

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального
образования «Сибирский государственный медицинский университет»

На правах рукописи

ЕФИМОВ СЕРГЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

Разработка лекарственного растительного сбора как основы для
создания антимуtagenного фитосредства

15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук

Научный руководитель:
Заслуженный работник высшей школы
Российской Федерации,
доктор фармацевтических наук,
профессор Дмитрук С.Е.

Томск – 2004

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМА МУТАГЕНЕЗА И ПРЕДПОСЫЛКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИМУТАГЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ФЛОРЫ СИБИРИ	8
1.1. Проблема загрязнения окружающей среды мутагенами и коррекция мутагенного воздействия.....	8
1.2. Современные антимутагены синтетического происхождения.....	23
1.3. Перспективные антимутагены природного происхождения.....	26
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	32
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1. Характеристика объектов исследования.....	32
2.2. Методики химического исследования	33
2.3. Методики исследования фармакологической активности.....	53
2.4. Методики морфологических и микроскопических исследований..	58
ГЛАВА 3. ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИМУТАГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ СРЕДИ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ФЛОРЫ СИБИРИ	60
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА АНТИМУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ	69
4.1. Обоснование компонентного состава сбора.....	69
4.1.1. Разработка вариантов прописи сбора.....	73
4.2. Исследование химического состава сбора.....	78
4.2.1. Качественное обнаружение основных групп БАВ.....	78
4.2.2. Количественное определение БАВ.....	82
4.2.3. Исследование элементного состава.....	88
4.3. Разработка методик стандартизации сбора.....	89
4.3.1. Методики качественного обнаружения БАВ.....	90
4.3.2. Методики количественного определения БАВ.....	92
4.3.3. Разработка товароведческих показателей сбора.....	97
4.3.4. Изучение микроскопических и морфологических признаков сбора.....	100
ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОЛИЭКСТРАКТА, ОЦЕНКА ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ	120
5.1. Выбор рационального метода получения жидкого экстракта и его стандартизация.....	120
5.2. Исследование фармакологических свойств жидкого экстракта.....	128

5.2.1. Оценка безвредности (острой токсичности).....	128
5.2.2. Антимутагенная активность	128
5.2.3. Влияние экстракта на цитогенетические нарушения хромосом, вызванные ионизирующей радиацией	130
5.2.4. Влияние экстракта на активность эксцизионной ДНК-репарации..	132
5.2.5. Антиоксидантная активность.....	133
ВЫВОДЫ	134
ЛИТЕРАТУРА	136
ПРИЛОЖЕНИЕ	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одной из важнейших задач современной медицины является профилактика и коррекция последствий загрязнения окружающей среды для человека. Эта проблема, помимо возрастания естественного фона радиации, находится в тесной связи с постоянным поступлением в окружающую среду отходов промышленных производств и применяемых в сельском хозяйстве химикатов. Указанная задача относится к числу важных также в связи с расширением арсенала химических соединений в промышленности, быту, медицине и научных исследованиях [39,40,51,60].

С особой остротой данная проблема возникает в моменты аварий на химическом производстве и атомных электростанциях, когда окружающая среда и человеческое сообщество испытывает на себе действие сильнейшего мутагенного пресса.

Следует отметить, что выраженным мутагенным действием на организм человека обладают и некоторые широко используемые в медицинской практике препараты и вакцины (диоксидин, винкристин, циклофосфамид, тетрациклин, нирдазол, пипемидиевая кислота, паротитная и туляремиальная вакцины, вакцинный штамм вируса кори и др.) [27,50,61,92,96,138].

Все упомянутые и другие факторы риска влияют на генетический аппарат, который отвечает за точность воспроизводства свойств и признаков в поколениях, а также за выполнение роли регулятора всех протекающих в организме процессов. Как следствие действия мутагенов отмечаемая в настоящее время эскалация мутаций, врожденных уродств, злокачественных новообразований.

Поскольку исключить контакт человека с мутагенными факторами практически невозможно, важное значение приобретает поиск природных антимутагенов, способных предотвратить генотоксичное действие внешнесредовых факторов. С данной точки зрения интерес представляют лекарственные растения, использование которых значительно возросло в последние годы. И это не случайно, т.к. для биологически активных веществ

содержащихся в растениях характерны низкая токсичность и аллергогенность, комплексное воздействие на организм, возможность длительного применения без побочных эффектов.

Отдельные примеры влияния растительных биологически активных комплексов на мутационный процесс демонстрируют перспективы подобного рода исследований [18,45,46,124,125,151,159,171].

Поэтому поиск корректоров мутагенных эффектов незаменимых ксенобиотиков из растений в качестве профилактических средств защиты генетических структур человека от мутагенных воздействий, является актуальной задачей. В пользу актуальности указанной проблемы также свидетельствует крайне малая степень изученности представителей флоры Сибири на антимутагенную активность.

Цель диссертационной работы состоит в оценке антимутагенной активности различных представителей флоры Сибири и создании научно-обоснованной прописи лекарственного растительного сбора, обладающего антимутагенным действием.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Провести скрининговые исследования перспективных источников антимутагенных веществ среди некоторых представителей флоры Сибири;
- Научно обосновать компонентный состав антимутагенного сбора;
- Провести фармакогностическое исследование сбора и разработать методики его идентификации и стандартизации;
- Предложить рациональную технологию жидкого экстракта из антимутагенного сбора и провести его стандартизацию;
- Изучить специфическое действие жидкого экстракта;
- Разработать проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на лекарственный растительный сбор;

Научная новизна работы. На основании собственных исследований и анализа литературных источников разработана пропись лекарственного растительного сбора, обладающего антимуtagenным действием.

Установлен качественный и количественный состав основных биологически активных веществ сбора (полисахариды, фенольные соединения в т.ч. флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты и кумарины, аскорбиновая кислота, витамин К, каротиноиды, хлорофилл) и полученного из него водно-спиртового экстракта.

Предложены показатели определения доброкачественности сбора, включенные в проект ФСП

Для идентификации сбора предложены внешние и микроскопические диагностические признаки входящих в него ингредиентов.

Определены и включены в нормативную документацию методики качественного обнаружения и количественного определения биологически активных веществ (БАВ) сбора (полисахаридов и флавоноидов).

Обоснован рациональный метод получения жидкого экстракта из сбора и проведена его стандартизация по общепринятым показателям, содержанию флавоноидов и полисахаридов, установлено его антимуtagenное и антиоксидантное действие, доказана безвредность

Практическая значимость работы. Теоретические и экспериментальные исследования показали целесообразность использования предложенного сбора и жидкого экстракта из него в качестве антимуtagenного средства. Разработан проект ФСП на лекарственный растительный сбор антимуtagenного действия. Предложена рациональная технология получения жидкого экстракта из сбора.

На защиту выносятся результаты теоретического и экспериментального обоснования разработки лекарственного растительного сбора и экстракционного препарата на его основе, обладающего антимуtagenным действием.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на 62-ой международной конференции студентов и молодых ученых (г.Томск, 2003 г); постоянно действующей научно-технической школе-семинаре студентов, аспирантов и молодых специалистов «Информационные системы мониторинга окружающей среды» (г.Томск, 2003-2004 гг.); IV конгрессе молодых ученых «Науки о человеке» (г. Томск, 2003 г.); V конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (г. Томск, 2004 г.); научном семинаре института фитохимии министерства образования и науки Республики Казахстан (г. Караганда, 2004 г.); IV межрегиональной научно-практической конференции «Фармация XXI века» (г. Новосибирск, 2004 г.); 59-ой региональной научной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (г. Пятигорск, 2004 г.); научной конференции «Лекарственные растения в фармакологии и фармации» (г. Барнаул, 2004г.), пятой межрегиональной научно-практической конференции «Молодежь в XXI веке» (г. Барнаул, 2004г), а также на научных семинарах кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии СибГМУ (г.Томск, 2001-2004 гг.);

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 статей и тезисов докладов, получена приоритетная справка по заявке на изобретение (№2004116287 от 28.05.2004 г).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии Сибирского государственного медицинского университета и комплексной целевой программой СО АМН Российской Федерации «Фармакогностическое изучение перспективных источников биологически активных веществ Сибири» (№ Государственной регистрации 01.2.00 101709).

Глава 1

Проблема мутагенеза и предпосылки для получения антимутагенных средств на основе лекарственного растительного сырья флоры Сибири (Обзор литературы)

1.1. Проблема загрязнения окружающей среды мутагенами и коррекция мутагенного воздействия

Результаты экспериментальных и эпидемиологических наблюдений последних лет убеждают в том, что именно индуцированным мутациям принадлежит главная роль в увеличении наследственной, врожденной и онкологической патологии [6,44,45,47,79,124,181].

Мутагенез, особенно в современных условиях интенсивного антропогенного загрязнения биосферы, представляет явную угрозу для генетического гомеостаза, жизнеспособности и нормального функционирования биосистем, как на организменном, так и на популяционном уровнях.

Контроль за распространением мутагенов и меры по ограничению контакта с ними – давно осознанная необходимость, тем не менее, мутагенные факторы различной природы широко распространены в среде обитания человека. Наиболее радикальной мерой, оптимизирующей мутационный процесс, является изъятие или нормирование мутагенов в окружающей среде. Вместе с тем, полностью исключить контакт с рядом мутагенов не представляется возможным по медицинским или экономическим соображениям [39,47,77,147]. Другим подходом может быть применение специальных средств защиты – антимутагенов.

В табл. 1 приведены данные о количестве лиц в Соединенных Штатах Америки (США), ежедневно контактирующих с промышленными мутагенами, что позволяет получить представление о серьезности ситуации с их распространением [45].

Как видно из таблицы, наиболее значительными источниками загрязнения в США являются асбестодобывающее и асбестоцементное

производство, полимерное и химическое производство, производство пластмасс, резины, а также текстильная и кожевенная промышленности. Большое число мутагенов образуется в деревообрабатывающей промышленности, нефтеперегонном производстве, при добыче каменного угля. Всего же подвергаются действию мутагенов на рабочем месте около 20% экономически активного населения.

Таблица 1 – Основные промышленные мутагены [45]

Мутаген	Основные источники загрязнения	Количество лиц, подвергающихся воздействию мутагенов на рабочем месте
асбестовые волокна	Асбестодобывающее, асбестоцементное производство.	27500000
каменноугольная пыль	Добыча каменного угля	400000
древесная пыль	Деревообрабатывающая промышленность	600000
дизельные выхлопы	Транспорт, производства с использованием дизельных двигателей	1350000
акриламид	Химическое производство	11000
мышьяк	Стекловаренное, деревообрабатывающее и химическое производство	55000
бензол	Нефтеперегонное производство	238000
бензидин	Химическое и лакокрасочное производство	79000
этиленоксид	Химическое и лабораторное производство	270000
формальдегид	Производство резины и древесностружечных плит, текстильное и кожевенное производства	1500000
пропиленоксид	Химическое производство и производство крахмала	421000
стирен	Полимерное и химическое производство	1000000
толуол	Производство бензина, химическое производство	1200000
винилхлорид	Производство пластмасс	1000000
Итого 36000000 человек		

Промышленность – не единственный источник мутагенов. Они могут образовываться и при приготовлении пищи т.к. встречаются в составе пищевых растений; при использовании незаменимых лекарственных средств.

В виде активных форм кислорода, перекисленных липидов, в результате действия стресса мутагены возникают непосредственно в организме человека [45,77].

С обнаружением все большего числа мутагенов появились попытки их классифицировать: так Ильинских Н.Н. и Новицкий В.В. с соавт. [92], выделили 3 основные группы мутагенов: физические, такие как альфа, гамма, рентгеновские лучи, ультрафиолетовые лучи; инфекционные – вирус полиомиелита, кори, оспы, паротит, и химические, являющиеся наиболее распространенной группой (к ним отнесены азотистый иприт, ацетальдегид, билульфон, диоксидин, винбластин, нирдазол, этидиум бромид и некоторые другие). К группе химических мутагенов также относят промышленные мутагены перечисленные в таблице 1.

Исходя из вышесказанного, можно утверждать, что мутагенные воздействия на человека практически неизбежны, что придает актуальность поиску путей профилактики мутагенеза на основе применения природных, безвредных соединений.

Явление антимутагенеза впервые установлено в 1952-1959 гг., когда была показана способность пуриновых нуклеотидов эффективно снижать уровни спонтанного и индуцированного мутирования в экспериментах на *E. Coli* [47].

Базой, определяющей дальнейшие направления поиска антимутагенов, стали представления о том, что возникновение мутаций сложный многоэтапный процесс, составляющими которого являются поступление, распределение, превращение и выведение генетически активного агента, его накопление в области клетки и молекулы-мишени, взаимодействие с ДНК и влияние на репарационные и репликационные системы. Считалось, что влияние на любой из перечисленных этапов становления мутаций может инактивировать действие мутагена. Такой подход оказался вполне плодотворным, и к настоящему времени антимутагенные свойства выявлены у нескольких десятков природных и синтетических соединений: витаминов,

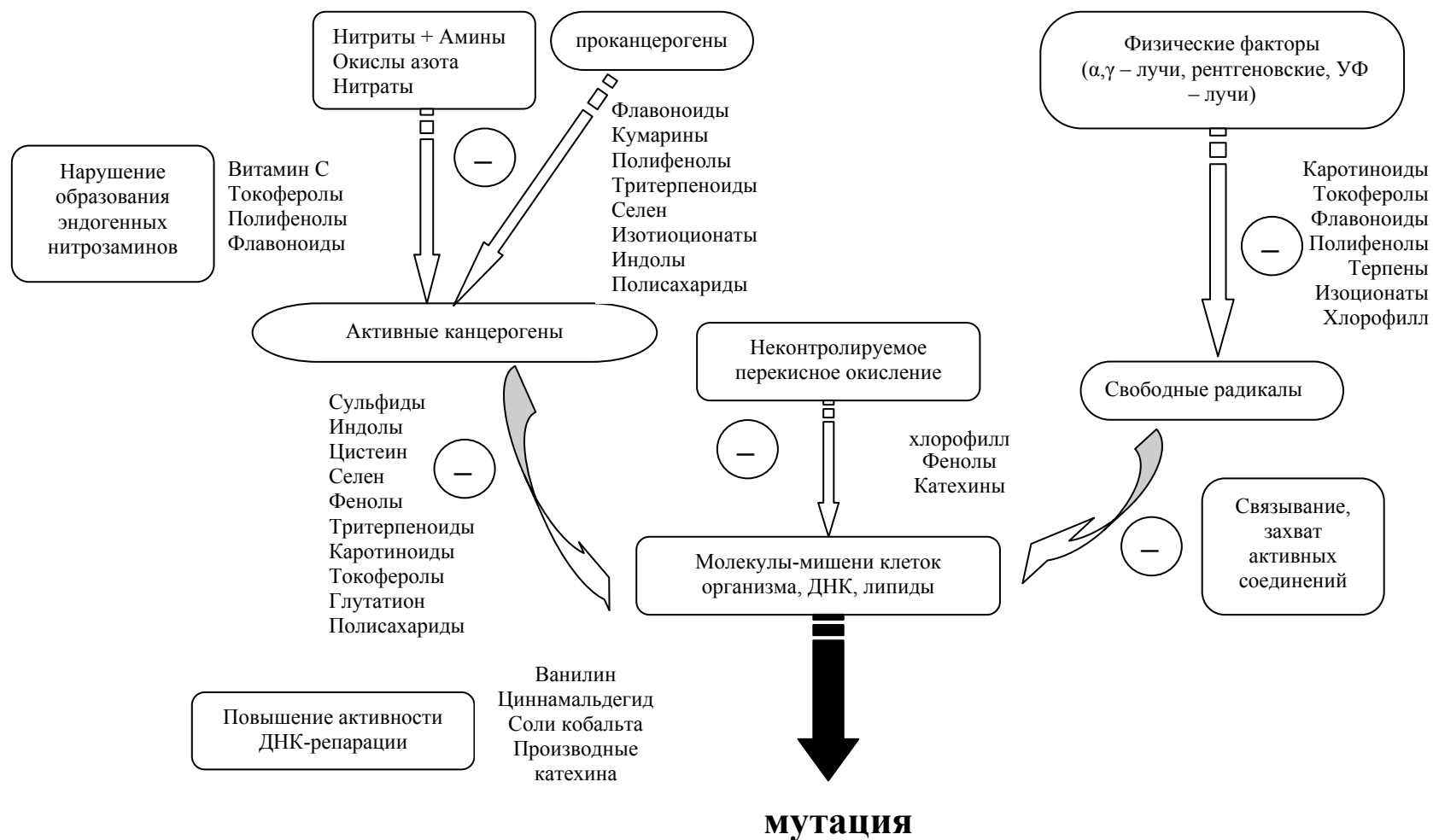
аминокислот, естественных метаболитов, пищевых добавок, лекарств и некоторых других веществ органической и неорганической природы [6,10,12,18, 26,33,45,47,52,136,154,167]

В целом антимутагенез проявляется снижением уровня спонтанных и индуцированных мутаций и может быть обусловлен действием как эндогенных, так и экзогенных антимутагенов. Первый серьезный анализ этого явления сделан В.К. Щербаковым, который предположил, что оптимальный уровень спонтанного мутирования поддерживается благодаря балансу мутагенных и антимутагенных метаболитов [77]. Затем в монографии Р.И. Гончаровой проанализированы известные к тому времени данные по генетическому контролированию мутационного процесса, а также некоторые другие аспекты антимутагенеза. В частности, были предложены перспективные для поиска антимутагенов классы соединений – ингибиторы свободнорадикальных реакций (антиоксиданты) и полиамины. Практически одновременно С.Н. Clarke и D.M. Shankel [77] выдвинули гипотезу генетического и физиологического антимутагенеза у прокариот.

В связи с накоплением за последние годы большого количества информации по антимутагенам возникла естественная потребность в их классификации. Такие попытки предпринимались неоднократно, мы же отталкивались от наиболее информативной классификации, учитывающей пути возникновения мутаций и механизмы действия антимутагенов. Указанная классификация в схематичном виде представлена на рис.1.

Опираясь на данную классификацию, ниже нами подробнее рассмотрены некоторые группы антимутагенов с целью определения возможности их использования в качестве средств защиты генетического аппарата человека.

Дисмутагены. Очевидно, что в тех случаях, когда контакт человека с мутагенами имеет непреднамеренный характер, например при авариях на химических производствах, одним из подходов к защите генетических структур является применение дисмутагенов – веществ, способных инактивировать мутаген или предупреждать его образование вне клетки.



Примечание: (—) – активизация антимутагенного процесса

Рисунок 1 – Основные мутагенные факторы и механизмы действия антимутагенов [6,77,135,147,151]

Например, в желудочно-кишечном тракте экзогенный глутатион инактивирует мутагенные электрофилы, и этим препятствует их мутагенному действию на организм, а аскорбиновая кислота подавляет образование нитрозомутагенов в реакциях между амидами, аминами и нитратами. Аналогичное действие оказывают витамин Е, а также ряд природных и синтетических фенолов [36,47,147,157].

Осознавая значимость природных компонентов для предупреждения образования мутагенов, отметим, что они уже сегодня могут иметь практическое использование. Вместе с тем очевидна недостаточность сведений о дисмутагенных свойствах химических соединений. Кроме того, дисмутагены малоприспособлены для коррекции мутагенных эффектов лекарственных средств, когда важно не только устранить мутагенное действие, но и сохранить терапевтическую активность используемого препарата.

Репарогены. Многочисленные литературные источники свидетельствуют об обратимости первичных повреждений ДНК, возникших вследствие действия мутагенов. В этом случае можно говорить об активации репарационных систем организма.

Термин «репарогены» объединяет различные по химическому строению соединения, антимутагенный эффект которых связан с активирующим влиянием на системы репарации ДНК.

Репарация ДНК является мощным антимутагенным рычагом, представленная многоцелевым комплексом энзиматических систем, восстанавливающих первоначальную структуру ДНК, избавляя ее от значительной части первичных повреждений [54,77,129,131,136].

Репарогеном, является парааминобензойная кислота, оказывающая ингибирующее влияние на мутагенные эффекты нитрозопроизводных мочевины и ряда других мутагенов в экспериментах на *E.coli* [47,130].

Другой пример – интерфероны. Результаты многолетних исследований говорят о том, что нативный и рекомбинантный интерфероны стимулируют репарацию ДНК и, таким образом, защищают генетические структуры клеток человека от радиационного и химически индуцированного мутагенеза [47,54,125,138].

Обращает на себя внимание тот факт, что репарагенной активностью могут обладать не только органические соединения. Например, снижение мутагенных эффектов, наблюдаемое под влиянием хлорида кобальта, обусловлено его активирующим влиянием на SOS-репарацию ДНК [47,54,55].

Уникальность репарогенов определяется тем, что они способны препятствовать реализации первичных повреждений ДНК при мутации, что дает возможность их использования непосредственно после мутагенного воздействия, тогда как другие соединения должны применяться одновременно с повреждающим фактором. Вместе с тем, активация репараций не гарантирует полного исключения возникновения мутаций из-за существования нерепарабельных повреждений ДНК [9,47,54,77].

Согласно сведениям современных литературных источников ведущую роль в мутационном процессе играет репликация ДНК. Постулируется, что повышение точности работы сложного репликативного механизма может быть одним из важнейших механизмов подавления мутационного процесса. Вместе с тем методы выделения антимутагенных ДНК-полимераз для использования их с целью повышения точности функционирования репликативного механизма до сих пор недостаточно разработаны [54,77].

Модификаторы метаболизма и транспорта мутагенов. Многократными экспериментами подтверждено, что влияние на активность ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, может модифицировать их мутагенные эффекты. Под влиянием индукторов метаболических систем снижаются эффекты прямых мутагенов, а ингибиторы метаболизма ослабляют повреждающее действие веществ, требующих для проявления мутагенных эффектов метаболической активации [47,129,147,148,151]. Примером может

служить снижению уровней хромосомных aberrаций, индуцированных прямым мутагеном фотрином у мышей, которое было показано на фоне индукции микросомальных ферментов фенобарбиталом. Эффект непрямого мутагена циклофосамида, усиливался в результате химической индукции ферментных систем у мышей, дрозофилы, в тестах на микроорганизмах с метаболической активацией. Аналогичный эффект наблюдается в отношении 2-аминоантрацена и бензапирена, тогда как селен, ингибирующий метаболизм последнего ксенобиотика, одновременно снижал его мутагенное действие [47]. Особое значение имеет комплекс глутатион-S-трансфераз, специализированных на детоксикации электрофилов [77].

Антиоксиданты. Среди известных на сегодняшний день антимутагенов значительно число соединений, обладающих свойствами ингибировать свободнорадикальные процессы. В подтверждение этого свидетельствует значительный экспериментальный материал, полученный при исследовании влияния антиоксидантов на индуцированный мутагенез, который позволяет утверждать о наличии взаимосвязи между антиоксидантными и антимутагенными свойствами природных и синтетических соединений. Антимутагенные свойства широко исследованы и установлены в эксперименте *in vitro* и *in vivo* для глутатиона, аскорбиновой кислоты, токоферола, каротиноидов и *in vitro* для антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы [6,15,45,47,77,78,168,175]. В.Н. Георгиевым с соавт. на модели химического мутагенеза показана высокая антимутагенная эффективность убихинонов – природных внутриклеточных антиоксидантов терпеноидной структуры [32,33].

Вместе с тем во многих работах изучение антимутагенности антиоксидантов проводилось вне связи с представлениями о свободнорадикальных реакциях как источнике эндогенных мутагенов и роли свободных радикалов в повреждающем действии мутагенов.

К базовым факторам антиоксидантной защиты организма относят некоторые ферменты и витамины (табл 2.) [13,15,25,45].

Таблица 2 – Базовые факторы антиоксидантной защиты организма

Мишень	Агент	Функция
O ₂	Супероксиддисмутаза	Превращает O ₂ в H ₂ O ₂
H ₂ O ₂	Глутатион-пероксидаза	Превращает H ₂ O ₂ в H ₂ O и O ₂
	Каталаза	Превращает H ₂ O ₂ в H ₂ O и O ₂
Свободные радикалы	β-каротин (провитамин А)	Связывает жирорастворимые свободные радикалы
	Витамин Е (α-токоферол)	
	Витамин С (аскорбиновая кислота) Мочевая кислота	Связывает водорастворимые свободные радикалы
	Мелатонин	Связывает жиро- и водорастворимые свободные радикалы
Переходные металлы	Хелатные агенты	Предотвращают катализ свободнорадикальных реакций переходными металлами, железом и медью

Как видно из таблицы, повреждающему действию супероксидного анион-радикала на биологические структуры организма препятствует фермент супероксиддисмутаза, под действием которого происходит утрата мутагенных свойств (дисмутация) этого продукта с образованием перекиси водорода.

Главным лимитирующим фактором образования гидроксильного радикала является активность ферментов – каталазы и глутатионпероксидазы, катализирующих разложение гидроперекиси водорода до воды.

Кроме этих ферментов, в антирадикальную систему защиты клетки входит большое количество низкомолекулярных компонентов, активных в водной и липидной фазах; среди них серосодержащие соединения, каротиноиды, витамины С и Е, фенольные соединения, а также природные внутриклеточные антиоксиданты терпеноидной структуры – убихиноны [32,33].

Как уже упоминалось ранее, к настоящему времени изучено значительное число антимутагенов, как среди различных химических соединений, так и среди природных биологически активных веществ [6,18,45,54,156,171,173]. В связи с тем, что химические соединения кроме антимутагенного действия часто

обладают побочным эффектом, большой интерес представляют антимутагены природного происхождения, в частности растительного [18,124].

Антимутагенная активность препаратов, полученных из растений, зависит от соединений входящих в состав их клеток и тканей.

На текущий момент изучены и выделены из растений десятки химических соединений, обладающих выраженной антимутагенной активностью [18,36,39,123,151,171,176,173,178]. Ниже приведена краткая характеристика основных классов биологически активных веществ, представляющих интерес для коррекции мутаций.

Среди *витаминов*, проявляющих существенную антимутагенную активность следует отметить витамин С (аскорбиновая кислота), которая как сильный антиоксидант обладает выраженной способностью снижать действие мутагенов разных классов, - в первую очередь – свободных радикалов. Эпидемиологические наблюдения показывают обратную корреляцию между потреблением витамина С и риском заболевания раком [6,26,45,77,105,147,148,157]. Антимутагенные эффекты аскорбиновой кислоты могут быть обусловлены, в том числе и ее влиянием на иммунокомпетентную систему, «очищающую» организм от мутантно измененных клеток [18].

Исследования репаративной активности ДНК и образования структурных мутаций у рабочих, контактирующих с солями молибдена и кадмия, до и после приема ими аскорбиновой кислоты, ретинола и их комбинации показали, что прием рабочими аскорбиновой кислоты приводил к уменьшению спонтанного уровня структурных мутаций, а также снижению количества разрывов ДНК [136]. Тырсина Е.Г. с соавт. [14] показали, что аскорбиновая кислота и ее различные синтетические формы – аскорбилпальмитат и аскорбат натрия эффективно снижают мутагенную активность N-метил-N-нитрозогуанидина у бактерий *Salmonella typhimurium* TA 100 в тесте Эймса. При этом, наибольшую активность проявил аскорбилпальмитат, что в значительной степени объясняется его высокими поверхностно-активными свойствами и мембранным механизмом действия.

Среди других витаминных препаратов достаточно полно изучены антимуtagenные свойства витамина Е (α -токоферола). Многочисленные литературные источники выделяют альфа-токоферол как один из наиболее эффективных и универсальных генозащитных средств, а исследователи в области антимутагенеза применяют его в качестве препарата сравнения [7,18,45,54,77,148, 179].

Витамин Е (α -токоферол) представляет собой смесь родственных соединений группы фенола, из которых наиболее активен токоферол, являющийся одним из основных антиоксидантов организма. Он в достаточных количествах содержится в продуктах растительного происхождения, особенно в растительных маслах. Следует отметить, что данные об антимутагенной активности α -токоферола были получены параллельно на растениях и на культуре клеток человека, что свидетельствует об универсальности эффекта этого препарата. Как предполагается, антимутагенные свойства альфа-токоферола в значительной степени обусловлены его способностью ингибировать свободнорадикальные процессы [7,54,77].

Весьма распространен в растениях бета-каротин (провитамин А). Главный вклад в антимутагенное действие, вносит его антиоксидантная активность, способность к нейтрализации липидных супероксидрадикалов и прерыванию свободнорадикальных процессов [6,18,45,151,154,175]. Антимутагенный эффект бета-каротина в ряде случаев превосходит другие витамины [18]. В подтверждение высокого антимутагенного потенциала каротиноидов послужили проведенные Белоголовской Е.Г. и Дурневым А.Д. с соавторами [10,27] эксперименты, оценивающие влияние бета и апо-каротина на кластогенную активность циклофосфамида и диоксицина у мышей. В результате авторами установлено, что исследуемые препараты во всем диапазоне испытанных доз вызывают статистически достоверное снижение мутагенного эффекта циклофосфана и диоксицина [10,27].

В.М. Хабибуллина и соавт. [63] исследовали антимутагенную активность β -каротина на фоне действия циклофосфана. В результате было установлено,

что на фоне приема β -каротина происходит снижение числа клеток со множественными разрывами и транслокациями хромосом, индуцированное действием циклофосфана.

Американские ученые провели изучение влияния бета-каротина на мутагенные эффекты уроантисептиков, широко применяющихся в современной клинической практике (налидиксовая кислота, норфлоксацин, пипемидовая кислота), в результате было установлено его антимуtagenное действие. При этом добавление каротина в комплексной терапии совместно с уроантисептиками не влияло на фармакологическую активность последних [154].

Различными исследованиями подтверждены антимуtagenные свойства витамина К, выражающиеся в снижении частоты спонтанных и индуцированных aberrаций хромосом. В тесте на *Salmonella*, показана антимуtagenная активность витамина В₂ и фолиевой кислоты [7,18,157].

Известно, что *полифенолы* являются ингибиторами свободнорадикальных процессов [13,25]. При изучении радиационного распада ДНК оказалось, что полифенольные соединения тормозят его при добавлении как до, так и после облучения, причем степень защиты линейно растет с увеличением антиокислительной эффективности ингибиторов [122].

Из фенольных соединений наибольшей биологической активностью обладают двуароматические фенолы, объединенные общим термином биофлавоноиды. Флавоноиды присущи, в основном, высшим растениям, однако встречаются также в водорослях, грибах и в наиболее примитивной группе высших зародышевых растений – мохообразных. Представители большинства классов флавоноидов встречаются у папоротникообразных и голосемянных растений, а наиболее часто – у покрытосемянных. Дж. Харборн с соотрудн. исследовали более 1000 видов растений, и почти в $\frac{3}{4}$ из них обнаружили флавоноиды [30].

Биофлавоноиды обладают Р-витаминной активностью и проявляют себя как антиоксиданты, синергичные с аскорбиновой кислотой; способны связать

тяжелые металлы, нейтрализуют перекисное окисление липидов, блокируют связывание активных форм мутагенов с ДНК и угнетают свободнорадикальные реакции. Такие их представители как кверцетин и куркумины – антагонисты опухолевых промоторов; катехины повышают точность репарации ДНК [18,151]. Кроме того, предполагается, что антимутагенные свойства кверцетина обусловлены его способностью ингибировать свободнорадикальные процессы. 3-рамногликозидом кверцетина является рутин. Им богаты листья чая, руты, гречихи. В результате исследования зависимости действия продуктов пероксидазного окисления замещенных бензидинов от антиоксидантных свойств кверцетина и рутина было установлено, что они эффективно предотвращают определяемые электрофоретические сшивки и разрывы ДНК продуктами одно- и двухэлектронного окисления замещенных бензидинов [77]. Рутин (100-150 мг/сут) существенно снижает уровень клеток с хромосомными aberrациями у пациентов с анемией Фанкони [45].

Как следует из литературных источников, антимутагенный эффект природного полифенольного комплекса может быть связан как с прямым воздействием антимутагенов с аутомутагенами и продуктами их превращения, так и с активацией восстановительных систем клетки. Некоторые фенолы подавляют процесс образования мутагенов из их предшественников [18].

Результаты испытаний генозащитной активности полифенолов зеленого чая, куркумина и эллаговой кислоты, проведенные учеными медицинского департамента Государственного университета штата Огайо (США), выявили их выраженное действие не только на индуцированный мутагенез, но и на канцерогенез кожи, легких, кардиального отдела желудка, пищевода, двенадцатиперстной кишки и на индукцию опухоли толстой кишки у мышей. Причем наиболее активным являлся эпигаллокатехин-3 галлат, основной компонент полифенольного комплекса зеленого чая. Указанными учеными приводятся несколько механизмов как возможные в антимутагенном и антиканцерогенном действии: повышение антиоксидантной защиты организма, ингибирование химически индуцированного перекисного окисления липидов,

угнетение киназы С и клеточной промоции. Что касается эллаговой кислоты – она, также оказалась очень активной в антимутагенном отношении и оказала угнетающее воздействие на химически индуцированный рак легких, печени, кожи и пищевода у грызунов [176]. Показано, что галловая и кофейная кислоты также являются антимутагенами [36].

Из группы природных фенолов заслуживают быть отмеченными *кумарины*, которые содержатся во многих растениях. По заключению авторов выполненных исследований показано, что кумарины, выделенные из растительных экстрактов, снижают мутагенное действие аминоантрацена и бензапирена. Известен своей антимутагенной активностью 7-оксикумарин, содержащийся в цветах ромашки. [148,151].

Среди биологически активных веществ растительного происхождения на антимутагенную активность исследована сумма *танинов*, выделенных из отходов винограда. Исследования, проведенные в институте ботаники Академии Наук Азербайджана Д.Д. Ахундовой с соавторами показали, что танины обладают способностью снижать на различных объектах спонтанную и индуцированную мутабельность [7,18].

Из *тритерпеновых* соединений представляют интерес в антимутагенном отношении сапонины и растительные стерины. Наиболее интересны сапонины солодкового корня (глицирризин), корней первоцвета лекарственного (примулагенины), и цветков календулы [151,159].

В антимутагенном отношении следует отметить аллипсульфид и другие серосодержащие соединения входящие в состав эфирных масел ряда растений цитрусовых. Наибольший интерес из них вызывают сульфиды чеснока, которые обладают высокой антиканцерогенной активностью, снижая индукцию опухолей диметилгидразином, алкилирующими агентами, нитрозосоединениями и другими веществами [11,24,148,151]. Нелетучие серосодержащие соединения, оказывают угнетающее влияние на метаболизм проканцерогенов и, вероятно, принимают участие в детоксикации мутагенов в печени. Биологическая активность других классов серосодержащих соединений

связана с их участием в функционировании системы глутатиона, защищающего Н-группы белков от окисления [18,147,151].

Глутатион играет специфическую роль в восстановлении перекиси водорода и окисленных форм аскорбиновой кислоты, поддерживает железо в двухвалентной форме, препятствует перекисному окислению липидов. Реакция окисления глутатиона перекисью водорода катализируется селенсодержащей пероксидазой, видимо, именно этим механизмом объясняется антимуtagenный эффект селена.

С точки зрения антимуtagenного эффекта представляют интерес и природные ростовые вещества (фитогормоны), выделенные из растений. Они стимулируют клеточное деление и синтез ДНК и белков, ускоряют прорастание и цветение, задерживают увядание растений. Фитогормон кинетин стимулирует процессы репарации на хромосомном уровне, а гибберелловая кислота участвуют в процессе репарации посредством образования взаимосвязи с регуляторными белками [18,54].

Антимуtagenной активностью обладают также выделенные из растений хлорофиллы *a* и *b*, и их натриевая соль – хлорофиллин [33,36].

К веществам, способным химически связывать мутагены еще до поступления в клетку, относятся *полисахариды* растительного происхождения: клетчатка, целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнин, пектины. В тесте Эймса полисахариды ингибировали мутагенез, индуцированный продуктами пиролиза белков и аминокислот. Полисахариды, в эксперименте, снижают частоту злокачественных опухолей у людей и животных, в том числе и с помощью активации эндокринной системы [6,36,147,148,151].

