кислота, каротин, витамин В, пектиновые вещества [9,21].
12.	Листья шелковицы белой- <i>Folia Mori albae</i> , Шелковица	Настой, входит в состав сборов.	Гипогликемическое средство при инсулинонезависим ой форме сахарного диабета.	Полисахариды, аскорбиновая кислота, каротин, эфирное масло, дубильные вещества [9,22].

ТОС
№
KUTUBKON

	белая – <i>Morus alba L.</i> Тутовые - <i>Moraceae.</i>			
13.	Корневища имбиря - <i>Rhizomata</i> <i>Zingiberis.</i> Имбирь аптечный - <i>Zingiber</i> <i>officinale.</i> Имбирные - <i>Zingiberaceae.</i>	Порошок, настойка, сироп, Зинаксин, Дипана, Фит олор.	Способствующе пищеварению, ветрогонное, спазмолитическое, гепатопротектор, отхаркивающее.	Эфирное масло, содержащее сеск- витерпеноиды зингеберены, гингеролы со жгучим вкусом, незаменимые аминокислоты, макро- и микроэлементы – Ca, Mg, Fe, Cr, Se [13,18].
14.	Лист и плод лавра – <i>Folium et fructus</i> <i>Lauri.</i> Лавр благородный - <i>Laurus nobilis.</i> Лавровые – <i>Lauraceae.</i>	Эфирное масло.	Ветрогонное, диуретическое, корректирующее средство.	Эфирное масло (карвон, камфен), флавоноиды, дубильные вещества, аскорбиновая кислота [15,22].
15.	Корни одуванчика - <i>Radices Taraxaci</i> Одуванчик лекарственный - <i>Taraxacum</i> <i>officinale.</i> Астровые – <i>Asteraceae.</i>	Водный настой, отвар, густой экстракт.	Улучшает пищеварение, аппетит и общий обмен веществ, , повышает общий тонус организма.	Тритерпеновые соединения: тараксастерол, тараксерол, псевдотараксастерол, β-амирин; стерины: β- ситостерин, стигмастерин, тараксол; углеводы: до 40 % инулина [7,13].

16.	Корни цикория – <i>Radices Cichorii intybi</i> Цикорий лекарственный – <i>Cichorium intybi</i> Астровые – <i>Asteraceae</i> .	Экстракты и отвар (надземной части и корней).	Желчегонное, гипогликемическое, мочегонное средство.	Дубильные вещества, витамины С, В, каротин, эфирные масла флавоноиды, кумарины [7,18].
17.	Корни лопуха- <i>Radices Arctii</i> Лопух- <i>Arctum leiospermum</i> . Астровые – <i>Asteraceae</i> .	Отвар, настой, настойка.	Гипогликемическое, влияет на обмен углеводов.	Инулин, полисахариды, крахмал, сахара, протеин, эфирное масло, органические кислоты, смолистые и дубильные вещества. В листьях лопуха содержится большое количество аскорбиновой кислоты, флавоноиды, эфирное масло, слизи [15].
18.	Клубни топинамбура (земляной груши) - <i>Tuber Helianthi tuberosum</i> . Топинамбур - <i>Helianthus tuberosus</i> . Астровые – <i>Asteraceae</i> .	Инулин, <i>Фитодиабетин</i> , пищевые добавки с экстрактом топинамбура или с инулином.	Гипогликемическое, влияет на обмен углеводов.	Клетчатка, углеводы, органические кислоты — лимонная, яблочная и другие, аминокислоты, по большей части незаменимые — валин, аргинин, лизин, лейцин и прочие, растительные жиры, инулин, витамины В ₁ , В ₂ , В ₆ , В ₉ , С и А (каротин) [13,18].
19.	Клубни георгинии - <i>Tuber Dahliae variabilis</i> Георгиния <i>Dahlia variabilis</i> . Астровые – <i>Asteraceae</i> .	Инулин	Влияет на обмен углеводов, в частности, при сахарном диабете	Инулин, полисахариды, сахара, эфирные масла, дубильные вещества, микро- и макроэлементы [15].

20. Травя эхинацеи пурпурной — <i>Herba</i> <i>Echinaceae</i> <i>purpureae.</i> Эхинацея пурпурная — <i>Echinacea</i> <i>purpurea.</i> Астровые — <i>Asteraceae.</i>	Отвар, настойка	Иммуностимули- рующее средство	полисахариды, эфирные масла, флавоноиды, оксикоричные (цикориевая, феруловая, кумаровая, кофейная) кислоты, дубильные вещества, сапонины, по лиамины, эхинацин, эхинолон (ненасыщенный кетоспирт), эхинакозид (гликозид, содержащий кофейную кислоту и пирокатехин), органические кислоты, смолы, фитостерины; ко рневища и корни — инулин, глюкозу, эфирн ые и жирные масла, фенолкарбоновые кислоты, бетаин, смолы. Все части растения содержат ферменты, макро- (калий, кальций) и микроэлементы (селе н, кобальт, серебро, мо либден, цинк, марганец и др.) [7,15,23].
---	--------------------	-----------------------------------	--

Опыт применения лекарственных растений показал их эффективность, главным образом, при лечении сахарного диабета II типа (инсулиннезависимого). При диабете II типа фитотерапия может применяться в виде монотерапии, обеспечивающей стабилизацию или регрессию заболевания, или в сочетании с пероральными препаратами сульфомочевины и бигуанидов, что позволяет уменьшить дозу последних.

При диабете I типа (инсулинозависимом) использование растений приемлемо, в основном, в течение первого года болезни для активации репаративных процессов в β -клеточном аппарате поджелудочной железы, стимуляции иммунитета, а также в качестве подщелачивающего средства в организме, склонном к ацидозу. Последний эффект фитотерапии можно использовать у больных сахарным диабетом I типа и при более длительном течении заболевания [24].

Для снижения уровня сахара в крови рекомендованы многочисленные прописи растительных сборов, один из которых, известный под названием «Арфазетин», является официальным [25]. Сбор разработан в Российской Федерации и разрешен для широкого применения в медицинской практике.

Состав сбора: побеги черники – 20 г, створки плодов (бобов) фасоли обыкновенной – 20 г, корни аралии маньчжурской – 10 г, корневища с корнями заманихи высокой – 10 г, траву хвоща полевого – 15 г, плоды шиповника – 15 г, траву зверобоя продырявленного – 10 г, цветки ромашки аптечной – 10 г.

Сбор снижает уровень гликемии, усиливает гликогенсинтезирующую функцию печени, оказывает общеукрепляющее, противовоспалительное, мембраностабилизирующее действие, способствует регенерации клеток эндокринной паренхимы поджелудочной железы, что улучшает ее деятельность в целом. Однако, несмотря на целесообразность применения для терапии сахарного диабета, сбор «Арфазетин» является труднодоступным, поскольку включает растения, не произрастающие в Узбекистане (черника, аралия маньчжурская, заманиха), и поэтому остается предметом импорта в нашу страну.

Между тем, из приведенных выше данных видно, что значительная часть растений, рекомендуемых для использования в комплексной терапии

диабета и его осложнений, произрастает и выращивается на территории нашей республики.

Вышеуказанные обстоятельства открывают хорошие перспективы для создания конкурентоспособных инновационных гипогликемических лекарственных средств для лечения на основе местного растительного сырья.

1.3. Характеристика нового растительного гипогликемического сбора

В настоящее время для лечения этого заболевания в нашей республике используются 86 лекарственных средств с учетом всех лекарственных форм и дозировок, из которых порядка 85,5% выпускается зарубежными производителями, 11% - в странах СНГ и лишь 5,5% в Узбекистане [26].

Учитывая изложенные обстоятельства, на кафедре фармакогнозии Ташкентского фармацевтического института был разработан состав нового гипогликемического сбора, включающее лекарственное растительное сырье имеющее достаточную сырьевую базу на территории нашей республики.

В его состав включены следующие компоненты:

- ✓ листья шелковицы белой (*Morus alba* L.) - 1 часть
- ✓ листья подорожника большого (*Plantago major* L.) - 1 часть

Подбор компонентов сбора осуществлен, исходя из данных литературы о фармакологических свойствах, химическом составе и опыте использования растительного сырья в народной и научной медицине.

Шелкови́ца бе́лая - *Morus alba* L.

Лиственное дерево; вид рода Шелковица (*Morus*) семейства Тутовые (*Moraceae*). Дерево высотой до 15—18 м с раскидистой шаровидной кроной. Ствол и крупные ветви покрыты серовато-бурой корой. Листья широкояйцевидные, при основании неравнобокие, черешковые, по краю пальчато-зубчатые, 5—15 см длиной. Расположены

на побегах двух типов: удлинённых вегетативных и укороченных плодородных. Цветки однополые, собраны в соцветия: тычиночные — в пониклые цилиндрические колосья, пестичные — в короткие овальные на очень коротких цветоносах. Ось соцветия при плодах разрастается, образуя соплодия из многочисленных орешков, заключённых в разросшиеся мясистые и сочные околоплодники. Цветёт в апреле — мае, плоды созревают в мае — июне.

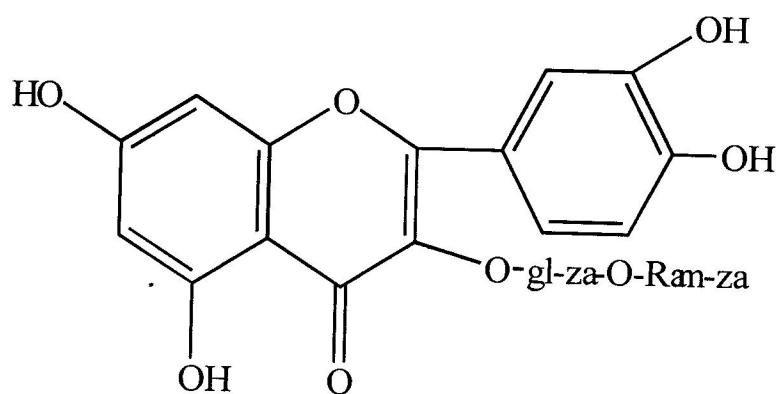
Соплодия — многокостянки, длиной до 4 см, цилиндрические, белые или окрашены в розовый или красный цвет. Вкус приторно сладкий. Они съедобны в свежем виде (белые, мягкие и от лёгкого трясения ветки падают на землю), их можно сушить и сбраживать в вино; вкус по насыщенности уступает чёрной шелковице.

Шелковица белая происходит из восточных районов Китая, где она культивируется уже около четырёх тысяч лет в качестве корма для тутового шелкопряда. Из Китая шелковица распространилась в Среднюю Азию, Афганистан, Северную Индию, Пакистан, Иран, несколько позднее — в Закавказье. Примерно в VI в. появилась в Грузии, в Европе известна с XII в., в Америке — не раньше XVI в. В XVII в. разводилась в Москве, однако климат оказался слишком суровым для неё, и выращивание шелковицы переместилось в Нижнее Поволжье и на Северный Кавказ.

В настоящее время она повсюду экстенсивно насаждена и широко натурализовалась от Индии, Афганистана и Ирана до Испании и Португалии. В европейской части России её культура возможна до линии Волгограда, севернее — опасность вымерзания. На Северном Кавказе шелковица часто дичает и встречается в составе приречных лесов.

Химический состав

В листьях шелковицы белой обнаружены полисахариды дубильные вещества (3,2-3,7 %), флавоноиды (до 1 %), кумарины, органические кислоты, смолы, эфирное масло (0,03-0,04), стерины (β -ситостерин, капестерин). Из суммы флавоноидов выделены рутин, гиперозид и кверцетин, из кумаринов — остхол.



Рутин

В плодах содержится до 12 % сахаров (иногда и до 23 %), представленных в основном моносахаридами, около 1,5 % азотистых веществ, 0,1 % фосфорной кислоты, флавоноиды, каротин, пектин, органические кислоты (яблочная, лимонная), немного витамина С и дубильных веществ.

Использование в медицине

Белая шелковица издавна использовались в традиционной медицине Азии и Индии для управления уровня инсулином у людей, страдающих диабетом, снижения высокого кровяного давления, при гипергликемии, болезни сердца, высоком уровне холестерина, для обогащения крови, лечения анемии, для борьбы с усталостью. Шелковица обладает превосходными свойствами очищать организм от свободных радикалов (а они ускоряют старение организма и провоцируют развитие артрита и артроза). Она обладает сильными противовирусными и

противомикробными свойствами, тем самым помогая организму бороться с инфекцией и способствуя общему оздоровлению человека.

Белая шелковица используется как антибактериальное, вяжущее, потогонное, гипогликемическое средство, помогает от зубной боли, улучшает зрение. Ее листья, как правило, используется в лечении простуды, ангины, гриппа, глазных инфекций и кровотечений из носа. Недавние исследования в Японии показали, что белая шелковица содержит определенные химические вещества, которые производят такой же эффект, как некоторые лекарства, используемые для лечения сахарного диабета 2 типа. Они замедляют распад сахаров в кишечнике таким образом, что те более медленно проникают в кровь. Это помогает организму поддерживать уровень сахара в крови на приемлемом уровне. Поэтому белую шелковицу можно успешно применять в лечении диабета 2-го типа [9,21].

Подорожник большой – *Plantago major* L.

Семейство. Подорожниковые – *Plantaginaceae*.

Дикорастущие подорожники - многолетние растения с розеткой прикорневых листьев цветочными стрелками. Соцветие - колос, цветки мелкие, пленчатые, светло-буроватые. Чашечка из 4 листиков, венчик сростнолепестный, с четырьмя долями, тычинок - 4. Плод - многосемянная коробочка.

Внешний вид сырья

Листья подорожника большого широкояйцевидные или широкоэллиптические, суженные в широкий черешок, цельно-крайные, с 5-9 дугонервными главными жилками, до 20 см длиной, от 3 до 10 см шириной. Запах слабый. Вкус слабо-горьковатый. Листья других видов подорожника отличаются по форме и размерам.

Химический состав

Листьях подорожника содержат до 20% пектиновых веществ. В составе полисахаридного комплекса обнаружены пектовая кислота, галактоарабан,

галактан. В листьях находятся флавоноиды: лютеополин, апигенин, кверцетин, скутелляреин, гиспидулин, байкалеин, лютеолин и их производные. Также в растении присутствуют иридоидные гликозиды: аукубин (0,37%) и каталпол, сапонины, кумарин эскулетин, горькие, дубильные, стероидные вещества, следы алкалоидов; органические кислоты: бензойная, салициловая, сиреневая и др.; оксикоричные кислоты: хлорогеновая, коричная, паракумаровая, феруловая, кофейная, сиреневая, ваниловая и др.; аминокислоты, тиразол, эфирное масло, фитонциды, витамины К, С, пантотеновая кислота; макро- и микроэлементы.

Применение и лекарственные формы

Листья входят в состав сборов от кашля. Сок из свежей травы употребляют при гастритах и хронических коликах. Из водного экстракта листьев получен препарат плантаглюцид в виде гранул, который применяются для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

Семена подорожника большого в сочетании с экстрактом крушины в виде пургенола применяется как слабительное [13,15].

Для внедрения нового препарата гипогликемического действия в медицинскую практику было изучено влияние его на физиологический уровень крови, а также на содержание сахара в крови при гипергликемии вызванной глюкозой.

Для анализа использовали настои из сбора (1:10), которые готовили в соответствии с требованиями статьи ГФ XI "Настои и отвары" и использовали свежеприготовленными. Изучение влияния гипогликемического сбора на физиологический уровень крови определяли по методике [27,29] на 12 крысах массой 140-160 г.



Рис.1. Шелкови́ца бе́лая - Morus alba L.



Рис.2. Подорожник большой – Plantago major L.

Крысы в течение 7 дней содержались в условиях вивария. Перед опытом крыс взвешивали и определяли исходную концентрацию сахара в крови. Кровь брали после помещения животных в специальную камеру – домик для исключения чрезмерного волнения. После установления исходной концентрации глюкозы в крови крыс разделили на две группы по 6 голов в каждой. 1-я группа являлась контрольной и получала воду в объеме 1,5-1,7 мл внутрь, второй опытной группе вводили внутрь атравматическим зондом водный настой гипогликемического сбора в дозе 10 мл/кг однократно. Через 60 и 120 мин после орального введения испытуемого раствора определяли уровень сахара в крови крыс. Определение сахара в крови проводили с применением стандартного набора фирмы «ЭКО – лаб» Россия по глюкозооксидазному методу. Измерение оптической плотности проб проводили на приборе КФК. Полученные результаты обработаны статистически. Изучено также сахароснижающее действие гипогликемического сбора (ГС) на модели гипергликемии вызванной нагрузкой высоких доз глюкозы по методике [5,6] на 12 крыс массой 150 – 170 г. Крысы в течение 7 дней содержались в условиях вивария. Перед опытом крыс взвешивали и определяли исходную концентрацию сахара в крови. Кровь брали после помещения животных в специальную камеру – домик для исключения чрезмерного волнения. После установления исходной концентрации глюкозы в крови крыс разделили на две группы по 6 голов в каждой. 1-я группа являлась контрольной и получила очищенную воду в объеме 1,5-1,7 мл внутрь, вторая опытная вводили внутрь атравматическим зондом водный настой сбора в дозе 10 мл/кг, однократно. Через 30 мин после орального введения испытуемого растворов крысам обеих групп инъецировали внутрибрюшинно 40% ампульный раствор глюкозы из расчета 5000 мг/кг. Спустя 2 часа после глюкозной нагрузки вновь определяли содержание сахара крови

Данные по изучению действия сбора на физиологический уровень глюкозы в крови у крыс представлены в таблице 1.

Таблица 1

Действие гипогликемического сбора на физиологический уровень глюкозы в крови крыс ($M \pm m$, $n=6$).

Условие опыта	Исходная $n=6$	ГС 1-й час	ГС 2-час	
Содержание глюкозы в крови, ммоль/л	$6,00 \pm 0,38$	$6,65 \pm 1,14$	$4,65 \pm 0,43$	$P < 0,01$

Как видно из таблицы, что исходная концентрация сахара в крови крыс равна $6,00 \pm 0,38$ ммоль/л., однократное введение гипогликемического сбора вызывало недостоверное повышение уровня сахара крови в первый час после резорбции. Во 2-й час выявлено снижение уровня сахара в крови опытных крыс на 22,5 при сравнении с исходной концентрацией гликемии у крыс.

Данные по изучению действия гипогликемического сбора на уровень глюкозы в крови при гипергликемии представлены в таблице 2.

Таблица 2

Действие гипогликемического сбора на уровень глюкозы в крови крыс при гипергликемии ($M \pm m$, $n=6$).

Условия опыта	Исходная $n=12$	Контроль (глюкоза)	ГС + глюкоза	
Содержание глюкозы в крови, ммоль/л	$4,56 \pm 0,38$	$10,43 \pm 1,14$	$7,21 \pm 0,43$	$P < 0,01$

Как видно из таблицы 2, исходная концентрация сахара в крови крыс равна $4,56 \pm 0,38$ ммоль/л, инъекция глюкозы привела к повышению

уровня сахара в крови контрольных крыс более чем в 2,2 раза. В аналогичных условиях через 2 часа после получения настоя сбора в крови опытных крыс отмечается снижение сахара крови до $7,21 \pm 0,43$ ммоль/л, что ниже контрольного уровня на 30,8 %. Данный факт свидетельствует об ингибировании гипергликемической реакции организма на введение экзогенной глюкозы.

Результаты проведенных исследований показали, что гипогликемический сбор вызывает снижение уровня сахара у здоровых крыс, а также при гипергликемии, вызванной нагрузкой высоких доз глюкозы.

1.4. Современные подходы к разработке и стандартизации растительных сборов

В настоящее время лекарственные растительные сборы широко используются в народной и научной медицине, благодаря гармоничному взаимодействию различных групп биологически активных веществ. Они хорошо зарекомендовали себя как средства комплексной, реабилитационной терапии и профилактики многих заболеваний органов пищеварения, дыхания, сердечно-сосудистой системы, почек и др.

Если раньше состав сборов определялся эмпирически, путем проб и ошибок, то в последние годы формируются новые подходы к созданию фитокомпозиций. Подбор компонентов сборов осуществляют, исходя из современных представлений о патогенезе заболевания, учитывая опыт составления сложных рецептов в народной медицине, их успешное использование в лечении различных заболеваний, доступность и достаточные запасы лекарственного растительного сырья, а также результаты фармакологического скрининга. При составлении композиций необходимо также иметь в виду, что помимо основного, фармакологического эффекта сбор должен способствовать нормализации

функций и систем, нарушенных в связи с течением заболевания. В качестве возможных компонентов рассматриваются только виды лекарственного растительного сырья, разрешенные к применению и соответствующие требованиям действующей нормативной документации [11,12,24].

Следует учитывать технологические и диагностические свойства включаемых компонентов. Сильная опушенность надземных частей и волокнистость некоторых подземных органов, затрудняют измельчение и смешивание компонентов, отрицательно влияют на сыпучесть сборов и их фасовку как в пачки и в фильтр-пакеты. Поэтому в ходе исследований проводится замена в составе сборов некоторых компонентов на близкие по фармакологической активности и коррекция процентного содержания компонентов с низкими технологическими свойствами.

Стандартизация новых растительных сборов с последующей разработкой проектов нормативной документации является неременным условием внедрения их в медицинскую практику и промышленное производство [30].

Общая статья ГФ XI, посвященная сборам [31], регламентирует определение подлинности компонентов по внешнему виду при рассмотрении невооруженным глазом и с помощью лупы (10х). Трудно распознаваемые или сильно измельченные частицы подвергают микроскопическому анализу,

В сборах определяют содержание действующих веществ (методы определения указываются в соответствующей нормативной документации), влажность, содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, измельченность, а также содержание примесей.

Внедрение новых видов сборов, промышленных технологий и развитие фармакогностических методов анализа лекарственного

растительного сырья делают актуальным пересмотр и унификацию требований к качеству сборов.

Результаты исследований по разработке и фармакогностическому анализу новых сборов показали целесообразность постановки вопроса о диагностичности сборов при контроле их качества. Особое значение этот вопрос приобретает относительно сборов, фасованных в фильтр-пакеты, так как для их производства предусматривается измельченность сырья менее 2 мм. Определение подлинности многокомпонентных смесей растительного сырья с таким размером частиц вызывает большие затруднения и требует включения в нормативную документацию дополнительных характеристик, позволяющих в совокупности сделать вывод о видовой принадлежности растительных частиц [32-34].

Для обеспечения диагностичности сборов рекомендуется соблюдение следующих основных условий:

- обеспечение необходимого фармакологического эффекта минимальным количеством компонентов;
- ограничение числа компонентов, относящихся к одной морфологической группе сырья;
- оптимальная измельченность, не затрудняющая визуализацию морфологических признаков всех видов сырья, входящих в состав сбора.