Большой интерес представляют данные о дисмутагенном действии гуминовых кислот, широко распространенных в природе и в первую очередь на территории Западной Сибири, на 2/3 покрытой торфяными болотами [151]. В подтверждение сказанного свидетельствуют результаты исследования влияния гумизоля (0,01% раствор фракций гуминовых кислот лечебной грязи в изотоническом растворе натрия хлорида) на цитогенетические последствия

влияния циклофосфана на организм. Под действием гумизоля добавленного в культуру Т-лимфоцитов одновременно с циклофосфаном наблюдалось снижение мутагенного эффекта смеси и процента хроматидных разрывов. Антимутагенный эффект гумизоля объясняется способностью этого препарата угнетать биотрансформацию ксенобиотиков в печени [126].

Как видно из приведенного обзора, механизмы антимутагенной активности биологически активных веществ растений различны и многосторонни. Поэтому с целью создания высокоэффективных препаратов, способных предупреждать мутагенный эффект ксенобиотиков, а также модифицировать их действие, требуется подбор растений, содержащих различные действующие начала. На актуальность сочетания в одном сборе нескольких видов растений накладывает отпечаток то обстоятельство, что при комбинированном применении действие ингибиторов мутагенеза часто может носить синергетический или аддитивный характер. Например, синергизм проявляется при использовании витаминов С и Е; оптимум действия витамина Е необходим для протекторного эффекта витамина А. Более того витамин Е действует аддитивно с соединениями селена [54].

Указанные примеры еще раз подчеркивают актуальность не только поиска антимутагенов природного происхождения, но и необходимость поиска путей их рационального использования.

1.2. Современные антимутагены синтетического происхождения

В настоящее время получил развитие также поиск антимутагенов среди синтетических соединений, причем особое внимание уделяется средствам, специфически устраняющим мутагенный эффект определенных химических агентов. Это нашло отражение в развитии концепции лекарственного антимутагенеза [36,45,47,77].

Первое изучение фармакологического корректора мутагенных эффектов, известного антибактериального средства диоксидина, было выполнено в середине 80-х годов. В данной работе показано, что диоксидин, применяемый

по жизненным показаниям внутривенно в дозе 10 мг/кг, значительно повышает выход клеток с нарушениями в числе и структуре хромосом в группе обследованных пациентов (12 человек) и не проявляет подобной способности при сочетании с актопротектором *бемитилом*, назначаемым перорально в дозе 20 мг/кг (30 человек) [77].

В дальнейшем в совместной работе А.Д. Дурнева с соавторами [28] было показано, что у больных системной красной волчанкой, пролеченных *бемитилом*, заметно улучшается репарация ДНК и нормализуется содержание аутоантител к ДНК. Изучение влияния другого производного 2-меркаптобензимидазола – анксиолитика *афобазола* на цитогенетические эффекты диоксида и циклофосфана показало, что указанный препарат, в трех режимах дозирования, полностью подавляет мутагенное действие диоксида и уменьшает цитогенетический эффект диоксида на 44, 75 и 54% соответственно. Кроме того, он проявляет способность к уменьшению мутагенного действия циклофосфана у мышей на 33,69 и 64% соответственно [52].

Среди лекарственных препаратов наиболее полные сведения получены для *гексамидина*, в частности, было установлено, что противосудорожное средство гексамидин обладает выраженной способностью снижать уровень спонтанного мутирования и доминантных летальных мутаций на различных растительных и животных объектах. При этом гексамидин проявлял свои антимуtagenные свойства и при индуцированном мутагенезе, снижая уровень aberrаций хромосом [7].

К лекарственным препаратам, характеризующимся антимуtagenными свойствами, может быть отнесен и известный противогельминтный препарат *празиквантел*, который уменьшал изначально повышенный уровень микроядер в эритроцитах периферической крови, а также микроядер и хромосомных aberrаций в урогенитальных клетках больных [45].

Среди прочих антимутагенов лекарственной природы можно назвать *ксимедон*, который существенно снижает образование эритроцитов с микроядрами [114].

В развитие предположения о тесной корреляции между антимутагенными и антиоксидантными свойствами природных и синтетических соединений были изучены антимутагенные свойства *гипоксена* – антигипоксанта с выраженным антирадикальным и антиокислительным действием. В результате было установлено, что указанное средство способно ослаблять цитогенетическое действие диоксида у мышей при его внутрибрюшинном введении одновременно с мутагеном [58].

Достаточно подробно изучены антимутагенные свойства *аспартама*, который широко используется как лекарственное средство и пищевая добавка. В эксперименте аспартам значительно уменьшал кластогенные эффекты вызванные диоксином и циклофосфаном [12,27,79].

Обнаруженный относительно недавно новый вид биологической активности интерферонов – способность защищать клетки от действия мутагенов разной природы послужил толчком для разработки антимутагенных средств на его основе. Так, например, было установлено, что природный лейкоцитарный *интерферон*, примененный для лечения пигментной ксеродермы, нормализовал у больных исходно нарушенную репарацию ДНК [45].

Изучению антимутагенных свойств синтетического индуктора интерферона – *йодантипирина* посвящена работа Терновой С.В. с соавт. [138]. Указанными исследователями установлено, что профилактическое введение йодантипирина приводит к снижению уровня цитогенетических нарушений в клетках костного мозга, вызванных цитостатиком. Антимутагенные свойства установлены для некоторых производных *1,4-дигидропиридина* (*одно,триядерных*), а также и для других препаратов-продуктов химического синтеза: димеркаптола, томерзола, аспирина, гумизола, бедитина, тодрализина, новобиоцина, пуромицина, D-пеницилламина, флуфеназина, трифлуоперазина,

новогидрогуаретовой кислоты, хлорамфеникола, стрептомицина [36,45,47,77,79].

Признавая значимость направленного поиска антимутагенов среди синтетических соединений, необходимо отметить, что масштабы разработки и применения фармакологических средств защиты генома резко ограничены невозможностью их назначения с профилактическими целями здоровым людям. В связи с этим опыт применения препаратов этой группы ограничен ситуациями назначения фармакологических антимутагенов больным, которые по жизненным показаниям подвергались терапии заведомо мутагенными препаратами.

1.3. Перспективные антимутагены природного происхождения

Поиск эффективных лекарственных средств из растений, сегодня является весьма важной задачей. В их пользу убедительно говорит низкая токсичность и ограниченный спектр побочных явлений, они способны воздействовать на физиологические процессы, протекающие в организме человека и, соответственно повышать естественную защиту организма. Кроме того, процесс получения лекарственных средств из растений зачастую выгоднее химического синтеза [5,39,64,133].

Поэтому, не случайно, сегодня лекарственные вещества природного происхождения, особенно растительного, составляют порядка 30% всех препаратов, применяемых в современной медицине. Во многих случаях доля лекарственных препаратов из растений значительно превышает указанный процент [5,64].

Преимущество препаратов на основе биологически активных веществ растений во многих случаях очевидно, так как, с одной стороны, при их использовании практически отсутствуют осложнения и нежелательные побочные эффекты, с другой – существует широкий простор для маневрирования, который обеспечивается богатым выбором растений, обладающих одинаковыми видами действия. В пользу данного фактора

свидетельствует и возможность подбора в одном сборе таких комбинаций лекарственных растений, которые не только взаимно усиливают свои свойства, но и обеспечивают весь необходимый для больного набор фармакологических эффектов [111]. Так например, многие модификаторы мутагенеза имеют природное происхождение и действуют с помощью множественных и разных, не исключających друг друга механизмов, включая воздействия как на внеклеточном, так и на внутриклеточном уровне. Именно поэтому приоритетным направлением в создании антимуtagenных препаратов для практического применения является комбинирование нескольких природных антимуtagenов с различными или множественными механизмами действия.

Учитывая сказанное, в последнее время возрастает круг растений изучаемых на антимуtagenную активность. Так различными авторами было испытано более 2000 экстрактов растений, представляющих 39 семейств, и эффект ингибирования мутагенеза, индуцированного 2-аминоантраценом, был обнаружен у 80 видов, при этом большинство из них не обладали токсическими свойствами [54]. Обобщая материал по антимуtagenному действию растительных биологически активных комплексов, Шлянкевич М.А. с соавторами [151] посчитал целесообразным разделить все ранее исследованные растения на три группы, в зависимости от активности указанных видов (с высокой, средней и невысокой).

Высокой антимуtagenной активностью, по данным названных ученых обладает солодковый корень, чеснок, соевые бобы, имбирь, морковь, сельдерей, пастернак [151]. Среди известных лекарственных растений в эту группу отнесены такие растения, как чистотел большой, шлемник байкальский, родиола розовая, подорожник большой [18,171].

Средней антимуtagenной активностью обладают лук, чай, цитрусовые, льняное семя, пшеница, томаты, перец, цветная и брюссельская капуста. Из лекарственных растений в группу средней активности попали крапива двудомная, облепиха крушиновидная, кассия трубчатая, эвкалипт прутовидный. [18,151,173].

Невысокая антимуtagenная активность установлена для мяты перечной, полыни горькой, чабреца (тимьяна ползучего), черники обыкновенной, овса, ячменя, малины [151].

Ниже нами суммированы данные литературы по испытаниям препаратов растений на антимуtagenную активность на различных тест-системах (табл. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что в основном с этой целью использовали микробную тест-систему, а также опыты на лабораторных животных. Как видно из таблицы, растительные тест-системы, а также опыты на насекомых и на культуре клеток человека с этой целью используются редко. В редких случаях практикуется исследование указанной активности на нескольких тест-системах.

Из таблицы 3 также видно, что наиболее часто для испытаний антимуtagenной активности используют экстракт, а в качестве экстрагентов выбирают воду, реже этанол различной концентрации, хлороформ, ацетон. Что же касается видового разнообразия растений, оценка генозащитной активности которых проводилась, то в основном они представлены 17 ботаническими семействами (Eleagnaceae, Rubiaceae, Apiaceae, Poaceae, Myrtaceae, Theaceae, Cucurbitaceae, Brassicaceae, Vitaceae, Rosaceae, Potamogetonaceae, Solanaceae, Fabaceae, Urticaceae, Lamiaceae, Araliaceae и Asteraceae) среди которых наиболее значительная часть растений принадлежит к семействам Solanaceae, Fabaceae, Urticaceae, Lamiaceae, Araliaceae и Asteraceae.

Приведенные в таблице 3 данные подтверждают информацию (раздел 1.1) о том, что способность снижать действие мутагенов различных классов присуща лекарственному растительному сырью, содержащему витамины (кукуруза, морковь, капуста, крапива, облепиха, апельсин, грейпфрут, гранат и др.), фенольные соединения (дудник лекарственный, виноград, гуаява, чай, родиола розовая), полисахариды (пшеница, фейхоа, горох, дыня, паслен), терпеноиды (женьшень, солодка, шалфей, полисциас). Обращает на себя внимание присутствие в данной таблице большого числа пищевых и

экзотических растений и менее значительное представительство лекарственных растений, в том числе флоры Сибири.

Таблица 3 – Виды растений с установленной антимутагенной активностью [7,18,39,49,51,117,124,137,151,153,159,171].

Растение	Препарат	Тест-система	Используемый мутаген
Паслен черный – <i>Solanum nigrum</i> L.	масло	1,2	ионизирующая радиация, фтористый натрий
Дудник лекарственный – <i>Angelica archangelica</i> L.	водный и этанольный экстракты	2	тиофосфамид
Пшеница мягкая – <i>Triticum aestivum</i> L.	водный экстракт проростков	2	фтористый натрий
Морковь посевная – <i>Daucus sativa</i> Roehl.	сок	1	3-метилхолантрен и бензапирен
Момордика – <i>Momordica charantia</i> Spreng.	водный экстракт	2	митомицин с
Лук репчатый – <i>Allium cepa</i> L.	сок, водный диализат	1,2	7,12-диметилбензантрацен
Кукуруза обыкновенная – <i>Zea mays</i> L.	экстракт, масло	1	бензапирен, динитропирен
Шпинат посевной – <i>Shinacia sativa</i> L.	экстракт (водный и ацетоновый)	1	3-метилхолантеновые экстракты
Женьшень – <i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.	суспензионная культура, биоженьшень	2	митомицин С, нитрозометилмочевина
Крапива двудомная – <i>Urtica dioica</i> L.	водный экстракт	2	спонтанный
Чай – <i>Thea sinensis</i> L.	экстракт	1	бензапирен
Кофе – <i>Coffea arabica</i> L.	экстракт	2	циклофосфамид, прокарбазин
Облепиха крушиновидная – <i>Hippophae rhamnoides</i> L.	масло	4	нитрозометилмочевина, ионизирующая радиация
Кизильник кистецветный – <i>Cotoneaster racemiflora</i> L.	водный экстракт	3	спонтанная мутабельность
Лопух малый – <i>Arctium minus</i> Gaerth.	водный экстракт, сок	1,2	бензапирен, пирролизаты триптофана, акриламид, 3-метилхолантрен
Горох посевной – <i>Pisum sativum</i> L.	экстракт	1,2	нитрозометилмочевина
Индийский крыжовник – <i>Emblica officinalis</i> L.	водный, ацетоновый и хлороформный экстракты	1	азид натрия
Солодка голая – <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	экстракт	1	3-метилхолантрен, бензапирен, диметиламиноазобензол

Водяной перец – <i>Polygonum hidropiper</i> L.	водный экстракт	2	тяжелые металлы
Родиола розовая – <i>Rhodiola rosea</i> L.	экстракт	1	этидиум бромид, тиофосфамид, бихромат калия
Полискиас папоротниколистый – <i>Polyscias filicifolia</i> L.	экстракт на 40% этаноле	1	тиофосфамид, этидиум бромида, бихромат калия
Кассия трубчатая - <i>Cassia fistulata</i> Vahl.	водный экстракт	1	УФ-облучение
Редис – <i>Raphanus sativus</i> L.	лиофилизированный экстракт		афлатоксин В1 и производные акриламида
Герань – <i>Geranium trubergii</i> L.	водный экстракт	1	диол-эпоксид
Псидиум гуаява – <i>Psidium guajava</i> L.	водный экстракт	1,2	2-аминоантрацен
Рдест кучерявый – <i>Potamogeton crispus</i> L.	водный экстракт	1	бензапирен
Виноград культурный – <i>Vitis vinifera</i> L.	эботанин	1,2,3	ионизирующая радиация, нитрозогуанидин, фтористый натрий,
Апельсин сладкий – <i>Citrus sinensis</i> Osdeck.	сок	1	ионизирующая радиация
Грейпфрут – <i>Citrus paradisi</i>	сок	1	пищевые мутагены
Гранат – <i>Punica granatum</i> L.	экстракт	3	гамма-лучи
Нут полевой – <i>Cicer arietinum</i> L.	биоинин А	1	бензапирен
Капуста – <i>Brassica capitata</i> L.	водный экстракт	1	продукты превращения нитрита натрия
Дыня – <i>Cucumis mela</i> L.	вытяжка из плодов	2	митомицин С, тетрациклина гидрохлорид, диметилнитрозамин
Шалфей - <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge.	экстракт из листьев	1	перекисные соединения
Горец многоцветковый - <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	водный экстракт	1	ионизирующая радиация
Календула лекарственная – <i>Calendula officinalis</i> L.	экстракт цветков	1	бензапирен
Гречиха посевная <i>Fagopyrum esculentum</i> L.	экстракт околоплодника на 70% этаноле	2	ионизирующая радиация
Элеутерококк колючий – <i>Eleuterococcus senticosus</i> Rupr. et Maxim	этанольные экстракты	3	этиленметансульфонат
Фейхоа – <i>Feijoa sellowiana</i> O.Berg	экстракт плодов на 70% этаноле	2,3	метилнитрозогуанидин, рентгеновские лучи, нитрозометилмочевина

Примечание: Тест-системы для оценки антимутагенной активности: 1- микроорганизмы, 2- лабораторные животные, 3-растения, 4-насекомые.

Таким образом, на основании результатов анализа данных литературы можно сделать вывод, что вопросам изучения антимутагенных свойств разнообразных синтетических и природных соединений в последние десятилетия уделялось недостаточно внимания. Хотя к настоящему времени известно свыше 500 соединений, у которых обнаружены антимутагенные свойства, для защиты генома человека от реальных мутагенных воздействий апробированы единицы из них. Кроме того, большинство исследований антимутагенных свойств препаратов, проводятся в экспериментах *in vitro*, в условиях метаболической активации, и их результаты не могут быть напрямую экстраполированы на человека.

Вышеперечисленные факторы побудили нас акцентировать свое внимание на разработке и внедрении в практику эффективного, безвредного и экономически выгодного растительного средства, корректора мутагенеза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2

Объекты и методы исследования

2.1. Характеристика объектов исследования

Подбор компонентов сбора осуществлялся, на основании результатов скрининга водных экстрактов растений на антимуtagenную активность, при этом обращалось внимание на природу биологических веществ и многоуровневый патогенез мутаций. Компоненты предлагаемого сбора разрешены к применению в медицине как официальное лекарственное растительное сырье [37].

В состав исследуемого сбора отобрано 5 видов лекарственного растительного сырья: Flores Calendulae, Radices Taraxaci, Folia Urticae, Herba Eguiseti, Semini Lini, их характеристика представлена в таблице 4.

Таблица 4. – Характеристика объектов исследования

Вид сырья	Место сбора или поставщик, серия образца	Фаза вегетации и время сбора
Цветки календулы лекарственной	Хакасия, окр. с. Ефремикино, с. Каргасок Томской обл. ЗАО "ИВАН-ЧАЙ", (г.Москва №196211)	Фаза цветения, август 2001-2003 гг.
Корни одуванчика лекарственного	окр.г. Прокопьевск Кемеровской обл., ЗАО "ИВАН-ЧАЙ", (г.Москва №183318)	Конец августа 2001- 2003 гг.
Листья крапивы двудомной	Томский р-н Томской обл., ОАО «Краногорсклексредства» (Московская обл., Красногорский р-н, пос.Опалиха. №50305)	Фаза цветения, 2001-2003 гг.
Трава Хвоща полевого	Шегарский р-н Томской обл., Колыванский р-н Алтайского края, ООО "Камила", (Московская обл., г.Химки №01062000)	Фаза вегетации, Июль 2001-2003 гг.
Семена льна посевного	Алтайский край, окр. с. Поспелиха, ОАО «Краногорсклексредства» (Московская обл., Красногорский р-н, пос.Опалиха. №50503)	Фаза ранней желтой спелости, август 2001-2002 г.

Указанное сырье собиралось в течение лета 2001-2003 гг., сушилось, упаковывалось и хранилось в соответствии с требованиями нормативной документации (ГОСТ 6077-80, ОСТ 43-3-84 и ГФ XI). Кроме того, использовались промышленные партии сырья.

Исследуемое сырье подвергалось анализу на соответствие требованиям нормативной документации [1,2,37].

Для химических исследований из исследуемого сбора получали водно-спиртовой экстракт для чего точную навеску сырья заливали 40% этанолом и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течении 45 минут. Для фармакологических исследований получали водные, водно-спиртовые извлечения путем экстракции точной навески сырья водой, 20%, 40% и 70% этиловым спиртом на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. Кроме того, использовали такие липофильные экстрагенты как этилацетат, хлороформ, диэтиловый эфир и ацетон. Полученные экстракты сушили с помощью конвективной или инфракрасной сушилки, после чего использовали для проведения нижеуказанных исследований.

2.2. Методики химического исследования

Согласно данным литературы в состав сырья исследуемого лекарственного растительного сбора, входят различные группы биологически активных веществ, в том числе полисахариды, фенольные соединения, каротиноиды, аскорбиновая кислота, пигменты, сапонины, микроэлементы и другие, которые и обеспечивают антимуtagenное действие сбора [6,18,36,45,49,65,77,92,148,151,176]. Поэтому, именно на указанные группы БАВ прежде всего было направлено химическое исследование биологически активных веществ, содержащихся в компонентах сбора. Исследование проводили с использованием современных методов и приемов химического анализа: спектрофотометрического, титриметрического и др. Расчеты вели на абсолютно сухое сырье.

2.2.1. Фенольные соединения

Приготовление извлечений:

- *Для качественных реакций:* 0,5 гр. Растительного сбора заливали 25 мл 40% этанола. Нагревали на водяной бане с обратным

холодильником в течении 20-30 минут, процеживали через вату, и полученное извлечение использовали для проведения качественных реакций [37,38,68].

• *Для исследования качественного состава фенольных соединений с помощью хроматографии на бумаге (БХ):* 10,0 растительного сбора заливали 100 мл 40% этанола, нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30-45 минут.

а) *Реакция с железоаммонийными квасцами:* К 2-3 мл полученного извлечения добавляли несколько капель железоаммонийных квасцов. О наличии в сырье фенольных соединений свидетельствует появление черно-синего или черно-зеленого окрашивания и осадка [30,37].

б) *Реакция с ацетатом свинца:* К 1 мл извлечения добавляли 2 мл раствора 10% уксусной кислоты и 1 мл раствора 10% средней соли ацетата свинца [30,37,38].

в) *Реакция с железом окисного хлорида:* 0,05 мл извлечения сбора наносили на лист фильтровальной бумаги в одно пятно диаметром 10 мм. В это же пятно одним касанием наносили 0,1 мл хлороформа. Бумагу подсушивали до удаления запаха хлороформа и в центр пятна наносили 0,05 мл. 1% раствора железа окисного хлорида в 95% спирте. После высушивания на воздухе фиксировали изменение окраски [37,38].

г) *Исследование качественного состава фенольных соединений с помощью бумажной хроматографии* [66,68]: Полученное извлечение сгущали до 10 мл и в количестве 0,02 мл наносили микропипеткой или микрокапилляром на линию старта хроматографической бумаги марки «Ленинградская медленная» (ЛМ). Для хроматографирования фенольных соединений использовали системы растворителей: 15% раствор кислоты уксусной; н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:2). На хроматограмме фенольные соединения обнаруживали по характерному свечению в УФ-свете при длине волны 365 нм до и после обработки хроматограмм парами аммиака, спиртовыми растворами натрия гидроксида и алюминия хлорида.

д) *Сумму фенольных соединений* определяли оксидиметрическим методом путем титрования раствором калия перманганата [37]. Этот метод, по существу, дает представление о содержании в сборе не только таннидов, но и всего комплекса окисляемых соединений, переходящих в водное извлечение (таннидов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, аскорбиновой кислоты и др.). В качестве индикатора использовали индигосульфокислоту, которая является регулятором и индикатором реакции.

Для определения суммы фенольных соединений около 2,0 г (точная навеска) измельченного сбора, просеянного сквозь сито №3, помещали в коническую колбу, вместимостью 500 мл, залили 250 мл нагретой до кипения воды и кипятили с обратным холодильником на плитке с закрытой спиралью в течении 30 минут при периодическом помешивании. Извлечение охлаждали до комнатной температуры и процеживали в мерную колбу вместимостью 200-250 мл через вату так, чтобы частицы сбора не попали в колбу. Затем из колбы взяли пипеткой 25 мл полученного извлечения в другую колбу вместимостью 1 л, прибавили 500 мл воды очищенной, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титровали при постоянном помешивании 0,02 моль/л раствором калия перманганата до золотисто-желтого окрашивания.

Параллельно проводили контрольный опыт. В литровую колбу помещали 500 мл воды, 25 мл индигосульфокислоты и титровали 0,02 моль/л раствора калия перманганатом до золотисто-желтой окраски.

Содержание суммы фенольных соединений в процентах в пересчете на абсолютно сухой сбор вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot 0.004157 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad \text{где}$$

V – объем 0,02 моль/л раствора перманганата калия, израсходованного на титрование извлечения, в мл;

V_1 – объем 0,02 моль/л раствора перманганата калия, пошедшего на контрольный опыт;

m – масса сбора, в г;

W – потеря в массе при высушивании сбора, в %;

250 – общий объем извлечения, в мл;

25 – объема извлечения, взятого для титрования, в мл.

2.2.2. Фенолкарбоновые кислоты (ФКК)

Количественный анализ проводили прямым спектрофотометрированием без предварительного разделения суммы фенолкарбоновых кислот [80,100,108].

Для этого 0,5 г (т.н.) измельченного сырья помещали в колбы со шлифом объемом 50 мл, приливали 25 мл 40%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 45 минут. После охлаждения колбы взвешивали и доводили массу каждой из них до первоначальной 40% этанолом, извлечения перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр “синяя полоса” – раствор А. После охлаждения колбы вновь взвешивали, доводили таким же образом массу до первоначальной, перемешивали и фильтровали через фильтр “синяя полоса”. 1 мл полученного фильтрата вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора водой очищенной до метки – раствор Б.

Спектры полученных растворов Б снимали на спектрофотометре СФ-46 в УФ- области при длине волны 325 ± 5 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот осуществляли в пересчете на кофейную кислоту и сухое сырье.

$$X = \frac{D \times 25 \times 100 \times 100}{m \times E_{1\text{см}}^{1\%} \times (100 - W) \times 100}, \quad \text{где}$$

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения кофейной кислоты;

D - оптическая плотность испытуемого раствора;

m - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

2.2.3. Флавоноиды

Для качественных реакций определения флавоноидов в исследуемом сборе получали извлечение. С этой целью 1,0 растительного сбора помещали в широкогорлую колбу, заливали 30 мл 70% этанола и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником 10 минут. Извлечение охлаждали, фильтровали через вату и проводили с ним качественные реакции [30,37,71]:

а) *Проба Синода*. Взяв две пробирки с одинаковым количеством полученного экстракта (1мл) прибавляли по 3 капли концентрированной хлористоводородной кислоты. Затем в одну из пробирок добавляли несколько крупинок металлического цинка, обе пробирки нагревали на водяной бане до кипения и оставляли для охлаждения на 5-10 минут. О присутствии в извлечении флавоноидов свидетельствует окраска продукта реакции, которая зависит от группы флавоноидов.

б) *Реакция со щелочью*. К 0,5 мл полученного выше спиртового извлечения добавляли несколько капель 1% спиртового раствора щелочи. Флавоны и флавонолы растворяются в щелочах с образованием желтой окраски. Халконы и ауроны сразу-же образуют красные или пурпурные растворы (специфичная реакция).

в) *Проба с 0,5% раствором хлорного железа*. К 0,5 мл полученного выше спиртового экстракта добавляли 1-2 капли раствора хлорного железа. Давать окраску с хлорным железом – общее свойство полиоксифенольного соединения. Ортооксифенольные группы в молекулах флавоноидов обуславливают зеленую, а триоксифенольные группы – синюю окраску.

г) *Проба с алюминия хлоридом*. К 1 мл спиртового извлечения добавляли 3-5 капель 5% спиртового раствора реактива. При наличии флавоноидов появляется желтое окрашивание.

д) *Количественное определение суммы флавоноидов* проводили спектрофотометрическим методом с использованием комплексообразующей реакции с алюминия хлоридом [37,68,71,99,134]. Показания снимали в УФ-

области при длине волны 410 нм. Параллельно определяли оптическую плотность комплекса рутина с алюминия хлоридом.

Аналитическую пробу сбора измельчали до размера частиц проходящих через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 (т.н.) измельченного сбора помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 30 мл 70% этанола. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сбора со стенок. Горячее извлечение профильтровывали через вату в мерную колбу на 50 мл так, чтобы частицы сбора не попадали на фильтр. Вату помещали в колбу для экстрагирования и прибавляли 20 мл 70% этанола, экстракцию повторяли в описанных выше условиях еще два раза, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем доводили 70% этанолом до метки и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл раствора алюминия хлорида в 95% спирте, 2 мл раствора А и доводили объем раствора 95% спиртом до метки. Через 20 и 40 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухой сбор в % (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D * m_0 * 50 * 100 * 100}{D_0 * m * 25 * (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D₀ – оптическая плотность ГСО рутина;

M – масса сбора, в г;

M_0 – масса ГСО рутина, в г;

W – влажность сбора, в %.

Приготовление раствора ГСО рутина:

Около 0,0125 (т.н.) ГСО рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135⁰С в течение 3 часов, растворяли в 95% спирте в мерной колбе на 25 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, доводили объем раствора до метки 95% спиртом и перемешивали.

Приготовление 1% раствора алюминия хлорида в 95% этаноле:

1,0 г алюминия хлорида (ГОСТ 3759-75, ЧДА) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 95% этаноле и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Срок хранения реактива 3 месяца.

2.2.4. Кумарины

Для качественного определения кумаринов готовили извлечение, для чего брали 0,5 г растительного сбора, заливали 10 мл 30% этанола и нагревали на кипящей водяной бане 15 мин. После охлаждения извлечение профильтровывали и проводили с ним качественные реакции [30,37,38]:

а) *Реакция диазотирования.* К 1 мл извлечения добавляли 3 мл 1% спиртового раствора натрия гидроксида и нагревали на водяной бане в течение 5 минут (при наличии кумаринов раствор желтеет). Затем прибавляли 5 капель свежеприготовленного раствора диазотированной сульфаниловой кислоты. При наличии кумаринов появляется вишнево-красное или оранжево-красное окрашивание.

б) *Лактонная проба.* В две пробирки наливали по 1 мл извлечения. В одну из них добавляли 0,5 мл 10% раствора натрия гидроксида. Обе пробирки нагревали на водяной бане до кипения и охлаждали. В каждую пробирку наливали по 4 мл очищенной воды. О присутствии кумаринов судили по сохранению прозрачности раствора со щелочью.

в) Для проведения *количественного определения кумаринов* [30,37,38] сбор измельчали до 0,25 мм и около 0,25 г (точная навеска) измельченного

сбора, помещали в колбу на 200 мл. Навеску измельченного сбора заливали 50 мл 30% этанола и кипятили с обратным холодильником 30 минут. Затем фильтровали, фильтр промывали горячим 30% этанолом по 20 мл.

К объединенным фильтратам добавляли 2 мл 10% уксусного свинца и кипятили 3 мин. Горячую смесь фильтровали, колбу и фильтр трижды промывали 30% этанолом по 20 мл.

Затем к фильтрату добавляли 1 г однозамещенного фосфата натрия и снова кипятили 3 мин. Горячий раствор фильтровали непосредственно в делительную воронку, промывали колбу и фильтр 30% этанолом трижды по 20 мл и охлаждали.

Полученный водно-спиртовой раствор экстрагировали 3 раза порциями хлороформа по 25 мл. Объединенные порции промывали водой очищенной. Далее хлороформную вытяжку сушили безводным сульфатом натрия и высушенный хлороформный экстракт фильтровали, а осадок сульфата натрия на фильтре промывали хлороформом трижды по 10 мл, растворитель удаляли полностью до сухого остатка. Полученный осадок растворяли в 24 мл 96% этанола. К 12 мл этого раствора добавляли 20 мл 0,1 н раствора едкого натра и нагревали 5 мин на водяной бане при температуре 70-85 С⁰.

К охлажденному раствору добавляли 8 мл диазотированной сульфаниловой кислоты. Через 10 мин полученную смесь исследовали с помощью ФЭК-М, на сине-зеленом фильтре, толщина кюветы 1 см.

Содержание суммы кумаринов определяли по формуле:

$$X = \frac{C \times 80 \times 100}{m}, \text{ где}$$

C – концентрация по графику, в мг/мл;

80 – разведение;

m – точная навеска, в мг.

Приготовление диазотированной сульфаниловой кислоты:

Сульфаниловую кислоту массой 0,1 г растворяли в 90 мл воды очищенной и добавляли 1 мл концентрированной соляной кислоты. Далее объем доводили до

100 мл водой очищенной (раствор А). Затем готовили 10% раствор нитрита натрия (раствор Б). Непосредственно перед работой сливали 10 мл раствора А и 0,1 мл раствора Б (наливали раствор А в раствор Б).

2.2.5. Дубильные вещества

Для *качественного определения дубильных веществ* получали водные извлечения, для чего 5,0 г сбора заливали 100 мл горячей воды и кипятили в течение 5 минут. С фильтратом проводили качественные реакции [37]:

а) *Осаждение 1% раствором желатина*: к 2 мл испытуемого раствора добавляли по каплям 1% раствор желатина в 10% растворе натрия хлорида. При наличии дубильных веществ появляется осадок, исчезающий при добавлении избытка желатина.

б) *Реакция с солями алкалоидов*: к 3-5 мл извлечения добавляли 2-3 капли 1% раствора соли кодеина. При наличии таннидов наблюдается помутнение раствора.

2.2.6. Исследование фенольных соединений сбора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Исследование экстрактов на 20 и 70% этаноле, а также этилацетатной фракции антимуtagenного сбора проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series в следующих условиях:

- Аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C18 4,6x150 мм, с размером частиц 5 мкм;
- Состав подвижной фазы: ацетонитрил – вода очищенная – кислота уксусная (20:75:5);
- Детектирование при длине 255 нм;
- Температура колонки – 22⁰С;
- Скорость подвижной фазы 0,3 мл/мин;

- Объем вводимой пробы 20 мкл;
- Место проведения исследования – лаборатория контрольно-аналитических работ и стандартизации препаратов Института фитохимии МОН Республики Казахстан, г. Караганда;

Указанный метод позволяет разделять сложные смеси и получать некоторую информацию об их компонентах без выделения индивидуальных соединений и использования стандартов. Именно метод ВЭЖХ наиболее удобен для изучения различных групп фенольных соединений [57,74,115,169].

Для проведения анализа образцы проб растворяли в смеси ДМСО-Вода очищенная (1:1), полученные растворы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Полученный фильтрат и раствор достоверного образца попеременно хроматографировали на жидкостном хроматографе в условиях описанных выше. Обсчет данных проводили за счет программного обеспечения ChemStation.

При анализе были использованы достоверные образцы фенолкарбоновых кислот, флавоноидов, кумаринов: галловая кислота, кофейная кислота, салициловая кислота, коричная кислота, кумаровая кислота, протокатеховая кислота, м-оксикоричная кислота, феруловая кислота, рутин (PCO), кверцетин (PCO), лютеолин (PCO), лютеолин-7 гликозид (ГСО), гиперозид, апигенин, эскулетин, умбеллиферон, наренгенин.

2.2.7. Определение хлорофилла

Количественное определение хлорофилла в сборе проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 660 нм [21].

1.0 (точная навеска) измельченного сырья заливали 30 мл 80 % этанола и ставили на водяную баню с обратным холодильником на 30 минут. Полученное извлечение процеживали и переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяли трижды, пока извлечения не стали бесцветными. Далее

полученное спиртовое извлечение доводили до метки 80 % этанолом и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре (λ 660 нм).

В качестве раствора сравнения использовали 80 % этанол. Содержание хлорофилла определяли по следующей формуле:

$$X = \frac{D \times V \times 100 \times 100}{m \times 944,5 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

V – объем исследуемого раствора, в мл;

m – масса точной навески сырья, в гр;

W – влажность сырья, в %;

944,5 – экстинкция

2.2.8. Сапонины

Приготовление извлечения: Готовили водный настой 1:10, нагревая измельченный сбор на водяной бане в течение 10 минут. Настой после охлаждения фильтровали и проводили с ним качественные реакции [30,37]:

а) *Реакция пенообразования.* Брали две пробирки, в одну приливали 5 мл 0,1 моль/л хлористоводородной кислоты, а в другую – 5 мл 0,1 моль/л гидроксида натрия. Затем в обе пробирки добавляли по 2-3 капли извлечения и сильно встряхивали. По образованию в пробирках стойкой пены судили о присутствии в сборе сапонинов, а по высоте пенного столба – о природе сапонинов.

б) *Реакция с ацетатом свинца.* К 2 мл настоя в пробирке прибавляли несколько капель раствора ацетата свинца. О наличии сапонинов судили по образованию осадка. Причем, тритерпеновые сапонины осаждаются средним ацетатом свинца, а стероидные – основным.

в) *Реакция Либермана-Бурхардта.* К 2 мл настоя прибавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты, смесь уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (50:1). Наблюдали за изменением окраски.

2.2.9. Полисахариды

Для *качественного определения полисахаридов* готовили водный настой 1:10, нагревая измельченный сбор на водяной бане в течение 10 минут. Настой после охлаждения фильтровали и проводили с ним качественные реакции [37,41,91]:

а) *Реакция с реактивом Фелинга*. Полисахариды осаждали из настоя 95% этанолом. Раствор с осадком фильтровали через стеклянный фильтр ПОР 16, осадок с фильтра переносили в пробирку, прибавляли 5 мл разведенной хлористоводородной кислоты, кипятили несколько минут, прибавляли 10 мл реактива Фелинга и снова кипятили, наблюдая за изменением окраски раствора (восстанавливающие сахара).