Экспериментальный материал по фармакогностическому исследованию сборов различной измельченности (от 7 до 2 мм), включающих от 5 до 26 компонентов из различных морфологических групп, послужили специалистам основой для создания унифицированного подхода к определению подлинности этой группы лекарственных средств с учетом макро-, микроскопических и химических характеристик. Он заключается в детальном макроскопическом изучении сбора с использованием бинокулярной лупы или стереомикроскопа,

дифференциации сбора на отдельные компоненты по внешним признакам для последующего подтверждения их видовой принадлежности в ходе микроскопического исследования. Микроскопический анализ, так же как макроскопический, должен проводиться с целью получения максимально возможной информации о диагностических признаках всех компонентов сбора и элементов, относящихся к ним, т.е. для трав, например, должны быть приведены не только диагностические признаки листьев, но и цветков, плодов. На основании макро-, микроскопического анализов и качественных реакций, особенно в случае сложных прописей, целесообразно составлять и включать в нормативную документацию «Определитель» видов сырья, входящих в состав сбора. Наличие иллюстраций (рисунков) к разделам «Внешние признаки» и «Микроскопия» в значительной степени повышает достоверность анализа.

Важную роль в определении подлинности сбора, особенно высокой дисперсности, играют химические характеристики, получаемые в ходе качественного химического анализа. Наиболее информативными являются хроматографические методы анализа (ТСХ, ГХ, ГЖХ, ВЭЖХ), позволяющие делать заключение не только о подлинности сбора, но и о его чистоте.

Стандартизация сборов по действующим веществам осуществляется с учетом их химического состава. Поскольку основным показателем качества растительных сборов является содержание в них действующих веществ, большое внимание уделяется проведению комплекса фармакологических и фитохимических исследований по выявлению в них веществ, доминирующих не только в количественном отношении, но и определяющих терапевтический эффект [34], а также разработке и внедрению современных методов их количественного определения.

Так как растительные сборы предназначены для приготовления водных извлечений (настоев, отваров), при их стандартизации

рекомендуется определение содержания экстрактивных веществ, а также отдельных действующих веществ или группы биологически активных веществ, переходящих в водное извлечение. Как показывает анализ литературы, детальному изучению подвергают полисахариды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, фенольные гликозиды, которые преобладают в водных извлечениях из растительных сборов.

В случаях, когда действующим веществом является индивидуальное соединение или, что бывает гораздо чаще, два-три близких по структуре с установленным химическим составом и не отличающихся по фармакологической активности, при разработке методики анализа целесообразно предусмотреть включение стадии отделения этих веществ от сопутствующих продуктов с последующим количественным определением индивидуального соединения или суммы веществ титрометрическими, спектрофотометрическими, спектрофлуоресцентными и полярографическими методами.

Необходимость определения незначительных концентраций действующих веществ на фоне сложного матрикса биологически активных веществ предъявляет высокие требования к селективности и чувствительности методов анализа. Такими методами с соответствующей степенью избирательности, точности и доступности для внедрения в промышленное производство являются оптические и электрохимические методы в сочетании с различными видами хроматографии. В последние годы широкое распространение в анализе растительных сборов получили методы газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющие с высокой степенью точности определять качественно и количественно отдельные биологически активные доминантные соединения.

Исходя из потребностей практического здравоохранения в высокоэффективных комплексных фитопрепаратах с поливалентным

спектром действия, в последние годы разрабатываются перспективные и рациональные подходы к созданию лекарственных препаратов (настоек, экстрактов) на основе многокомпонентных сборов. При этом важное место отводится так называемой «сквозной» стандартизации, в основе которой лежит оценка качества сбора и полученных из него фитопрепаратов по содержанию одних и тех же биологически активных соединений. Это позволяет в достаточной мере гарантировать качество и постоянный состав суммарных препаратов.

Современные подходы к проблемам совершенствования качества сборов предъявляют новые требования к разрабатываемым нормативным документам [30].

В настоящее время отечественная нормативная документация на лекарственное растительное сырье, в т.ч. сборы, не регламентирует содержание не только необходимых, но и токсичных элементов. Отсутствие научно обоснованных значений предельно допустимых концентраций элементов приводит к тому, что заготовка сырья производится в различных районах, в т.ч. экологически неблагоприятных. Очевидно, что назрела необходимость установить содержание тяжелых металлов в отечественном сырье с тем, чтобы разработать научно обоснованные ПДК элементов для лекарственного растительного сырья и включить этот показатель в нормативную документацию. Кроме того, возросшая во всем мире опасность радиационного загрязнения требует введения показателя радиационной чистоты [35].

В числе показателей, нормирующих качество и безопасность лекарственных растительных средств, ВОЗ рекомендует также определять в них остаточное содержание пестицидов [36]. Последние, как известно, могут переходить в приготовленные из растительного сырья лекарственные формы, оказывая при их использовании острое токсичное и серьезные хронические воздействия на организм. Так, организация по защите

окружающей среды (ЕРА) допускает, что из 320 пестицидов, разрешенных к применению в агрономии, по меньшей мере, 66 являются вероятными канцерогенами [37]. Связанные с пестицидами хронические эффекты включают также заболевания нервной системы, репродуктивные расстройства, подавление иммунной системы и эндокринные нарушения. Согласно оценке экспертов Всемирного банка, от случайного отравления пестицидами в мире ежегодно погибают 355 тыс. человек. Возможное же количество серьезных случайных отравлений пестицидами составляет миллион случаев в год [38].

При необходимости в лекарственном растительном сырье, в т.ч. используемом при составлении композиций, и в самих сборах может быть регламентировано предельное содержание потенциальных канцерогенов – афлатоксинов (ядовитых веществ, вырабатываемых плесневыми грибами, главным образом рода *Aspergillus*) [39].

Целесообразным является также наличие в тексте отечественных нормативных документов иллюстраций хроматографического исследования лекарственного растительного сырья, не регламентируемое пока НД.

Подходы к стандартизации и требования к качеству лекарственного растительного сырья, заложенные в нормативных документах различных стран, сближаются. Наблюдаемая гармонизация требований является необходимой мерой, направленной на органичное вхождение препаратов растительного происхождения в номенклатуру современных эффективных лекарственных средств [39,40]. Это необходимо учитывать при разработке отечественной НД на лекарственное растительное сырье.

Выводы по I главе

Таким образом, приведенный выше обзор литературы указывает на необходимость использования фитотерапии в комплексном лечении сахарного диабета и их сочетанной патологии. Синтетические гипогликемические лекарственные средства, широко используемые в современной фармакотерапии, обладая высокой терапевтической активностью, тем не менее, могут стать при длительном применении причиной различных нарушений функций и структур организма вследствие нежелательных побочных явлений. По сравнению с ними лекарственные растения и, особенно, их оптимальные сочетания – сборы менее токсичны, легче усваиваются организмом и могут быть использованы длительное время без особых осложнений. В силу комплексного воздействия содержащихся в них биологически активных веществ растительные средства повышают эффективность лечения и профилактики указанных заболеваний, улучшают обмен веществ, сопротивляемость организма, в результате чего уменьшаются медикаментозная нагрузка и риск побочных эффектов химиотерапии.

Принимая во внимание несомненные преимущества растительных сборов и потребность практической медицины в эффективных и безопасных противотуберкулезных и гипогликемических препаратах, разработка, стандартизация и внедрение в практику здравоохранения новых инновационных сборов и лекарственных средств на их основе для лечения сочетанной патологии туберкулеза и сахарного диабета представляется практически важной задачей.

Решению этой задачи и посвящена настоящая магистерская диссертационная работа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА II. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА

2.1. Определение и идентификация основных групп биологически активных веществ сбора.

Для анализа использовали серийные образцы сбора, приготовленные в соответствии с указаниями статьи «Сборы» ГФ XI издания [41]. Лекарственное растительное сырье измельчали по отдельности до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. После чего пыль отсеивали сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм. Далее компоненты отвешивали и перемешивали до получения равномерной массы.

Для определения химического состава сбора проведено предварительное исследование его на содержание основных групп биологически активных веществ с использованием общеизвестных качественных реакций и хроматографических методов анализа [42-46].

Результаты исследования приведены в таблице 2.2.

Для подтверждения полученных результатов и идентификации обнаруженных веществ проведено сравнительное хроматографическое изучение извлечений, где эти вещества были выявлены, с соответствующими извлечениями исходных компонентов сбора в присутствии достоверных образцов «свидетелей». При визуальном сравнении хроматограмм до и после обработки хромогенными реактивами обнаружено большое сходство по набору биологически активных соединений в извлечениях сбора и его компонентов, отличающихся лишь величиной и интенсивностью пятен в УФ – свете.

При хроматографировании водного извлечения на бумаге (немецкая, марки FN-3 Mittelschnell laufend) в системе растворителей бутанол-уксусная кислота – вода (4:1:5) было подтверждено наличие следующих веществ:

- аскорбиновой кислоты (R_f 0,42, проявитель – реактив Тильманса);
- органических кислот: лимонной (R_f 0,48), яблочной (R_f 0,57), щавелевой (R_f 0,62), янтарной (R_f 0,6) (проявитель – 0,04% раствор бромфенолблау);
- свободных сахаров, представленных глюкозой (R_f 0,49), мальтозой (R_f 0,30), фруктозой (R_f 0,63), сахарозой (R_f 0,38) (проявитель – реактив Феллинга).

Полисахариды из водного извлечения выделяли осаждением этанолом. Моносахаридный состав полисахаридов определяли после гидролиза [122,123]. Гидролиз 0,05 г абсолютно сухого полисахарида проводили 2,5 мл 2 М серной кислоты на кипящей водяной бане в течение 8 ч. После нейтрализации бария карбонатом гидролизат обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+ -форма), концентрировали и хроматографировали одновременно с достоверными образцами на бумаге в системах бутанол-пиридин-вода (6:4:3) для нейтральных сахаров и этилацетат-уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (18:3:1:4) для кислых сахаров. Для обнаружения сахаров использовали кислый раствор анилинфталата и термическую обработку. В результате хроматографического анализа установлено, что полисахаридный комплекс сбора включает нейтральные моносахариды: D-глюкозу, L-фруктозу.

В гексановом извлечении методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» в системе гексан - диэтиловый эфир (17:3) обнаружили также 3 веществ каротиноидной природы, проявляющихся в виде пятен синего цвета на желто-зеленом фоне после обработки 10% спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и прогрева при температуре 60-80°C. При сопоставления с аутентичным образцом одно из обнаруженных веществ (R_f 0,48) идентифицировали с β -каротином.

Для определения кумаринов образцы сбора экстрагировали 95% этанолом на холоду в течение 24 ч. Затем извлечение центрифугировали со скоростью 4,5 тыс. об/мин в течение 7 мин, декантировали и

хроматографировали на пластинках «Silufol UV-254» в системе растворителей гексан-этилацетат (3:1). При просматривании высушенных хроматограмм в УФ-свете обнаружено 2 пятна с R_f 0,14 и 0,46, имеющих ярко-голубую флуоресценцию и дающих положительную реакцию с реактивом Паули. Это позволило отнести обнаруженные вещества к кумаринам.

Для выделения фенолкарбоновых кислот спиртовой экстракт растительного сбора хроматографировали на колонке с полиамидным сорбитом. Элюирование проводили водой; полученные фракции исследовали при помощи хроматографии на бумаге. Фракции, содержащие фенолкарбоновые кислоты, объединяли. Из подкисленных до pH 3 водных элюатов фенолкарбоновые кислоты извлекали этилацетатом. Затем этилацетатные извлечения упаривали и остаток хроматографировали в системе растворителей бензол-пропионовая кислота-вода (2:2:1). При проявлении хроматограмм диазотированной сульфаниловой кислотой определено наличие не менее 4 фенолкарбоновых кислот, из которых 3 идентифицированы путем сопоставления с достоверными образцами веществ (бензойная R_f 0,25, галловая R_f 0,28, салициловая R_f 0,30).