б) *Количественное содержание суммы водорастворимых полисахаридов* определяли гравиметрическим методом [20,37,41,91]. Для этого аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито по ТУ 23. 2. 2068-89 с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды очищенной, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяли еще четыре раза по 100 мл в течение 30 мин каждый раз. Водное извлечение центрифугировали с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантировали в мерную колбу вместимостью 500 мл через пять слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм предварительно смоченную водой. Фильтр промывали водой очищенной и доводили объем раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещали в центрифужную пробирку, прибавляли 75 мл 95% этанола, перемешивали, подогревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 5 мин. Через 30 мин 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 105°C стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм.

Затем осадок количественно переносили на тот же фильтр и промывали 15 мл смеси 95% этанола и воды (3:1).

Фильтр с осадком высушивали сначала на воздухе, затем при температуре 100-105°C до постоянной массы. Содержание суммы водорастворимых полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

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

m_1 – масса фильтра, в г;

m_2 – масса фильтра с осадком, в г;

m – масса сырья, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья (влажность), в %.

Для более детального изучения полисахаридного комплекса определяли сумму полисахаридов по фракциям [20,91].

Для этого остаток сбора после определения суммы полисахаридов обрабатывали экстрагентом (100 мл кипящей очищенной воды с 0,4 мл концентрированной хлористоводородной кислоты) на кипящей водяной бане (95-100°C) в течение 30 минут. Раствор фильтровали и охлаждали. Пектиновые вещества осаждали двукратным объемом 95% этанола. Через 12 часов осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера, промывали 95% этанолом. Осадок подсушивали и доводили до постоянной массы (пектиновые вещества - ПВ).

Содержание пектиновых веществ в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_2 \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m_1 – масса осадка водорастворимых полисахаридов, в г;

m_2 – масса осадка пектиновых веществ, в г;

W – потеря в массе при высушивании сбора (влажность), в %.

Остаток сбора экстрагировали 100 мл 10% водного раствора щелочи при температуре 20° С в течение 24 часов на встряхивающем аппарате. После этого

профильтровали и к полученному извлечению добавили 40 мл 50% кислоты уксусной для осаждения гемицеллюлозы А (Гц А). В фильтрате двукратным объемом 96% спирта осаждали гемицеллюлозу Б (Гц Б). Осадок подсушивали при температуре 90°С и доводили до постоянной массы.

Содержание гемицеллюлозы А в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_2 \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m_1 – масса осадка водорастворимых полисахаридов, в г;

m_2 – масса осадка гемицеллюлозы А, в г;

W – потеря в массе при высушивании сбора (влажность), в %.

Содержание гемицеллюлозы В в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_2 \times 100 \times 100}{m_1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m_1 – масса осадка водорастворимых полисахаридов, в г;

m_2 – масса осадка гемицеллюлозы В, в г;

W – потеря в массе при высушивании сбора (влажность), в %.

в) Для определения мономерного состава полисахаридного комплекса проводили кислотный гидролиз полисахаридов. Для этого к 0,1 г (точная навеска) полисахаридов прибавляли 5 мл 10% серной кислоты и растворы помещали в ампулы. Ампулы запаивали и нагревали в сушильном шкафу при температуре 105°С в течение 18 часов. После охлаждения содержимое количественно переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили объем до метки раствором серной кислоты (раствор А). Данный раствор служил для качественного и количественного обнаружения моносахаридов в полисахаридном комплексе.

Качественный анализ полисахаридных комплексов проводили методом бумажной хроматографии [20,37]. Для этого 10 мл раствора А разбавляли 5 мл воды и нейтрализовали сухим бария карбонатом по универсальной индикаторной бумаге. Раствор фильтровали через бумажный фильтр,

промывали водой, и полученный фильтрат упаривали до объема 0,5 мл. Наносили по 0,02 мл на хроматографическую бумагу марки «Ленинградская медленная». Нейтральные сахара хроматографировали восходящим методом в системе ацетон-бутанол-вода (7:2:1). Проявляли анилинфталатом и нагревали в сушильном шкафу при 100-1050С. Моносахара идентифицировали по величине Rf и окраске пятен в сравнении со стандартными образцами сахаров.

Количественное определение нейтральных сахаров в полисахаридном комплексе проводили спектрофотометрически после качественной реакции с пикриновой кислотой в щелочной среде.

10 мл гидролизата (раствор А) нейтрализовали по универсальной индикаторной бумаге 30% раствором натрия гидроксида. Раствор фильтровали через плотный бумажный фильтр. Затем количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем доводили до метки (раствор В). В плоскодонную колбу помещали 1 мл 1% раствора пикриновой кислоты, 3 мл 20% раствора натрия карбоната и 1,6 мл гидролизата (раствор В) и кипятили на водяной бане 10 минут, охлаждали и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 15 мл. Объем доводили до метки (раствор Г). Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 460 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали следующий раствор: 1 мл 1% раствора пикриновой кислоты, 3 мл 20% раствора натрия карбоната, 1 мл воды, нагретый на водяной бане в течение 10 минут и доведенный до 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора глюкозы.

Содержание суммы моносахаридов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D * 0.0005 * V_1 * V_3 * V_5 ** 100}{D_{cc} . * a * V_2 * V_4 * V_6}, где$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

D_{cc}. – оптическая плотность стандартного раствора глюкозы;

a – точная навеска образца ПСК, в г;

V1 – объем раствора А, в мл;

V2 – аликвота из раствора А, в мл;

V3 – объем раствора В, в мл;

V4 – аликвота из раствора В, в мл;

V5 – объем раствора Г, в мл;

V6 – объем стандартного раствора глюкозы, в мл;

0,0005 – концентрация стандартного образца глюкозы в 1 мл.

Стандартный раствор глюкозы: 1 мл стандартного образца глюкозы, 3 мл 20% раствора натрия карбоната, 1 мл 1% раствора пикриновой кислоты, нагретый на водяной бане в течение 10 минут и доведенный до 25 мл.

2.2.10. Каротиноиды

Количественное определение каротиноидов в растительном сборе определяли по методике В.А. Девятнина прямым колориметрированием при длине волны 440 нм [65,84,150].

Для этого 20,0 г (точная навеска) исследуемого сбора помещали в колбу для омыления, прибавляли 95 мл 5% спиртового раствора щелочи и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Затем раствор переносили в делительную воронку, прибавляли 30 мл гексана и несколько миллилитров воды (до разделения слоев). Смесь взбалтывали и отделяли гексановый слой. Извлекали несколько раз до получения бесцветных гексановых вытяжек. Оставшуюся в колбе после омыления массу промывали гексаном, полученные гексановые вытяжки прибавляли к основному раствору.

Гексановый раствор сушили безводным натрий сульфатом при взбалтывании до исчезновения мутности раствора, экстракт фильтровали и сгущали в колбе до 5-10 мл. Сгущенный экстракт пропускали через колонку с алюминия оксидом (III) в мерную колбу объемом 100 мл, доводили до метки гексаном (раствор А).

К 2 мл раствора А прибавляли 2 мл гексана (раствор Б) и колориметрировали раствор Б на приборе КФК-2 МП при длине волны 440 нм.

В качестве раствора сравнения использовали гексан. Концентрацию определяли по калибровочному графику, построенному по раствору калия бихромата, а содержание каротиноидов в сырье (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3 \times 100 \times 100}{m \times V_2 \times (100 - W) \times 1000}, \text{ где}$$

C – концентрация, найденная по калибровочному графику, в %;

m – навеска сбора, в г;

V1 – объем раствора А, в мл;

V2 – аликвота из раствора А, в мл;

V3 – объем раствора Б, в миллилитрах;

W – потеря в массе при высушивании сбора (влажность), в %.

2.2.11. Аскорбиновая кислота

Для количественного определения аскорбиновой кислоты из грубо измельченной аналитической пробы сбора брали навеску массой 20,0 (точная навеска), помещали в фарфоровую ступку, где тщательно растирали, постепенно добавляя 300 мл воды и настаивали, 10 минут. Затем смесь тщательно размешивали и извлечение фильтровали. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносили 1 мл полученного извлечения, 1 мл 2% раствора кислоты хлористоводородной, 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 секунд [37]. Содержание аскорбиновой кислоты в пересчете на абсолютно сухой сбор, в % (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 0,000088 \times 100 \times 100}{m \times 1 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

V – объем раствора 2,6 дихлорфенолиндофенолята натрия, в миллилитрах;

m – масса сырья, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья (влажность), в %;

0,000088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6 дихлорфенолиндофенолята натрия (0,001 моль/л).

2.2.12. Алифатические кислоты

Алифатические кислоты обнаруживали качественными реакциями с 20% р-ром кальция сульфата в присутствии кислоты соляной; ванилином и концентрированной серной кислотой; резорцином в присутствии концентрированной серной кислоты; 0,1 β -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты [69].

2.2.13. Витамин К

Приготовление извлечения: 20,0 г измельченного сбора заливали 100 мл ацетона и экстрагировали на кипящей водяной бане в течение 7 часов. Затем ацетоновый экстракт сливали в сухую колбу, ацетон отгоняли под вакуумом. Остаток в колбе после удаления ацетона растворяли в 20 мл 96% этанола, подвергали многократному очищению, т. е. охлаждению смесью льда с хлоридом натрия и центрифугированию. С полученным очищенным извлечением проводили химические реакции на витамин К.

а) Извлечение наносили на пластинку «Silufol» и хроматографировали восходящим методом в гексане. Детектирование витамина К проводили по свечению в УФ-свете, а затем при нагревании обрабатывали пластину концентрированной серной кислотой, фиксируя изменение окраски пятен [8,70].

б) *Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (2,6-ДХФИФ).* К 0,5 мл извлечения, предварительно разбавленного 1 мл 96% этанола, приливали 1 мл 1% раствора натрия гидроксида, перемешивали и добавляли 0,3 мл раствора 2,6-ДХФИФ, наблюдали характерную окраску [8,70].

в) *Реакция с натрия гидроксидом.* К 0.5 мл извлечения, разбавленного 96% этанолом до 5 мл, добавляли несколько капель 5% раствора натрия гидроксида, наблюдали появление характерного окрашивания [8,70].

г) *Количественное определение витамина К* проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 650 нм после реакции с раствором 2,6-ДХФИФ [8,70]. Сбор измельчали до 0,25 мм и около 20,0 г (точная навеска) и помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 90 мл ацетона и экстрагировали при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр («синяя полоса»). Из фильтрата ацетон отгоняли под вакуумом, остаток растворяли в 95 % этаноле, количественно переносили в мерную колбу емкостью 10 мл раствор доводили до метки этанолом (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 0,5 мл раствора А, прибавляли 1 мл 1 % спиртового раствора натрия гидроксида, 2 мл раствора 2,6-ДХФИФ и доводили полученный окрашенный раствор 95 % этанолом до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор В.

Содержание витамина К в пересчете на абсолютно-сухой сбор в процентах (Х) определяли по калибровочному графику, построенному по раствору метинона с 2,6-ДХФИФ и вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3 \times 100 \times 100}{m \times V_2 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

С – количество витамина К, найденное по калибровочному графику, в г/мл;

V_1 – объем раствора А, в мл;

V_2 – аликвота из раствора А, в мл;

V_3 – объем раствора Б, в мл;

m – масса сбора, в г;

W – потеря в массе при высушивании сбора (влажность), в %.

Приготовление раствора сравнения. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 0,5 мл раствора А, 1 мл 1 % спиртового раствора натрия гидроксида и доводили 95 %этанолом до метки (раствор В). Раствор использовали свежеприготовленным.

2.2.14. Алкалоиды

Для обнаружения алкалоидов 1,0 г измельченного сбора заливали 25 мл. 1% раствора хлористоводородной кислоты и нагревали на кипящей водяной бане 5 минут. Извлечения охлаждали, профильтровывали, с фильтратом проводили реакции с помощью цветных и общесадительных реактивов [38,70].

2.2.15. Химические элементы

Анализируемые пробы сбора высушивали до постоянной массы, а затем проводили сухое озоление. Определение химических элементов в образцах золы проводили нейтронно-активационным анализом (НАА) (пос. Спутник, г. Томск) [43,101]. Этот метод позволяет расширить число определяемых элементов до 29 и обеспечить высокую точность результатов. Зола в течение 12 часов облучали потоком нейтронов при плотности потока $2 \cdot 10^{13}$ нейтрон/(см²·сек). Короткоживущие изотопы измеряли через 7-9 суток (τ изм. – 400 сек.). Долгоживущие - через 25 суток (τ изм. – 1000 сек.). Для определения использовали стандарты: СТ – 1А; СТД – 1А; СТХМ – 3; СТХМ – 4. Стандарты на Zn, Se и Hg готовили индивидуально. Стандартное относительное отклонение представлено выборочно для трех элементов и составляет для Са – 0,04, для Со-0,039, для Вг-0,282. Доверительный интервал для Со, Са, Вг составляет 0,07; 0,11; 0,84 соответственно.

2.2.16. Определение экстрактивных веществ, влажности, золы общей и нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты вели по общепринятым методикам, изложенным в ГФ XI издания [37].

2.3. Методики исследования фармакологической активности

2.3.1. Оценку антимуtagenного действия экстрактов из растений и вариантов сбора проводили методом микроядерного анализа [60,92,174].

Эксперименты проводили на 446 белых беспородных половозрелых мышах – самцах в возрасте 8-12 недель средней массой 18-24 г., полученных из питомника «Рассвет» НПО «Вирион» г. Томска. После перевозки мыши в течение 2-х недель проходили период акклиматизации. Животных содержали в стандартных условиях вивария, при свободном доступе к воде и пище. Распределение животных по сериям эксперимента в зависимости от цели исследования представлено в табл. 5. Для исключения влияния сезонных колебаний на изучаемые показатели основные исследования были выполнены в осенне-зимний период. Забор материала для исследования у мышей осуществляли через 24 часа, на 3 и 5 сутки после введения препаратов. Полученные в опыте данные сравнивали с соответствующими значениями у интактных животных (фон), а также у мышей, подвергавшихся только действию ионизирующего излучения. В качестве индуктора мутагенеза использовали ионизирующую радиацию в дозе 1 Грей (рентгеновская установка РУМ-17). Каплю периферической крови животных помещали на сухое обезжиренное стекло и делали мазок, препараты высушивали на воздухе, фиксировали в абсолютном метиловом спирте в течении 10 минут, после чего окрашивали азур II эозином 40 мин. Препараты промывали водопроводной водой, высушивали и исследовали с использованием масляной иммерсии при увеличении 10*90. Подсчет эритроцитов с микроядрами у каждого животного проводили в расчете на 2000 нормохромных эритроцитов и выражали в промиллях (‰) [60,92]. О наличии антимуtagenного действия экстрактов судили по снижению числа эритроцитов с микроядрами по сравнению с группой облученных животных и фоновым уровнем числа микроядер.

Таблица 5 – Распределение животных по сериям экспериментов

№	Содержание эксперимента	Препарат, режим и доза введения	Сроки исследования (после введения препаратов), сут	Количество животных в группе (n)
1.	Проведение скрининговых исследований предполагаемых антимутагенов среди представителей Флоры Сибири с помощью микроядерного анализа	<i>-интактные животные</i> <i>-облученные</i> в дозе 1 Грей <i>-водные экстракты</i> растений (внутрижелудочно в дозе 50 мг/кг)	1	5
			1	5
			1	164
2.	Исследования по разработке прописи антимутагенного сбора	<i>-интактные животные</i> <i>-облученные</i> в дозе 1 Грей <i>-водные экстракты из вариантов прописи сбора</i> (внутрижелудочно однократно в дозах 25, 50, 100 мг/кг)	1,3,5	5
			1,3,5	5
			1,3,5	72
3.	Изучение влияния вида экстрагента на антимутагенную активность БАВ сбора методом микроядерного анализа	<i>-интактные животные</i> <i>-облученные</i> в дозе 1 Грей <i>-водный и этанольные экстракты</i> из сбора №6 (внутрижелудочно однократно в дозах 25,50,100 мг/кг)	1,3,5	5
			1,3,5	5
			1,3,5	60
4.	Испытание острой токсичности экстракта из антимутагенного сбора	<i>-экспериментальные животные</i> (экстракт на 20% этаноле из сбора внутрижелудочно в дозах 5000 мг/кг, 10000 мг/кг)	1-14	10
5.	Исследование влияние экстракта антимутагенного сбора на кластогенную активность циклофосфана и диоксидина	<i>-интактные животные</i> <i>-циклофосфан</i> (внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг) <i>-диоксидин</i> (внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг) <i>-экстракт</i> сбора (внутрижелудочно в дозах 50, 150, 500 мг/кг)	1,3,5	5
			1,3,5	5
			1,3,5	5
			1,3,5	35
6.	Исследование влияния экстракта сбора на цитогенетические нарушения хромосом, вызванные рентгеновским облучением.	<i>-интактные животные</i> <i>-облученные</i> на рентгеновской установке РУМ-17 в дозе 1 Грей <i>-экстракт сбора</i> (внутрижелудочно в дозе 150 мг/кг)	1-30	10
			1-30	10
			1-30	40
				Итого: 446 мышей

2.3.2. Изучение ДНК-репаративной активности жидкого экстракта

Активность репарационной системы ДНК исследовали с помощью метода сцинтилляционной радиометрии [55,136]. Исследование проводили на культуре клеток лимфоцитов, которые культивировали по общепринятой методике [24,54,55,136,162]. Использовали ФГА фирмы “Difco” США. В качестве референс-мутагена применяли также 4-нитрохинолин-1-оксид (4-НХО, УФ-миметик). В качестве источника УФ-излучения применяли две бактерицидные лампы БУФ-15, расположенные на фиксированном (30 см) расстоянии от объекта. Использовали УФ-излучение (длина волны 254 нм) в дозе 15 Дж/м², мощностью 1,6 Дж/с. 0,1 мл крови в каждом случае делили на три равные части, одну часть облучали УФ 10 сек., вторую - 15 сек., третью часть (контроль) облучению не подвергали. Каждую из этих порций крови по капле распределяли на 3 лунки в иммунологический планшет. В каждую лунку добавляли по 0,2 мл питательной среды 199 с 10% сыворотки крупного рогатого скота и содержащей SH-тимидин (10 мкКюри/мл среды). Клетки инкубировали в термостате 2 часа при температуре 37 С°. После 2-х часовой инкубации пробы фильтровали через миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,2 м и промывали дистиллированной водой (20 мл на пробу), 5%-м раствором трихлоруксусной кислоты (2 мл на пробу) и 96-м этиловым спиртом (1 мл на пробу). В просушенных фильтрах измеряли радиоактивность кислотонерастворимой фракции в импульсах в секунду на сцинтилляционном счётчике Mark (США). Индекс стимуляции определяли по большому среднему значению числа импульсов в облучённых пробах к таковому в контроле [55,136]. В клетках здоровых доноров индекс стимуляции репаративного синтеза ДНК составлял или превышал 2,0 при частичном ингибировании - колебался от 1,3 до 1,9 при глубоком ингибировании - не превышал 1,2 усл.единиц.

2.3.3. Исследование влияния экстракта из сбора на цитогенетические нарушения хромосом

Изучение хромосом проводили при увеличении 10х90, используя микроскоп МБИ-6. Для анализа отбирали метафазы с учетом предложений Н.П.Бочкова [23]. Для идентификации хромосом человека использовалась система классификации хромосом, принятая в 1971 году в Париже и дополненная в 1975 [146]. При анализе кариотипа во всех случаях, на каждый срок и вид эксперимента, а также в контролях использовали группу из 10 особей, у каждого животного изучено не менее 100 метафаз. Из структурных нарушений хромосом учитывались хроматидные и хромосомные разрывы, ацентрические одиночные и парные фрагменты и обмены. Кроме того, учитывались аномалии в числе хромосом: анеуплоидные (гипо- и гиперплоидные) и полиплоидные клетки. Принципы цитогенетического анализа не отличались от общепринятых [27,33,121].

Приготовление препаратов хромосом из клеток костного мозга животных. Хромосомы клеток костного мозга подопытных животных изучали на стадии метафазы. У животных 0,5 мл красного костного мозга из диафизов бедренных костей помещали в пробирки с 18 мл подогретой до 37° среды Игла, 0,3 мл 0,02% раствора гепарина, 2мл сыворотки крупного рогатого скота и колхицином из расчета 1мкг на 1 мл культуральной среды. Смесь выдерживали в термостате 60-80 минут. После центрифугирования производили гипотоническую обработку клеток 0,56% раствором KCl в течение 6-10 минут при 37°C, фиксировали в трех сменах смеси уксусной кислоты и метанола (1:3). Препараты готовили, высушивая каплю взвеси клеток на предметном стекле и окрашивали по Романовскому-Гимза.

2.3.4. Изучение антиоксидантного действия экстракта из сбора

Антиоксидантную активность жидкого экстракта из сбора определяли, используя метод катодной вольтамперометрии, в частности процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O₂). Он обладает рядом преимуществ, но главное – в его основе лежит модельная реакция ЭВ O₂, протекающая на

электроде по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в тканях и клетках организма [73,104,177].

Методика эксперимента заключалась в съемке вольтамперограмм катодного восстановления кислорода с помощью вольтамперометрического анализатора. Электрохимическая ячейка представляла собой стеклянный стаканчик с раствором фонового электролита и опущенными в него индикаторным ртутно-пленочным электродом, хлорид-серебряным электродом сравнения и стеклоуглеродным вспомогательным электродом. В качестве фонового электролита был выбран фосфатный буфер pH 6.86 (5 мл), объем аликвоты образца ($C=0.1$ г/мл) брали 0.02 мл и 0.2 мл. Перемешивание раствора осуществлялось с помощью магнитной мешалки. Предполагается, что антиоксиданты, имеющие восстановительную природу, реагируют с кислородом и его активными радикалами на поверхности индикаторного электрода, что отражается в уменьшении катодного тока ЭВ O_2 на ртутно-пленочном электроде в области потенциалов от 0 до -0.6 В.

В результате работы строились зависимости относительного уменьшения тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в присутствии эффективной концентрации препарата (рис.2).

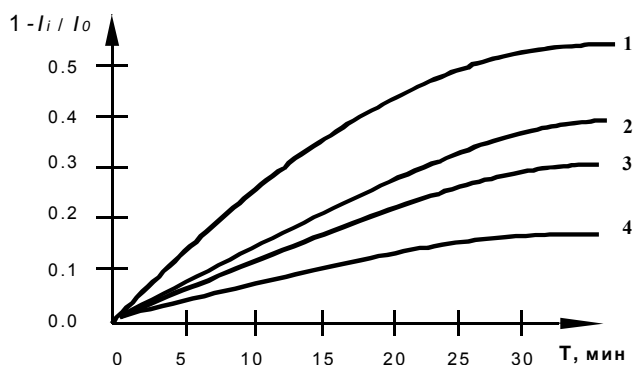


Рисунок 2. — Зависимость относительного изменения тока ЭВ O_2 от времени протекания процесса в присутствии 0.0038 г/мл П-22 (1); 0.0019 г/мл аскорбиновой кислоты (2); 0.0038 г/мл П-18 (3); 0.0038 г/мл П-20 (4); в растворе.

Антиоксидантная активность исследуемого препарата оценивалась по кинетическому критерию антиоксидантной активности K (мкмоль/л·мин),

который отражает количество прореагировавших с образцом кислородных форм, следствием чего является эффективность взаимодействия образца с кислородными радикалами и определяется по формуле:

$$K = \frac{C_{O_2}}{T} \left(1 - \frac{I_i}{I_{нач}} \right),$$

где C_{O_2} – концентрация кислорода в исходном растворе без вещества, мкмоль/л;

I_i – текущее значение предельного тока ЭВ O_2 , мкА;

$I_{нач}$ – значение предельного тока ЭВ O_2 в отсутствии вещества в растворе, мкА; T – время протекания процесса, мин.

2.4. Методики морфологических и микроскопических исследований сбора

Морфологические признаки сбора диагностировали под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (увеличения 8x1; 8x2; 8x4) по известным методикам [37,48].

Микроскопические признаки сбора установлены на основании анатомического исследования корней одуванчика, цветков календулы; листьев крапивы двудомной; травы хвоща полевого, семян льна. Для этого были приготовлены плоскостные препараты [22,37,48,53,90,113]. Для получения объективных результатов анализировали не менее десяти препаратов. Готовые препараты изучали под микроскопом МИКМЕД – 1 (увеличения 7x1,5x8; 7x1,5x40). Фотографировали фотоаппаратом «Зенит» с помощью фотонасадки МФН-3 и цифровым фотоаппаратом «Canon». Негативы сканировали, затем обрабатывали на компьютере в программе «Adobe Photoshop 7.0».

Минеральную природу кристаллоносной обкладки из призматических кристаллов и цистолитов доказали воздействием на препарат концентрированной серной кислоты. Крахмальные зерна обнаруживали гистохимической реакцией с использованием реактива Люголя. Наличие

кутикулы доказывали проведением реакции с Суданом III [90]. Наличие слизи доказывали с помощью реактива туши, присутствие инулина обнаруживали с α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты.

Для проведения статистической обработки фактического материала использовался статистический пакет Statistica 6.0. Фактические данные представлены в виде «среднее $\pm$ ошибка среднего» ($M \pm m$), кроме того, при микроядерном анализе рассчитывались доверительные интервалы для средних значений числа микроядер. Проверку на нормальность распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. Так как все изучаемые показатели подчинялись нормальному закону распределения, применялся параметрический t -критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

ГЛАВА 3

Поиск перспективных антимуtagenных веществ среди некоторых представителей флоры Сибири

В последнее время значительно возрос интерес к проблеме антимуtagенеза и интенсифицировались исследования в данной области. В связи с этим одной из важных задач генетиков стало поиск и разработка методов, с помощью которых возможно достаточно четко и быстро определить муtagенность и канцерогенность как вновь синтезируемых соединений, так и веществ, широко применяемых в быту, промышленности, сельском хозяйстве и медицине с тем, чтобы обезопасить человека от возможного контакта с источниками муtagаций [54,92,138].

В этом аспекте нашел широкое применение микроядерный тест: он используется для оценки действия загрязнителей среды на живые организмы и для выявления цитогенетических аномалий в соматических клетках лиц, подвергшихся воздействию различных агентов или ионизирующей радиации, а также подвергнутых медикаментозному лечению, вакцинации или больных инфекционными заболеваниями [60,92].

Микроядерный тест на лабораторных животных является одним из наиболее практичных кратковременных цитогенетических тестов, и хотя объектом для микроядерного анализа служат самые разнообразные представители животного мира, большая часть исследований выполнена на мышах. Анализ микроядер представляет значительный интерес, так как он сравнительно прост и достаточно недорог. Кроме указанных, к его преимуществам следует отнести быстроту выполнения и независимость кариотипа исследуемого вида, содержащего иногда большое количество мелких плохо различимых хромосом: кроме того, тестирование можно проводить в тканях с низкой митотической активностью. Поэтому, в настоящее время, микроядерный анализ широко используется для скрининга и мониторинга муtagенов самой различной природы, а также в исследованиях антимуtagенеза [92,138,174].

Таким образом, для проведения направленного поиска растений с антимуtagenной активностью нами был использован метод микроядерного анализа (раздел 2.2.2). Выполняя поставленную выше задачу и используя указанный метод, на антимуtagenную активность были изучены суммарные комплексы (водные экстракты) полученные из сырья, характеристика которого приведена в таблице 6. Как видно из представленных в таблице сведений в качестве объектов были использованы лекарственные и пищевые растения, а также растения, использующиеся в народной медицине. Необходимо отметить, что среди представленных в таблице 6 видов встречаются растения, для БАВ которых, ранее уже была установлена антимуtagenная активность. Среди них донник лекарственный, чеснок, лук репчатый, календула лекарственная, крапива двудомная, облепиха крушиновидная, лопух войлочный.

Следует добавить, что отбор компонентов для скрининга проводили, учитывая сведения о составе биологически активных веществ растений и практику их применения в народной медицине в качестве противораковых средств. Кроме того, серьезный аргумент при выборе объекта накладывал ресурсный фактор, так как в современных условиях доступность сырья, наряду с фармакологическими свойствами его БАВ, в конечном итоге, определяют спрос на предлагаемый препарат или биологически активную добавку. С указанной точки зрения наше внимание привлекали, прежде всего, растения широко распространенные в Сибири или успешно культивируемые.

В качестве сырья для приготовления водных экстрактов использовали надземные (листья, трава, плоды) и подземные (корни и корневища) органы 41 лекарственного растения (табл. 6), собранного в регионах Сибири (Томская, Новосибирская области, Алтайский, Красноярский края, Республика Хакасия). В результате, нами в работе исследовано антимуtagenное действие водных экстрактов 41 растения по отношению к мутагену – ионизирующей радиации. Высушенное сырье измельчали на гомогенизаторе и просеивали через сито. Экстракцию проводили согласно ГФ СССР (Государственной Фармакопее СССР) 11 издания. (1989) [37]. Экстракты готовили *ex tempore* и вводили из

Таблица 6 – Краткая химико-фармакологическая характеристика объектов исследования [18,37,49,70,83,95,110,118,119,133].

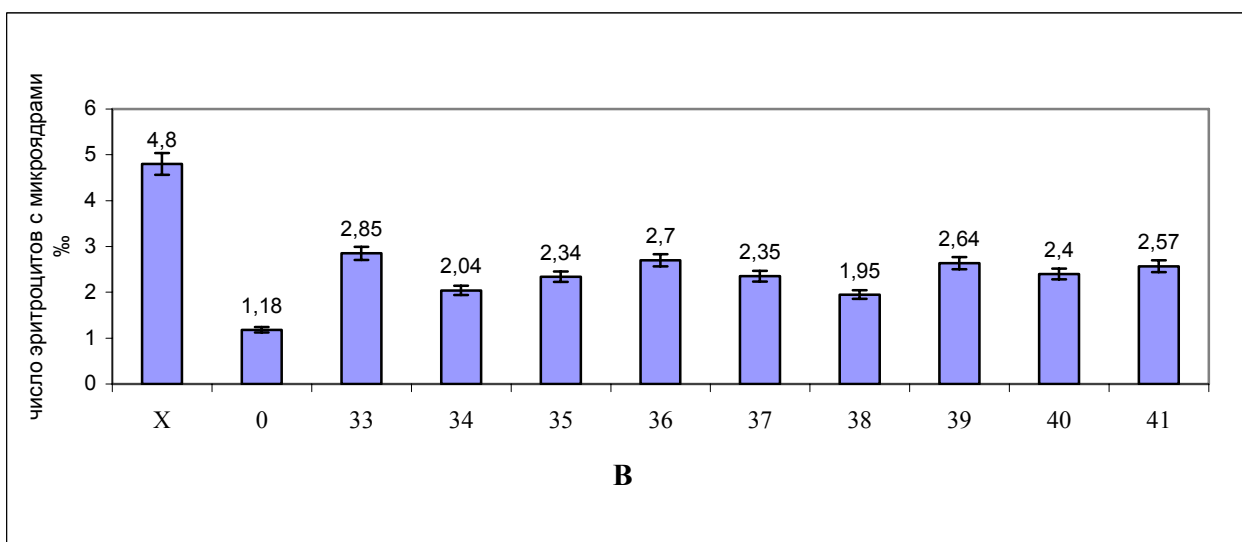
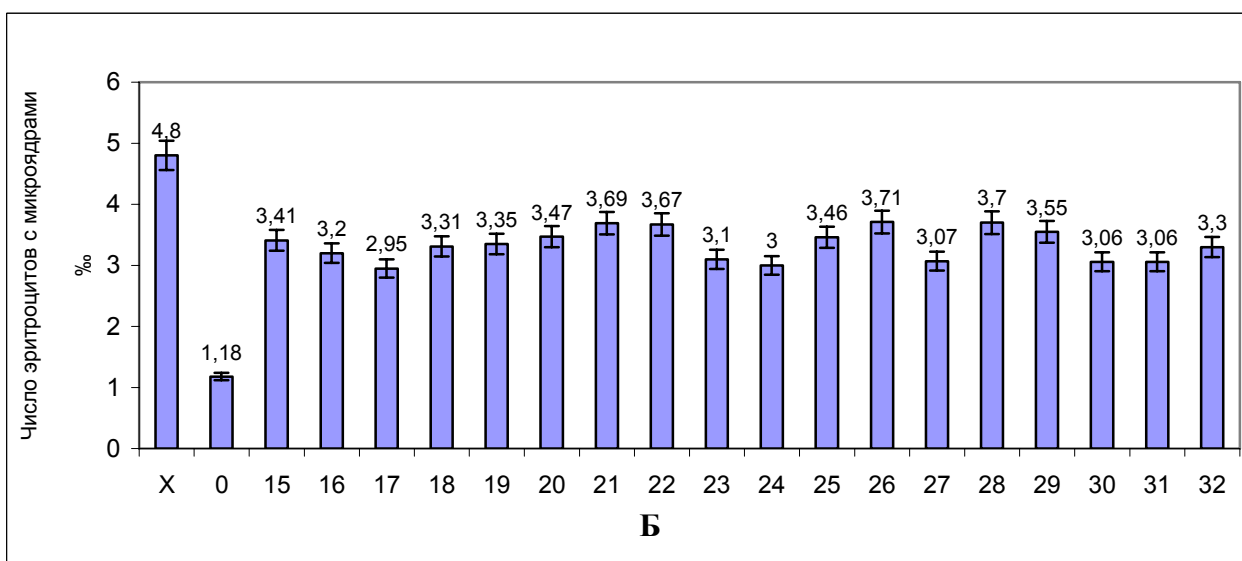
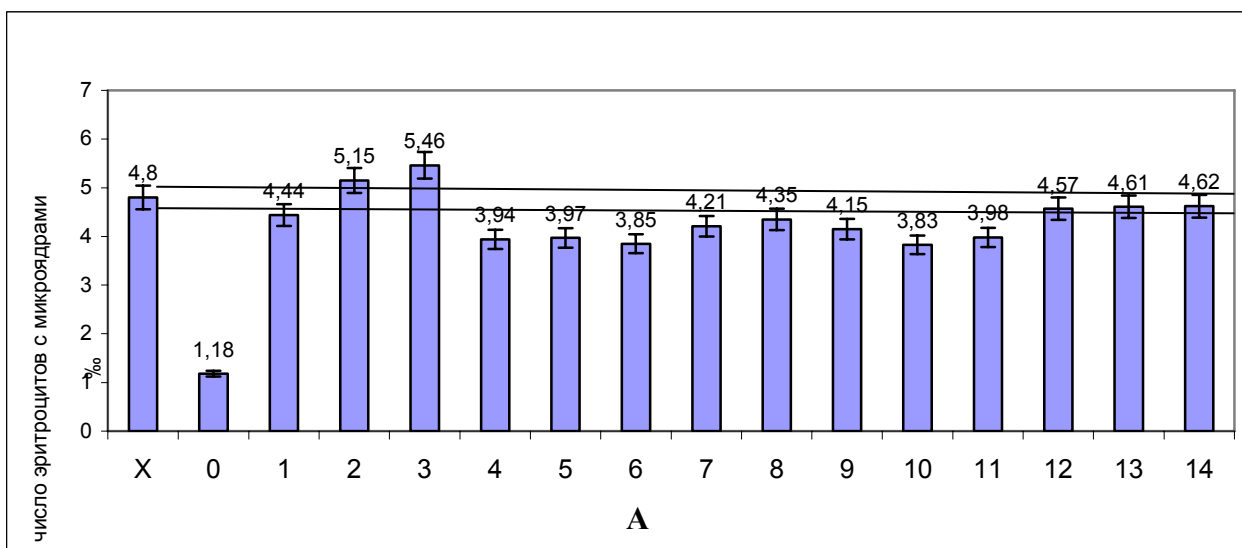
№	Название растения	Химический состав	Исследуемое сырье	Фармакологические свойства	Применение в медицине
1	Боярышник кроваво-красный – <i>Crataegus sanguinea</i> Pall. сем. – Rosaceae	флавоноиды, эфирные масла, тритерпеновые соединения	плоды	сердечно-сосудистое средство	при стенокардии, кардиосклерозе
2	Серпуха венценосная – <i>Serratula coronata</i> L., сем - Asteraceae	флавоноиды, тритерпеновые соединения	трава	противовоспалительное, антимикробное	при ангине, гепатите
3	Хвощ луговой – <i>Equisetum pratense</i> сем. Equisetaceae	сапонины, алкалоиды, флавоноиды	трава	мочегонное противомикробное	при воспалительных заболеваниях мочевыводящих путей
4	Хвощ зимующий – <i>Equisetum hiemale</i> сем. Equisetaceae	сапонины, алкалоиды, флавоноиды	трава	мочегонное противомикробное	при воспалительных заболеваниях мочевыводящих путей
5	Чистотел большой – <i>Chelidonium majus</i> L., сем. Papaveraceae	алкалоиды, витамин С, каротиноиды	трава	бактерицидное и фунгицидное, противовоспалительное	при раке кожи, экземе, псориазе, заболеваниях печени.
6	Чага (Трутовик косо́й) - <i>Inonotus obliquus</i> (Fr.) Pil. сем. – Hymenochaetaceae.	полифенолкарбонный комплекс	гриб	симптоматическое, противоопухолевое	при злокачественных новообразованиях
7	Лабазник шестилепестный – <i>Filipendula hexapetala</i> Gilib. сем. Rosaceae	витамин С, каротиноиды	трава	противовоспалительное, противоопухолевое	при злокачественных новообразованиях, ревматизме
8	Можжевельник обыкновенный – <i>Juniperus communis</i> L., сем. Cupressaceae	эфирные масла, органические кислоты	плоды	мочегонный, отхаркивающий эффекты	при цистите, рините
9	Зверобой продырявленный – <i>Hypericum perforatum</i> L., сем. Hypericaceae	антраценпроизводные, смолы, флавоноиды	трава	антисептическое, антибактериальное, вяжущее	при экземе, язвенной болезни
10	Калина обыкновенная – <i>Viburnum opulus</i> L., сем. Caprifoliaceae	витамины К, С дубильные вещества,	плоды	кровоостанавливающее, потогонное, противовоспалительное	в гинекологической практике, как противовоспалительное средство
11	Рябина черноплодная - <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliot. сем – Rosaceae	флавоноиды (рутин, кверцетин), витамин С, РР, каротиноиды	плоды	поливитаминное, гипотоническое	при авитаминозах, гипертонической болезни

12	Шиповник майский – <i>Rosa majalis</i> Herrm. сем. Rosaceae	витамин С, каротиноиды, пектины	плоды	поливитаминное средство	при авитаминозах, холангите
13	Клюква болотная - <i>Oxycoccus palustris</i> Pers. сем. Vacciniaceae	флавоноиды, пектины, витамин С, органические кислоты	плоды	жаропонижающее, антиоксическое, противовоспалительное	при гриппе, цистите, пиелонефрите
14	Хвощ болотный – <i>Equisetum palustre</i> сем. Equisetaceae	сапонины, алкалоиды, флавоноиды	травы	мочегонное противомикробное	при воспалительных заболеваниях мочевыводящих путей
15	Аир болотный – <i>Acorus calamus</i> L., сем. Araceae	эфирные масла, горечи, витамин С	корневище	противоязвенное, спазмолитическое, желчегонное	при язвенной болезни, гриппе, желчекаменной болезни, для возбуждения аппетита
16	Багульник болотный – <i>Ledum palustre</i> L., сем. Ericaceae	эфирные масла	побеги	отхаркивающее, бактерицидное,	при гриппе, ангине
17	Донник лекарственный - <i>Melilotus</i> <i>officinalis</i> Desr. Сем. Fabaceae	кумарины	травы	антибактериальное, противовоспалительное	наружно – как противовоспалительное средство
18	Лихнис халцедонский – <i>Lichnis</i> <i>chalcidonica</i> L. сем.	экдистероиды, сапонины, флавоноиды	травы	гемореологическое	при тромбофлебите
19	Лопух войлочный - <i>Arctium tomentosum</i> Mill. сем. Asteraceae	дубильные вещества, горечи, эфирные масла	корень	антибактериальное, противоопухолевое	при раке кожи, экземе
20	Мята перечная – <i>Mentha piperita</i> L., сем. Lamiaceae	эфирные масла, каротиноиды	листья	спазмолитическое, желчегонное	при гипертонии, гепатите, запорах
21	Облепиха крушиновидная - <i>Hippophae</i> <i>rhamnoides</i> L., сем - Eleagnaceae	каротиноиды, токоферолы, витамины С,Р, флавоноиды	плоды	болеутоляющее	при язвенной болезни, наружно – для лечения лучевых повреждений кожи, ожогов
22	Пижма обыкновенная - <i>Tanacetum</i> <i>vulgare</i> L., сем. Asteraceae	эфирное масло, флавоноиды, горечи	цветки	противоглистное, желчегонное, бактерицидное	при кольпите, холецистите, глистных инвазиях
23	Подорожник большой – <i>Plantago major</i> L., сем. Plantaginaceae	слизь, каротин, витамин К	листья	отхаркивающее, противомикробное	при анацидных гастритах, кольпите, пневмонии
24	Полынь горькая – <i>Artemisia absinthium</i> L., сем. Asteraceae	эфирные масла, горькое вещество — абсинтин	травы	возбуждающее аппетит, желчегонное	горечь – средство для возбуждения аппетита
25	Рябина обыкновенная – <i>Sorbus aucuparia</i> L., сем. Rosaceae	каротиноиды, витамины С,Р,В, флавоноиды	плоды	поливитаминное, гипогликемическое	при авитаминозе, ожирении, диабете
26	Ряска малая – <i>Lemna minor</i> L., сем. Lemnaceae	белки, аминокислоты, витамины А, В, С	травы	жаропонижающее, антибактериальное, десенсибилизирующее	при диатезе, аллергическом рините, геморрое
27	Сушеница топяная – <i>Gnaphalium uliginosum</i> L.s.l., сем. Asteraceae	каротиноиды, флавоноиды, эфирные масла	травы	антибактериальное, противоязвенное	при дерматите, язвенной болезни желудка, дуодените

28	Тмин обыкновенный – <i>Carum carvi</i> L., сем. <i>Ariaceae</i>	эфирные масла, флавоноиды	плоды	желчегонное, повышающее секрецию желудочного сока	при атонии, метеоризме, дуодените, запорах
29	Тысячелистник обыкновенный - <i>Achillea millefolium</i> L. сем. <i>Asteraceae</i>	эфирное масло, витамин К, флавоноиды	травы	бактерицидное, противовоспалительное, желчегонное	при гипертонии, гастрите, диатезе
30	Хвощ полевой <i>Equisetum arvense</i> L. Сем. <i>Equisetaceae</i>	алкалоиды сапонины, флавоноиды	травы	мочегонное противомикробное	при почечной недостаточности, простатите, ревматизме
31	Черника обыкновенная – <i>Vaccinium myrtillus</i> L., сем. <i>Vaccinaceae</i>	дубильные вещества, фенольные соединения, антоцианы	плоды	вяжущее, антисептическое, противовоспалительное	при пиелонефрите, диарее
32	Чеснок - <i>Allium sativum</i> . сем. <i>Liliaceae</i> .	эфирное масло, витамин С	луковица	противомикробное, противовоспалительное	при простудных заболеваниях
33	Валериана лекарственная - <i>Valeriana officinalis</i> L.; сем. <i>Valerianaceae</i> .	валепотриаты аминокислоты, эфирные масла	корневище с корнями	успокоительное, противовоспалительное действия	при гипертонии, дуодените, климактерическом синдроме
34	Календула лекарственная <i>Calendula officinalis</i> L., сем. <i>Asteraceae</i>	каротиноиды, сапонины дубильные вещества	цветки	антисептическое, противовоспалительное	при ангине, язве желудка, ожогах
35	Крапива двудомная <i>Urtica dioica</i> L., сем. <i>Urticaceae</i>	витамины С и К, хлорофилл, каротиноиды, флавоноиды	листья	обладает гемостатическим, противовоспалительным действием	при маточных, желудочных, геморроидальных кровотечениях, авитаминозах
36	Лен обыкновенный - <i>Linum usitatissimum</i> L. Сем. - <i>Linaceae</i>	слизь, жирное масло витамин А	семена	обволакивающее, желчегонное действие	при фарингите, кольпите, гастрите
37	Лук репчатый – <i>Allium cepa</i> L., сем. <i>Liliaceae</i>	витамины С, каротин, эфирные масла	луковица	противомикробное, гипогликемическое	при гриппе, диабете, рините
38	Одуванчик лекарственный <i>Taraxacum officinale</i> Wigg., сем. <i>Asteraceae</i>	полисахариды, флавоноиды	корень	желчегонное, мочегонное, отхаркивающее, антиаллергическое,	при холецистите, для возбуждения аппетита
39	Подорожник ланцетный – <i>Plantago lanceolata</i> ., сем. <i>Plantaginaceae</i>	слизь, каротин, витамин К	листья	отхаркивающее, противомикробное	при пневмонии, кольпите
40	Подорожник средний – <i>Plantago media</i> ., сем. <i>Plantaginaceae</i>	слизь, каротин, витамин К	листья	отхаркивающее, противомикробное	при пневмонии, кольпите
41	Хвощ лесной – <i>Equisetum sylvaticum</i> сем. <i>Equisetaceae</i>	сапонины, алкалоиды, флавоноиды	травы	мочегонное, противомикробное	при почечной недостаточности

расчета суховоздушной массы внутрижелудочно в дозе 50 мг/кг массы мыши в объеме растворителя 25 мл/кг. Затем животных облучали на рентгеновской установке РУМ – 17 (рентгеновская установка медицинская) в дозе 1Грей на рентгене научно-исследовательского института биологии и биофизики Томского Государственного Университета (Томск). Забор крови и приготовление мазков проводили как указано в параграфе 2.3.1.

Как видно из результатов представленных на рисунке 3 экстракты проявили разные уровни антимуtagenной активности. По данному признаку, их можно условно разделить на три группы. К первой группе отнесены экстракты с низким уровнем активности, которые снижали число микроядер в эритроцитах до 3,83‰ ($p < 0,05$), либо даже несколько увеличили их количество. В числе указанных источников сырья такие виды как – боярышник кроваво-красный, зверобой продырявленный, калина обыкновенная, клюква болотная, лабазник шестилепестной, можжевельник обыкновенный, рябина черноплодная, серпуха венценосная, хвощи болотный, зимующий, луговой, чага, чистотел большой, шиповник майский. Экстракты второй группы, проявили более высокую активность, и снизили количество микроядер в эритроцитах в пределах до 2,95‰ ($p < 0,05$), что дает предпосылки для их дальнейшего изучения. Такую активность проявили суммарные комплексы, полученные из сырья следующих видов: аир болотный, багульник болотный, донник лекарственный, лихнис халцедонский, лопух войлочный, мята перечная, облепиха крушиновидная, пижма обыкновенная, подорожник большой, полынь горькая, рябина обыкновенная, ряска малая, сушеница топяная, тмин обыкновенный, тысячелистник обыкновенный, хвощ полевой, черника обыкновенная, чеснок. Наиболее выраженные антимуtagenные свойства были установлены нами для экстрактов таких известных растений как: валериана лекарственная, календула лекарственная, крапива двудомная, лён обыкновенный, лук репчатый, одуванчик лекарственный, подорожник ланцетный, подорожник средний, хвощ



Примечание: А - группа растений с низкой антимутагенной активностью, Б - со средним уровнем активности, В- с выраженным уровнем активности. Цифрами по оси абсцисс обозначены растения, приведенные в табл.6. X – число эритроцитов с микроядрами у облученных мышей, 0 – интактные животные.

Рисунок 3 - Число эритроцитов с микроядрами (%) у облученных мышей на фоне введения экстрактов растений

лесной. Именно эффективность биологически активных комплексов растений последней группы послужила в дальнейшем основанием для составления на их основе сборов. При подборе компонентов сбора учитывалась также способность биологически активных веществ (БАВ) растений влиять на основные звенья мутационного процесса (рис. 1).

Скрининговые исследования выполненные с целью поиска перспективных в антимутагенном отношении объектов показали, что практически все из условно выбранных растений широко распространенных во флоре Сибири или культивирующиеся в данном регионе обладают антимутагенным действием.

Однако следует отметить, что степень указанной активности проявляется у них на разном уровне. В числе наиболее активных в антимутагенном отношении оказались водные экстракты таких известных растений как календула лекарственная, крапива двудомная, лён обыкновенный, лук репчатый, одуванчик лекарственный и др., которые снизили число эритроцитов с микроядрами в крови мышей, подвергнутых рентгеновскому облучению, в пределах от 2,85 до 1,95‰ (в контроле – 4,80‰). Несколько ниже антимутагенный эффект у суммарных комплексов из аира болотного, багульника болотного, донника лекарственного, лихниса халцедонского, лопуха войлочного и др., которые уменьшили число микроядер до 2,95‰. Низкий уровень антимутагенной активности отмечен для боярышника кроваво-красного, зверобоя продырявленного, калины обыкновенной, клюквы болотной, лабазника шестилепестного и др. (снижали количество микроядер в пределах до 3,83‰. Некоторое увеличение содержания эритроцитов с микроядрами, наблюдаемое при использовании экстрактов хвоща лугового и серпухи венценосной можно связать с возможной комутагенностью БАВ из указанных объектов.

Данные исследований на мышах с несомненностью свидетельствуют о наличии антимутагенной активности у некоторых экстрактов лекарственных

растений. Известно, что повреждающее действие ионизирующей радиации особенно интенсивно в определенные периоды клеточного цикла. Радиация способна вызвать потенциальные нарушения нити ДНК в период предсинтетический и синтетический, когда хромосомы являются однохроматидными или происходит образование второй хроматиды. В связи с этим возникает закономерное предположение, что анализируемые экстракты могут влиять как на процесс образования aberrаций хромосом, так и на ДНК-репаративные процессы.

Все это дает основание для разработки на основе изученных экстрактов лекарственных растительных средств и препаратов с антимуtagenной активностью, которые могут использоваться в практической деятельности, например в случаях терапевтического облучения пациента с лечебной и диагностическими целями, а также на производстве связанном с необходимостью находиться в условиях повышенного радиоактивного фона.

Глава 4

Разработка лекарственного растительного сбора антимутагенного действия

4.1. Обоснование компонентного состава сбора

На основании скринингового исследования растительных экстрактов на предмет антимутагенной активности, в результате изучения литературных источников, и учитывая потребность в недорогих отечественных препаратах обладающих комплексным антимутагенным действием, нами был разработан растительный сбор. Для этой цели были отобраны объекты лекарственного растительного сырья: корни одуванчика, цветки календулы, листья крапивы, трава хвоща полевого и семена льна. При подборе компонентов учитывали способность биологически активных веществ растений влиять на основные звенья мутационного процесса [18,49,56,109]. Ниже приведена информация, характеризующая с точки зрения антимутагенного действия каждый из пяти выбранных видов лекарственных растений, включенных в состав сбора.

Корни одуванчика лекарственного выбраны из-за способности его биологически активных веществ оказывать целенаправленное действие на мутагенез (рис.1), а также исходя из практики применения данного растения в народной медицине при раковых опухолях различной локализации [16,49,97,110]. В экспериментах на мышах с перевиваемыми опухолями показана возможность повышения эффективности цитостатического и хирургического методов лечения с помощью суммарного экстракта из одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg) [29]. В ряде случаев отмечено самостоятельное ингибирующее действие этого экстракта на опухоль и метастазы. Важным является также свойство экстракта одуванчика ослаблять токсический эффект циклофосфана на клетки красной крови [29].

Основные фармакологические эффекты одуванчика лекарственного можно связать с наличием в его составе таких групп биологически активных веществ как полисахариды, флавоноиды, сапонины, фенолкарбоновые кислоты, горечи гликозидного характера (тараксацин и тараксацерин), инулин, каучук, жирное

масло, состоящее из глицеридов пальмитиновой, олеиновой, линолевой, мелиссовой и церотиновой кислот [16,29,37,95,133]. В плане коррекции мутаций наибольший интерес представляют первые две группы БАВ (полисахариды и флавоноиды). Так полисахариды одуванчика, согласно данным литературы, способны препятствовать проникновению мутагена или его предшественников в организм и внутрь клетки, кроме того они участвуют в выведении ксенобиотиков из организма [49,151]. Флавоноиды, как следует из обзора литературы, проявляют себя как антиоксиданты и нарушают связывание активных форм мутагенов с ДНК.

Цветки ноготков лекарственных в состав сбора были выбраны по результатам скрининга, а также как концентраторы весьма важных групп биологически активных веществ-антимутагенов, и прежде всего каротиноидов, которые являются основными действующими веществами растения (до 3%). Помимо каротина в ноготках содержится ликопин и кислородные производные каротина – виолаксантин, цитраксантин, рубиксантин и флавоксантин [49,83,95,110,133]. Как следует из вышеприведенного обзора литературы, одним из механизмов антимутагенного действия каротиноидов и витамина А является нарушение метаболической активации мутагенов путем конкуренции с цитохромом Р-450. Другим возможным механизмом антимутагенного действия каротиноидов календулы является их способность обрывать цепную реакцию окисления, нейтрализовывать свободные радикалы – антиоксидантный эффект [6,45,151,160,154].

Другая активная в указанном отношении группа БАВ содержащаяся в цветках календулы – сапонины. Рядом исследований установлено, что тритерпеновые сапонины интенсивно угнетают метаболизм проканцерогенов. Сапонины календулы оказались сильным ингибитором мутагенеза в тесте Эймса под действием мочи курильщиков [151,159]. Помимо каротиноидов и сапонинов соцветия ноготков содержат флавоноиды, некоторое количество дубильных веществ, аскорбиновую кислоту, следы эфирного масла (до 0,12%), смолы,

горькое вещество календен (до 19%) и органические кислоты, в том числе яблочную и следы салициловой кислоты [83,95,110].

В старинных источниках встречаются сведения о том, что толченые листья и цветки ноготков использовали: наружно — для уничтожения бородавок и мозолей, внутрь — при раке (особенно молочной железы и женской половой сферы) [16,160]. Выдающийся русский врач-фармаколог А. П. Нелюбин писал в 1852 г. в своей «Фармакографии», что календула — это «целебное средство, одаренное особенною врачевною силою». Под действием препаратов календулы у больных раком желудка наблюдаются уменьшение интоксикации, устранение диспепсических явлений, отрыжки, тошноты, рвоты, чувства тяжести в подложечной области, улучшение аппетита и сна [16].

Выбор *листьев крапивы двудомной* связан, главным образом, с содержанием в ней витаминов (аскорбиновой кислоты, каротиноидов и витамина К), хлорофилла и солей железа, которые нормализуют в организме человека липидный обмен, оказывают стимулирующее действие на эритропоэз, а также снижают повреждающее действие мутагенов различных классов [37,83,95,120]. Кроме того, БАВ листьев крапивы обладают желчегонным и противовоспалительным действием, повышают процессы регенерации слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, а содержащийся в значительном количестве в листьях крапивы хлорофилл оказывает стимулирующее и тонизирующее действие. Он усиливает основной обмен веществ, а также повышает перистальтику кишечника, улучшает деятельность сердечно-сосудистой системы и дыхательного центра, стимулирует грануляцию и эпителизацию пораженных тканей [82,83,95,133]. Хлорофилл и его водорастворимый дериват хлорофиллин обладают выраженной способностью блокировать активацию промутагенов ферментами микросом, действовать как дисмутагены образуя неактивные комплексы с мутагенами, они способны также нейтрализовывать свободные радикалы. Натриевая соль хлорофиллина значительно уменьшает морфологическую трансформацию клеток в культуре под действием ряда канцерогенов, не влияя при этом на рост самих клеток [151].

Трава хвоща полевого, также является одним из компонентов сбора и содержит до 5 % тритерпенового сапонины эквизетонина, структура которого пока не установлена. Другой группой биологически активных веществ указанного сырья являются алкалоиды: никотин, эквизетин (пальострин) и 3-метоксипиридин, присутствующие в хвоще в незначительных количествах. Содержатся в нем также флавоноидные соединения, в том числе свойственный хвощам эквизетрин, представляющий собой дисахарид флавонола кемпферола. Характерной составной частью хвоща является кремниевая кислота, содержание которой может достигать 25 %. [70,83,110].

Из перечисленных БАВ травы хвоща полевого, прежде всего, следует обратить внимание на группу сапонинов и флавоноидов так как согласно сведениям литературных источников [130,151] тритерпеновые сапонины интенсивно угнетают метаболизм проканцерогенов. Что же касается флавоноидов, то они проявляют себя как антиоксиданты, синергичные с аскорбиновой кислотой. Они способны связывать тяжелые металлы, угнетать перекисное окисление липидов, блокировать связывание активных форм мутагенов с ДНК и угнетать свободнорадикальные реакции [18,77,151].

Препараты хвоща полевого обладают широким спектром фармакологических свойств, в том числе мочегонным, дезинфицирующим, противовоспалительным и кровоостанавливающим [70,83,133].

Семена льна посевного (обыкновенного) в состав сбора включены по результатам скрининга, а также исходя из сведений литературы, свидетельствующих о возможном дисмутагенном действии БАВ семян льна [151].

В семенах содержатся слизь (до 12 %); жирное масло (до 48 %); белковые вещества (до 33 %). При гидролизе слизи образуются галактоза, галактуроновая кислота, ксилоза, арабиноза и рамноза. За счет наличия большого количества слизи семена обладают обволакивающим, легким слабительным и противовоспалительным действием, поэтому показаны при болезнях желудочно-кишечного тракта. Слизь препятствует всасыванию из кишечника

ядовитых веществ, образующихся при инфекционных заболеваниях и отравлениях, кроме того, имеются данные, говорящие о дисмутагенном действии слизи [49,95,110]. Немаловажная роль в фармакологическом действии семян льна принадлежит витаминам А (каротин) и Е (токоферол), вносящим вклад в их антимуtagenное действие [6,18,45].

В народной медицине отвар семян льна рекомендуют при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, язвенной болезни желудка, воспалении дыхательных и мочевыводящих путей, почечных коликах. Кашицу из измельченных семян, разведенных горячей водой, прикладывают к воспаленным участкам кожи и фурункулам. Льняное масло, смешанное в равных частях с известковой водой, используют при различных ожогах. В литовской народной медицине, как и другие слизистые отвары растений, применяется при раковых опухолях ЖКТ и при раздражении слизистой кишечника [16,95,133].

Таким образом, результаты скрининга на антимуtagenную активность перечисленных выше растений и данные литературы позволили нам обосновать целесообразность их использования в составе антимуtagenного сбора. При этом следует еще раз подчеркнуть, что состав БАВ выбранных растений является достаточно изученным и позволяет обеспечить комплексное антимуtagenное действие на все звенья мутагенеза (рис. 4).

Составлению прописи сбора, т.е. подбору количественного соотношения его компонентов посвящен следующий раздел диссертационной работы.

4.1.1 Разработка вариантов прописи сбора

Известно, что кроме формирования обоснованного компонентного состава лекарственного растительного сбора требуется и разработка рационального количественного соотношения его компонентов.

С этой целью на следующем этапе исследований было составлено шесть вариантов прописи сбора, которые отличались количественным соотношением каждого из пяти компонентов по отношению друг к другу.



Рисунок 4 – Химический состав компонентов сбора

Варианты количественного соотношения компонентов сбора представлены в таблице 7. Для каждого из 6 вариантов указанного сбора определялась антимуtagenная активность. Исследование проводили методом микроядерного анализа (п.п.2.3.1). Для оценки динамики проявлений фармакологических эффектов забор крови у животных проводили не однократно, как на этапе скрининга, а трижды – на первые, третьи и пятые сутки.

Таблица 7 – Количественное соотношение компонентов антимуtagenного сбора

Лекарственное растительное сырье	Массовых частей сырья					
	вариант №1	вариант №2	вариант №3	вариант №4	вариант №5	вариант №6
Цветки ноготков	5	1	2	3	4	1
Корни одуванчика	4	5	1	2	3	1
Листья крапивы	3	4	5	1	2	1
Трава хвоща полевого	2	3	4	5	1	1
Семена льна	1	2	3	4	5	1

Результаты испытаний представлены в таблице 8, из которой видно, что облучение мышей ионизирующей радиацией в дозе 1 Грей вызывает достоверное повышение числа эритроцитов с микроядрами в периферической крови в первый день после облучения до 4,96% ($p<0,05$), в дальнейшем, на пятые сутки после воздействия мутагена, данный показатель снижается до 4,00% ($p<0,05$). На этом фоне введение водных экстрактов перед облучением приводило к уменьшению числа микроядер в пределах от 3,76 (в контроле 4,96) до 1,8 % (в контроле 4,30) ($p<0,05$). Наиболее активным в результате эксперимента можно считать вариант № 6 в дозе 50 мг/кг, снизивший в первый день после облучения количество микроядер до 1,82% ($p<0,05$). На третьи и пятые сутки снижение числа микроядер, под влиянием водного экстракта из варианта №6 составляло до 1,80 и 1,92% ($p<0,05$) соответственно. Близкий

уровень антимутагенной активности был установлен для варианта №1 в дозе 100 мг/кг, чье действие более выражено на ранних сроках эксперимента.

Таблица 8 – Влияние экстрактов из вариантов сбора на число эритроцитов с микроядрами в крови мышей ($M \pm m$, средние из 5 определений)

Экспериментальные группы	Доза (мг/кг)	Число эритроцитов с микроядрами ‰		
		1 сутки	3 сутки	5 сутки
Экстракт из варианта №1+облучение	25	2,56±0,7*	2,62±0,5**	2,4±0,3*
	50	2,44±0,1*	2,46±0,2*	2,6±0,5**
	100	2,4±0,1*	2,6±0,3*	2,0±0,2*
Экстракт из варианта №2+облучение	25	2,78±0,1*	2,86±0,5*	2,98±0,4*
	50	2,52±0,2*	3,0±0,2*	3,4±0,1*
	100	3,26±0,1*	2,5±0,5*	2,8±0,2*
Экстракт из варианта №3+облучение	25	3,76±0,8*	3,52±0,6**	2,82±0,4*
	50	3,4±0,2*	2,9±0,5*	2,8±0,3*
	100	3,5±0,1*	3,4±0,3*	2,8±0,5*
Экстракт из варианта №4+облучение	25	3,04±0,7*	3,24±0,3*	2,84±0,6*
	50	2,74±0,3*	3,0±0,1*	2,5±0,2*
	100	3,4±0,3*	3,2±0,3*	2,9±0,3*
Экстракт из варианта №5+облучение	25	2,66±0,9*	3,28±0,8*	3,12±0,1*
	50	2,54±0,2*	2,8±0,2*	2,6±0,4*
	100	2,5±0,5*	2,5±0,2*	2,4±0,1*
Экстракт из варианта №6+облучение	25	2,04±0,3*	2,36±0,4*	2,28±0,8*
	50	1,82±0,4*	1,8±0,1*	1,92±0,2*
	100	2,2±0,2*	2,5±0,3*	2,2±0,1*
Интактные животные	-	1,22±0,2*	1,42±0,3*	1,4±0,3*
Облученные животные (контроль)	-	4,96±0,6	4,3±0,5	4,0±0,5

Примечание: * - отмечены значения достоверно отличающиеся от контроля (* - при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$), состав сборов лекарственных растений приведен в таблице 7.

Остальные виды экстрактов из вариантов сбора лекарственного растительного сырья (№2,3,4,5) показали в эксперименте различные уровни активности, выраженные в способности снижать число микроядер в эритроцитах в пределах до 2,50‰ (в контроле 4,96).

Таким образом, на основании полученных нами данных, можно утверждать, что экстракт шестого варианта сбора (табл. 7) обладает более активными антимутагенными свойствами, что выражается в его способности

снижать частоту индуцированных ионизирующим излучением микроядер в периферической крови мышей. Не трудно заметить, что в указанном сборе все 5 компонентов присутствуют в равных количествах (табл. 7).

Однако в задачи нашего исследования входило не только разработка состава сбора, но и методов его стандартизации. Последнее включало исследование качественного и количественного содержания основных групп БАВ сбора и выбор главных действующих веществ, по которым будет проводиться его стандартизация. Указанные исследования описаны в следующем разделе диссертации.

4.2 Исследование химического состава сбора

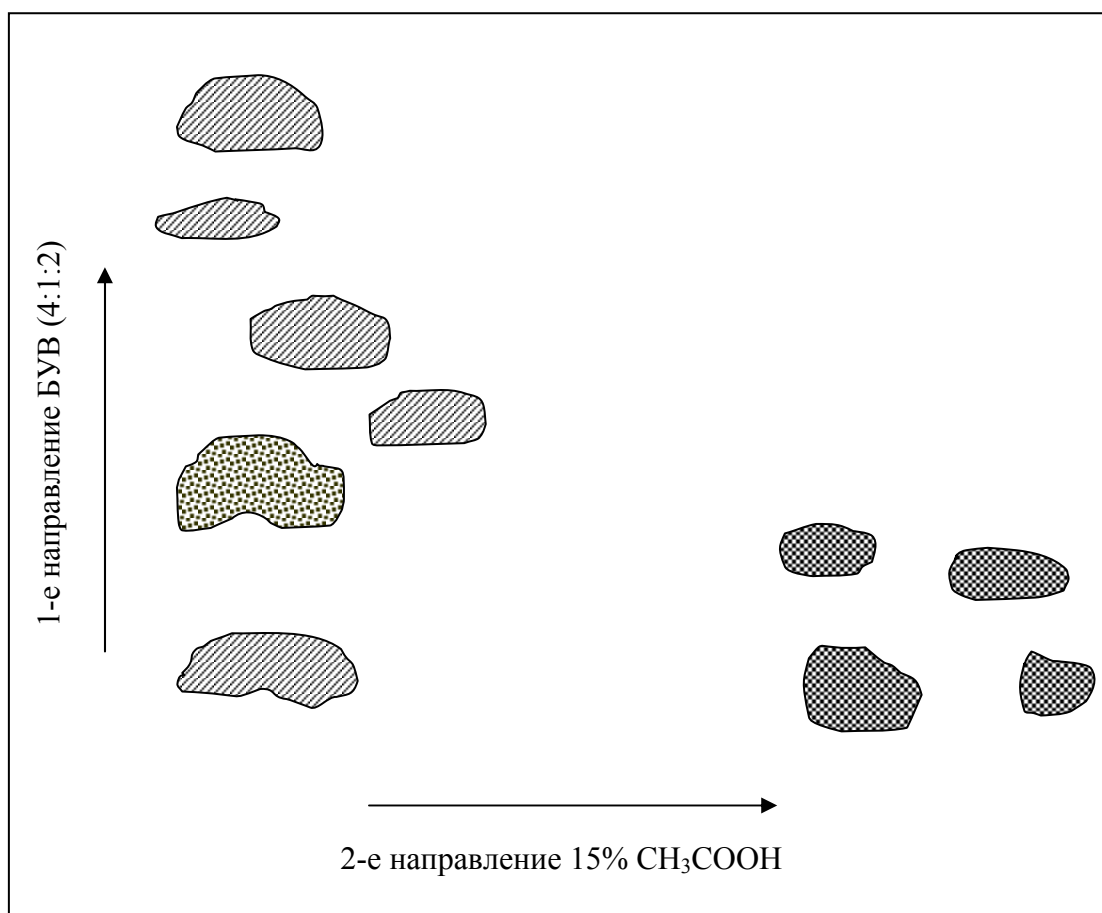
4.2.1. Качественное обнаружение основных групп биологически активных веществ

По данным источников литературы наиболее значимыми БАВ компонентов сбора являются полисахариды, витамины, растительные пигменты, фенольные соединения, сапонины; макро и микроэлементы. Поэтому названные классы БАВ определялись нами в антимутагеном сборе, как в качественном, так и в количественном отношении.

- Качественное обнаружение *полисахаридов* как отмечалось выше (п.п.2.2.9) проводили в водном извлечении, используя реактив Фелинга. В результате реакции наблюдали появление буровато-красного осадка.

- Общепринятыми реакциями спиртового извлечения из сбора (п.п. 2.2.1) с растворами солей железа (железо-аммонийными квасцами и железа хлоридом) было получено интенсивное темно-зеленое окрашивание, свидетельствующее о присутствии в извлечении *фенольных соединений*.

Для качественного исследования состава фенольных соединений использовали экстракт на 40% этаноле, который сгущали под вакуумом и подвергали хроматографическому разделению на бумаге марки «ЛМ» как это указано в разделе 2.2.1. В результате при детектировании в УФ-свете и качественными реакциями со спиртовыми растворами натрия гидроксида и алюминия хлорида на хроматограммах было обнаружено не менее 10 веществ фенольной природы (рис. 5). При этом 4 вещества имели желто-зеленую флюоресценцию, что предварительно позволяет отнести их к агликонам флавоноидов. Остальные 6 веществ на хроматограмме проявлялись в виде синих, сине-фиолетовых и голубых пятен. Такое свечение характерно для кумаринов, фенолкарбоновых кислот (ФКК), а также некоторых флавоноидов (изофлавонов) (рис.5). По интенсивности и величине пятен можно предположить, что данные вещества присутствуют в растительном сборе в высоких количествах.



Примечание: на рисунке отмечены:

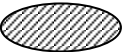
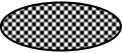
-  Голубые и сине-фиолетовые пятна (фенолокислоты, кумарины);
-  Желто-зеленые пятна (агликоны флавоноидов)
-  Темно-коричневые пятна (гликозиды флавоноидов)

Рисунок 5 – Схема бумажной хроматограммы этанольного извлечения из сбора

- Наличие *флавоноидов* было доказано также с помощью известных реакций (п.п.2.2.3):

а) проба Синода – наблюдали появление оранжевого окрашивания.

б) реакция со 1% спиртовым раствором щелочи – наблюдали появление слабо-желтой окраски.

в) с раствором хлорного железа образовалась синяя окраска.

- Для качественного определения *кумаринов* использовали бумажную хроматографию (рис. 5), а также некоторые специфичные реакции (см. п.п. 2.2.4.):

а) Реакция диазотирования – при добавлении к спиртовому извлечению из сбора 1% спиртового раствора натрия гидроксида наблюдали желтую окраску в присутствии диазотированной сульфаниловой кислоты переходящую в оранжево-красную.

б) Лактонная проба – о присутствии кумаринов судили по сохранению прозрачности раствора со щелочью

- О присутствии *дубильных веществ* судили по специфичным для них реакциям: с раствором желатина и с солями алкалоидов (п.п.2.2.5). В первом случае наблюдали образование обильного осадка, а во втором - помутнение извлечения.

- Присутствие *сапонинов* в исследуемом сборе доказывали несколькими известными реакциями описанными в разделе 2.2.8. Так, в результате реакции пенообразования, водное извлечение при интенсивном встряхивании образовывало густую пену, устойчивую при добавлении растворов натрия гидроксида и кислоты хлористоводородной. При добавлении к водному экстракту раствора ацетата свинца наблюдали образование осадка, а в реакции Либермана-Бурхардта – розовую окраску.

- Наличие *алифатических кислот* было доказано с использованием специальных реактивов (п.п.2.2.12):

а) β -нафтола – при его добавлении к извлечению из сбора в присутствии хлористоводородной кислоты наблюдали ярко-желтую с зеленым оттенком флюоресценцию (яблочная кислота);

б) резорцина – при добавлении его в извлечение из сбора, в присутствии гидроксида аммония и концентрированной серной кислоты наблюдали зеленую флюоресценцию (янтарная кислота);

в) ванилина – при добавлении его в извлечение в присутствии серной кислоты и при нагревании образовалось фиолетовое окрашивание (лимонная кислота).

- Для обнаружения *алкалоидов* в растительном сборе использовали известные реакции с общеосадительными реактивами, а также реактивы

образующие окрашенные соединения с ними (см. п.п.2.2.14). В результате при добавлении к исследуемому извлечению кремневольфрамовой, фосфорномолибденовой, фосфорновольфрамовой, пикриновой кислот, реактивов Вагнера, Фреде, Майера и Драгендорфа наблюдали появление мути и окрашивания оцениваемые от одного до трех знаков плюс, что свидетельствует о присутствии указанного класса соединений в исследуемом сборе.