Для определения флавоноидов спиртовые извлечения сбора, полученные описанным выше способом, подвергали хроматографическому исследованию на бумаге (немецкая, марки FN-3 Mittelschnell laufend) в системе растворителей 15% уксусной кислоты и н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5). В аналогичных условиях проводили разделение аутентичных образцов («свидетелей»). Флавоноиды определяли по характеру флуоресценции в УФ-свете до и после обработки хромогенными реактивами (парами аммиака, спиртовым раствором натрия гидроксида, 1% спиртовым раствором алюминия хлорида) и сопоставлением значений R_f обнаруженных веществ и аутентичных образцов. Идентификацию флавоноидов на хроматограммах проводили также путем внесения заведомо известных соединений в исходный экстракт. При этом наблюдали усиление

соответствующего пятна.

Результаты анализа приведены в таблице 3.

Таблица 3

**Цветные реакции и данные хроматографического анализа
флавоноидных соединений гипогликемического сбора**

№	Значение Rf в системах		1% раствор $AlCl_3$ в этаноле	5% водный раствор натрия гидроксида	Характер флюоресценции В УФ-свете		Идентифицированный флавоноид
	БУВ (4:1:5)	15% CH_3COOH			до обработки парами аммиака	после обработки парами аммиака	
1.	0,45	0,14	бледно-желтая	желтая	желтая	желтая	рутин
2.	0,55	0,35	бледно-желтая	ярко-желтая	ярко-зелено-желтая	ярко-желтая	гиперозид
3.	0,78	0,02	бледно-желтая	желтая	ярко-желтая	ярко-желтая	кверцитин

Для определения дубильных веществ готовили водные извлечения и провели следующие качественные реакции.

Реакции осаждения.

1. К 2-3мл извлечения добавили по каплям 1% раствор желатины. Появилось муть исчезающая при добавлении избытка реактива.

2. К 2 - 3 мл извлечения прибавили несколько капель 1% раствора хинина хлорида. Появился аморфный осадок.

Цветные реакции.

При добавлении к 2-3 мл извлечения 4 - 5 капель раствора железоаммониевых квасцов появилось черно-синее окрашивание.

Реакции классификации дубильных веществ

1. К 2 мл фильтрата добавили 10 капель 1% железоаммониевых квасцов и около 0,2мл кристаллического ацетата свинца, раствор перемешали. Гидролизуемые дубильные вещества окрасились в сине-фиолетовый цвет (в нейтральной среде).

2. К 1 мл извлечения добавили 2 мл 10% CH_3COOH и 1 мл 10% $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ - гидролизуемые дубильные вещества образовали осадок.

Для обнаружения сапонинов готовили извлечение из сбора по следующей методики. Для этого 1 г сбора заливали 100 мл 0,9% раствора хлорида натрия и нагревали в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 минут. После остывания фильтровали и фильтрат использовали для качественных реакций.

Качественные реакции для обнаружения сапонинов

1. Реакция пенообразования. 2-3 мл извлечения сильно встряхивали в пробирке.
2. Реакция гемолиза крови. К 2 мл отвара добавили равный объем 2% раствора дефибринированной крови. Не образовалось прозрачный раствор красного цвета.
3. Реакция Фонтана-Канделя. Берут две пробирки. В них налили по 5 мл отвара и в одну из пробирок налили 2 мл 0,1 н раствора соляной кислоты (рН 1,0), а в другую – 2 мл 0,1н раствора гидроокиси натрия (рН 13) и энергично встряхивали в течение одной минуты. В обеих пробирках не образовалась пена.

Для проведения качественных реакций на алкалоиды готовили уксусно-кислые извлечения из сбора (по Юрашевскому). Для этого 1 г навески сбора помещали в колбу емкостью 150мл и доливали 2% раствором уксусной

кислоты, до покрывания сырья и нагревали до кипения. Затем смесь охлаждали и отфильтровывали. 1-2 капли фильтрата помещали на предметные стекла и рядом по 1 капле используемого реактива осторожно перемешивая капли, наблюдая в местах слияния эффект реакции. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты реакции на алкалоиды

№	Название реактива	Состав реактивов	Среда	Результаты реакции-осадки
1	Вагнера	$I_2 + KI$	Кислая	-
2	Драгендорфа	$BiI_3 + KI (KBiI_4)$	Кислая	-
3	Зонненштейна	К-та фосфорно-молибденовая $H_2BO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2H_2O$	Кислая	-
4	Шейблера	К-та фосфорно-вольфрамовая $H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$	Кислая	-
5	Р-р танина	10%	Кислая	-
6	Пикриновая кислота	1%	Кислая	-

Результаты обнаружения и идентификации биологически активных веществ гипогликемического сбора приведены в таблице 5.

Таблица 5

Химические компоненты гипогликемического сбора

Исследованные группы	Результаты анализа
----------------------	--------------------

Углеводы:	
сахара (глюкоза, мальтоза, фруктоза, сахароза)	+
водорастворимые полисахариды	+
Витамины (аскорбиновая кислота, каротиноиды)	+
Органические кислоты (лимонная, яблочная, щавелевая, янтарная)	+
Флавоноиды (рутин, кверцетин, гиперозид)	+
Фенолкарбоновые кислоты	+
(бензойная, галловая, салициловая)	+
Кумарины	+
Дубильные вещества	+
Эфирные масла	+
Алкалоиды	-
Сапонины	-

Из данных приведенных в таблице следует, что гипогликемический сбор содержит основные группы биологически активных веществ, характерные для его исходных компонентов - листьев подорожника большого и шелковицы белой.

2.2. Количественное определение основных групп биологически активных веществ

Содержание флавоноидов сбора определяли спектрофотометрическим методом [47]. В основе последней лежит реакция комплексообразования с алюминия хлоридом в солянокислой среде в сочетании со спектрофотометрическим дифференциальным определением оптической плотности комплексов, что позволяет проводить непосредственное

спектрофотометрирование в извлечениях из сбора (после гидролиза) без дополнительных трудоемких стадий очистки при 430 нм.

Аналитическую пробу сбора измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 30 мл 90% спирта, содержащего 1% концентрированной хлористоводородной кислоты, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяли еще раз указанным выше способом, затем еще 1 раз 90% спиртом в течение 30 мин. Извлечения фильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу, промывали фильтр 90% спиртом и доводили объем фильтрата 90% спиртом до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2 мл раствора А, прибавляли 1 мл 1% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводили объем раствора 95% спиртом до метки. Через 20 мин измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенного 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

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

$$X = \frac{K \cdot D \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{856 \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - w)}$$

где K - поправочный коэффициент; D - оптическая плотность исследуемого раствора; 856 - удельный показатель поглощения комплекса кверцетина с алюминия хлоридом при 430 нм; m - масса сырья, в граммах; w - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

П р и м е ч а н и е. Определение поправочного коэффициента по калию дихромату: около 0,05г (точная навеска) калия дихромата, высушенного до постоянной массы при температуре 100-105⁰С, растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в 30 мл 0,005 моль/л раствора серной кислоты и доводят объем раствора той же кислотой до метки и перемешивают.

К 2 мл полученного раствора прибавляют 8 мл 0,005 моль/л раствора серной кислоты, перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 0,005 моль/л раствора серной кислоты. Удельный показатель поглощения калия дихромата ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) вычисляют по формуле:

$$E_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{D \cdot 50 \cdot 10}{a \cdot 2 \cdot 1}$$

где D - оптическая плотность исследуемого раствора; a - масса калия дихромата в граммах.

Содеожание флавоноидов гипогликемического сбора составляет в среднем $0,4 \pm 0,10$ %.

Количественное содержание кумаринов определяли по методу Никонова Г.К. и соавт. [48]. 25 г сбора (точная навеска) экстрагировали в аппарате Сокслета хлороформом. Далее полученное хлороформное извлечение отгоняли; остаток нагревали на водяной бане с 20 мл 10% раствора натрия гидроксида, затем обрабатывали хлороформом четыре раза по 25 мл в делительной воронке. Оставшийся щелочной раствор подкисляли 20% раствором серной кислоты и вновь обрабатывали хлороформом. Хлороформные извлечения объединяли, обрабатывали последовательно 20 мл 5% раствора натрия карбоната и 20 мл воды, после чего обезвоживали безводным натрия сульфатом. Хлороформ отгоняли, остаток высушивали при 70⁰С до постоянного веса и взвешивали.

Содержание кумаринов в сборе составляет $0,05 \pm 0,10$ %.

Здесь и далее результаты определений математически обработаны и статистически достоверны.

Фенолкарбоновые кислоты определяли весовым методом. Для этого 200 г сбора экстрагировали этиловым спиртом на водяной бане с обратным холодильником. Полученный спиртовой экстракт сгущали, растворяли в небольшом количестве спирта и разбавляли очищенной водой в соотношении 1:2. Полученный раствор обрабатывали эфиром 5 раз по 100 мл. Эфирные извлечения объединяли и обрабатывали несколько раз 10% раствором натрия карбоната. Затем объединенный содовый раствор подкисляли 10% раствором серной кислоты и извлекали несколько раз эфиром. Далее полученные извлечения объединяли, промывали несколько раз водой, обезвоживали, отгоняли и взвешивали остаток, содержащий сумму фенолокислот.

Содержание фенолкарбоновых кислот в исследуемом сборе составляет в среднем $0,25 \pm 0,09$ %.

Количественное содержание полисахаридов в исследуемом сборе определяли гравиметрическим методом после осаждения этанолом [41]. Аналитическую пробу сбора измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 200 мл воды, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию повторяли еще 2 раза, используя первый раз 200 мл, второй – 100 мл воды. Водные извлечения объединяли, центрифугировали с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантировали в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм, предварительно промытую водой. Фильтр промывали водой и доводили объем раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещали в центрифужную пробирку, прибавляли 75

мл 95% спирта, перемешивали, подогревали на водяной бане до 30°C в течение 5 мин. Через час содержимое центрифугировали с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтровали под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100-105°C стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Осадок количественно переносили на фильтр и последовательно промывали 15 мл раствора 95% спирта в воде (3:1), 10 мл ацетона, 10 мл этилацетата. Фильтр с осадком высушивали сначала на воздухе, затем при температуре 100-105°C до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (x) вычисляли по формуле:

$$x = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где m_1 – масса фильтра в граммах; m_2 – масса фильтра с осадком в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах

Установлено, что содержание водорастворимых полисахаридов в исследуемом сборе составляет в среднем $9,3 \pm 0,3\%$.

Содержание нейтральных (восстанавливающих) сахаров определяли спектрофотометрическим методом после реакции с пикриновой кислотой в щелочной среде [49]. Для этого полисахариды осаждали этанолом из 25 мл раствора А, как описано выше. Осадок на фильтре промывали 10 мл смеси 95% спирта и воды (3:1), переносили количественно, используя 7,5 мл разведенной хлористоводородной кислоты, в колбу со шлифом и нагревали в течение 30 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Гидролизат нейтрализовали 30% водным раствором натрия гидроксида. Раствор количественно фильтровали через плотный бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем водой до метки (раствор Б).

К 1 мл раствора Б прибавляли 1 мл 1% раствора пикриновой кислоты и

3 мл 20% раствора натрия карбоната, после чего нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем раствор охлаждали и переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 460 нм. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца глюкозы.

Содержание восстанавливающих сахаров в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (x) вычисляли по формуле:

$$x = \frac{D \cdot 0,00056 \cdot 500 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_{cm} \cdot m \cdot 1 \cdot 25(100 - w)},$$

где: D – оптическая плотность исследуемого раствора; D_{cm} – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы; 0,00056 – концентрация стандартного образца глюкозы в 1 мл; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Содержание восстанавливающих сахаров в сборе составляет в среднем $5,35 \pm 0,12\%$.

Количественное содержание каротиноидов в сборе определяли по методике [50].

Содержание каротиноидов в сборе составляет в среднем $3,3 \pm 0,50$ мг%.

Количественное содержание дубильных веществ определяли перманганатометрическим методом. Около 2 г сбора помещали в колбу вместимостью 500 мл, заливали 250 мл нагретой до кипения воды и кипятили с обратным холодильником на электрической плите с закрытой спиралью, в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждали и процеживали около 100 мл в колбу вместимостью 250 мл через вату. 25 мл полученного извлечения помещали в коническую колбу вместимостью 1 л, прибавляли 500 мл воды, 25 мл индигосульфокислоты и титровали при постоянном перемешивании раствором калия перманганата (0,02 моль/л) до золотисто-желтого окрашивания.

После полного окисления танидов перманганат окисляет индисульфокислоту до изатина, в результате чего окраска из синей переходит в золотисто-желтую:

Параллельно проводили контрольный опыт (титровали 25 мл индигосульфокислоты в 500мл воды).

Содержание дубильных веществ (х) в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) * 0.004157 * 250 * 100 * 100}{m * 25 * (100 - W)}$$

где V-объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, в миллилитрах; V-объем раствора калия перманганата (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л) (в пересчете на танин), в граммах; m-масса сырья в граммах; W-потеря в массе при высушивании сырья в процентах; 250-общий объемизвлечения в миллилитрах; 25-объем извлечения, взятого для титрования, в миллилитрах.

Содержание дубильных веществ в сборе составляет в среднем $4,50 \pm 0,40\%$.

Содержание аскорбиновой кислоты определяли по методике [41]. Навеску массой 20 г, помещали в фарфоровую ступку, где тщательно растирали со стеклянным порошком (около 5 г), постепенно добавляя 300 мл дистиллированной воды, и настаивали 10 мин, затем размешивали и фильтровали. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносили 1 мл полученного фильтрата, 1 мл 2% раствора хлористоводородной кислоты, 13 мл воды, перемешивали и титровали из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л) до появления розовой окраски, не

исчезающей в течение 30-60 с.

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

$$X = \frac{V \cdot 0,000088 \cdot 300 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где 0,000088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л), в граммах;

V- объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л), пошедшего на титрование, в миллилитрах; m – масса сырья в граммах;

W- потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Примечание. 2,6-дихлорфенолиндофенол в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой – красную, а при восстановлении обесцвечивается.

Содержание аскорбиновой кислоты в сборе составляет в среднем $110 \pm 2,06$ мг %.

Количественное содержание эфирных масел также определяли по ГФ – XI. В колбу Эрленмейера помещали 20 г исследуемого сбора и заливали 250-300мл воды. Колбу соединяли с холодильником, устанавливали на электрическую печь с асбестовой сеткой и нагревали до кипения. Эфирное масло, увлеченное парами воды, после охлаждения в холодильнике собирается в градуированной трубке, плавая в ней над водой, а избыток последней уходит через боковую трубку обратно в колбу, отдавая парам растворившееся масло.

Перегонка продолжалась до тех пор, пока уровень эфирного масла в приборе Гинзберга не перестала увеличиваться. После охлаждения определяли объем масла. При пересчете на навеску получали объемный процент содержания эфирного масла в исследуемом сборе. Для перевода в весовой процент полученный объем масла умножали на его удельный вес.

$$X = \frac{v.d.100.100}{M(100 - W)};$$

v - объем эфирного масла (мл), d - удельный вес эфирного масла, M - навеска (г), W – влажность (%) сырья.

В результате обнаружены следы эфирного масла в сборе.

Содержание других биологически активных веществ определяли по общеизвестным методикам. В частности, количественное содержание свободных органических кислот определяли по методике, изложенном в ГФ XI [41], сахаров – по методу Фрезениуса [51].

Результаты количественного определения основных групп биологически активных веществ гипогликемического сбора обобщены в таблице 6.

Таблица 6.

**Количественное содержание биологически активных
веществ в гипогликемическом сборе**

Биологически активные вещества	Содержание, % на абс.сухой вес
1	2
Углеводы:	
- моносахариды	5,35±0,12
- водорастворимые полисахариды	9,3±0,3
Витамины:	
- аскорбиновая кислота, мг%	110±2,06
- каротиноиды, мг%	3,3±0,50
Органические кислоты	1,68±0,22
Эфирное масло	следы
Флавоноиды	0,4±0,10
Кумарины	0,05 ±0,10
Фенолкарбоновые кислоты	0,25±0,09

Дубильные вещества	4,50±0,40
--------------------	-----------

Таким образом, в результате изучения химического состава нового растительного сбора установлен комплекс биологически активных веществ, обуславливающих его специфическую активность.

Полученные данные были использованы для обоснования системы стандартизации сбора.

2.3. Стандартизация гипогликемического сбора

Для введения рекомендуемого сбора в медицинскую практику нами решен комплекс вопросов, связанных с его стандартизацией – определением надежных характеристик подлинности и показателей качества сбора, позволяющих разработать необходимую нормативную документацию на их основе.

Подлинность сбора устанавливали по внешним, анатомо-диагностическим признакам и качественным реакциям.

Для определения внешних признаков из средней пробы сбора выделяли аналитическую пробу массой 10 г, помещали на чистую глянцевую бумагу (40х50 см) и определяли в ней по внешнему виду составные компоненты – листья шелковицы белой и подорожника большого, рассматривая их невооруженным глазом и с помощью лупы (10х). Размеры лекарственного сырья определяли с помощью измерительной линейки. Цвет определяли при дневном освещении, запах – при растирании, вкус – в водном извлечении сбора.

Гипогликемический сбор представляет собой смесь измельченных листьев шелковицы белой и подорожника большого, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Листья подорожника скрученные, широкояйцевидные или широкоэллиптические, цельнокрайние или слегка зубчатые, с 3-9 продольными дугообразными жилками, суженные в широкий

черешок различный длины. Листья шелковицы белой почковидно-яйцевидные или яйцевидные, редко продолговато-яйцевидные, часто перистодвупятилопастные или перисторассеченные, при основании сердцевидные слегка неравнобокие, наверху тупые или коротко заостренные, сверху шероховатые или гладкие, снизу по жилкам и в углах их опушенные. Черешки листьев опушенные. Цвет листьев с верхней стороны темно-зеленый, с нижней несколько светлее.

Запах слабый. Вкус своеобразный, слабо-горьковатый.

Морфологические признаки компонентов сбора, выявленные при макроскопическом анализе, полностью соответствовали литературным данным [9,13,15,21].

Для микроскопического анализа аналитическую пробу для определения подлинности сбора помещали на сито по ГОСТ 214-83 с отверстиями размером 0,5 мм и просеивали. Частицы просева использовали для приготовления микропрепаратов, при последующем просмотре которых под микроскопом обнаружены элементы, свойственные листьям шелковицы белой и подорожника большого [9,52].

При разработке методов стандартизации сбора исходили из того, что его фармакологическое действие обусловлено комплексом биологически активных веществ, содержащихся в отдельных компонентах сбора, в частности, полисахаридами, которые выбраны нами в качестве критерия доброкачественности сбора.

Для установления подлинности сбора нами предлагается реакция осаждения полисахаридов 95% этанолом.

М е т о д и к а. К 10 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение») прибавляют 30 мл 95% спирта и перемешивают; появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

При разработке критериев доброкачественности изучаемого сбора в соответствии с указаниями ГФ XI определены прежде всего содержание

действующих веществ, а также влажность, содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, измельченность и содержание примесей.

Количественное содержание полисахаридов в сборе определяли по следующей методике. Около 10 г сбора помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании, на электрической плитке в течение 30 мин.

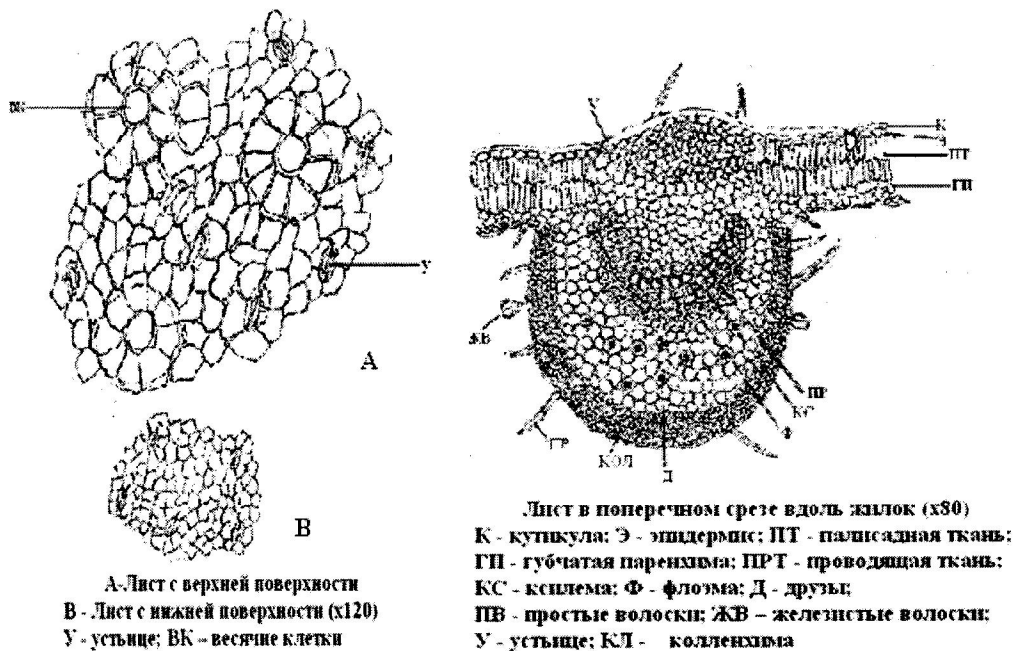


Рис.3 Микроскопия листа шелковицы белой.

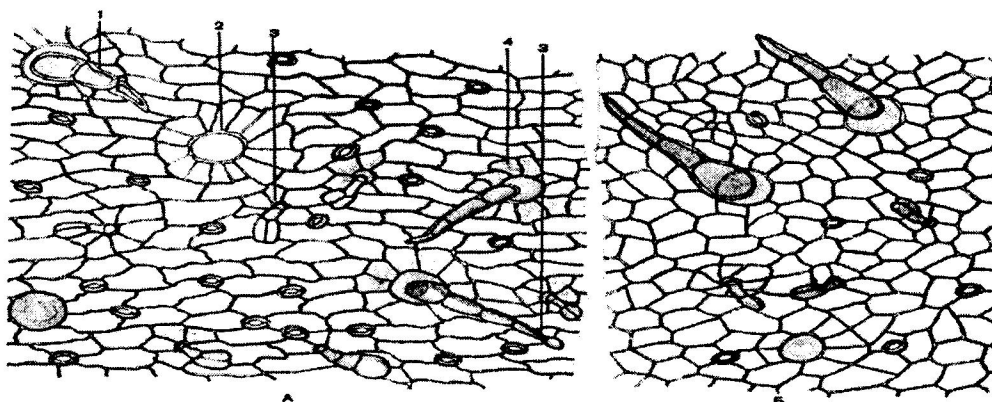


Рис.4 Микроскопия листа подорожника большого

А - эпидермис нижней стороны; Б - эпидермис верхней стороны: 1 - простой волосок; 2 - место прикрепления волоска; 3 - головчатый волосок; 4 - складчатость кутикулы.

Экстракцию водой повторяют ещё 2 раза, используя первый раз 200 мл, второй раз 100 мл воды. Водные извлечения объединяют и центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно смоченной водой. Фильтр промывают водой и доводят объём раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл 95% спирта, перемешивают, подогревают на водяной бане до 30⁰С в течение 5 мин. Через час содержимое центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100-105⁰С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Осадок количественно переносят на фильтр и последовательно промывают 15 мл раствора 95% спирта в воде (3:1), 10 мл ацетона, 10 мл этилацетата. Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100-105⁰С до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 500 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)},$$

где m_1 - масса фильтра в граммах; m_2 - масса фильтра с осадком в граммах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Результаты количественного определения представлены в таблице 7.