Наличие *витамина К* в исследуемом лекарственном сборе доказывали реакцией с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (2,6-ДХФИФ) и 5% раствором натрия гидроксида (п.п. 2.2.13). О положительном результате реакции в первом случае свидетельствует появление изумрудно-зеленой окраски, а во втором – оранжево-бурое окрашивание.

Итоговые результаты качественного анализа БАВ антимуtagenного сбора представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты качественного анализа на основные группы БАВ антимуtagenного сбора

Биологически активное вещество	Результат анализа
Полисахариды	+
Сапонины	+
Витамин К	+
Алкалоиды	+
Алифатические кислоты	+
Фенольные соединения в т.ч.:	+
Флавоноиды	+
Фенолкарбоновые кислоты	+
Кумарины	+
Дубильные вещества	+

Примечание: + указанная группа присутствует в сборе

Таким образом, на основании проведенных качественных реакций, в разработанном нами антимуtagenном сборе было установлено присутствие 10 групп БАВ, в том числе фенольных соединений (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, дубильные вещества), а также сапонинов, полисахаридов, витамина К, алифатических кислот и алкалоидов.

Учитывая участие вышеперечисленных групп БАВ в установлении антимуtagenного эффекта на следующем этапе в исследуемом сборе нами проведено количественное определение суммы фенольных соединений, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и кумаринов, а также полисахаридов, каротиноидов, хлорофилла, витамина К и аскорбиновой кислоты.

4.2.2 Количественное определение БАВ

- Определение содержания суммы *фенольных соединений* проводили перманганатометрическим методом, предлагаемым Государственной фармакопеей XI издания для определения дубильных веществ в растительном сырье. В результате исследований установлено, что содержание суммы фенольных соединений в сборе составляет 2,22%.

- Как отмечалось выше (см. п.п.2.2.3) для количественного определения суммы *флавоноидов* в сборе нами применен метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования с раствором алюминия хлорида. Содержание суммы флавоноидов в антимуtagenном сборе составляет 1,36%.

- Количественное определение *фенолкарбоновых кислот* проводили прямым спектрофотометрированием водно-спиртового экстракта, без предварительного хроматографического выделения суммы фенолкарбоновых кислот как указано в параграфе 2.2.1., их содержание в антимуtagenном сборе составляет 0,75%.

- Количественное содержание *кумаринов* в сборе определяли фотоколориметрическим методом, основанном на способности последних вступать во взаимодействие с солями диазония, образуя устойчивые окрашенные соединения (п.п.2.2.4). Содержание кумаринов в исследуемом сборе составляет 0,053%.

- Определение *витамина К* проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 650 нм после реакции с раствором 2,6-ДХФИФ (см. п.п.2.2.13). Содержание витамина К в исследуемом сборе составляет 0,147%.

- Для определения *каротиноидов* в сборе предварительно проводили его омыление, а затем обработку гексаном. После чего выделяли каротиноидов методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия. Элюат, собранный в мерную колбу объемом 50 мл, имел ярко желто-оранжевую окраску, что свидетельствует о присутствии каротиноидов в исследуемом сырье в значительных количествах. Спектрофотометрическое определение при длине волны 440 нм показало, что содержание указанной группы БАВ в антимуtagenном сборе составляет 121,11 мг %.

- Количественное определение *хлорофилла* в сборе проводили, как описано в параграфе 2.2.7, спектрофотометрическим методом при длине волны 660 нм. В результате установлено, что содержание хлорофилла в сборе составляет 13 мг%.

- Количественное определение *аскорбиновой кислоты* проводили титриметрическим методом, основанном на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать 2,6-дихлориндофенолят натрия (см. п.п. 2.2.11). В результате исследований установили, что содержание аскорбиновой кислоты в сборе составляет 0,046% (Табл. 10).

- Содержание суммы *полисахаридов* в сборе, установленное гравиметрическим методом, как описано в п.п. 2.2.9. составляет 16,48%.

Итоговые результаты количественного анализа основных групп биологически активных веществ антимуtagenного сбора представлены в таблице 10.

Для установления количественного содержания в полисахаридном комплексе водорастворимых полисахаридов, пектинов, гемицеллюлоз А и В проводили последовательное фракционное выделение последних (п.п. 2.2.9). Кроме того, устанавливали качественный состав полисахаридного комплекса.

Таблица 10 – Количественное содержание основных групп БАВ в сборе ($M \pm m$, средние из 5 определений)

Группа БАВ	Содержание (%)
Сумма полисахаридов,	16,48 $\pm$ 0,46
Сумма фенольных соединений	2,22 $\pm$ 0,15
Флавоноиды	1,36 $\pm$ 0,06
Фенолкарбоновые кислоты	0,75 $\pm$ 0,02
Кумарины	0,05 $\pm$ 0,00
Аскорбиновая кислота (мг%)	46,00 $\pm$ 2,00
Каротиноиды (мг%)	121,11 $\pm$ 1,50
Витамин К	0,15 $\pm$ 0,01
Хлорофилл (мг%)	13,00 $\pm$ 0,05

Как видно из таблицы 11, в полисахаридном комплексе сбора преобладают водорастворимые полисахариды (8,65%), а также гемицеллюлоза А (4,86%). В гораздо меньших количествах представлены гемицеллюлоза Б (1,99%) и пектиновые вещества (0,98%). Что же касается качественного состава моносахаров, определенного с помощью методик указанных в разделе 2.2.9, то он представлен глюкозой, галактозой, ксилозой, рамнозой, арабинозой, галактуроновой кислотой.

Таблица 11 – Содержание и состав полисахаридного комплекса антимутагенного сбора

Тип полисахарида	Выход ПСК, % от массы абс. сухого сырья	Содержание, %		Качественный состав ПСК*
		Восстанавливающих сахаров	В том числе свободных сахаров	
Водорастворимые полисахариды (ВРПС)	8,65 $\pm$ 0,39	26,12 $\pm$ 0,71	0,90 $\pm$ 0,80	Ara, Glc, Gal Xyl, Rha
Пектиновые вещества (ПВ)	0,98 $\pm$ 0,02	8,84 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,01	Ara, Gal, Xyl, Glc, GalUA
Гемицеллюлоза А (ГЦ А)	4,86 $\pm$ 0,12	17,36 $\pm$ 1,40	0,48 $\pm$ 0,09	Glc, Gal, Rha
Гемицеллюлоза В (ГЦ В)	1,99 $\pm$ 0,04	12,42 $\pm$ 1,14	0,38 $\pm$ 0,04	Gal, Glc, Ara, Xyl

* Примечание: Ara-арабиноза, Gal-галактоза, GalUA-галактуроновая кислота, Glc-глюкоза, Rha – рамноза, Xyl- ксилоза.

В разделе 4.2.1 был исследован фенольный комплекс сбора методом бумажной хроматографии. Для более детального изучения химического состава фенольного комплекса экстрактов из сбора нами использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для этих целей проводили экстракцию 20% и 70% этанолом измельченного сырья сбора. Полученный на 70% этаноле экстракт последовательно обрабатывали хлороформом и этилацетатом. ВЭЖХ анализу подвергали этилацетатную фракцию, а также суммарные экстракты на 20 и 70% этаноле. Исследование проводили, как это указано в разделе 2.2.6.

В результате были идентифицированы компоненты и определен количественный состав методом внутренней нормализации (табл. 12).

Таблица 12 – Результаты анализа экстрактов сбора методом ВЭЖХ

№ п/п	Время удерживания в мин.	Наименование компонента	Содержание компонента, %		
			20 % этанольном извлечении	70 % этанольном извлечении	этилацетатной фракции
1.	8.911	эскулетин	-	-	12,17
2.	9.53	рутин	3,01	3,45	-
3.	8.69	кофейная кислота	7,47	6,69	-
4.	5.72	галловая кислота	5,99	4,79	-

Хроматограммы 20% и 70% этанольных экстрактов представлены на рис. 6 и 7 из которых видно что исследуемые экстракты содержат не менее 20 компонентов, из которых два нами отнесены к фенолкарбоновым кислотам (кофейная и галловая кислоты), 1 вещество было идентифицировано как рутин. Хроматограмма этилацетатной фракции представленная на рис.8 показывает, что в ней содержится не менее 25 компонентов, из которых идентифицировать удалось только эскулетин.

Таким образом, в результате ВЭЖХ-анализа фракций и суммарного экстракта сбора нами получены дополнительные сведения о его химическом составе.

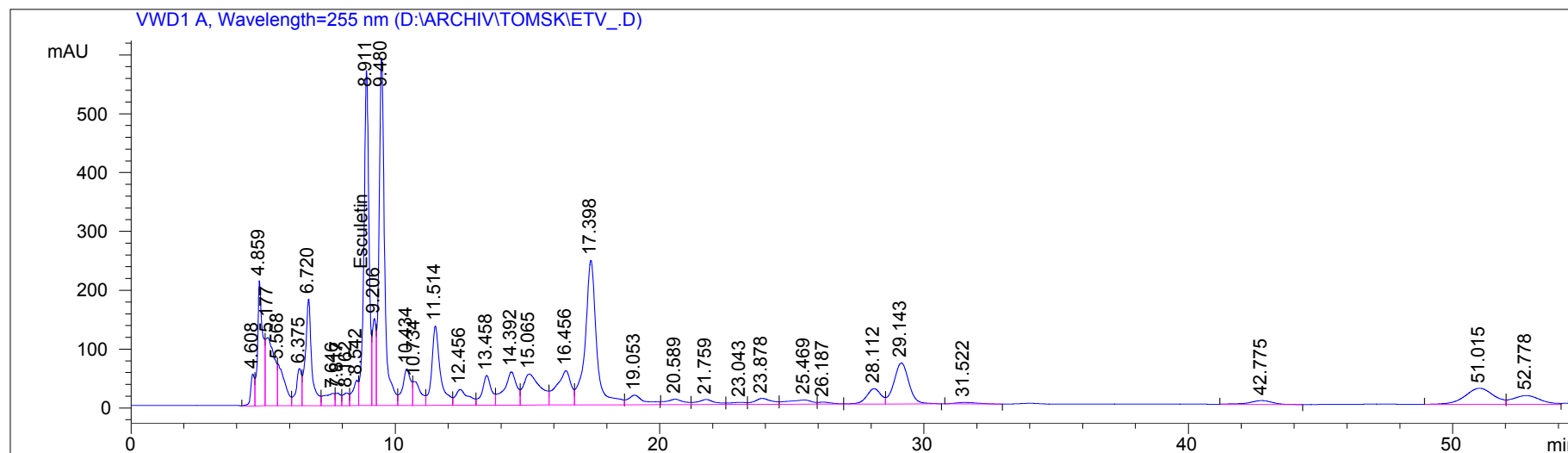


Рисунок 6 – Хроматограмма этилацетатной фракции сбора.

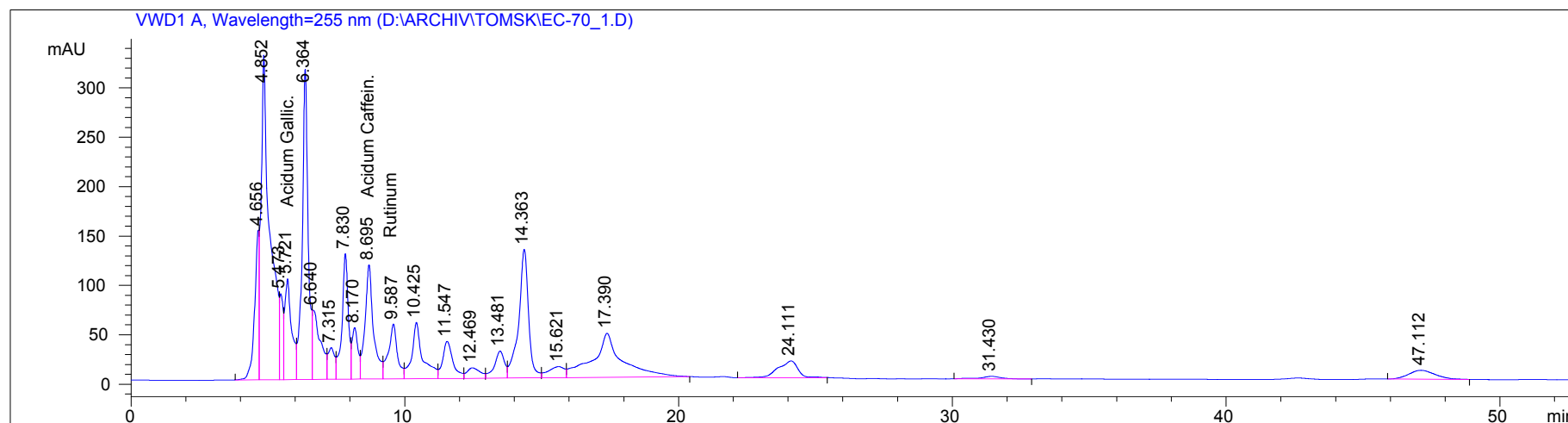


Рисунок 7 – Хроматограмма 70 % этанольного экстракта.

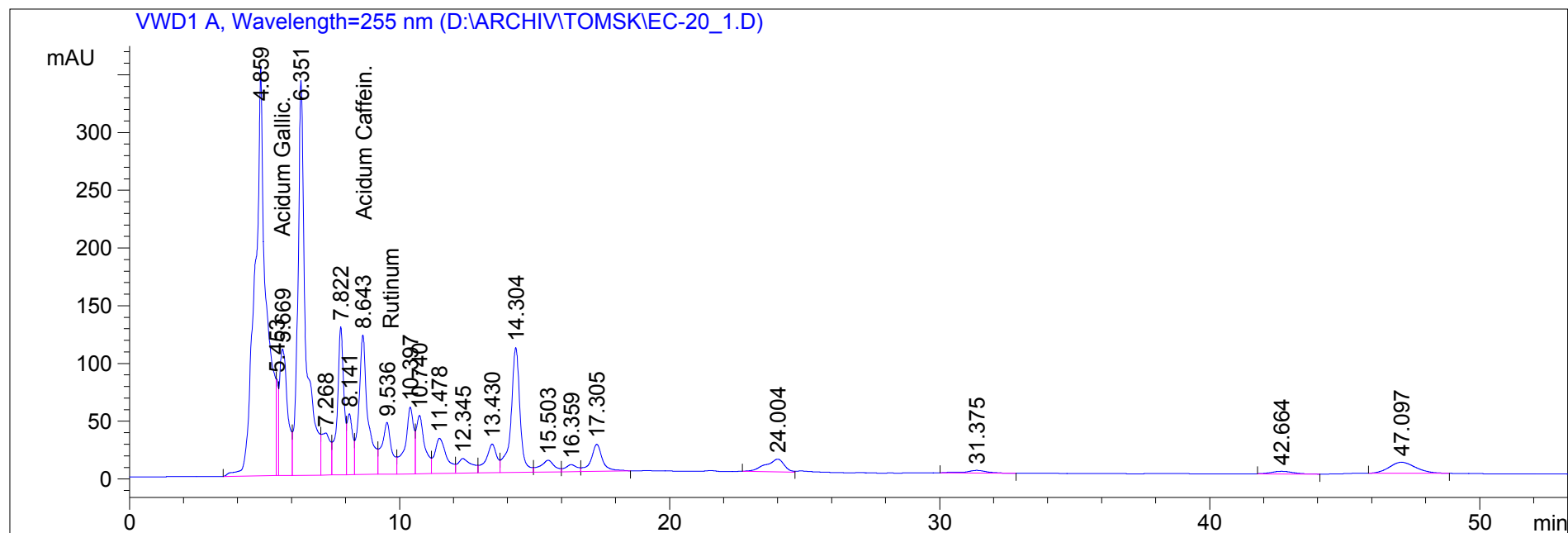


Рисунок 8 – Хроматограмма 20 % этанольного экстракта.

4.2.3. Исследование элементного состава

Определение химических элементов в сборе проводилось с помощью нейтронно-активационного анализа (п.п. 2.2.15), а мотивацией для этого были данные литературы, свидетельствующие о том, что некоторые элементы могут прямо или косвенно принимать участие в антимуtagenном действии.

Результаты определения представлены в таблице 13, из которой видно, что нейтронно-активационный анализ позволил выявить в компонентах антимуtagenного сбора, а точнее в самом сборе наличие макроэлементов, таких как Ca, Fe, Na, Ba; ультрамикроэлементов (U, Yb, Cs, Hf, Tb, Ta) и микроэлементов, которые представлены биогенными (Co, Zn, Se и др.), токсичными (Hg, Sb, Cr, Br и др.) и очень редкими элементами (Au, Ag, U, Th).

Таблица 13 – Содержание химических элементов в сборе, %

Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %
Ca	0,89	Zn*	6,3	Co*	0,22
Na	0,053	Br*	13,12	Sm*	0,026
Fe	0,032	Ba*	17,69	Lu*	0,0022
Cr*	1,54	Se*	0,30	U *	0,11
Yb*	0,011	As*	0,44	Th*	0,028
Au*	0,0044	La*	0,016	Hf*	0,04
Sr*	54,19	Cs*	0,074	Tb*	0,0066
Ag*	1,49	Sc*	0,087	Rb*	23,22
Eu*	0,0066	Sb*	0,051	Ta*	0,015
Hg*	0,17				

Примечание: * - содержание элемента $\% \cdot 10^{-4}$

По результатам определения макро и микроэлементов можно утверждать, что минеральный состав сбора представлен 28 химическими элементами, из которых в сравнении с другими растениями, в количественном отношении выделяются такие жизненно важные элементы как кальций, цинк, кобальт, железо и селен. Что же касается роли элементов в антимуtagenном действии, то по данным литературных источников ее определяют прежде всего такие элементы как селен, цинк, кальций и кобальт [43,87,109,155,166].

Резюмируя вышеизложенное, следует сказать, что по данным химического исследования сбор антимутагенного действия содержит богатый комплекс БАВ, представленный флавоноидами, фенолокислотами, кумаринами, витаминами (К, С, каротиноидами), макро- и микроэлементами. Обращает на себя внимание высокий выход полисахаридного комплекса у исследуемых объектов, содержание которого составляет 16,48%. При этом последний представлен водорастворимыми полисахаридами, пектиновыми веществами, гемицеллюлозой А, гемицеллюлозой Б.

Поэтому дальнейшей задачей нашего исследования явилось использование полученных результатов химического исследования сбора для разработки методик его стандартизации.

4.3. Разработка методик стандартизации сбора

Для использования сбора в качестве антимутагенного средства и получения на его основе экстракционных препаратов необходима нормативная документация, регламентирующая его качество и сроки хранения. Нами разработан проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) «Сбор антимутагенный», в котором описаны внешние признаки сырья, экспериментально определены его числовые показатели, а также методики качественного обнаружения и количественного определения, основных групп биологически активных веществ.

Для разработки проекта ФСП использовали 5 образцов сбора, приготовленного из различных партий лекарственного растительного сырья, собранного в фазу цветения и плодоношения в 2001-2003 гг., а также из промышленных партий сырья (табл. 4).

В следующем разделе диссертации описаны разработанные методики определения подлинности антимутагенного сбора.

4.3.1 Методики качественного обнаружения БАВ

По нашему мнению, наиболее приемлемыми группами БАВ, методики определения которых достаточно достоверны и легко воспроизводимы, являются флавоноиды и полисахариды, которые наряду с другими БАВ по данным литературы, с определенной степенью достоверности, могут быть ответственными за антимуtagenное действие компонентов антимуtagenного сбора. Поэтому стандартизацию антимуtagenного сбора нами предложено проводить именно по этим группам биологически активных веществ.

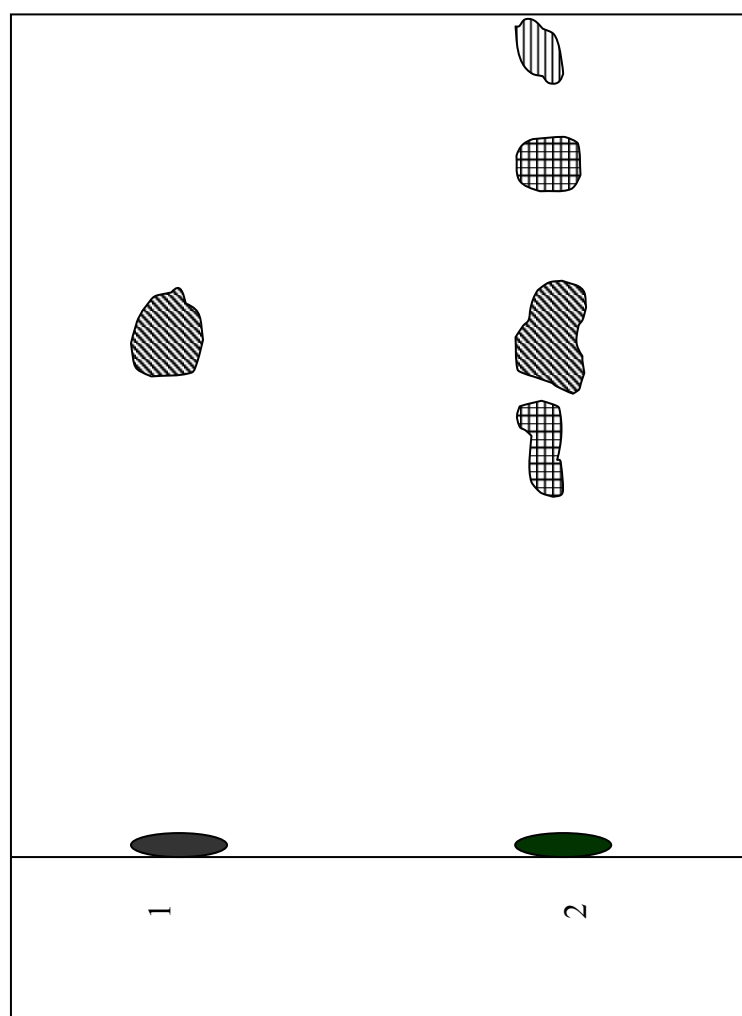
Флавоноиды

а) Качественное обнаружение *флавоноидов* предлагаем проводить методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [70,139].

С этой целью 1 г сбора измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм помещают в колбу вместимостью 50 мл, заливают 10 мл этанола 70%. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин с момента закипания спирта в колбе.

После охлаждения извлечение декантируют и 0,02 мл раствора микропипеткой или микрокапилляром наносят на линию старта пластинки «Сорбфил» размером 7x15 см в виде точки, рядом наносят в виде точки - 0,005 мл 0,05% раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, затем помещают в камеру (предварительное насыщение камеры не менее 1 часа) со смесью растворителей этилацетат-уксусная кислота-вода (10:4:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 12 см, пластинку вынимают из камеры, высушивают в вытяжном шкафу в течении 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 360 нм. На уровне пятна ГСО рутин должно появиться пятно коричневого цвета $R_f \approx 0,58$. Затем пластинку опрыскивают 5% спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают ее в течении 2-3 мин в сушильном шкафу при температуре 100-105⁰С. При этом пятно приобретает желтую окраску, в видимом и яркую

лимонно-желтую окраску в УФ-свете (рутин). На фоне выявленного пятна рутина в исследуемом извлечении в аналогичных условиях проявились 3 других пятна, два из которых характерному хроматографическому поведению (окраске пятен в УФ-свете до и после проявления хроматограммы спиртовым раствором алюминия хлорида), можно предположительно отнести к флавоноидам. Еще одно пятно, располагавшееся рядом с линией финиша и флюоресцирующее красным цветом, вероятно представлено хлорофиллом (рис. 9).



Примечание:

1 – достоверный образец рутина

2 – спиртовое извлечение из антимуtagenного сбора

Рисунок 9 – Схема хроматограммы спиртового извлечения из антимуtagenного сбора

4.3.2. Методики количественного определения БАВ

а) Количественное определение суммы *флавоноидов* проводили спектрофотометрическим методом с использованием ГСО рутина и комплексообразующей реакции с алюминия хлоридом.

При разработке методики анализа исследовали влияние на выход флавоноидов таких технологических факторов как: степень измельчения сырья, условия экстракции, при этом в качестве экстрагента использовали воду очищенную и этанол различной концентрации. Результаты выполненных исследований представлены в табл. 14.

Таблица 14 – Влияние условий экстракции на выход флавоноидов из антимуtagenного сбора

Факторы	Значение	Флавоноиды, %
Время экстракции	30 мин	1,13 ± 0,01
	45 мин	1,20 ± 0,02
	60 мин	1,24 ± 0,01
Вид экстрагента	Вода	0,89 ± 0,02
	Этанол 20%	1,05 ± 0,01
	Этанол 40%	1,18±0,16
	Этанол 70%	1,22±0,04
	Этанол 70%, подкисленный р-ром HCL	1,42±0,06
Соотношение сырья и экстрагента	1:50	1,24±0,02
	1:100	1,22±0,07
	1:200	1,15±0,04
Время комплексообразования, мин	10	0,96±0,06
	20	1,22±0,11
	40	1,28±0,02
	60	1,20 ±0,05
Температурный режим Водяная баня, С ⁰	30	1,10±0,04
	60	1,21±0,07
	90	1,28±0,02
Измельченность сырья, мм	1	1,24±0,02
	6	1,19±0,04

В результате проведенных исследований было установлено, что наибольшее количество флавоноидов извлекается из сырья, при измельчении частиц сбора до размера 1 мм. Экстрагирование флавоноидов лучше проводить 70% этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1:50 на кипящей водяной бане. Дальнейшее увеличение соотношения сырье:экстрагент не приводит к повышению выхода флавоноидов. В связи с тем, что флавоноиды в данном сырье содержатся как в виде агликонов, так и гликозидов проведено их извлечение 70% этанолом, подкисленным хлористоводородной кислотой, с целью гидролиза гликозидов. Результаты представленные в таблице показывают, что подкисление экстракта приводит к увеличению выхода флавоноидов. Изучение стабильности продуктов реакции во времени показало, что в течении 40 минут после прибавления раствора реактива оптическая плотность продуктов реакции возрастает.

Как видно из таблицы 14, в результате проведенных испытаний были установлены оптимальные параметры, влияющие на выход флавоноидов, которые были учтены при использовании методики количественного определения указанной группы БАВ с целью стандартизации антимуtagenного сбора. Суть видоизмененной методики приводится ниже: Аналитическая проба сбора измельчалась до размера частиц проходящих через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 (т.н.) измельченного сбора помещалось в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, затем прибавлялось 30 мл 70% этанола подкисленного 1,8 мл кислоты хлористоводородной. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сбора со стенок. Горячее извлечение профильтровывалось через вату в мерную колбу на 50 мл так, чтобы частицы сбора не попадали на фильтр. Вату помещали в колбу для экстрагирования и прибавляли 20 мл 70% этанола, экстракция повторялась в описанных выше условиях еще два раза, извлечение фильтровалось в ту же мерную колбу.

После охлаждения объем доводился 70% этанолом до метки и перемешивался (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл раствора алюминия хлорида в 95% спирте, 2 мл раствора А и доводили объем раствора 95% спиртом до метки. Через 40 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытываемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухой сбор в % (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D * m_0 * 50 * 100 * 100}{D_0 * m * 25 * (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытываемого раствора;

D₀ – оптическая плотность ГСО рутина;

M – масса сбора, в г;

M₀ – масса ГСО рутина, в г;

W – влажность сбора, в %.

Содержание суммы флавоноидов в образцах сбора колебалось от 1,27% до 1,42% (табл. 15). В проекте ФСП норма содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин составляет не менее 1,00 %.

Таблица 15 – Содержание флавоноидов в сборе

Серия	Содержание, %
1	1,27
2	1,35
3	1,40
4	1,42
5	1,38

Результаты статистической обработки (табл. 16) свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95,00% находится в пределах $\pm 0,06$. Ошибка методики составляет 4,93%.

Таблица 16 – Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов

f	$\bar{X}$	S_x	P, %	$T_{(P,F)}$	$\pm \Delta X$	E, %
5	1,36	0,026	95	2,57	0,06	4,933

б) Количественное определение *водорастворимых полисахаридов* проводили гравиметрическим методом [п.п. 2.2.9 - б].

С целью разработки методики для стандартизации сбора по содержанию полисахаридов аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды очищенной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяют еще четыре раза по 100 мл в течение 30 мин каждый раз. Водное извлечение центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через пять слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм предварительно смоченную водой. Фильтр промывают водой очищенной и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл 95% этанола, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60°C в течение 5 мин. Через 30 мин 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 105°C стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 15 мл смеси 95% этанола и воды (3:1). Фильтр с осадком высушивают сначала на

воздухе, затем при температуре 100-105°C до постоянной массы. Содержание суммы водорастворимых полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

m_1 – масса фильтра, в г;

m_2 – масса фильтра с осадком, в г;

m – масса сырья, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья (влажность), в %.

Содержание суммы водорастворимых полисахаридов в сборе колебалось от 8,20% до 9,11% (табл.17). В проекте ФСП норма содержания суммы водорастворимых полисахаридов составляет не менее 8,00 %. Результаты статистической обработки (табл. 18) свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95,00% находится в пределах $\pm 0,39$. Ошибка методики составляет 4,56%.

Таблица 17 – Содержание водорастворимых полисахаридов в сборе

Серия	Содержание, %
1	8,65
2	8,82
3	8,48
4	8,20
5	9,11

Таблица 18 – Метрологические характеристики методики количественного определения полисахаридов

f	$\bar{X}$	S_x	P, %	$T_{(P,F)}$	$\pm \Delta X$	E, %
5	8,65	0,153	95	2,57	0,39	4,562

Таким образом для предлагаемого антимуtagenного сбора было в экспериментальных условиях изучено влияние ряда технологических параметров и других факторов на выход флавоноидов и полисахаридов. На основании полученных результатов внесены некоторые изменения в существующие методики.

4.3.3 Разработка товароведческих показателей сбора

Согласно требованиям нормативной документации для лекарственного растительного сырья, предлагаемого к применению и приготовлению лекарственных средств необходимо определять товароведческие показатели – влажность, золу общую, золу нерастворимую в 10% растворе хлористоводородной кислоты, примеси, измельченность, содержание экстрактивных веществ. Поэтому, для оценки качества антимуtagenного сбора нами определены его основные числовые показатели по методикам Государственной фармакопеи 11 издания:

Влажность сбора определяли при температуре 105⁰С, высушивая навески до постоянной массы. Потеря массы сырья при высушивании колебалась от 5,97% до 9,75% (табл. 19). Предлагаем внести в нормативную документацию показатель влажности не более 14%.

При анализе образцов сбора показатель *зола общей* составлял от 10,39% до 11,59% (табл. 19). В нормативном документе данный показатель будет составлять не более 13%. Содержание золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной, определено в несущественных количествах от 1,1% до 2,42%, в нормативный документ предлагаем ввести данный показатель не более 4%.

В анализируемых образцах сбора обнаружены в качестве *органической примеси* кусочки стебля крапивы двудомной и кусочки стебля ноготков лекарственных. Содержание данных примесей не превышало 1,9% (табл. 19), поэтому в проекте фармакопейной статьи предприятия этот показатель составляет не более 2%. Вместе с тем, в образцах сбора присутствовала *минеральная примесь* и не превышала 2,31% (табл. 19). В нормативном документе этот показатель будет не более 3%.

Кроме действующих веществ, для стандартизации сбора, представляло интерес определение содержания *экстрактивных веществ*. Для этого использовали принятые в технологии получения пищевых и лекарственных экстрактов экстрагенты: воду, этанол 20%, 40% и 70%. Результаты

представлены в таблице 19. Как показывают данные таблицы, наибольшее количество экстрактивных веществ (более 25%) извлекается из сбора водой. Близкое число экстрактивных веществ извлекается 20% этанолом (до 24%). При этом 20 и 40% этанолом извлекается несколько меньшее количество экстрактивных веществ – около 23%. В связи с тем, что в дальнейшем получение экстракционного препарата из сбора предполагается проводить этанолом, для стандартизации сбора, предлагаем ввести показатель «содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 20%-ным этанолом. В проекте ФСП этот показатель будет составлять не менее 20,00%.

Таблица 19 – Итоговые результаты определения числовых показателей сбора

№	Показатели, %	№ Образца				
		1	2	3	4	5
1	Влажность	5,97	9,75	6,50	8,40	6,68
2	Зола:					
	• Зола общая	10,39	11,23	11,59	11,41	10,68
	• Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты	1,10	1,54	2,42	2,00	2,12
3	Экстрактивные вещества:					
	• Экстрагент – вода	25,52	25,50	25,65	26,12	24,95
	• Экстрагент – 20% этанол	23,26	23,44	24,10	24,15	23,45
	• Экстрагент – 40% этанол	23,18	23,11	23,83	23,90	23,34
	• Экстрагент – 70% этанол	23,11	23,13	23,00	23,94	23,23
4	Примеси:					
	• Органические примеси	1,89	1,17	1,27	1,52	1,90
	• Минеральные примеси	2,31	2,33	2,15	1,99	2,11

Измельченность сырья (результаты ситового анализа). Для определения фракционного состава сбора (степени его измельченности) нами проведен ситовый анализ. Для этого использовали набор сит с диаметром отверстий от 0,1 по 6 мм. Как показывают результаты анализа, представленные в таблице 20, сбор, в основном, состоит из частиц сырья размером 1-3 мм (74,32%), через сито с диаметром отверстий 3 мм проходит 21,91% частиц; около 6% сбора составляют частицы размером 1 мм. Как видно из таблицы, наиболее

значительную фракцию сбора составляют частицы размером 2 мм (46,35%). Таким образом, антимуtagenный сбор представляет собой практически однородную по размерам смесь. Вместе с тем, содержание частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм, колебалось от 0,21% до 0,85% (табл. 20). Предлагаем для ФСП данный показатель не более 1,00%. Кроме того, в ФСП регламентируется содержание частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,1 мм, которое колебалось от 0,34% до 0,57% (табл. 20). Предлагаем установить норму для этого показателя не более 1,00%.

Таблица 20 – Результаты ситового анализа антимуtagenного сбора

№	Частиц сырья не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм, %	Частиц сырья, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий мм, %								
		0,1	0,3	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
1.	0,21	0,50	5,31	4,89	6,25	48,40	20,00	6,79	5,33	2,32
2.	0,24	0,57	4,20	4,83	5,95	44,55	22,15	6,97	7,00	3,54
3.	0,57	0,43	3,94	5,00	5,25	45,12	22,85	6,15	8,22	2,47
4.	0,85	0,52	4,10	3,56	6,62	45,40	24,10	6,00	3,33	5,52
5.	0,83	0,34	5,30	4,80	6,23	48,32	20,45	5,95	4,80	2,98

На следующем этапе представляло интерес определить внешние и микроскопические диагностические признаки ингредиентов сбора.

Указанные исследования описаны в следующем разделе диссертационной работы.

4.3.4 Изучение микроскопических и морфологических признаков сбора

Кроме разработанных числовых показателей и методик качественного обнаружения и количественного определения БАВ нами изучены и определены морфологические и микроскопические признаки сбора, включенные в проект ФСП.

Морфологические признаки сбора. Изучение внешних признаков сбора проводили в 2 этапа: сначала осматривали невооруженным глазом, отмечая общую структуру, цвет и запах растительной смеси; вкус водного извлечения. Затем сбор изучали под стереомикроскопом, выделяя все составляющие каждого компонента и детально их характеризую.

Так, сбор представляет собой смесь неоднородных частиц (кусочков листьев, черешков, стеблей, ветвей, цветков, корней, семян) светло-зеленого, темно-зеленого, серовато-зеленого, серо-белого с темно-бурыми и желтыми вкраплениями, светло-коричневого, темно-коричневого, оранжевого, бледно-желтого, желто-коричневого цветов, проходящих сквозь сито диаметром 6 мм. Запах характерный. Вкус водного извлечения сладковато-горький.