Таблица 7

Метрологические характеристики методики количественного определения полисахаридов в гипогликемическом сборе

f	$\bar{x}$	S^2	S	$t(pt)$	Δx	$\Delta \bar{x}$	$E_I\%$	$E\%$
-----	-----------	-------	-----	---------	------------	------------------	---------	-------

5	9,3	0,0275	0,1658	2,78	0,4610	0,216	4,95	2,32
---	-----	--------	--------	------	--------	-------	------	------

Как показали результаты исследования, содержание полисахаридов в сборе колеблется в пределах 9,2-9,4%. Исходя из полученных данных, норма содержания полисахаридов в сборе установлена не менее 8%.

Другие, перечисленные выше числовые показатели определяли по методикам, изложенным в ГФ XI. Исходя из полученных данных установлены нормы числовых показателей, нормирующие качество сбора (табл. 8).

Таблица 8

Числовые показатели гипогликемического сбора

Наименование показателей	Норма для сырья
Содержание полисахаридов, %, не менее	8
Влажность, %, не более	10
Золы общей, %, не более	18
Золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, %, не более	6
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, %, не более	2
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, %, не более	1
Органической примеси, %, не более	1
Минеральной примеси, %, не более	0,5

Таким образом в результате проведенных исследований установлены научно обоснованные показатели подлинности и доброкачественности гипогликемического сбора, послужившие основой для разработки соответствующей нормативной документации.

Выводы по 2 главе

В результате проведенных исследований был изучен химический состав сбора. Проведены качественные реакции, хроматографический анализ и количественное определение основных действующих веществ.

Стандартизация новых растительных сборов с последующей разработкой проектов нормативной документации является непременным условием внедрения их в медицинскую практику и промышленное производство. Учитывая эти обстоятельства были определены числовые показатели, характеризующие подлинность и доброкачественность гипогликемического сбора. Для рекомендации нового сбора как эффективный препарат гипогликемического действия в медицинскую практику были решены вопросы с его стандартизацией. Полученные данные будут использованы для составления проекта ВФС на сбор.

ГЛАВА III. ПОЛУЧЕНИЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

3.1. Получение сухого экстракта.

Исследования последних лет показали целесообразность перевода сборов и индивидуальных видов лекарственного растительного сырья в водорастворимые сухие экстракты, для использования их в качестве субстанций рациональных готовых лекарственных форм, а также концентратов для получения стандартизованных водных извлечений в аптечных и домашних условиях. Суммарные экстракционные препараты сохраняют все свойства многокомпонентных сборов и обеспечивают максимальное содержание биологически активных веществ, точность дозирования, удобство в применении, стабильность при хранении, а также комплексное фармакологическое действие компонентов сбора.

Учитывая вышеизложенное, сотрудниками Ташкентского фармацевтического института разработана технология получения сухого экстракта гипогликемического сбора.

При получении сухого экстракта использована несложная, экономичная (выделение суммы основных биологически активных веществ из растительного сбора осуществляется водой) и безопасная технология, позволяющая добиться выхода готового продукта порядка 20-21% и сохранить физиологическую активность исходного сбора.

Для экстракции комплекса полисахаридов из листьев тутовника белого и подорожника большого использовали стандартное сырьё различной степени измельчения – 100, 200, 300, 400, 500 и 1000 мкм, смешанного в соотношении 1:1. В качестве экстрагента использовали этиловый спирт различной концентрации – 40-96%, а также воду очищенную различной температуры – 20-95° С. Экстракцию проводили методом мацерации. Время экстракции и

температуру сгущения и сушки комплекса полисахаридов устанавливали экспериментально по количеству и качеству выхода готового продукта.

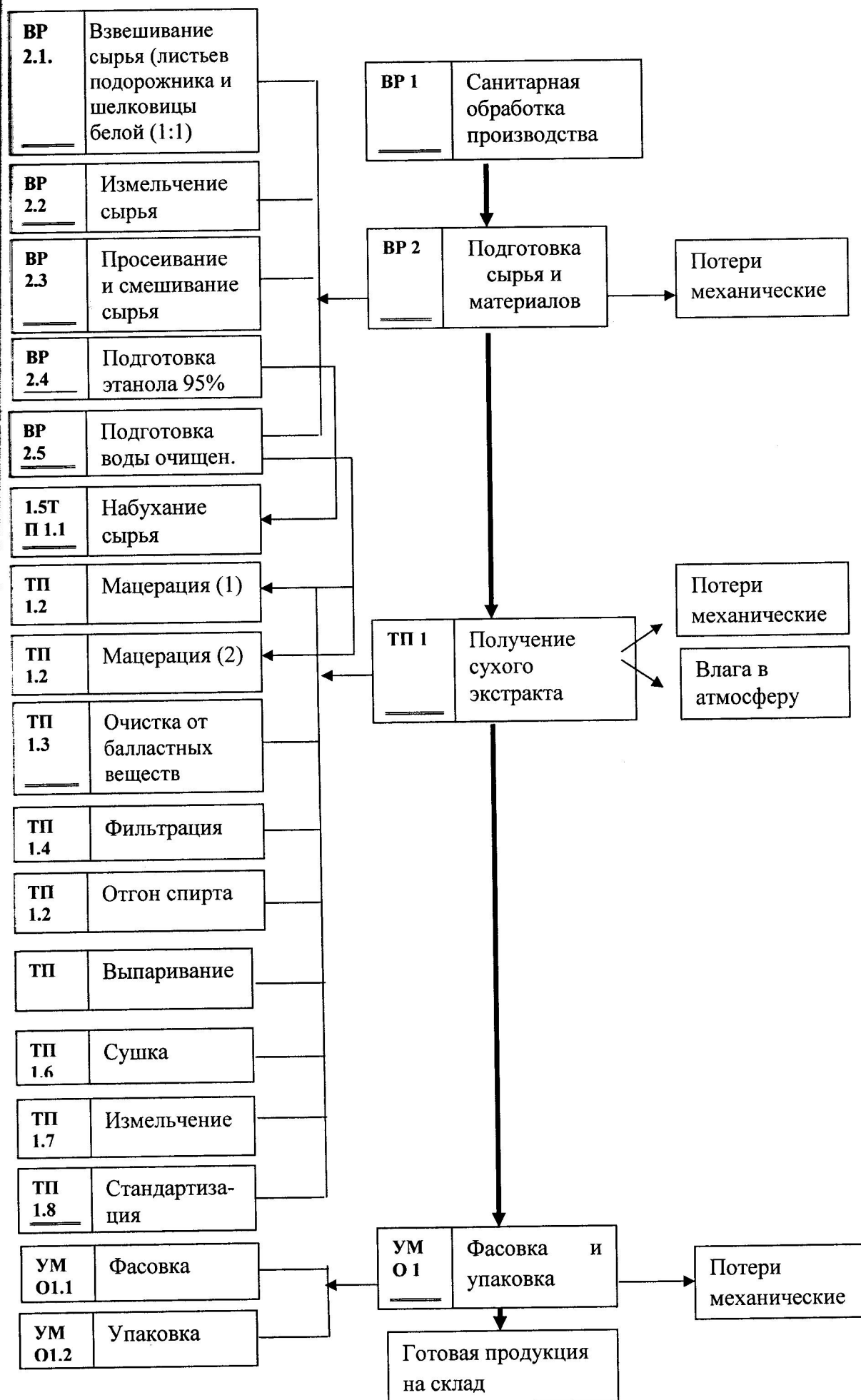
На основе проведённых исследований предложена следующая технология экстракции комплекса полисахаридов: 100 г сбора, состоящего из листьев тутовника белого и подорожника большого (в соотношении 1:1) замачивали в мацерационном баке в 90% этиловом спирте на 3-4 часа, затем в бак заливали 1000 мл воды очищенной температуры 95°C и кипятили на слабом огне в течении 45 минут. Затем вытяжку сливали, а сырьё заливали 500 мл воды очищенной температуры 95°C и кипятили на слабом огне в течении 20 минут. Вторичную вытяжку сливали и объединяли с первичной, фильтровали в горячем виде. Затем вытяжку перенесли в выпарительную чашку и сгущали на медленном огне до $1/10$ первоначального объёма, т.е. до 150 мл. Сгущённую вытяжку перенесли в химический стакан и охладив до температуры 40°C и добавляли трёхкратное количество 90% спирта (450-500 мл), перемешивали и оставляли на 30-40 минут. По истечении времени жидкость осторожно сливают, и осадок промывали 30-50 мл 95-96% спиртом. Осадок сгущали и сушили в сушильном шкафу при температуре $50-70^{\circ}\text{C}$. Полученный комплекс полисахаридов измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 150 мкм.

Таким образом, в результате проведённых исследований выделены полисахаридный комплекс из листьев шелковицы белой и подорожника большого горячей водной экстракцией, а также проведена оценка их качества по внешнему виду – порошок светло буро-коричневой окраски, с металлическим блеском, горького вкуса, без запаха; хорошо растворим в горячей и мало растворим в холодной воде. Остаточная влажность сухого экстракта $3,2 \pm 1,4\%$.

Технологическая схема производства сухого экстракта включает следующие стадии производства:

1. Подготовка растительного сырья (измельчение, взвешивание);
2. Подготовка экстрагента;
3. Набухание сырья 90% этанолом (в соотношении 1:1);
4. Мацерация водой очищенной (температурой $(95 \pm 2)^{\circ} \text{C}$, в соотношении 1:10);
5. Повторная мацерация водой очищенной (температурой $(95 \pm 2)^{\circ} \text{C}$, в соотношении 1:5);
6. Очистка вытяжки от балластных веществ;
7. Фильтрация;
8. Выпаривание;
9. Высушивание;
10. Стандартизация;
11. Фасовка и упаковка.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА СУХОГО ЭКСТРАКТА



3.2. Изучение острой токсичности и влияния водных сухих экстрактов гипогликемического сбора и его компонентов на течение экспериментальной алиментарной гипергликемии

В первой серии исследований была изучена острая токсичность вышеуказанных сухих экстрактов. Согласно методике [53-55] острая токсичность исследуемых сухих экстрактов изучалась на 60 белых мышах, массой 18-22 г обоего пола, которых разделили на 8 групп по 6 особей. Изучаемые экстракты вводили орально в виде 2-5% водных растворов в дозе от 250-500 мг/кг до 1500-2000 мг/кг. Контрольная группа животных получала очищенную воду в соответствующем объеме. Наблюдение за состоянием животных вели в течение двух дней в лаборатории и до 14 дня в условиях вивария. При этом учитывали общее поведение, питание, состояние шерсти животных, двигательную активность, стул, диурез, а также гибель мышей. Все животные содержались в условиях вивария и находились на полноценном пищевом и водном рационе.

В результате проведенных исследований было выявлено, что изучаемые экстракты в дозе 250-500 мг/кг каких-либо изменений не вызывали. В дозе 750-1500 мг/кг отмечалось небольшое седативное действие, что продолжалось в течение 45-60 минут, а в дозе 2000 мг/кг часть животных скопилась в группу, двигательная активность их заметно уменьшилась, через 60-75 минуты она самостоятельно возвращалась к исходной. Внешний вид, дыхание и реакция на внешние факторы у всех животных не изменились. За период наблюдения гибели животных не наблюдалось.

Следовательно, можно заключить, что изучаемые экстракты являются малотоксичными при оральном введении.

В отдельной серии опытов изучали влияние экстрактов на течение экспериментальной алиментарной гипергликемии. Опыты проводили на крысах массой 170-210 г обоего пола. Алиментарную гипергликемию у крыс вызывали однократным внутрибрюшинным введением гипертонического раствора глюкозы в дозе 4,5 г/кг. Изучаемые сухие экстракты вводили орально в дозе по 100 мг/кг за 30 минут до введения глюкозы. Затем через 60, 90 и 120 минут определяли уровень глюкозы в крови ферментативно-колориметрическим методом.

Контрольным животным вводили очищенную воду в соответствующем объеме. Проведенные исследования показали, что изученные экстракты достоверно снижают уровень сахара в крови на 90 минуте исследования. Полученные данные приведены в таблице 9.

Таблица 9

**Влияние водных сухих экстрактов листьев подорожника
большого, шелковицы белой и гипогликемического сбора на
содержание сахара в крови белых крыс ($M \pm m$; $n=6$. Сахар в крови у
интактных животных $4,8 \pm 0,52$ ммоль/л)**

№ п/п	Группа животных	Уровень сахара в крови после введения изучаемых препаратов в дозе 100 мг/кг, через						Гипогли- кеми- ческий эффек- т, %
		60 мин		90 мин		120 мин		
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
1.	Контрольная группа	7,35±0,55	100	7,85±0,51	100	5,35±0,45	100	100
2.	Группа, получавшая сухой экстракт подорожника большого	6,56±0,65	89,3	5,88±0,35 *	74,9	5,62±0,43	96,9	74,9/ 25,1
3.	Группа, получавшая сухой экстракт шелковицы белой	6,61±0,58	89,9	5,79±0,43 *	73,8	5,40±0,50	92,3	73,8/ 26,2
4	Группа, получавшая сухой экстракт гипогликемии- ческого сбора	5,20±0,61	72,7	5,35±0,34	68,1	5,23±0,52	63,1	68,1/ 32,8

*Примечание: достоверные данные при $P < 0,05$ по сравнению к контролю.

Как видно из таблицы 9 максимальный гипогликемический эффект отмечается через 90 минут после введения препаратов. Затем уровень сахара в крови восстанавливается до исходного. Через 60 минут начинается гипогликемический эффект, но оно проявляется недостоверно по отношению к контрольному. Таким образом показано, что изучаемые экстракты листьев подорожника большого, шелковицы белой и гипогликемического сбора являются относительно малотоксичными. На фоне экспериментальной гипергликемии они обладают заметным гипогликемическим действием и снижают сахар в крови на 25,1%, 26,2%, 32,85% соответственно. По результатам фармакологических исследований сухой экстракт гипогликемического сбора, можно рекомендовать как эффективное средство для лечения сахарного диабета.

3.3.Изучение основных групп биологически активных веществ сухого экстракта

Как известно, стандартизация сырья и препаратов из него возможна при наличии точных данных о химическом составе и фармакологической активности действующих веществ, содержащихся в растениях [56]. В связи с этим мы исследовали химический состав сухого экстракта нового гипогликемического сбора для обоснования системы его стандартизации.

Для определения химического состава сухого экстракта сбора проведено предварительное исследование его на содержание основных групп биологически активных веществ с использованием общеизвестных качественных реакций и хроматографических методов анализа [42-46]. Результаты проведенных качественных реакций обобщены в таблице 10.

Как видно из таблицы 10, в сухом экстракте установлено наличие аскорбиновой кислоты, органических кислот, полисахаридов, дубильных веществ, фенолкарбоновых кислот, флавоноидов, кумаринов и др. веществ

Таблица 10

Химические компоненты гипогликемического сбора

Исследованные группы	Результаты анализа
Углеводы:	
сахара (глюкоза, мальтоза, фруктоза, сахароза)	+
водорастворимые полисахариды	+
Витамины (аскорбиновая кислота, каротиноиды, витамин В ₁)	+
Органические кислоты (лимонная, яблочная, щавелевая, янтарная)	+
Флавоноиды (рутин, кверцетин, гиперозид)	+
Фенолкарбоновые кислоты	+
(бензойная, галловая, салициловая)	+
Кумарины	+
Дубильные вещества	+
Эфирные масла	+
Алкалоиды	-
Сапонины	-

Результаты количественного определения основных групп биологически активных веществ, обнаруженных в сухом экстракте приведены в табл.11.

Таблица 11

**Содержание основных биологически активных веществ в
сухом экстракте гипогликемического сбора**

Наименование БАВ	Содержание в абсолютно сухой смеси сырья, %
Аскорбиновая кислота, мг%	120±0,22
Органические кислоты	3,62±0,5
Полисахариды	19,08±0,3
Дубильные вещества	10,05±0,6
Фенолкарбоновые кислоты	0,47±0,1
Флавоноиды	0,6±0,4

На основании полученных данных можно сделать вывод о переходе основных биологически активных веществ в сухой экстракт из сбора, что подтверждает правильность и рациональность разработанной технологической схемы его получения.

Выводы по 3 главе

В результате изучения химического состава сухого экстракта гипогликемического сбора обнаружены сахара, водорастворимые полисахариды, витамины, органические кислоты, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, дубильные вещества, не обнаружены эфирные масла, алкалоиды, сапонины. Также проведены исследования по количественному определению обнаруженных биологически активных веществ. Результаты химического анализа биологически активных веществ показывают правильность разработанной технологической схемы получения сухого экстракта гипогликемического сбора.

ГЛАВА IV. СТАНДАРТИЗАЦИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СБОРА

4.1. Разработка характеристик подлинности.

В результате исследований последних лет показана целесообразность перевода сборов и индивидуальных видов лекарственного растительного сырья в водорастворимые сухие экстракты, для использования их в качестве субстанций рациональных готовых лекарственных форм, а также концентратов для получения стандартизованных водных извлечений в аптечных и домашних условиях.

Суммарные экстракционные препараты сохраняют все свойства многокомпонентных сборов и обеспечивают максимальное содержание биологически активных веществ, точность дозирования, удобство в применении, стабильность при хранении, а также комплексное фармакологическое действие компонентов сбора.

Для введения рекомендуемого сухого экстракта гипогликемического сбора в медицинскую практику нами решен комплекс вопросов, связанных с его стандартизацией – определением надежных характеристик подлинности и показателей качества сбора, позволяющих разработать необходимую нормативную документацию на их основе.

Разработку методов стандартизации проводили на пяти опытных сериях сухого экстракта в соответствии с требованиями статьи Государственной Фармакопеи XI издания «Экстракты» [41]. Из числовых показателей, характеризующих качество сухого экстракта, определяли содержание действующих веществ, влаги, тяжелых металлов, а также микробиологическую чистоту.

Подлинность сухого экстракта устанавливали по внешним признакам и результатам качественных реакций. Внешние признаки сухого

экстракта определяли невооруженным глазом. Цвет при дневном освещении, запах – при растирании, вкус – в водном извлечении.

В результате определения внешних признаков установлено, что сухой экстракт гипогликемического сбора представляет собой бурый, сыпучий, гигроскопичный порошок со своеобразным запахом и горьковатым вкусом, растворимый в воде, разбавленном спирте и нерастворимый в органических растворителях.

Для определения подлинности сухого экстракта предлагается реакция осаждения 95% полисахаридов этанолом.

М е т о д и к а. К 10 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение») прибавляют 30 мл 95% спирта и перемешивают; появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды).

4.2.Разработка показателей качества

Принимая во внимание, что фармакологическое действие сухого экстракта гипогликемического сбора обусловлено полисахаридами, эта группа биологически активных веществ выбрана в качестве основного критерия доброкачественности при химической стандартизации препарата. Количественное содержание полисахаридов в сухом экстракте определяли гравиметрически по методике, изложенной в ГФ XI. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента.

Методика количественного определения полисахаридов в сборе. Около 10 г сухого экстракта сбора помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 200 мл воды, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяют ещё 2 раза, используя первый раз 200 мл, второй раз 100 мл воды. Водные извлечения объединяют и центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и

декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенную в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно смоченную водой. Фильтр промывают водой и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл 95% спирта этилового, взбалтывают, подогревают на водяной бане до 30°C в течение 5 мин и оставляют. Через час содержимое центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100-105°C стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Осадок количественно переносят на фильтр и последовательно промывают 15 мл раствора 95% спирта в воде (3:1), 10 мл ацетона, 10 мл этилацетата. Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100-105°C до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 500 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)},$$

где m_1 - масса фильтра в граммах; m_2 - масса фильтра с осадком в граммах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Результаты анализа приведены в таблице 12.

Таблица 12

**Метрологические характеристики методики количественного
определения полисахаридов в сухом экстракте гипогликемического
сбора**

n	$\bar{x}$	S^2	S	$t(pt)$	Δx	$\Delta \bar{x}$	$E_{abs} \%$	$E_{отн} \%$
18,8								

18,5	19,08	0,2120	0,4604	2,78	1,28000	0,5724	6,7	3,0
18,9								
19,6								
19,6								

Как показали результаты исследования, содержание полисахаридов в сухом экстракте колеблется в пределах 18,5-19,6 %. Исходя из полученных данных, норма содержания полисахаридов в сухом экстракте установлена не менее 18%.

Другие, перечисленные выше числовые показатели определяли по методикам, изложенным в ГФ XI. Исходя из полученных данных установлены нормы числовых показателей, характеризующие качество сухого экстракта (табл.14).

Для определения влаги около 0,5 г сухого экстракта (точная навеска) сушили в сушильном шкафу при $102,5 \pm 2,5$ °C в течение пяти часов, затем охлаждали и взвешивали.

При определении качества сухого экстракта установлено также содержание тяжелых металлов по следующей методике: к 1 г сухого экстракта прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, осторожно сжигают и прокаливают. Полученный остаток обрабатывают при нагревании 5 мл насыщенного раствора аммония ацетата. Фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл воды и доводят объем фильтрата до 200 мл. 10 мл полученного раствора выдерживают испытание на тяжелые металлы.

Принимая во внимание, что лекарственные средства, в том числе растительного происхождения, не стерилизуемые в процессе производства, могут быть контаминированы микроорганизмами [57], мы исследовали *микробиологическую чистоту сухого экстракта в соответствии с требованиями ГФ XI [41] и изменением к статье ГФ XI "Методы микробиологического контроля лекарственных средств" от 29 сентября*

2005 г., категория 4 А. Результаты микробиологической чистоты приведены в таблице 13.

Таблица 13

Показатели микробиологической чистоты сухого экстракта

Показатели	Требование нормативных документов (ГФ XI, вып.2, с.193.)	Результаты анализа	Соответствие требованиям НД
Общее число аэробных бактерий (в 1 г образца)	Не более 10^3 (суммарно)	Менее 10	Соответствует
Общее число дрожжевых и плесневых грибов (в 1 г образца)	Не более 10^2 (суммарно)	Менее 10	Соответствует
Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus и Salmonella (в 1 г образца)	Должны отсутствовать	Отсутствуют	Соответствует

Из полученных данных, можно заключить, что сухой экстракт соответствует требованиям, предъявляемым к лекарственным средствам в отношении микробиологической чистоты.

Таблица 14

Числовые показатели сухого экстракта гипогликемического сбора

Наименование показателей	Норма для сухого экстракта
Описание	Тёмно-бурый, сыпучий, гигроскопичный порошок со своеобразным запахом и горьковатым вкусом, растворимый в воде,

	разбавленном спирте и нерастворимый в органических растворителях.
Подлинность	Реакция с 95% спиртом, появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии
Потеря в массе при высушивании	Не более 5%
Содержание полисахаридов	Не менее 18 %
Тяжелые металлы	Не более 0,01%

Как видно из таблицы 14, исходя из результатов количественного определения полисахаридов, норму их содержания рекомендуется установить не менее 18%. Определены и другие числовые показатели, нормирующие качество сухого экстракта: влажность – не более 5 %, тяжелые металлы не более 0,01%.