При просмотре сбора под стереомикроскопом (увеличение 8х; 16х; 32х) видны кусочки листьев, черешков, стеблей, ветвей, цветков, корней, цельные семена:

- кусочки листьев и черешков темно-зеленого цвета с морщинистой поверхностью, по крупным жилкам хорошо заметны жгучие волоски (листья крапивы);
- кусочки стеблей и ветвей частично с узлами и влагалищами серовато-зеленого цвета (травя хвоща полевого);
- кусочки язычковых цветков оранжевого цвета, бесплодные трубчатые цветки оранжево-желтого цвета, кусочки листочков обертки или цельные листочки серовато-зеленого цвета, опушенные, заостренные, узколанцетные (цветки календулы)

- кусочки деревянистых корней различной формы серо-белого цвета с темно-бурыми и желтыми вкраплениями (корни одуванчика);

- семена сплюснутые, яйцевидной формы, заостренные с одного конца и округлые с другого, неравнобокие, темно-коричневого цвета, поверхность семян гладкая, блестящая, со светло-желтым, ясно заметным семенным рубчиком (семена льна).

Как видно из вышеописанного, при изучении под стереомикроскопом все компоненты сбора четко диагностируются по характерным видовым и групповым признакам.

Микроскопические признаки сбора. Микроскопические признаки сбора установлены на основании анатомического исследования листьев крапивы двудомной, травы хвоща полевого, цветков ноготков, корней одуванчика лекарственного и семян льна. Для микроскопического исследования отбирали кусочки каждого компонента сбора под стереомикроскопом и кипятили в 2,5% растворе щелочи в течение 1-2 минут, тщательно промывали водой. Промытые кусочки сбора помещали на предметное стекло в 1-2 капли раствора хлоралгидрата и нагревали для дополнительного просветления препарата, Из кусочков корней готовили давленные препараты в хлоралгидрате. Из семян делали поперечные срезы. Препараты исследовали под микроскопом. Диагностические признаки всех компонентов определялись и соответствовали описанию в частных статьях ГФ XI.

При рассмотрении приготовленных микропрепаратов с поверхности видны:

- клетки эпидермиса кусочков верхней стороны листа **крапивы** – многоугольные или слабо извилистые; нижней стороны листа – сильно извилистые. Устьица окружены 3-5 клетками эпидермиса, встречаются в основном на нижней стороне листа (рис. 9г,10а). Характерно наличие в клетках эпидермиса цистолитов в виде продолговато-округлых образований с зернистой структурой и небольшим пятном в центре – ножка (рис.9г). Минеральную природу цистолитов доказали воздействием на микропрепарат

концентрированной серной кислотой. На верхней и нижней стороне листа, по краю и жилкам хорошо видны одноклеточные ретортовидные волоски, имеющие расширенное основание и вытянутую заостренную верхушку (рис. 9в,д; 10а,б). Клетки эпидермиса у основания волоска образуют розетку (рис. 10а,б). Кроме того, по крупным жилкам встречаются жгучие волоски, состоящие из многоклеточного основания (подставки) и крупной конечной клетки, которая заканчивается легко обламывающейся головкой (рис. 9 а,б). В крупных жилках расположены клетки с мелкими друзами оксалата кальция, образующими характерные цепочки (рис. 10в);

– обрывки эпидермиса кусочков стеблей и ветвей **хвоща полевого** на ребрах сильно удлинённые с утолщёнными прямыми или слегка извилистыми пористыми стенками, без устьиц (рис.11а); в бороздках и нередуцированных листьях слегка удлинённые с более извилистыми пористыми стенками, с устьицами (рис.11б). У обоих типов эпидермиса на стенках концов (стыков) некоторые клетки заметны характерные выросты, с поверхности имеющие вид спаренных кружочков, при рассмотрении в продольном положении - закругленные или зубчатые с ясно выраженной перегородкой; некоторые клетки имеют сосочковидные выросты (рис.11в,г,д,е). Устьица слегка погруженные, с характерной лучистой складчатостью кутикулы, расположены обычно в 3 ряда, реже в 4, 2 и 1 (рис.12а,б,в).

– удлинённые клетки эпидермиса язычковых цветков **ноготков** с оранжевыми округлыми хроматопластами (рис.13а), на зубчиках эпидермис с сосочками иногда с устьицами (рис.13б); трубка венчика густо опушена простыми и железистыми одно-, двухрядными волосками; завязь также опушена: с выпуклом стороны железистыми, по краям вогнутой стороны – простыми двухрядными волосками (рис.13в,г). Эпидермис трубчатых цветков такой же, как и язычковых но у зубчиков он с более вытянутыми сосочками (рис.14а); нижняя часть трубки венчика и завязь густо опушены одно-, двухрядными железистыми, реже двухрядными простыми волосками

(рис.14б,в). Пыльца округлая, шиповатая (рис.14г). Эпидермис листочков обертки по краю представлен удлинёнными клетками с прямыми стенками, в средней части -извилистыми стенками и устьицами (рис.15а,б); листочки обертки густо опушены: по краю - длинными одно-, двухрядными простыми, двухрядными железистыми и ветвистыми волосками; в средней части - только железистыми волосками (рис.15в,г);

– обрывки клеток пробки корней **одуванчика** светло-коричневой окраски (рис.16а), крупных овальных клеток паренхимы коры с млечниками (рис.16б), заполненных желто-коричневым содержимым, обрывки лестничных и сетчатых сосудов (16в). Присутствие инулина обнаруживали с α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты (соскоб корня от прибавления 20% спиртового раствора α -нафтола и концентрированной серной кислоты окрасился в фиолетово-розовый цвет).

– эпидермис семян **льна**, состоящий из крупных, четырехугольных клеток, покрытых толстым слоем кутикулы, содержащих слизь; боковые (радиальные) стенки клеток слегка извилистые. Под эпидермисом лежат 1 - 2 ряда паренхимных клеток. Третий слой представлен механической тканью, состоящей из одного ряда сильно утолщенных одревесневших желтых клеток пронизанных поровыми канальцами. Под механической тканью расположены узкие тонкостенные клетки «поперечного слоя» (вытянуты поперек семени). Самый внутренний слой кожуры - пигментный, состоящий из одного ряда четырехугольных клеток с заметно утолщенными пористыми оболочками и темно-желтым содержимым (рис. 17). Эндосперм состоит из многоугольных клеток и содержит алейроновые зерна и капли жирного масла (рис.18 а). Ткань семядолей отличается более мелкими клетками (рис.18 б). Наличие слизи доказывали гистохимической реакцией с раствором туши. На темно-сером фоне белыми пятнами выделялись клетки со слизью.

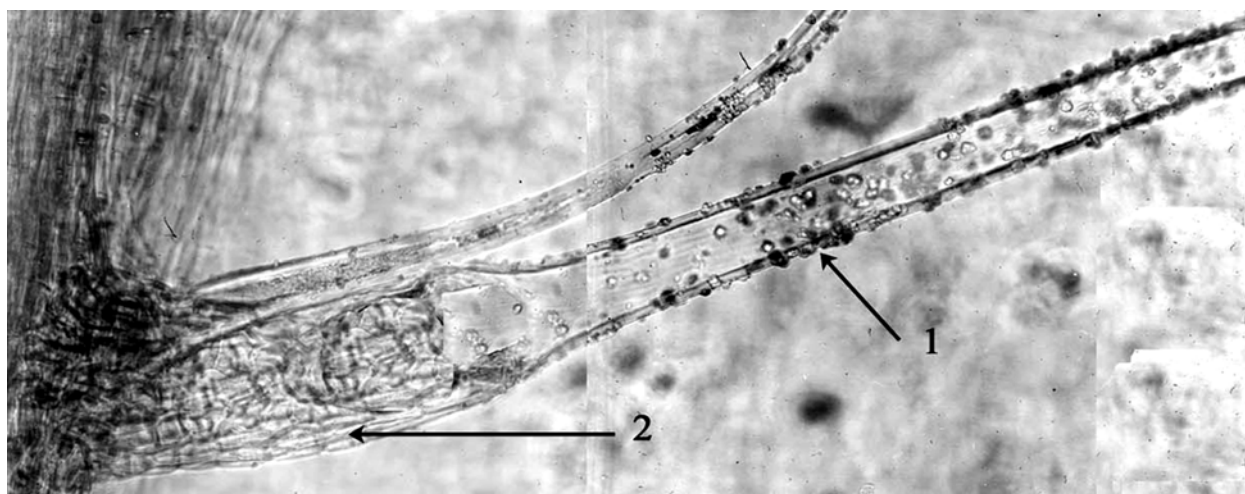
Фрагменты анатомического строения листа крапивы (x420)

Рисунок 9 – Эпидермис нижней (а, б, в), верхней (г) стороны листа и край листовой пластинки (д):

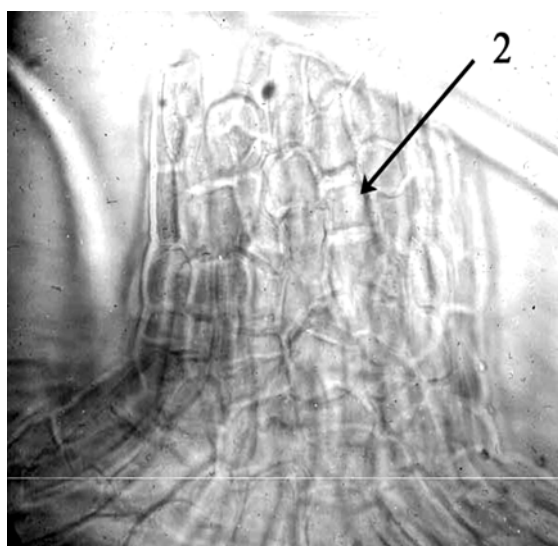
1-жгучий волосок по жилке, 2-многоклеточная подставка жгучего волоска, 3-ретортовидный волосок по жилке, 4-ретортовидный волосок по краю листа, 5-цистолиты.

Рисунок 10 – Эпидермис верхней стороны листа (а), фрагмент ретортовидного волоска (б) и жилки (в):

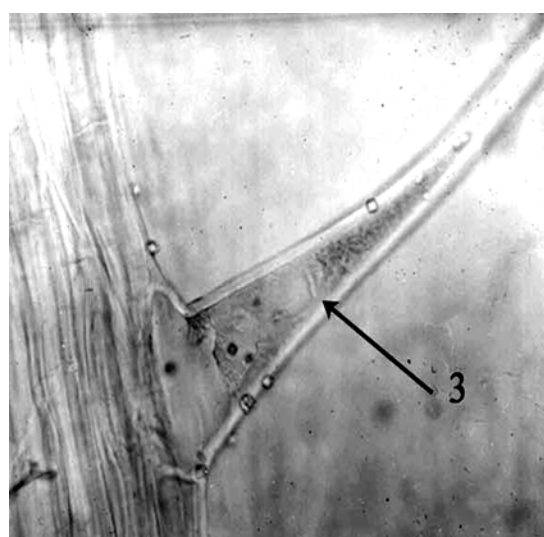
1-основание ретортовидного волоска, 2-друзы оксалата кальция.



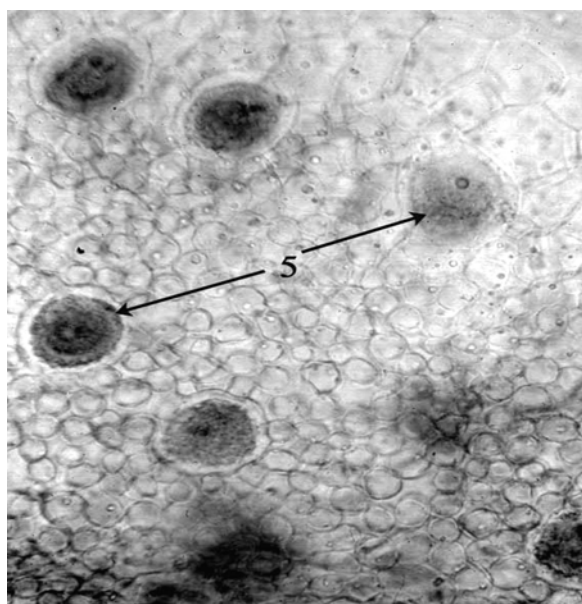
а



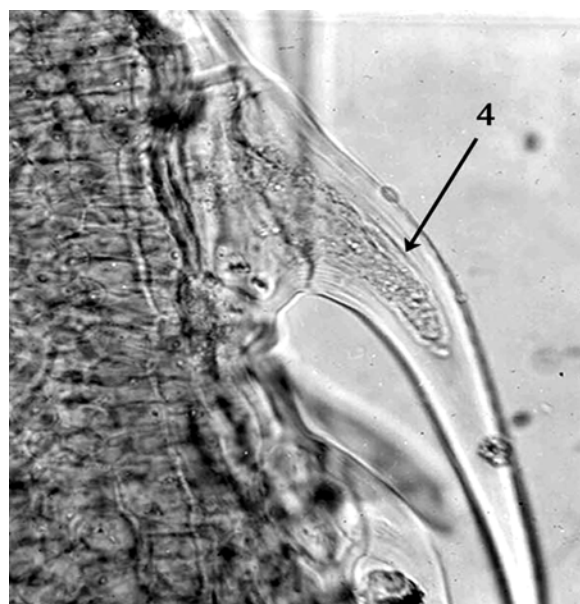
б



в

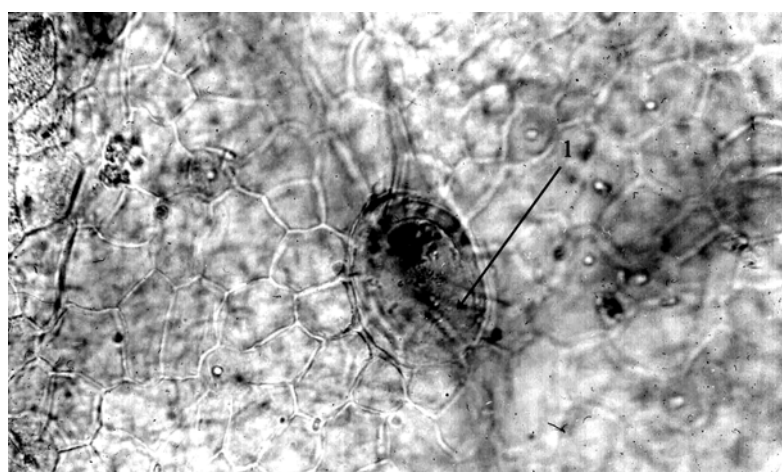


Г

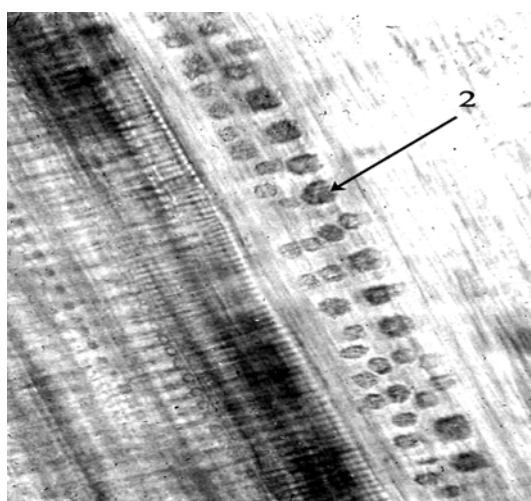


Д

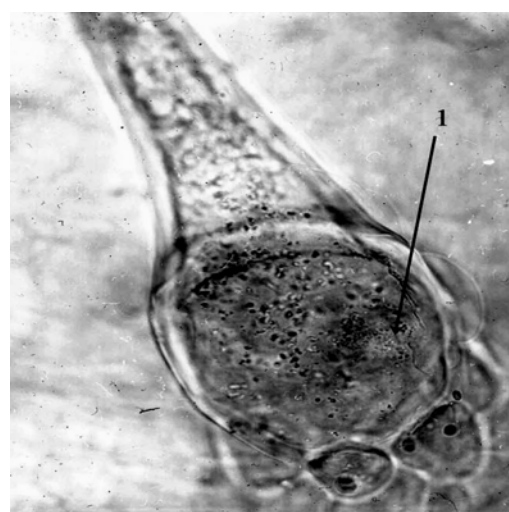
Рисунок 9



а



в



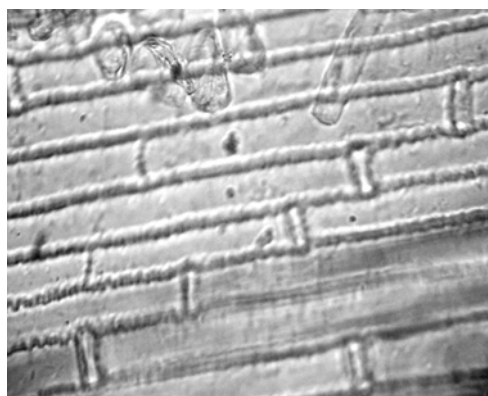
б

Рисунок 10

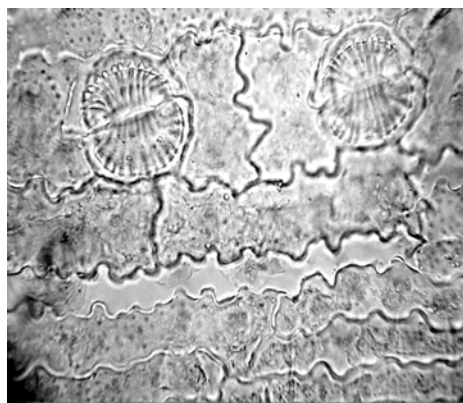
Фрагменты анатомического строения травы хвоща полевого (x420)

Рисунок 11 – Эпидермис на ребрах (а), в бороздках (б), сосочковидные выросты (в, г, д, е).

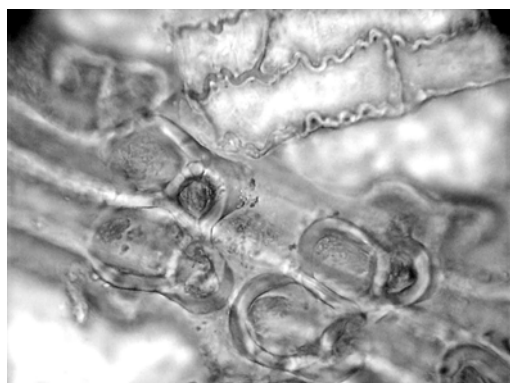
Рисунок 12 – Устьица в 3 ряда (а), в 2 ряда (б), в 1 ряд (в).



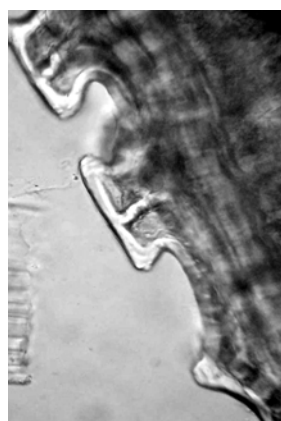
а



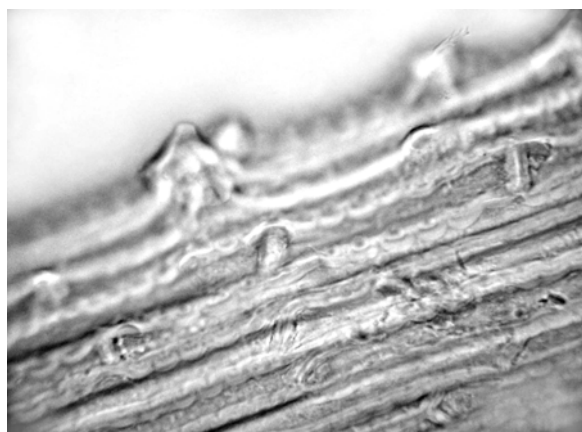
б



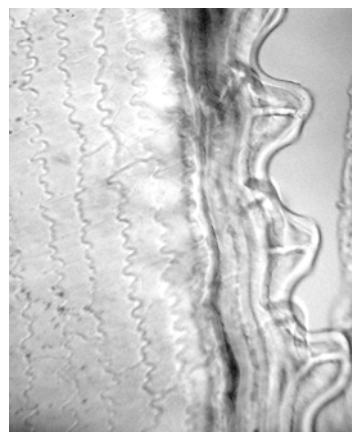
в



г

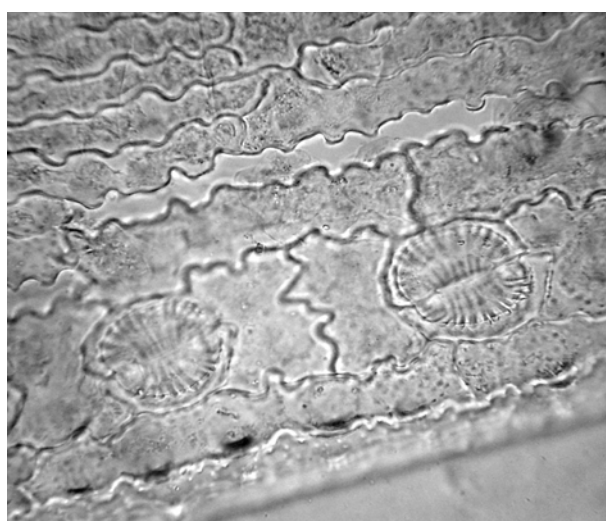
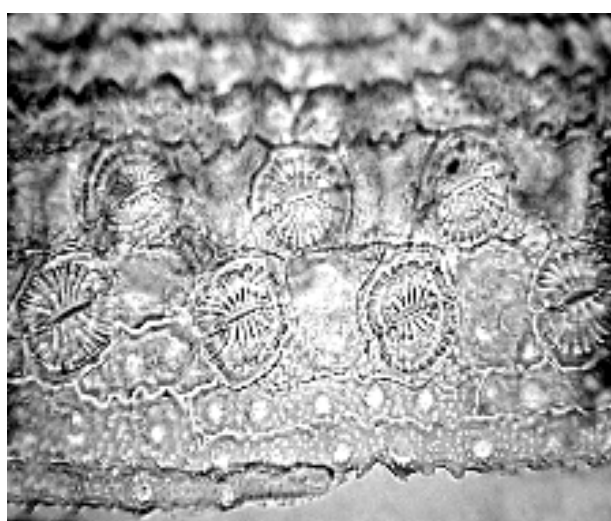
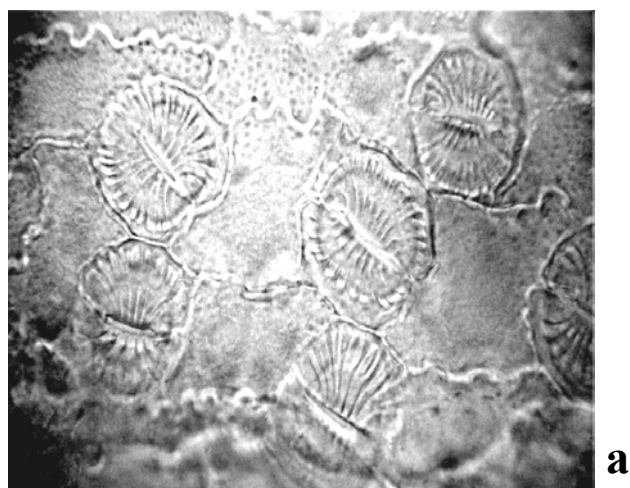


д



е

Рисунок 11



б

в

Рисунок 12

Фрагменты анатомического строения цветка ноготков (x420)

Рисунок 13 – Эпидермис (а, б), простые (в) и железистые (г) волоски язычкового цветка.

Рисунок 14 – Эпидермис (а), простые (б) и железистые (в) волоски, пыльца (г) трубчатого цветка.

Рисунок 15 – Эпидермис по краю (а) и в средней части (б), простые (в) и железистые (г) волоски листовой обертки.



а



б



в

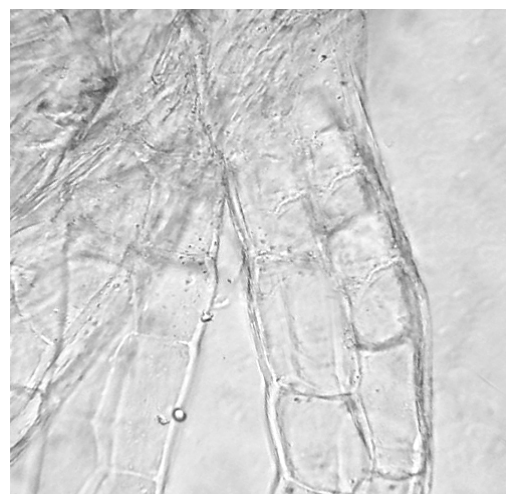


г

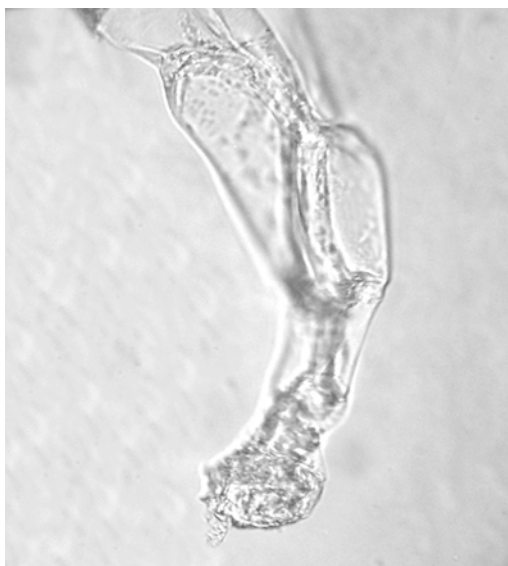
Рисунок 13



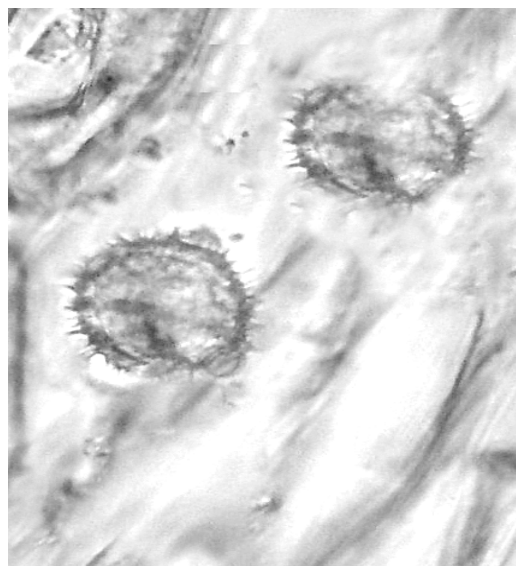
а



б



В

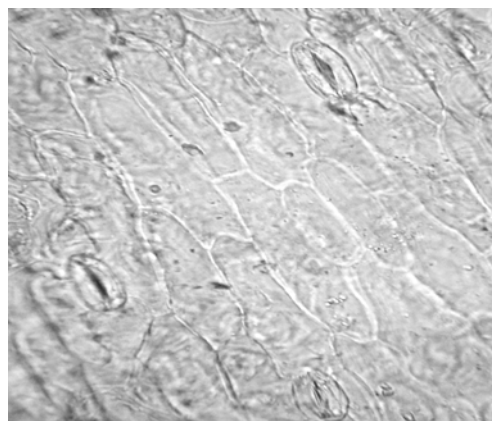


Г

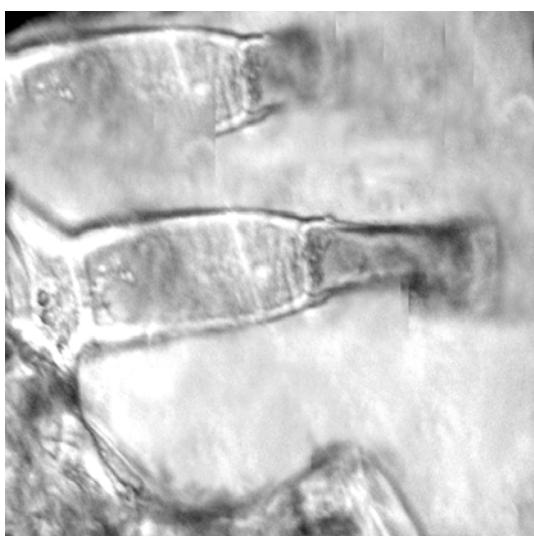
Рисунок 14



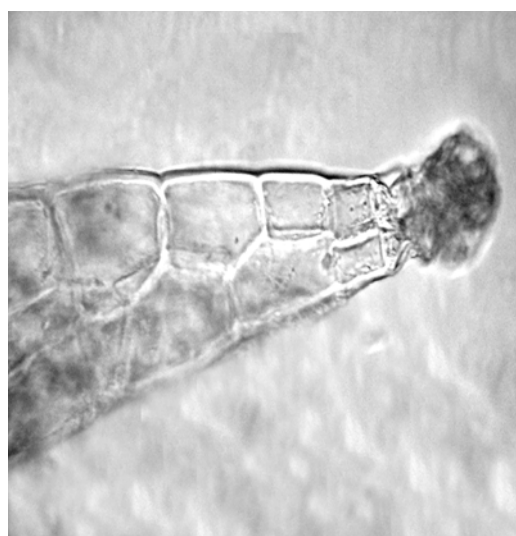
а



б



В



Г

Рисунок 15

Фрагменты анатомического строения корня одуванчика (x420)

Рисунок 16 – Пробка и кора (а), млечники (б), сосуды (в).

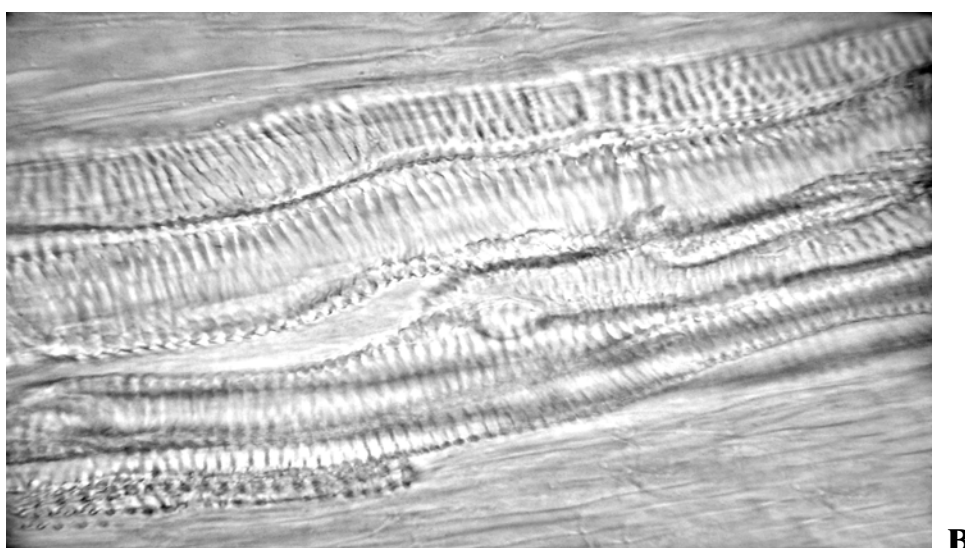
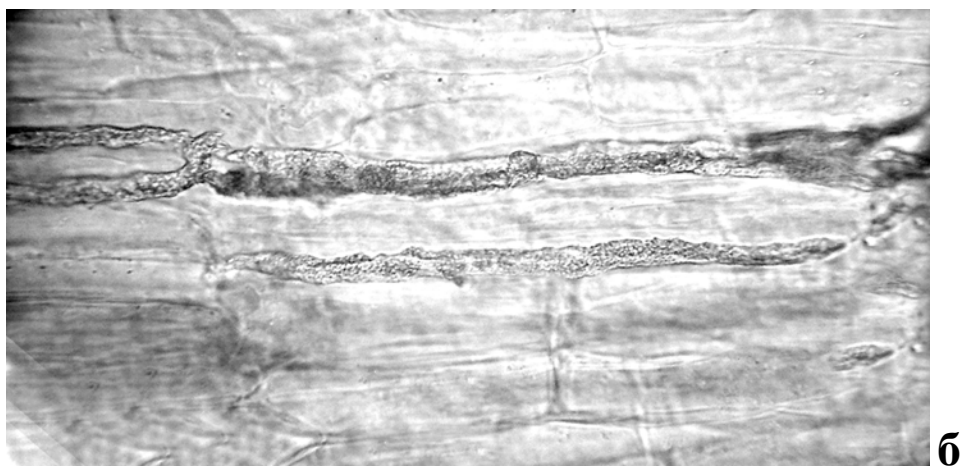


Рисунок 16

Фрагменты анатомического строения семени льна (x420)

Рис. 17. Поперечный срез семени:

1-кожура, 2-эндосперм, 3-зародыш.

Рис. 18. Кожура и эндосперм (а), ткань семядолей (б):

1-кутикула со слизью, 2-одревесневшие клетки, 3-внутренний слой, 4-эндосперм.

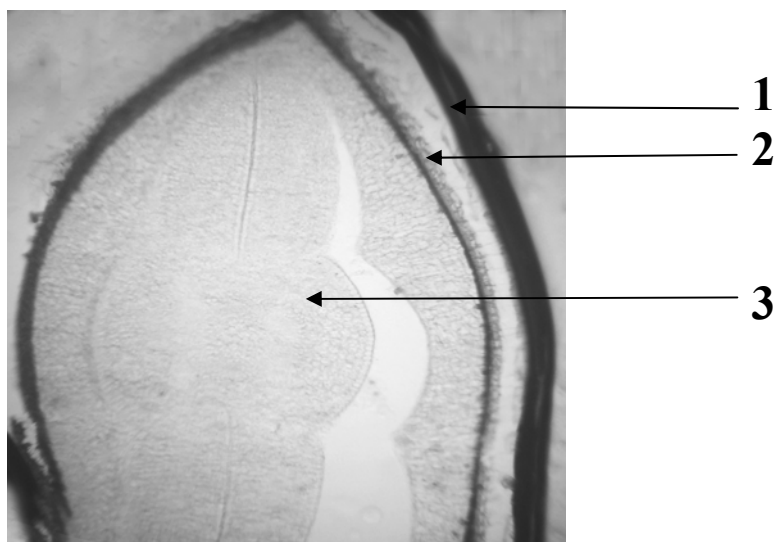
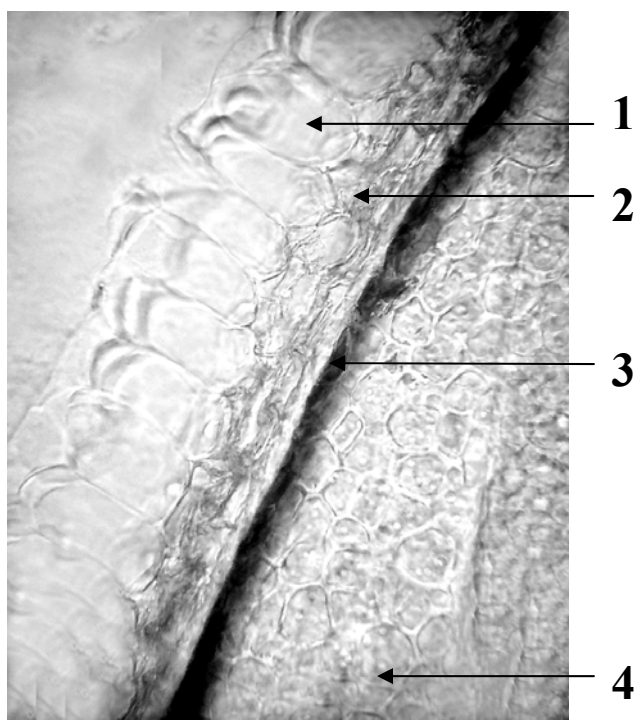
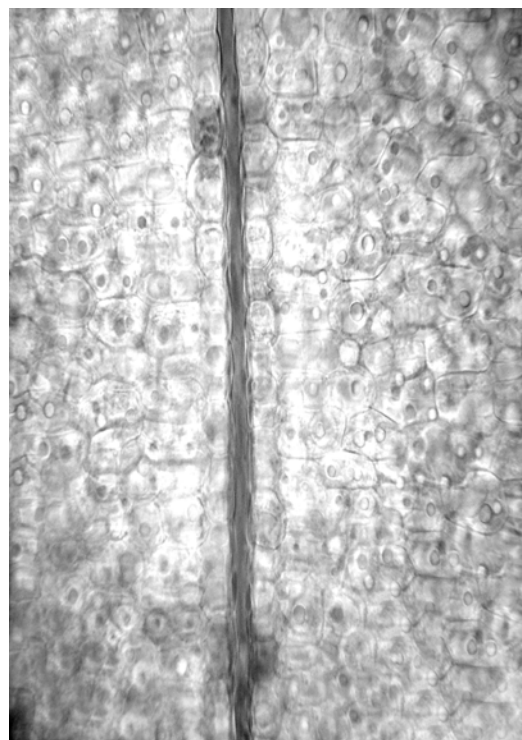


Рисунок 17



а



б

Рисунок 18

Таким образом, в результате проведенного микроскопического и гистохимического исследования нами выявлен ряд диагностически значимых признаков, представленные в таблице 21.