В результате проведенных исследований было также установлены надежные характеристики подлинности и показатели доброкачественности сухого экстракта гипогликемического сбора, послужившие основой для разработки соответствующей нормативной документации.

Выводы по 4 главе

Фармакологические исследования показали, что сухой экстракт гипогликемического сбора, можно рекомендовать как эффективное средство для лечения сахарного диабета.

Проведенные исследования позволили установить надежные характеристики подлинности и показатели доброкачественности сухого экстракта гипогликемического сбора, послужившие основой для разработки соответствующей нормативной документации.

Из полученных данных можно заключить, что сухой экстракт в полной мере отвечает требованиям, предъявляемым к лекарственным препаратам в отношении микробиологической чистоты.

Таким образом, в результате проведенных исследований в практику здравоохранения рекомендован новое инновационное лекарственные средство для лечения патологии сахарного диабета – растительный гипогликемический сбор и его сухой экстракт, разработанный на основе местных экологически чистых лекарственных растений, обеспеченных промышленной сырьевой базой.

Освоение производства указанных лекарственных растительных средств обеспечит импортозамещение и расширение экспортного потенциала республики за счет использования местного растительного сырья, а также решение важной социальной задачи государства по обеспечению населения эффективными и доступными жизненно важными лекарственными средствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате проведенных исследований разработан оптимальный состав нового гипогликемического сбора, включающего лекарственные растения обеспеченные достаточной сырьевой базой на территории нашей республики.

2. Впервые проведены комплексные исследования по теоретическому и экспериментальному обоснованию системы стандартизации нового гипогликемического растительного сбора и разработанного на его основе сухого экстракта.

3. Установлено, что комплекс биологически активных соединений гипогликемического сбора, обуславливающий его специфическую фармакологическую активность, представлен флавоноидами, дубильными веществами, фенолкарбоновыми кислотами, кумаринами, эфирным маслом, водорастворимыми полисахаридами, витаминами. Определены состав и количественное содержание основных групп биологически активных веществ сбора.

4. Предложена система стандартизации гипогликемического сбора: разработаны методические приемы качественного и количественного определения основных действующих веществ, определены характеристики подлинности и показатели качества сбора.

5. Решены практические вопросы создания и стандартизации рациональной лекарственной формы на основе растительного сбора (сухого экстракта сбора).

6. Результаты исследования послужат основой для разработки проекта нормативной документации (Временной фармакопейной статьи) на гипогликемический сбор и сухой экстракт.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ўзбекистон Республикасининг Қонуни. 25.05.2000 й. п 71-II фаолиятнинг айрим турларини лицензиялаш тўғрисида.
2. Доклад Президента РУз И.А.Каримова на торжественном собрании, посвящённом 21-й годовщине Конституции Республики Узбекистан
3. Питер Дж. Уоткинс. Сахарный диабет = ABC of Diabetes / М. И. Балаболкин. — 2. — М.: Бином, 2006. — Р. 15. — 134 р. — 3000 экз. — ISBN 5-9518-0156-7.
4. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27: 1047-53.
5. Вахтангишвили Р.И. Диагноз сахарный диабет не приговор. -Ростов н/Д.: 2006. -249 с.
6. Бабах О.Я. Заболевания печени у пациентов с сахарным диабетом: современная тактика и стратегия терапии // Мед. газета «Здоровье Украины». – Киев, 2008. – № 6/1. – С. 14-15.
7. Замотаев И.П. Фармакотерапевтические свойства лекарственных растений. – Москва, 1993. – С. 14-15.
8. Матковская А.Н., Трумпе Т.Е. Фитотерапия в комплексном лечении сахарного диабета// В помощь практическому врачу.–Москва, 1991.– С.35-37.
9. Холматов Х.Х., Обидов О.О. Антидиабетик хусусиятли доривор гиёҳлар тўғрисида // Кимё ва фармация. – Тошкент, 1993. – №3. – Б.12-17.
10. Абидов А.А. О механизме сахароснижающего эффекта препаратов растительного происхождения // Материалы научно-практической конференции «Интеграция образования, науки и производства в фармации», посвященной 70-летию Ташкентского фармацевтического института. – Ташкент, 2007. – С. 258 - 259.

11. Решетько О.В., Горшкова Н.В., Луцевич К.А. Современное состояние и проблемы использования лекарственных средств растительного происхождения // Ремедиум. – 2008. – №12. – С.22-26.
12. Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация. [http: / www.rusvrach.ru/ articles/ farm-02-2004](http://www.rusvrach.ru/articles/farm-02-2004), sv 39-41.
13. Ужегов Г.Н. Большая семейная энциклопедия народной медицины. – М.: Олма-Пресс Образование, 2006. – 1200 с.
14. Губанов, И. А. и др. 1201. *Plantago major* L. s.l. (incl. *P. intermedia* DC., *P. major* L. subsp. *intermedia* (DC.) Arcang.) — Подорожник большой // Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. — М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2004. — Т. 3. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). — С. 240.
15. Виноградова Т.А., Гажёв Б.Н. и др. Практическая фитотерапия / М.: «ЭКСМО-Пресс»; СПб.: «Валери СПД», 2001. – 640 с.
16. Реднюк Т.Д., Спешиллов Л.Я., Исхаков Н.П. Оздоровительные чаи – М., 1993. – 135 с.
17. Indian Pharmacopoeia 1996. – CD-ROM version 1.0. – Produced and developed by FDA Maharashtra, 1996.
18. Ибрагимов А.Я. Доривор ва зиравор ўсимликлар. – Т.: NISIM, 2005. – 220 б.
19. Машковский М.Д. Лекарства XX века. Очерк создания современных лекарственных средств. – М.: «Новая волна», 1998. – 380 с.
20. Hagedorn D. J. Virus Diseases of Pea, *Pisum sativum*. — St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1974. — P. 7.
21. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1 вид. – Доповнення 1. – Харків: РІРЕГ, 2008.

22. Гаммерман А. Ф., Кадаев Г. Н., Яценко-Хмелевский А. А. Лекарственные растения : справ. пособие. — М.: Высш. шк., 1983. — С. 314.
23. Bianchini F., Corbetta F. The Complete Book of Fruits and Vegetables. — New York: Crown, 1976. — P. 40. — ISBN 978-0-517-52033-8.
24. Матковская А.Н., Трумпе Т.Е. Фитотерапия в комплексном лечении сахарного диабета// В помощь практическому врачу.—Москва, 1991.— С.35-37.
25. Короткова В. Д. и др. "Арфазетин" в лечении сахарного диабета", "Проблемы эндокринологии". — М.: Медицина, 1988. — Т.34 — № 4. — С.25.
26. Государственный реестр лекарственных средств и медицинских изделий Республики Узбекистан. 16- изд. Переработанное и дополненное.—Т.: 2012. -660 с.
27. Абидов А.А. Лабораторно-функциональная диагностика.—Т.: Медицина, 2010.—С. 62.
28. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта —Л., Медгиз 1963. -152 с.
29. Доклинические исследования лекарственных средств (Методические рекомендации). —Киев, 2002. -566 с.
30. Самылина И.А. Проблемы стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных средств // 1-й Междунар. конгресс "Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты». — М., 1994. — С.203.
31. Государственная фармакопея СССР: Вып.1. / МЗ СССР. — 11-е изд. — М.: Медицина, 1987. — 337 с.

- 32.Беседина Н.А. Исследования по стандартизации измельченного лекарственного растительного сырья и его водных извлечений: Автореф. дис. ... канд.фарм.наук – М., 2007. – 24 с.
- 33.Сорокина А.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев, отваров и сухих экстрактов из лекарственного растительного сырья /Дисс. док. фарм. наук. – М., 2002.
- 34.Маркарян А.А. Современное состояние стандартизации лекарственного растительного сырья и получаемых из него фитопрепаратов. [http // treskunov.narod.ru / conference 2004 / markaryan 1.html](http://treskunov.narod.ru/conference/2004/markaryan1.html).
- 35.Листов С.А., Непесов Г.А., Сахатов Э.С. Содержание тяжелых металлов в настоях и отварах из лекарственного растительного сырья // Фармация. – Москва,1992. - №4. – С.37-41.
- 36.Ковалева Е.Л., Багирова В.Л., Баландина И.А., Лякина М.Н. Формирование регистрационного досье на лекарственные средства // Фармация. – 2006. – № 5. – С. 6-8.
37. Антропогенные воздействия на лекарственные растения (современное состояние) / С.А.Листов, А.В.Чуннин, А.П.Арзамасцев и др. – М., 1990. – 106 с.
38. Public Health Impacts of Pesticides Used in Agriculture, World Health Organization, 1990. – P.15.
39. МЗ РФ: Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. ОСТ 91500.05.001-00/ Дата введения 01.03.2000 г. / Утв. приказом МЗ РФ №82 от 29.02.2000 г. – М., 2000. – 54 с.
40. Филиппова И. Фармакопея – гармонизация без потерь // Ремедиум. – 2008. – № 12. – С. 8-12.

41. Государственная фармакопея СССР: Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
42. British Pharmacopoeia. –London: HMSO , 1998. – Vol. I.– P.731.
43. The International Pharmacopoeia. Third Ed. Vol.1. General methods of analysis: – Geneva: World Health Organization, 1979. – 225 p.
44. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. – World Health Organization, 1998. – 128 p.
45. Хайс И.М., Мацек К. Хроматография на бумаге.–М.:ИЛ,1962.–852 с.
46. Evans WC. Trease G.E. Pharmacognosy. -15th ed.- Edinburg, Saunders, WB, 2000. – 832 p.
47. Урманова Ф.Ф., Пулатова Д.К., Комилов Х.М. Флавоноиды *Achillea filipendulina* Lam. // *Kimyo va farmatsiya*. – 1999. – №3. – С. 21-23.
48. Никонов Г.К., Перельсон М.Е. К вопросу изучения кумаринов флоры СССР // *Тр. ВИЛР*. – М., 1969. – Т.XV. – С. 88-125.
49. Дзюба Н.П., Чушенко В.В., Хат Г.Я. Восстановление лекісного та кількісного складу полісахаридів у рослинній спровиніта препаратах фізико-хімічними методами. Повід I // *Фарм.журн.* – Харьков,1975. – №6. – С.54-58.
50. Керимов Ю.Б., Алиев М.Н., Исмаилов Э.С. Изучение некоторых растений содержащих антрахиноны, кумарины и липофильные фракции //Реализация научных достижений в практической фармации: Тез.докл.Респ.науч. конф. – Харьков, 1991. – С. 186-187.
51. Разработка метода стандартизації нового лікарського засобу піфламін / Ковальова А.М., Георгієвський Г.В. и др.// *Фармаком.*– Киев. – 2002. – №2. – С.92 - 97.

52. Н.Т. Фарманова, Ф.Ф. Урманова, Т.П. Пулатова. Разработка показателей подлинности листьев шелковицы белой (*Morus alba*)// *Farmatsevtika jurnali*. - Тошкент, 2010. - №2. - Б. 23-26.
53. Стефанов А.В. Доклинические исследования лекарственных средств (Методические рекомендации, Киев. 2002, -568 с.
54. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва, 2005, -857 с.
55. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета / под ред. Миронова А.Н. – Москва, 2012. – С.670.
56. Маркарян А.А. Современное состояние стандартизации лекарственного растительного сырья и получаемых из него фитопрепаратов. [http // treskunov.narod.ru / conference 2004 / markaryan 1.html](http://treskunov.narod.ru/conference2004/markaryan1.html).
57. Гунар О.В., Булгакова Г.М., Каламова Н.И. К вопросу о качестве растительного сырья по показателю «Микробиологическая чистота»// *Фармация*. – Москва, 2002. - №1 – С.19-22.