Таблица 21 – Диагностически значимые микроскопические признаки сбора

Название сырья	Микроскопические признаки
Листья крапивы	1. Цистолиты в клетках эпидермиса в виде продолговато-округлых образований 2. Ретортовидные волоски. Клетки эпидермиса у основания волоска образуют розетку. 3. Жгучие волоски с многоклеточным основанием. 4. В крупных жилках – клетки с мелкими друзами оксалата кальция, образующими характерные цепочки.
Трава хвоща	1. Клетки эпидермиса на ребрах сильно удлинённые с утолщёнными прямыми пористыми стенками, без устьиц; на бороздках – слегка удлинённые с более извилистыми пористыми стенками, с устьицами. 2. Устьица с характерной лучистой складчатостью кутикулы. 3. Сосочковидные выросты.
Цветки ноготков	1. Эпидермис у зубчиков язычковых и трубчатых цветков с сосочками. 2. Простые и железистые одно-, двухрядные волоски. 3. Клетки эпидермиса листочков обертки удлинённые с прямыми стенками по краю, в средней части – с извилистыми стенками и устьицами.
Корни одуванчика	1. Крупные овальные клетки паренхимы с млечниками
Семена льна	1. Клетки эпидермиса крупные четырехугольной формы, покрыты толстым слоем кутикулы, содержащие слизь. 2. Клетки эндосперма многоугольной формы, содержащие алейроновые зерна.

С целью получения максимально возможной информации диагностических признаках всех компонентов сбора и диагностики скрытых допустимых и недопустимых примесей нами был проведен микроскопический анализ мелкой фракции сбора, имеющей размер частиц 1 мм и менее. Для этого частицы сбора, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, кипятили в 2,5% растворе щелочи, тщательно промывали водой и готовили микропрепараты. В качестве включающей жидкости использовали глицерин и хлоралгидрат. Всего было приготовлено более десяти микропрепаратов.

При исследовании мелкой фракции сбора под микроскопом видны фрагменты всех составных компонентов, причем в поле зрения наиболее часто встречаются частицы листьев крапивы и травы хвоща, так как из-за хрупкости они очень сильно измельчаются.

Среди фрагментов **листьев крапивы** наиболее часто встречаются: кусочки эпидермиса с цистолитами в клетках и ретортовидными волосками (рис.19б,в,г). Так же в поле зрения видны цельные или части жгучих волосков (рис. 19а), так как из-за хрупкости они обламываются; встречаются кусочки жилок с мелкими друзами оксалата кальция, образующими характерные цепочки (рис.19д). Кроме того, наряду с диагностическими для крапивы элементами присутствуют цельные или фрагменты околоцветника женских цветов, почти до основания рассеченные на неравные доли с коротко-волосистым опушением из ретортовидных волосков (рис.19е). Наряду с этим хорошо заметны яйцевидные, тупозаостренные, сплюснутые семянки с таким же опушением (рис.19ж). Околоцветник и семянки крапивы можно рассматривать как возможные к другим частям растения (стебли, соцветия и пр.).

Среди элементов **травы хвоща полевого** без затруднений дифференцируются кусочки эпидермиса с удлиненными прямыми и извилистыми пористыми стенками (рис. 20а,б,в,г), устьица с лучистой

складчатостью кутикулы (рис. 21а,б), сосочковидные выросты (рис. 21в,г,д) и фрагменты проводящих пучков (рис. 22а,б).

Несколько реже среди остальных составных компонентов мелкой фракции сбора встречаются элементы цветков ноготков и корней одуванчика.

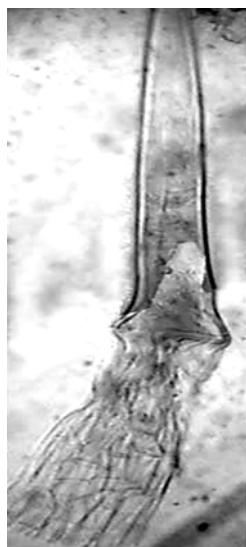
Среди элементов **цветков ноготков** хорошо заметны кусочки эпидермиса с сосочками (рис.23а,б). Так же в поле зрения видны цельные или части простых и железистых одно-, двухрядных волосков (рис.24а, б). Кроме того, встречается округлая, шиповатая пыльца.

Элементы **корня одуванчика** представлены фрагментами коры - клетки паренхимы с млечниками, обрывки сосудов (рис.25 а, б).

Наряду с элементами сбора в поле зрения наблюдаются трудно диагностируемые мелкие частицы растительного сырья и отдельные, или сгруппированные в виде черных бесформенных масс, посторонние кристаллические включения (кремнезем).

Фрагменты анатомического строения листа крапивы мелкой фракции сбора (x84)

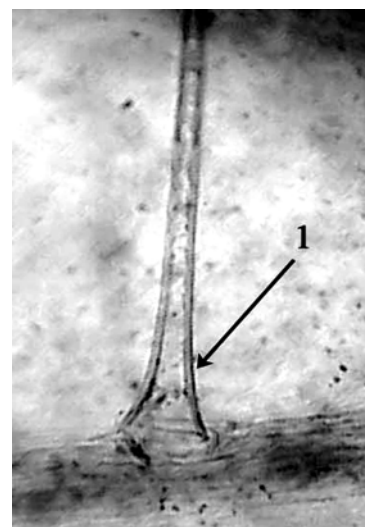
Рисунок 19 – Эпидермис листовой пластинки (б, в, г), фрагменты жгучего волоска (а), жилки (д), околоцветника женского цветка (е) и семянки (ж): 1-ретортовидный волосок; 2-цистолиты; 3-друзы оксалата кальция.



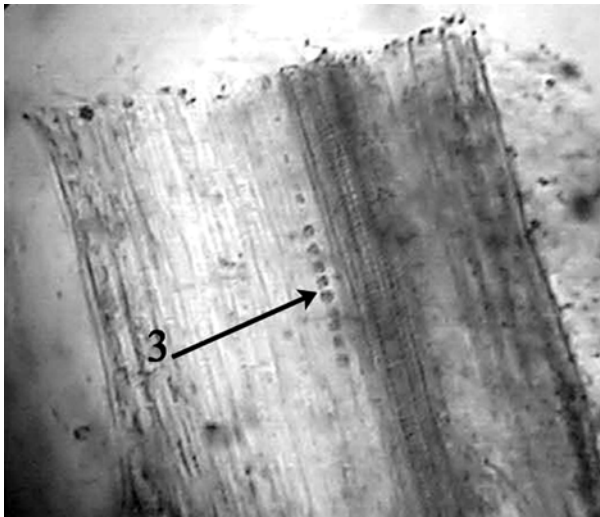
а



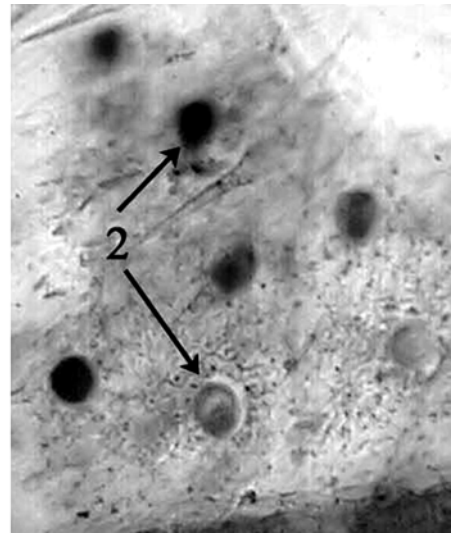
б



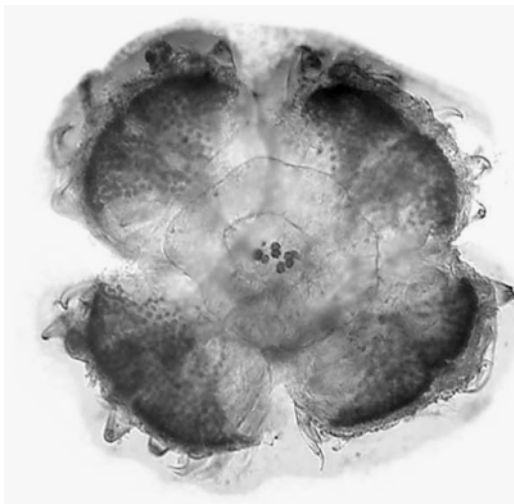
в



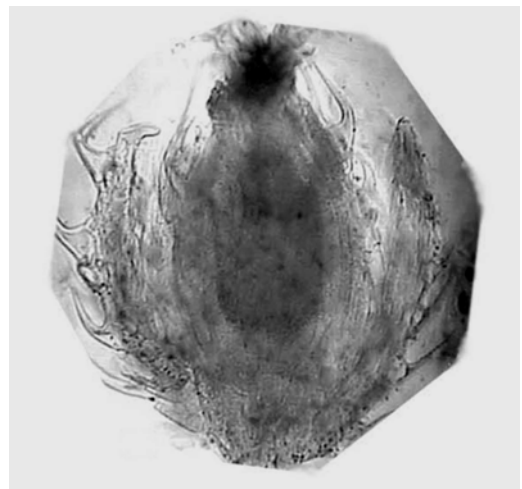
Г



Д



е



Ж

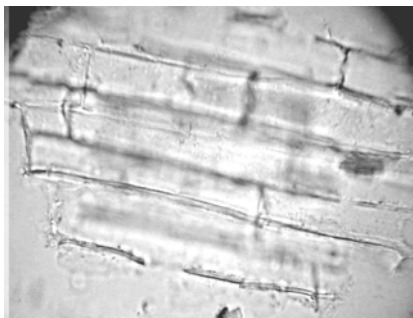
Рисунок 19

Фрагменты анатомического строения травы хвоща полевого мелкой фракции сбора (x84)

Рисунок 20 – Эпидермис на ребрах, в бороздках стебля и ветвей (а,б,в, г).

Рисунок 21 – Устьица (а, б), выросты клеток (в, г, д).

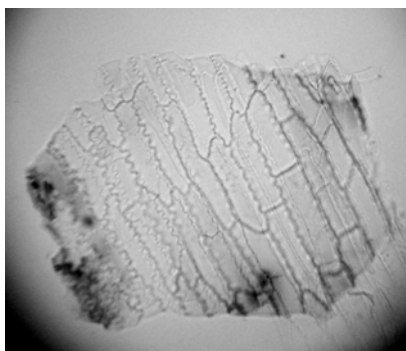
Рисунок 22 – Проводящие пучки (а, б).



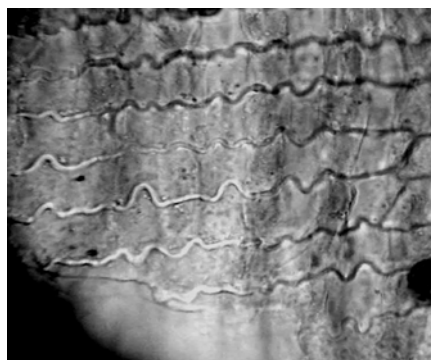
а



б



в

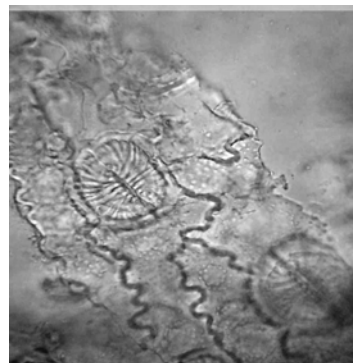


г

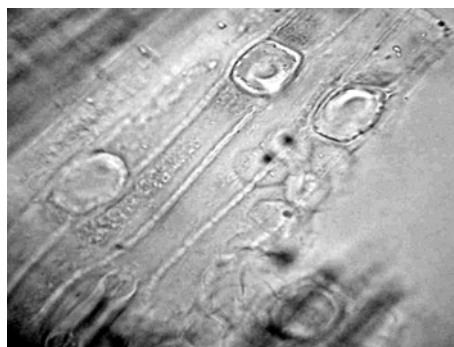
Рисунок 20.



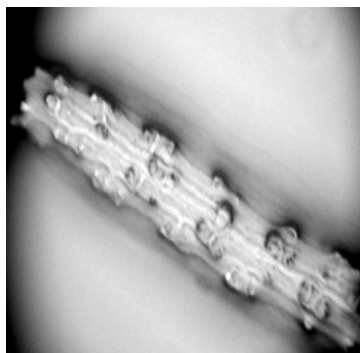
а



б



в



г



д

Рисунок 21

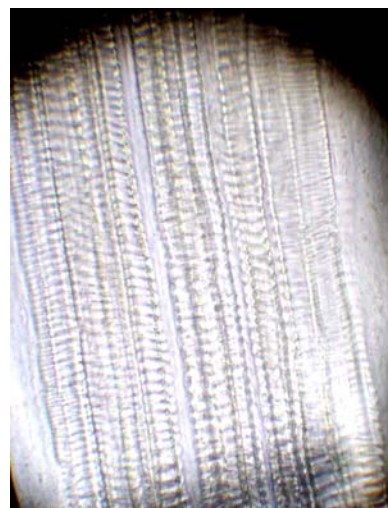
**а****б**

Рисунок 22

**Фрагменты анатомического строения цветка ноготков
мелкой фракции сбора (x84)**

Рисунок 23 – Эпидермис язычкового и трубчатого цветка (а,б),
листочков обертки (в).

Рисунок 24 – Простые (а) и железистые (б) волоски.

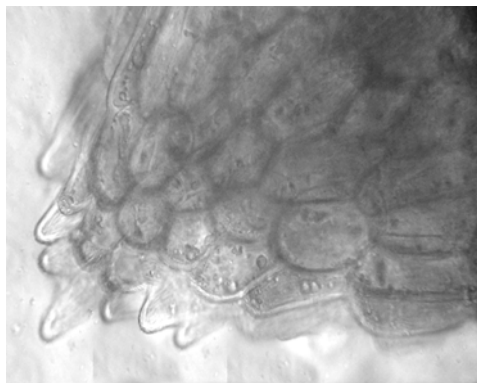
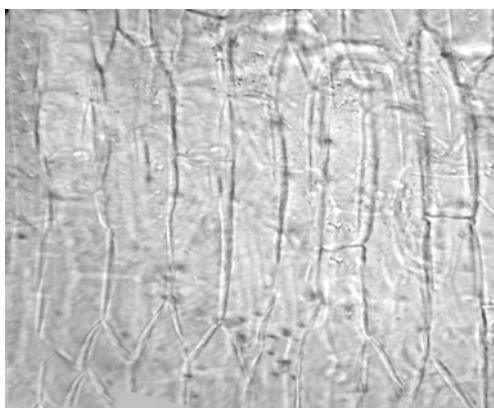
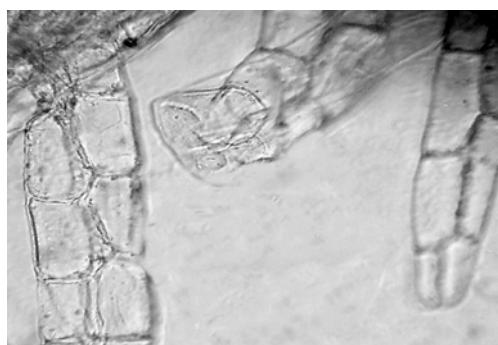
**а****б****в**

Рисунок 23



а

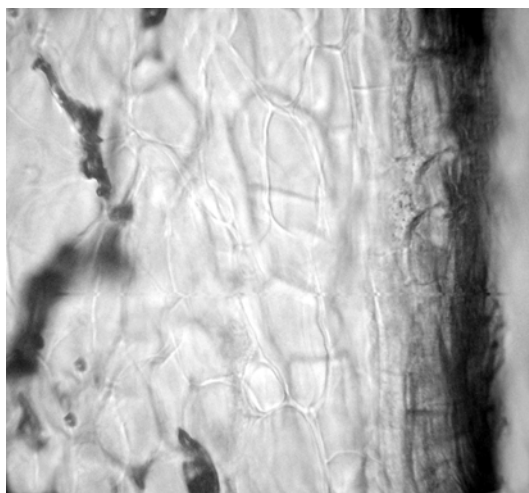


б

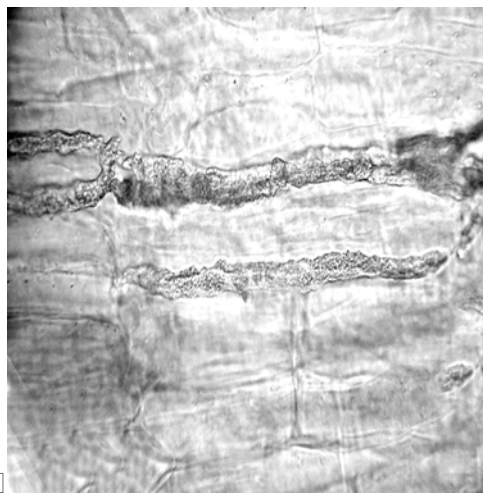
Рисунок 24

**Фрагменты анатомического строения корня одуванчика мелкой
фракции сбора (x84)**

Рисунок 25 Кора (а), млечники (б).



а



б

Рисунок 25

Резюмируя результаты проведенного микроскопического анализа мелкой фракции сбора, следует отметить, что были выявлены четко диагностируемые элементы каждого из компонентов. Представленные рисунки показывают, что на проявляемость специфических анатомо-диагностических признаков компонентов сбора измельченность сырья не оказывает существенного влияния. Кроме того, в мелкой фракции нами были выявлены возможные примеси (семянки и околоцветник цветка крапивы).

Таким образом, на основании полученных результатов нами разработаны и представлены в проекте ФСП «Сбор антимутагенный» числовые показатели данного сырья: содержание флавоноидов, водорастворимых полисахаридов, экстрактивных веществ, влаги, золы и примесей, а также выявлены внешние и микроскопические признаки сбора, позволяющие оценивать его качество в соответствии с современными требованиями.

ГЛАВА 5.

Получение и стандартизация полиэкстракта, оценка его фармакологических свойств

На основе разработанного сбора был получен жидкий экстракт (полиэкстракт). Перевод растительного сбора в суммарный экстракционный препарат связан с низкой стабильностью, а так же с неполным извлечением БАВ и неудобством применения настоя из сбора. Поэтому одной из задач нашей работы явилась разработка технологии жидкого стандартизованного экстракта и твердой лекарственной формы антимуtagenного действия на его основе. Также представлялось необходимым провести оценку антимуtagenных и антиоксидантных свойств, безвредности экстракционного препарата.

5.1. Выбор рационального метода получения экстракта и его стандартизация

Для выбора рационального метода получения экстракта из антимуtagenного сбора нами был проведен сравнительный анализ влияния ряда факторов на выход биологически активных веществ с помощью общепринятых методик [37,59,76,112].

При выборе экстрагента методом микроядерного анализа были изучены антимуtagenные свойства экстрактов, полученных на воде, а также на 20%, 40% и 70% этаноле. Препараты вводились животным внутрижелудочно в дозах 50 и 150 мг/кг массы мыши в объеме растворителя 25 мл/кг. Как и в предыдущих испытаниях, использовали два вида контроля: интактных животных, которым вводили дистиллированную воду в объеме 25 мл/кг и животных подвергавшихся только действию радиации в дозе 1Гр.

Результаты представлены в таблице 22, из которой видно, что при введении мышам перед облучением водного экстракта в дозе 50 мг/кг, наблюдалось наиболее значительное снижение числа микроядер. Близкий уровень антимуtagenной активности продемонстрировал экстракт на 20%

этаноле (введенный в дозе 50 мг/кг), снизивший кластогенную активность радиации в виде уменьшения количества микроядер до 3,11‰ (первые сутки),

Таблица 22. – Антимутагенная активность сбора в зависимости от используемого экстрагента ($M \pm m$, средние из 5 определений)

Экспериментальные группы	Доза, экстракта мг/кг	Число эритроцитов с микроядрами, ‰		
		1 сутки	3 сутки	5 сутки
Экстракт водный+облучение	50	2,37±0,09*	3,43±0,12*	2,10±0,05*
	150	2,83±0,08*	3,38±0,17*	2,22±0,12*
Экстракт на 20% этаноле+облучение	50	3,11±0,11*	3,0±0,10*	2,40±0,12*
	150	3,45±0,13*	3,11±0,13*	2,32±0,10*
Экстракт на 40% этаноле+облучение	50	4,0±0,27*	4,33±0,23*	3,00±0,15*
	150	4,0±0,10*	4,66±0,23*	3,00±0,12*
Экстракт на 70% этаноле+облучение	50	5,41±0,27	4,57±0,10*	3,10±0,11*
	150	4,29±0,18	4,66±0,11*	2,90±0,10*
Интактные животные	-	1,8±0,04*	1,83±0,05*	1,70±0,08*
Облученные животные (контроль)	-	5,66±0,11	7,02±0,04	4,10±0,06

примечание: * - отмечены значения достоверно отличающиеся от контроля ($p < 0,05$)

затем на третьи и пятые сутки снижение числа микроядер в эритроцитах доходило до 3,0‰ и 2,32‰ соответственно.

В группе животных, получавших экстракт на 70% этаноле эффект снижения числа микроядер, индуцированных радиацией был менее выражен, и доходил до 4,29, 4,57 и 2,9‰ на первые, третьи и пятые сутки соответственно.

Кроме того, для обоснования выбора экстрагента нами изучена динамика извлечения флавоноидов и экстрактивных веществ из сбора водой, 20%, 40% и 70% этанолом [59]. Определение суммы экстрактивных веществ проводили по методике профессора Ю.Г. Пшукова [116]. Результаты исследований представлены в таблице 23.

Как видно из данных таблицы, максимальное количество экстрактивных веществ извлекается водой, а наименьшее – 70% этанолом. Но при выборе экстрагента остановились на 20% этаноле, т.к. первостепенное значение имеет природа БАВ. Так, доминирующими БАВ антимутагенного сбора, являются

флавоноиды и полисахариды. Полисахариды лучше всего извлекаются водой, а флавоноиды этанолом 70% концентрации. В случае экстракции водно-спиртовой смесью извлекаются вещества как липофильного, так и гидрофильного характера и замедляется гидролиз. Полученные извлечения, по сравнению с водой, обладают устойчивостью к микробной контаминации. Кроме того, экстракт на 20% этаноле по степени антимуtagenной активности приближается к водному экстракту (табл. 22). Поэтому в дальнейшем при разработке технологии жидкого экстракта в качестве экстрагента применяли 20% этанол.

Таблица 23. – Влияние технологических факторов на полноту извлечений флавоноидов и экстрактивных веществ из антимуtagenного сбора

($M \pm m$, средние из 5 определений)

Факторы	Значение	Экстрактивные вещества, %	Флавоноиды, %
Продолжительность настаивания	6 часов	10,25±0,33	1,14±0,01
	12 часов	16,04±0,07	1,21±0,02
	24 часа	17,85±0,04	1,24±0,01
Вид экстрагента	Вода горячая	17,89±0,47	0,89±0,02
	Этанол 20%	15,60±0,06	1,05±0,01
	Этанол 40%	13,55±0,45	1,18±0,16
	Этанол 70%	12,13±0,23	1,23±0,04

Продолжительность настаивания (табл. 23) существенно влияла на выход экстрактивных и биологически активных веществ из сбора. Изучение влияния продолжительности настаивания вели с экстрагентом – этанол 20%; сырье с размером частиц, регламентируемым ГФ-ХІ: трава – 5 - 7 мм, листья -4-8мм, корни – 3 - 5 мм и семена – 2 - 4 мм. С целью сокращения продолжительности эксперимента экстрагирование проводили методом ускоренной мацерации при интенсивном перемешивании; экспозиция каждого настаивания варьировала от 6 до 24 ч. Максимум истощения по экстрактивным веществам и

флавоноидам достигается к 24 часам экстракции, разница с 12 часами незначительна.

Для изучения полноты и скорости экстрагирования, определения расходных норм сырья и экстрагента, а также для управления процессом экстрагирования были определены следующие технологические параметры: влажность, содержание экстрактивных веществ, доброкачественность сырья, насыпная масса, коэффициенты наполнения сухого и набухшего сырья, коэффициенты вытеснения, образования внутреннего сока, поглощения сырья и насыпной массы [37,59,76]. Результаты исследования технологических свойств сбора представлены в таблице 24.

Таблица 24. – Технологические свойства сбора

Параметры качества	Показатели качества
В - влажность, %	$7,3 \pm 0,02$
Х - содержание СЭВ, %	$23,26 \pm 0,08$
А - Доброкачественность, %	$0,43 \pm 0,02$
γ - насыпная масса, г/см ³	$0,14 \pm 0,01$
F - коэффициент наполнения сухого сырья, см ³ /г	$5,48 \pm 0,06$
N - коэффициент наполнения набухшего сырья, см ³ /г	$8,03 \pm 0,01$
Δ - коэффициент вытеснения, см ³ /г	$1,64 \pm 0,02$
К – коэффициент образования внутреннего сока см ³ /г	$2,44 \pm 0,06$
Кп = коэфф. поглощения	$2,312 \pm 0,04$

С помощью полученных коэффициентов наполнения сухого и набухшего сырья осуществляли подбор рабочего объема диффузоров. Основываясь на данных литературы [59,76,93,112] и используя коэффициенты вытеснения, образования внутреннего сока, поглощения сырья и насыпную массу, определяли количество экстрагента, необходимое для настаивания и перколяции.

Для получения стандартизованного экстракта сбора применяли метод реперколяции, турбоэкстракции (вихревой) и роторно-кавитационный метод (с

оптимизацией процесса экстрагирования ультразвуком). На данном этапе, изучался выход флавоноидов, полисахаридов, каротиноидов и химических элементов, а также экстрактивных веществ в зависимости от способа экстрагирования. Сравнение содержания БАВ и степени истощенности сырья, представленное в таблице 25, а также влияние метода экстрагирования на выход химических элементов (табл. 26,27,28), демонстрирует возможность использования всех методов для получения экстракта.

Таблица 25. – Сравнительная характеристика методов экстрагирования

Метод получения экстракта	БАВ, %					
	экстрактивные вещества		полисахариды		Флавоноиды	
	В экстракте	Истощение	В экстракте	Истощение	В экстракте	Истощение
Реперколяция	15,9± 0,06	68,6±0,6	9,7± 0,22	58,8± 0,12	0,68± 0,17	55,3±0,11
Вихревая экстракция	20,7± 0,12	76,1±0,8	10,2± 0,18	60,3± 0,9	1,07± 0,05	74,8±0,10
Роторно-кавитационная	16,6± 0,10	71,3± 0,8	9,65± 0,11	58,5± 0,13	0,84± 0,12	68,3±0,19

Таблица 26. – Содержание элементов в экстрактах полученных методом реперколяции по Н.Д. Чулкову

Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %
Ca	0,98	Zn*	19,55	Co*	0,44
Na	0,15	Br*	20,44	Sm*	0,092
Fe	0,17	Ba*	13,39	Lu*	<0,01
Cr*	20,00	Se*	0,40	U *	<0,098
Yb*	<0,082	As*	<0,44	Th*	0,076
Au*	0,02	La*	0,33	Hf*	0,04
Sr*	55,55	Cs*	0,16	Tb*	<0,012
Ag*	0,078	Sc*	0,11	Rb*	24,12
Eu*	0,01	Sb*	0,05	Ta*	0,033
Hg*	0,02				

Примечание: * - содержание элемента %*10⁻⁴

Таблица 27. – Содержание элементов в экстрактах полученных роторно-кавитационным методом

Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %
Ca	1,12	Zn*	22,51	Co*	0,47
Na	0,17	Br*	19,00	Sm*	0,08
Fe	0,13	Ba*	20,01	Lu*	<0,02
Cr*	22,70	Se*	0,92	U*	<0,087
Yb*	<0,09	As*	<0,30	Th*	0,082
Au*	0,011	La*	0,31	Hf*	0,03
Sr*	57,20	Cs*	0,12	Tb*	<0,02
Ag*	0,089	Sc*	0,144	Rb*	27,22
Eu*	0,03	Sb*	0,11	Ta*	0,052
Hg*	-				

Примечание: * - содержание элемента $\% \cdot 10^{-4}$

Таблица 28. – Содержание элементов в экстрактах полученных методом турбоэкстракции

Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %	Элемент	Содержание, %
Ca	1,31	Zn*	21,57	Co*	0,57
Na	0,17	Br*	20,62	Sm*	0,086
Fe	0,14	Ba*	19,77	Lu*	<0,014
Cr*	23,49	Se*	0,98	U*	<0,089
Yb*	<0,089	As*	<0,35	Th*	0,071
Au*	0,019	La*	0,37	Hf*	0,035
Sr*	57,53	Cs*	0,14	Tb*	<0,017
Ag*	0,089	Sc*	0,147	Rb*	27,14
Eu*	0,021	Sb*	0,107	Ta*	0,053
Hg*	-				

Примечание: * - содержание элемента $\% \cdot 10^{-4}$

Вместе с тем, данные, представленные в таблице 25, показывают, что предпочтительным для получения экстракционных препаратов является метод вихревой экстракции, так как позволяет наиболее полно извлечь полисахариды, флавоноиды и экстрактивные вещества, а также добиться наибольшей степени истощенности сырья. К преимуществам указанного метода можно отнести сокращение времени экстракции растительного материала до 4 часов вместо 7 суток. При этом основными факторами, влияющими на процесс экстракции, являются температурный режим и интенсивное перемешивание сырья.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами была предложена технология получения жидкого экстракта методом турбоэкстракции. Жидкий экстракт получали на 20% этаноле в соотношении 1:10 методом турбоэкстракции (вихревой), при этом в течение экстракции изменялся температурный режим экстрагента.

5.1.1. Получение экстрактов с помощью метода турбоэкстракции

Метод основан на интенсивном перемешивании в среде экстрагента с помощью быстроходных мешалок. Скорость вращения мешалок от 3000 до 5000 об/мин. В процессе экстрагирования в таких условиях изменяется способ обтекания частиц сырья экстрагентом, толщина ламинарного слоя становится минимальной (слой почти исчезает), конвективная диффузия протекает мгновенно. Высокая скорость перемешивания создает условия неравномерного давления на поток обрабатываемой смеси; в системе возникает эффект кавитации и пульсации, что положительно сказывается на скорости внутренней диффузии. Время экстрагирования материала сокращается до 4 часов вместо 7 суток как при использовании классического метода – мацерации [40,42].

Устройство и принцип работы аппарата

Цилиндрическую емкость загружали растительным сырьем, затем заливали 20% этанолом. После этого на замоченное сырье подавали горячий экстрагент (температура 90⁰С) в соотношении сырье и экстрагент 1:10. В начальный период экстрагирования при $t = 90^0\text{C}$ время составляло 10 минут, затем мешалка отключалась на 30 минут. Во втором цикле снова подключалась мешалка и экстракция производилась при температуре 60-70⁰С в течение 40 минут. Следующий цикл экстракции проводился без мешалки. К концу экстракции первичное извлечение охлаждалось до 20⁰С. Полученное первичное извлечение процеживалось через двойной слой марли, затем

осветлялось при $t\ 8^{\circ}\text{C}$. Очищенное извлечение упаривали и сушили конвективным способом.

Стандартизацию полученного жидкого экстракта проводили согласно ГФ IX по внешнему виду, содержанию этанола, сухому остатку [37,86], содержанию флавоноидов и полисахаридов. Результаты представлены в таблице 29.

Количественное содержание флавоноидов и полисахаридов нормирующих качество экстракта, проводилось по методикам, описанным в главе 2, и модифицированным применительно к жидкому экстракту.

Таблица 29. – Параметры качества полиэкстракта

№	Параметры качества	Значение параметра
1	Внешний вид	жидкость темно-бурого цвета, характерного запаха
2	Концентрация этанола, %v	19,59±0,95
3	Плотность, г/см	0,9486±0,03
4	Флавоноиды, %	1,07±0,07
5	Полисахариды, %	10,2±0,08
6	Сухой остаток, %	20,7± 0,02
7	Тяжелые металлы	удовлетв. (по сырью)

Готовый продукт – жидкий экстракт представляет собой жидкость темно-бурого цвета, с характерным запахом, сладковато-горького вкуса.

5.2. Исследование фармакологических свойств жидкого экстракта

5.2.1. Оценка безвредности (острой токсичности)

При исследовании острой токсичности проводили эксперименты на 10 беспородных белых мышах-самцах средней массой 18-20 гр. Экстракт вводили однократно в желудок через зонд в виде водного раствора в дозах от 5000 до 10000 мг/кг [69,92]. При наблюдении в течение 14 суток у животных не отмечали изменений поведенческих реакций, признаков диареи, каких-либо других токсических патофизиологических проявлений. Гибель животных не наступила. Следовательно, экстракт из сбора согласно ГОСТ 121007-76 (Государственный стандарт на вредные вещества) можно отнести к 4 классу: «вещества малоопасные».

5.2.2. Антимутагенная активность

Антимутагенную активность экстракта из сбора на 20% этаноле, оценивали как это указано выше (глава 2), с помощью микроядерного анализа. Для индукции мутагенеза использовали внутрибрюшинное введение диоксидина (ДН) («Фармакон», Санкт-Петербург) в дозе 200 мг/кг и циклофосфана (ЦФ) («Биохимик», Саранск) в дозе 40 мг/кг. Мыши получали мутагены и исследуемый экстракт однократно на срок 24 часа, забор крови и приготовление мазков осуществляли на первые, третьи и пятые сутки после введения препаратов.

Анализ данных эксперимента, представленный в таблице 30, показывает полное отсутствие кластогенных свойств у исследуемого экстракта введенного даже в высокой дозе (500 мг/кг).

Вместе с тем, введение циклофосфана в дозе 40 мг/кг и диоксидина в дозе 200 мг/кг приводило к повышению, по сравнению с интактным контролем, содержания эритроцитов с микроядрами в периферической крови. На этом фоне, введение экстракта из сбора в дозе 150 мг/кг одновременно с ЦФ приводило к уменьшению числа микроядер до 4,15‰ на третьи сутки

исследования (в группе животных получавших циклофосфан без введения экстракта число микроядер в эритроцитах 5,90‰); в дальнейшем, на пятые сутки исследования, снижение числа микроядер в данной группе животных доходило до 3,90‰ (в контроле 5,55‰).

Таблица 30. – Влияние полиэкстракта на число эритроцитов с микроядрами в крови мышей, на фоне действия мутагенов – диоксидина и циклофосфана

Вид эксперимента	Доза, мг/кг	Число эритроцитов с микроядрами, ‰		
		1 сутки	3 сутки	5 сутки
экстракт	50	1,65±0,09*	1,80±0,05*	1,90±0,13*
экстракт	150	1,75±0,10*	1,95±0,09*	1,85±0,05*
экстракт	500	1,90±0,13*	2,00±0,16*	1,95±0,12*
ЦФ	40	5,60±0,50*	5,90±0,80*	5,55±0,10*
экстракт+ЦФ	50	5,00±0,10*	4,90±0,35*	4,30±0,50*
экстракт+ЦФ	150	4,75±0,20*	4,15±0,80*	3,90±0,40*
ДО	200	4,80±0,09*	6,80±0,40*	5,10±0,30*
экстракт+ДО	50	3,50±0,20*	4,00±0,22*	3,55±0,15*
экстракт+ДО	150	4,70±0,12*	4,50±0,13*	4,00±1,0*
Интактные животные	-	1,70±0,05*	1,85±0,07*	1,80±0,05*

Примечания: * - достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

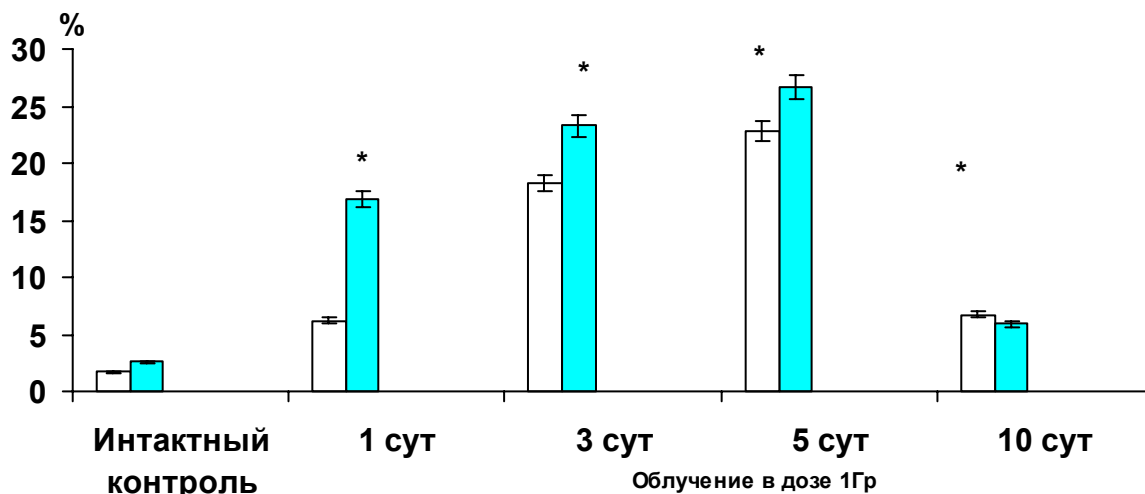
Из таблицы видно, что экстракт в дозе 50 мг/кг снижал число клеток с микроядрами в случае совместного введения с диоксидином. Так, через 24 часа после введения препаратов, снижение числа микроядер составляло 3,50‰, на третьи сутки 4,00‰, и на пятый день – 3,55‰ (в контрольной группе число микроядер составляло 4,80, 6,80, и 5,10 промилле на первые, третьи и пятые сутки соответственно).

Исходя из полученных нами данных, можно утверждать, что полиэкстракт на 20% этаноле, обладает антимуtagenными свойствами, что выражается в способности его БАВ снижать частоту индуцированных ЦФ и ДО микроядер в периферической крови мышей.

5.2.3. Влияние экстракта на цитогенетические нарушения хромосом, вызванные ионизирующей радиацией

Опыты проведены на мышах, которым вводили экстракт из сбора, а затем их облучали рентгеновскими лучами в дозе 1 Гр. Всего в эксперименте использовали 60 мышей. Анализ хромосом и приготовление препаратов из клеток костного мозга проводили обычным способом [56]. Результаты исследований обобщены в виде диаграмм на рисунках 26, 27.

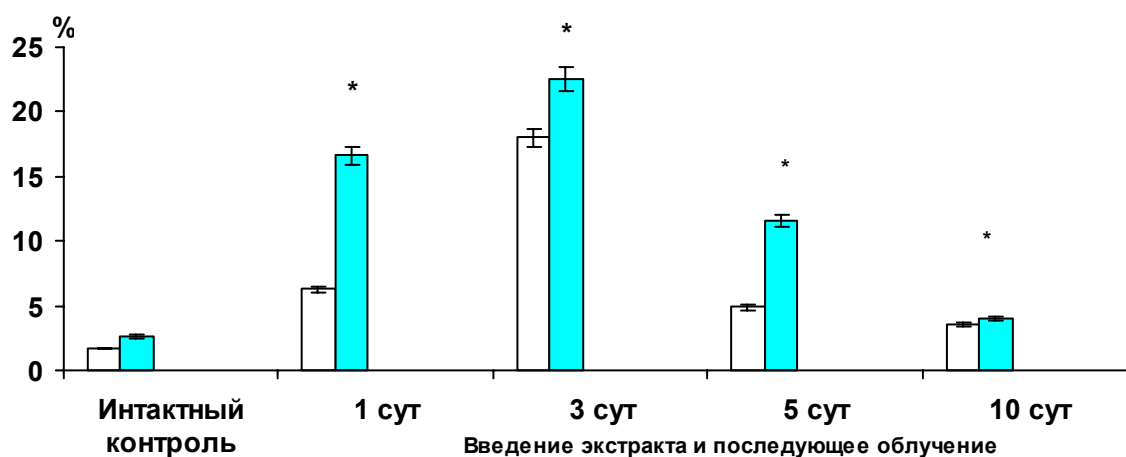
Как видно из рисунка 26, облучение мышей в дозе 1 Гр. индуцирует через 1 сут. $6,2 \pm 0,9\%$ клеток со структурными нарушениями хромосом (в контроле - $1,7 \pm 0,4\%$; $P < 0,01$) и $16,8 \pm 1,6\%$ клеток с измененным числом хромосом (в контроле - $2,6 \pm 0,4\%$; $P < 0,01$). Через 2 сут. частота наблюдаемых клеток со структурными нарушениями хромосом возрастает до $18,3 \pm 1,2\%$, а клеток с измененным числом хромосом — до $23,3 \pm 1,6\%$. Через 5 сут. соответствующие показатели возрастали до $22,8 \pm 1,1$ и $26,7 \pm 1,2\%$ (во всех случаях $P < 0,01$), а через 10 сут. наблюдается постепенная нормализация в частоте клеток с нарушениями в числе и структуре хромосом (соответственно $5,9 \pm 0,4$ и $6,7 \pm 0,5\%$; $P < 0,05$).



Примечание: - клеток со структурными абберациями, - клеток с измененным числом хромосом

Рисунок 26. – Уровень клеток (%) с цитогенетическими нарушениями в клетках костного мозга мышей, подвергнутых облучению в дозе 1Гр

Экстракт из сбора не оказывал заметного защитного действия на первый день после облучения (число клеток со структурными aberrациями $6,3 \pm 0,4\%$, с измененным числом хромосом $16,6 \pm 1,2\%$) (рис. 27). На 3 сутки после введения, экстракт также не оказывал значительного влияния на частоту клеток с хромосомными нарушениями у облученных мышей (частота клеток со структурными aberrациями $18,0 \pm 1,4\%$, с измененным числом хромосом $22,5 \pm 0,7\%$), и только на 5 сутки после введения экстракта происходило заметное уменьшение числа клеток с нарушениями в числе и структуре хромосом. Так, если у мышей через 5 сут. после облучения частота клеток со структурными нарушениями составляла $22,8 \pm 1,8\%$, то при введении экстракта сбора на этом фоне - $4,9 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$), а частота клеток с измененным числом хромосом снижалась с $26,7 \pm 1,0\%$ до $11,5 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$).



Примечание: – клеток со структурными aberrациями, – клеток с измененным числом хромосом

Рисунок 27. – Уровень клеток с цитогенетическими нарушениями в клетках костного мозга мышей, подвергнутых облучению в дозе 1Гр на фоне введения экстракта сбора.

Как показывают данные рисунка 27, наиболее значительное уменьшение числа клеток с нарушениями в структуре и числе хромосом наблюдалось на 10 сутки после введения экстракта. Так, число клеток с нарушениями в структуре хромосом после облучения составляло $3,6 \pm 0,9\%$, а число клеток с измененным

числом хромосом - $4,0 \pm 0,6\%$, т.е. снижалось до уровня, близкого контрольному ($p < 0,05$).

Таким образом, совокупность описанных данных дает основание утверждать, что экстракт из сбора способен значительно уменьшать число клеток с цитогенетическими нарушениями (в числе и структуре хромосом), вызванными ионизирующей радиацией.

5.2.4. Влияние экстракта на активность эксцизионной ДНК-репарации

Результаты изучения последствий стимуляции ДНК-репарации УФ-облучением и введением 4-НХО представлены в таблице 31 свидетельствуют о том, что индекс стимуляции различен при введении витамина А и экстракта сбора.

Таблица 31. – Уровень активности эксцизионных ДНК-репаративных процессов в культурах Т – лимфоцитов после введения экстракта из лекарственных растений и витамина А

Показатели		Контроль	Больные	
			после введения витамина А	после введения экстракта
Индекс стимуляции ДНК-репаративной активности (в усл. ед.)	УФ	$2,9 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,2^*$	$5,7 \pm 1,1^*$
	4-НХО	$3,2 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,3^*$	$7,6 \pm 1,8^{**}$

* - достоверные отличия от контроля: одной при $P < 0,01$; двумя при $P < 0,05$

Если витамин А слабо влиял на этот показатель, преимущественно в сторону его снижения, то при введении экстрактов растений этот показатель был достоверно выше, чем в контроле: $5,7 \pm 1,1$ при стимуляции УФ-лучами (в контроле $2,9 \pm 0,4$) и $7,6 \pm 1,8$ при стимуляции 4-нитрохинолин-1-оксидом – (в контроле $3,2 \pm 0,4$).

Таким образом, описанные данные позволяют предполагать, что именно способность к активации ДНК-репаративных процессов является одним из

возможных механизмов антимуtagenного эффекта экстракта из сбора лекарственных растений. Усиление под влиянием экстракта процессов репарации ДНК, вероятно, не единственная причина его антимуtagenного действия. В нем могут участвовать и процессы связывания биологически активными веществами сбора свободных радикалов, образующихся под влиянием мутагенов.

5.2.5. Антиоксидантная активность

Антиоксидантную активность жидкого экстракта из сбора определяли, как указано в п.п. 2.2.2, используя метод катодной вольтамперометрии [73,104,177]. Результаты исследований представлены в таблице, из которой заметно, что экстракт из сбора обладает выраженным антиоксидантным действием (значение К составило 0,412 и 0,602 мкмоль/л при концентрациях $3.8 \cdot 10^{-4}$ и $3.8 \cdot 10^{-3}$ соответственно) сравнимым с эффектом препаратов сравнения – аскорбиновой кислоты и дигидрокверцетина.

Таблица 32. – Антиоксидантная активность экстракта из сбора на фоне препаратов сравнения – аскорбиновой кислоты (АсКис) и дигидрокверцетина (ДГКвер)

образец	С раб, г/мл	К, мкмоль/л мин	г	Sr
экстракт	$3.8 \cdot 10^{-4}$	0.412	0.99	0.043
	$3.8 \cdot 10^{-3}$	0.602	0.99	0.042
ДГКвер	$3.85 \cdot 10^{-5}$	0.589	0.989	0.032
	$1.92 \cdot 10^{-4}$	0.781	0.987	0.038
АсКис	$3.97 \cdot 10^{-4}$	0.683	0.995	0.062
	$1.19 \cdot 10^{-3}$	1.15	0.983	0.054

Примечание: С – концентрация препарата, К – коэффициент антиоксидантной активности, г – коэффициент корреляции - ошибка линеаризации прямой, Sr – относительное стандартное отклонение.

При этом при повышении концентрации экстракта на порядок, наблюдается значительное повышение антиоксидантной активности. Вышеописанные данные дают основание считать, что выявленная антиоксидантная активность может являться одним из механизмов антимуtagenного действия экстракта из сбора.

ВЫВОДЫ:

1. В результате экспериментальных исследований водных экстрактов полученных из сырья 41 вида растений произрастающих и культивируемых на территории Сибири была научно обоснована пропись антимуtagenного сбора, в состав которой вошли в равных количествах листья крапивы двудомной, цветки календулы лекарственной, трава хвоща полевого, семена льна обыкновенного, и корни одуванчика лекарственного.
2. В составе антимуtagenного сбора установлено содержание основных групп БАВ в следующих количествах: суммы фенольных соединений – 2,22%, флавоноидов – 1,36%, фенолкарбоновых кислот – 0,72%, кумаринов - 0,053%, суммы полисахаридов – 16,48%, водорастворимых полисахаридов – 8,65%, пектиновых веществ – 0,98%, гемицеллюлозы А – 4,86%, гемицеллюлозы Б – 1,99%; аскорбиновой кислоты – 46мг%; витамина К – 0,14%, каротиноидов – 121мг%, хлорофилла – 13мг%.
3. Элементный состав сбора обладающего антимуtagenным действием представлен 28 макро и микроэлементами, из которых в наибольших количествах содержатся такие жизненно важные элементы как кальций (0,89%), железо (0,032%), цинк ($6,3 \cdot 10^{-4}$), кобальт ($0,22 \cdot 10^{-4}$), и селен ($0,30 \cdot 10^{-4}$).
4. В проект ФСП для определения доброкачественности предложенного сбора рекомендовано включить следующие показатели качества: содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин не менее 1%; суммы водорастворимых полисахаридов не менее 8%, экстрактивных веществ извлекаемых 20% этанолом не менее 20%; влажность не более 14%, золы общей не более 13%, золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 4%, частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм не более 1,00 %, частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,1 мм не более 1,00 %, органической примеси не более 2%, минеральной примеси не более 3%.

5. Для идентификации сбора предложены внешние и микроскопические диагностические признаки, входящих в него компонентов (структура эпидермиса, характерные волосы и минеральные включения), а также химические реакции на слизь и инулин.
6. Показана возможность получения стандартизованного экстракта из антимуtagenного сбора методами турбоэкстракции, реперколяции, а также роторно-кавитационным методом.
7. Изучение специфической активности жидкого экстракта сбора показало, что он снижает мутагенное действие ионизирующей радиации, диоксида и циклофосфана у мышей, активизирует процессы эксцизионной ДНК-репарации в культуре клеток, проявляет антиоксидантную активность и вызывает значительное уменьшение числа клеток с нарушениями в структуре и числе хромосом вызванными рентгеновским облучением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. «Листья крапивы» / Государственная фармакопея СССР, изд. 11-е, 1989, вып.2.,ст 25.: Изменение №1 от 14.11.1996.
2. «Листья крапивы» / Государственная фармакопея СССР, изд. 11-е, 1989, вып.2.,ст 25.: Изменение №2 от 20.08.1997
3. «Методы микробиологического контроля лекарственных средств»: Раздел «Требования, предъявляемые к микробиологической чистоте готовых лекарственных средств, основного сырья (субстанций) и вспомогательных материалов» / Государственная фармакопея СССР, изд. 11-е, 1989, вып. 2., стр. 187.: Изменение от 01.06.96.
4. Агамов А.Г. Возможности использования растительных препаратов в онкологии / А.Г. Агамов, С.В. Чепоров, В.А. Романов // Современные проблемы фармакогнозии и фармации: Межвузовский сборник научных трудов, посвященный 15-летию кафедры фармакогнозии Ярославской государственной медицинской академии / Ярославская гос. мед.акад. – Ярославль: Изд-во техн. Ун-та, 1999. – С.15-16.
5. Адекенов С.М. Биологически активные вещества растений и перспективы создания новых лекарственных препаратов / С.М. Адекенов / Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов / Книга 2. Биологически активные вещества растений, их химическая модификация и биоскрининг. – Алматы: Гылым, 2004. – С.7-17.
6. Алекперов У.К. Антимутагенез. Теоретические и практические аспекты / У.К. Алекперов. – М.: Наука, 1984. – 100 с.
7. Алекперов У.К. Антимутагены и проблема защиты генетического аппарата. / У.К. Алекперов. – Баку: 1979. – 114с.
8. Андреева В.Ю. Химическое исследование надземной части манжетки обыкновенной / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. - № 2. – С.79-85.
9. Анतिकанцерогенная и антиметастатическая активность индукторов интерферона природного и синтетического происхождения с выраженными

- антимутагенными свойствами / Г.Н. Золотарева, А.С. Кинзирский, Н.С. Логинова и др. // Доклады АМН СССР. – 1991. Т.317, №4. – С.992-996.
10. Антикластогенная активность апо-каротина *in vivo* / А.Д. Дурнев, Л.С. Тюрина, Н.В. Гусева и др. // Эксперим. и клин. фармакол. - 1997. - Т. 60.- №3. - С. 68-70.
11. Антимутагенная и антиоксидантная активность краун-соединений в сравнении с эффектами экстракта чеснока / Г.Д. Засухина, И.М. Васильева, Е.С. Михальчик и др // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т.135.-№3. – С.302-305.
12. Антимутагенная активность аспартама / А.В. Кулакова, Е.Г. Белоголовская, А.В. Орещенко, и др. // Эксперим. и клин. фармакол. – 1999. – Т.62.-№4. С. 48-50.
13. Антиоксидантные свойства природных фенолов / А.Д. Гордиенко, Н.Ф. Комисаренко, В.В. Левченко и др. // Тез. докл. пятого всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям. – Таллин. – 1987. С. 32-33.
14. Аскорбилпальмитат – антимутаген мембранного действия / Е.Г. Тырсина, О.Г. Россихина, Ю.А. Тырсин, С.К. Абилов // Доклады АН СССР. -1991.-Т.318.- №4. – С.992-994.
15. Аскорбиновая кислота как антимутаген / Р. Шрам // Тез. докл. Междунар. конф. по проекту №12 программы Юнеско «Человек и биосфера». М., 1984. – С.93-94.
16. Балицкий К.П. Лекарственные растения и рак / К.П. Балицкий ., А.Л. Воронцова. – Киев: Наук.думка, 1982. – 376 с.
17. Бандюкова В.А. Тонкослойная хроматография флавоноидов / В.А.Бандюкова, А.А. Шинкаренко // Химия природных соединений.- 1983.- №1.- С.20-24.
18. Бариляк И.Р. Антимутагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения / И.Р. Бариляк, А.В. Исаева // Цитология и генетика. – 1994. – №3. – С.3-17.

19. Басова Е.В. Химико-фармакологическое изучение багульника болотного: Автореф. Дис. ...канд.фарм.наук / Е.В. Басова. – Томск, 2004. – 22 с.
20. Беляков К.В. Количественное определение полисахаридов в листьях мать-и-мачехи (*Tussilago farfara* L.) / К.В. Беляков, Д.М. Попов // Фармация. – 1999. - № 1. – С. 23–24.
21. Блинова О.А Стандартизация хвойного хлорофиллина натрия, разработка состава, технологии лечебных и лечебно-профилактических средств на его основе: Автореф.дис...канд.фарм.наук / О.А. Блинова. – Пермь, 1998. – 31с.
22. Богачева Н.Г. Стандартизация лекарственного растительного сырья облепихи крушиновидной / Н.Г. Богачева, Н.П. Кокушкина, Т.А. Сокольская // Фармация. – 2001. - № 1. – С. 12-13.
23. Бочков Н.П. Генетика человека (наследственность и патология) / Н.П. Бочков. – М., Медицина,- 1978. -377 с.
24. Васильева И.М. Сравнение протекторного эффекта чесночного экстракта и защиты клеток при адаптивном ответе / И.М. Васильева, Г.Д. Засухина // Генетика. - 2002. –Т.38.-№3.-С.422-425.
25. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. – 1998. - №7. – С.43-51.
26. Влияние приема витаминов на чувствительность лимфоцитов периферической крови к кластогенному действию мутагенов *in vitro* / А.Д. Дурнев, В.А. Никитина, О.А. Вржесинская и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002.-Т.134.-№9. – С.303-307.
27. Влияние β -каротина и аспартама на кластогенную активность циклофосфамида и диоксида у мышей / Е.Г. Белоголовская, А.В. Орещенко, А.Д. Дурнев и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000.-Т.130.-№11. – С.570-573.
28. Влияние бемитила на продукцию антител к ДНК у больных системной красной волчанкой / Т.А. Лисицина, А.Д. Дурнев, М.М. Иванова и др. // Эксперим. и клин. фармакол. – 1999. – Т.62.-№5. С. 38-41.

29. Влияние суммарного экстракта из *Taraxacum officinale* Wigg. на эффективность лечения мышей с перевиваемыми опухолями / Т.Г. Разина, Е.П. Зуева, Е.Н. Амосова и др. // Растительные ресурсы. – 1998. – Т.34, Вып. 1. – С. 64-68.
30. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е.А.Краснов, Т.П.Березовская, Н.В. Алексеук и др. Под ред. Е.Е.Сироткиной.- Томск,1987.- 184 с.
31. Гариков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. Методы обнаружения и оценки ошибок / А.К.Гариков.- Ленинград: Химия, 1984.- 168 с.
32. Георгиев В.Н. Фармакологическое изучение антимуtagenных свойств убихинона-10 (Q-10): Автореф. дис... канд. биол. наук / В.Н. Георгиев. – Москва, 1994. – 24с.
33. Георгиев В.Н. Убихиноны и антимуtagenная защита организма / В.Н. Георгиев, А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин // Вопросы медицинской химии., М.: Медицина – 1994.-№5. – С.8-9.
34. Георгиевский В.П. Физико-химические методы анализа биологически активных веществ растительного происхождения / В.П. Георгиевский, Н.А. Казаринов, М.О. Каррыев. – Ашхабад: Ылым, 1976. – 240 с.
35. Гончарова Р.И. Антимуtagenны как средства защиты наследственности в экстремальных условиях / Р.И. Гончарова, Т.Д. Кужир // Сборник статей по материалам конференции «Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях», Москва, 26-29 сент. 2000 г. – Москва. – 2000. Т.1. С. 122-124.
36. Гончарова Р.И. Антимуtagenез как генетический процесс / Р.И. Гончарова // Вестник РАМН.- М.:Медицина – 1993.-№1. – С.26-33.
37. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР.-11-е изд., доп.- М: Медицина,1989.- 400 с.

38. Гринкевич Н. И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.А. Сафронич.- Москва: Высшая школа, 1983.- 176 с.
39. Гусейнов М.Б. Изучение антимутагенной активности экстракта из плодов фейхоа: Автореф. дис... канд.биол.наук / М.Б. Гусейнов. – Баку, 1992. – 11с.
40. Джафарова С.Д. Генотоксичность ионов фтора и возможность коррекции фториндуцированного мутагенеза: Автореф. дис...канд.биол.наук / С.Д. Джафарова. – Баку, 1994. – 25с.
41. Дзюба Н.П. Установление качественного и количественного состава полисахаридов в растительном сырье и препаратах физико-химическими методами / Н.П. Дзюба, Г.Я. Хант, В.Н. Цушенко // Фармацевтический журнал.- 1975. - №6.- С.54-58.
42. Дмитриев А.Б. Спектрофотометрическое определение флавонолов и изофлавонолов при совместном присутствии / А.Б. Дмитриев, А.Л. Казакова // Хим.-фарм. Журн., -1981. – Т.15, № 12. – С.90-93.
43. Драницина В.Б. Микроэлементы – химически и фармакологически активные ингредиенты лекарственных растений: Автореф. дис...канд. биол. наук / В.Б. Драницина. - Ярославль, 1975. – 26 с.
44. Дурнев А.Д. Комутагенез – новое направление исследований в генотоксикологии / А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003.-Т.135.-№6. – С.604-611.
45. Дурнев А.Д. Модификация мутационного процесса в клетках человека / А.Д. Дурнев // Вестник РАМН. – 2001. -№10. – С. 70-77.
46. Дурнев А.Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания / А.Д. Дурнев // Генетика. – 1997. – Т.33. - №2. С.165-176.
47. Дурнев А.Д. Фармакологические проблемы поиска и применения антимутагенов / А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин // Вестник РАМН. – 1993. -№1. – С.19-25.
48. Ермакова В.А. Фармакогностическое изучение и стандартизация сборов, брикетов, растительных порошков: Автореф.дис...докт.фармац.наук / В.А. Ермакова. – Москва,1999. – 46 с.

49. Ефимов С.Н. Антимутагенная активность лекарственных растений Сибирского региона / С.Н. Ефимов, С.И. Дмитрук, Н.Н. Ильинских // Бюллетень Сибирской медицины. – 2004. – Т.3, -№3. – С.17-26.
50. Ефимов С.Н. Радиопротекторное действие препаратов растительного происхождения / С.Н. Ефимов, А.Г. Семенов // Сборник статей по результатам международной 62-ой итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова (21-23 апреля 2003 г.) – Томск., 2003 – 330 с. – с. 192.
51. Ефимов С.Н. Изучение антимутагенной активности природных биологически активных веществ околоплодника гречихи посевной / С.Н. Ефимов, А.Г. Семенов, Д.Л. Стахеев // Современные проблемы фундаментальной и клинической медицины: Сборник статей молодых ученых и студентов / результаты 60-ой юбилейной конференции им. Н.И. Пирогова. - Томск, 2001. - С.131-132.
52. Жанатаев А.К. Сравнительное изучение антимутагенной активности афобазола при различных режимах введения / А.К. Жанатаев, А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 2000. -Том 130, -№11. – С.539-542.
53. Зайчикова С.Г. Фармакогностическое изучение сырья травы чины посевной (*Lathyrus sativus* L.) / С.Г. Зайчикова / Фармация. – 2002. - № 3. – С. 15–16.
54. Засухина Г.Д. Мутагенез, антимутагенез, репарация ДНК / Г.Д. Засухина, Т.А. Синельщикова // Вестник РАМН.- М.:Медицина. – 1993. -№1. – С.9-14.
55. Засухина Г.Д. Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды / Г.Д. Засухина. – М.:Наука, 1979.- 183 с.
56. Зеликсон Ю.И. История и тенденции развития сборов / Ю.И. Зеликсон, Т.С. Кондратьева // Фармация. – 2001. -№2. – С.45-48.
57. Ивасенко С.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография природных соединений / С.А. Ивасенко / Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов / Книга 2. Биологически активные

вещества растений, их химическая модификация и биоскрининг. – Алматы: Гылым, 2004. – С. 382-407.

58. Изучение антимутагенной активности гипоксена *in vivo* / О.А. Карпова, Л.В. Михина, А.А. Денисов, М.К. Кузьмич // Эксперим. и клин. фармакол. – 2002. – Т.65.-№3. С.54-56.

59. Изучение процесса экстракции и количественное определение суммы биологически активных веществ в суммарном препарате желчегонного действия / Г.И. Российская, Т.Л. Даргаева, Л.И. Брутко и др. // Фармация. – 1985. - №6. – С.18-21.

60. Ильинских Н.Н. Использование микроядерного теста при анализе генотоксического действия мутагенов на человека, животных и растения / Н.Н. Ильинских / Всесоюз.симпоз. «Объем и методы генотоксической оценки и побочных эффектов биологически активных веществ».-Ленинград, 1989. – С.48.

61. Ильинских Н.Н. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет / Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, Е.Ф. Бочаров. – Новосибирск: Наука, 1986. – 256с.

62. Ильинских Н.Н. Инфекционный мутагенез / Н.Н. Ильинских, Е.Ф. Бочаров, И.Н. Ильинских – Новосибирск: Наука, 1984.-168 с.

63. Исследование антимутагенной активности бета-каротина / В.М. Хабибулина., С.А. Коростелев., О.Б. Дризе и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1995. - Т. 120.- N 9. - С. 276-278.

64. Карбышев А.В. Химико-фармакологическое изучение гумата натрия из сапропеля: Автореф.дис...канд.фарм.наук / А.В. Карбышев. – Пермь, 1999. – 24с.

65. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов / В.Н.Карнаухов. - Москва, 1988.-197с.

66. Качественный анализ флавоноидов в растительном материале при помощи хроматографии на бумаге: Метод.рекомендации / Сост. В.А.Бандюкова, А.Л.Шинкаренко.-Пятигорск, 1972.-21с.

67. Кивман Г.Я. Проблемы нормирования микробиологической чистоты лекарственного растительного сырья / Г.Я. Кивман, Т.А. Шуб, В.С. Чудаева // Хим. – фармацевт. журнал. – 1994. – № 6. – С. 60-62.
68. Клышев Л.К. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования) / Л.К.Клышев, В.А.Бандюкова, А.С.Алюкина. - Алма-Ата: Наука, 1978.-220с.
69. Количественное и качественное определение алифатических кислот / (для исследования пищевых и лекарственных растений) - методическое указание / Томск, 1986.- 16с.
70. Коломиец Н.Э. Сравнительное химико-фармакологическое исследование растений рода *Equisetum*: Дис. ...канд.фарм.наук / Н.Э. Коломиец. – Томск, 2003. – 156 с.
71. Компанцева Е.В. Идентификация и количественное определение флавоноидов в многокомпонентном лекарственном средстве кардиотонического действия / Е.В. Компанцева, А.Ю. Айрапетова // Фармация. – 2000. - № 1. – С. 40-41.
72. Корепанов С.В. Травы против рака / С.В. Корепанов. – Барнаул, 2002. – 16 с.
73. Короткова Е. И. Вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов. / Е.И. Короткова // Журн. Физич. химии. – 2000. – Т. 74, № 9. – С. 1704—1706.
74. Косман В.М. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений растительного происхождения в обращено-фазовой ВЭЖХ. Флавоны, флавонолы, флавононы и их гликозиды. / В.М. Косман, И.Г. Зенкевич // Растительные ресурсы. – 1997. – Т.33, Вып.2. – С.18-25.
75. Костеша Н.Я. Пути повышения резистентности организма при действии ионизирующего излучения: Автореф.дис...д-ра мед.наук / Н.Я. Костеша. – Москва, 2001. – 56с.

76. Кравченко Н.В. Выбор оптимальных размеров частиц при совместном экстрагировании различных видов сырья, входящего в состав сборов / Н.В. Кравченко, И.А. Муравьев, Ю.Г. Пшуков // Фармация. – 1985. – С.9-12.
77. Кужир Т.Д. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот / Т.Д. Кужир. – Мн.:Тэхналогія, 1999. – 267 с
78. Кужир Т.Д. Влияние антиоксидантов на формирование индуцированных этилметансульфонатом разрывов хромосом в зависимости от систем материнской репарации у *Drosophila melanogaster* / Т.Д. Кужир О.В. Даливеля // Вестник РАМН. – 1993. – №1. – С.56-64.
79. Кулакова А.В. Изучение мутагенной и антимутагенной активности новых фармакологических препаратов, обладающих мембранотропными свойствами: Автореф.дис...канд.биол.наук / А.В. Кулакова. – Москва, 1998. – 23с.
80. Куркин В.А. Фенилпропаноиды – перспективные природные биологически активные соединения / В.А.Куркин.- Самара, 1996.-80с.
81. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф.Лакин. – М., 1990.- 156 с.
82. Лежнева Л.П. Исследования по расширению области использования крапивы двудомной в медицине: Автореф.дис...канд.фарм.наук / Л.П. Лежнева. – Пятигорск, 1986. – 22 с.
83. Лекарственные препараты в России: Справочник. / М.: АстраФармСервис, 2004 г.-1488 с.
84. Лунин Ю.Л. Хроматографическое разделение каротиноидов растительного происхождения / Ю.Л. Лунин, Е.А. Симонова // Химико–фармацевтический журнал. – 1991. -№9. – С.75-77.
85. Львова Г.Н. Модификация репаративного синтеза ДНК при адаптивном ответе и воздействии антимутагена – чесночного экстракта в фибробластах человека, обработанных мутагенами / Г.Н. Львова, Г.Д. Засухина // Генетика. – 2002. – Т.38.-№3. С.306-309.
86. Макаров М.Т. Стандартизация спиртосодержащих жидких лекарственных форм фитопрепаратов / М.Т. Макаров, К.А. Краснов, Н.А. Тюкавкина // Фармация. – 1997.-№5. – С.20-22.

87. Меджидов М.М. Исследование цитологического и цитогенетического действия селеносодержащих соединений: Автореф дис...канд.биол.наук / М.М. Меджидов. – Баку, 1980. – 27 с.
88. Медико-биологические аспекты каротиноидов / А.В. Сергеев, А.В. Вакулова, М.Я. Шашкина, Т.А. Жидкова // Вопросы медицинской химии. 1992. Т.38. - №6. – С.8-12.
89. Методы токсикологических исследований при разработке новых лекарственных препаратов и современные требования к ним / Е.В. Арзамасцев // Сборник научных трудов: Состояние и перспективы исследований биологически активных веществ из растений и создание на их основе новых лекарственных препаратов.-М.,1983.-С.119-123
90. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей: Метод.пособие / Сост: Г.Г. Фурст. – М., 1979. – 155 с.
91. Методы исследования углеводов / Пер. с англ. В.А. Несмеянова; Под. ред. А.Я. Хорлина. – М., 1975. – 445 с.
92. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н.Н.Ильинских, В.В.Новицкий, Н.Н.Ванчугова, И.Н.Ильинских.-Томск: Изд-во Том. Ун-та, 1991.-272с.
93. Минина С.А. Оптимизация процесса экстрагирования корня женьшеня. / С.А. Минина, Л.В. Шигарова, В.А. Вайнтейн // Химико-фармацевтический журнал. – 1998. - №7. – С.42-44.
94. Мкртчян Л.Н. Действие препарата «Лоштак» на кластогенную активность циклофосфана / Л.Н. Мкртчян, А.К. Нерсисян, А.Г. Паносян // Генетика, -1995. –Т.31.-№5.-С.729-731.
95. Муравьева Д.А. Фармакогнозия: Учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.:Медицина, 2002. – 656с.
96. Нестерова Е.В. Модификация лацидипином кластогенного эффекта диоксидина in vivo / Е.В. Нестерова, А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин / Эксперим. и клин. фармакол. – 2000. – Т.63.-№4. С. 48-52.

97. Никулина Е.В. Возможности фитотерапии в онкологии / Е.В. Никулина, В.Ф. Корсун // Современные проблемы фармакогнозии и фармации: Межвузовский сборник научных трудов, посвященный 15-летию кафедры фармакогнозии Ярославской государственной медицинской академии. – Ярославль: Изд-во техн. Ун-та, 1999. – С.118-121.
98. Омарова Н.М. Масляные экстракты крапивы и солодки как средства коррекции токсических эффектов противоопухолевых химиотерапевтических средств / Н.М. Омарова / Развитие фитохимии и перспективы создания новых лекарственных препаратов / Книга 2. Биологически активные вещества растений, их химическая модификация и биоскрининг. – Алматы: Гылым, 2004. – С. 270-276.
99. Определение содержания суммы флавоноидов в траве душицы обыкновенной / М.Н. Лякина, А.К. Виноградов // Научные труды: Фармация на современном этапе – проблемы и достижения. – М., 2000. – Т. XXXIX., Ч. 2. – С. 74-79.
100. Определение суммы фенолкарбоновых кислот в корнях лопуха большого (*Arctium lappa* L.) / Д.А. Шматков, Д.М. Попов // Научные труды: Фармация на современном этапе – проблемы и достижения. – М., 2000. – Т. XXXIX., Ч. 2. – С. 174-178.
101. Определение микроэлементов в лекарственном растительном сырье, заготавливаемом в Московской области / С.Н. Спирова, В.И. Шиянов, С.С. Стуловский и др. // Фармация. – М., 1993. – Т. XLII., № 3. – С. 44–48.
102. Определение фенольных соединений глауцима желтого, одуванчика лекарственного, полыни горькой и крымской / Л.Я. Ладная, Л. В. Бензель, О.Я. Самофал и др.// Тез. докл.респ.научн. конф.: Оптимизация лекарственного обеспечения и пути повышения эффективности фармацевтической науки., Харьков, 1986.- С. 216-217.
103. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств: Метод.реком. Фармкомитета МЗ РФ, Ведом.фармакол.комитета. 1998,- № 4,- с. 32-39.

104. Патент № 2002-115-232 РФ Вольтамперометрический способ определения активности антиоксидантов. Е.И. Короткова, Ю.А. Карбаинов.
/ от 6.06.2002г.
105. Перминова И.Н. Различия в индивидуальной чувствительности к антимуtagenному действию ретинола в лимфоцитах рабочих, контактирующих с соединениями никеля / И.Н. Перминова, М.Н. Яковлева, Н.И. Алехина, Г.Д. Засухина // Генетика, 2001. –Т.37.-№8.-С.1165-1168.
106. Петрова Ч.А. Фармакогностическое исследование сборов для лечения хронического панкреатита / Ч.А. Петрова, Т.И. Плеханова, К.А. Пупыкина // Здравooхранение Башкортостана, спец.выпуск. – 2002. – №2. – С.89.
107. Петрова Ч.А. Определение острой токсичности сбора, применяемого для лечения хронического панкреатита в стадии обострения / Ч.А. Петрова // Вопросы теоретической и практической медицины: Матер. 67-й Республиканской научно-практической конф. – Уфа, 2002. – С.65.
108. Петрова Ч.А. Фитохимический анализ растительных сборов, применяемых в гастроэнтерологии / Ч.А. Петрова, К.А. Пупыкина, А.В. Козлов // Медицинская наука 2002: Матер. Республ. конф. Молодых ученых, посвященной Году Здоровья, 70-летию БГМУ и дню Медицинского работника. – Уфа, 2002. – С.172.
109. Печенникова Е.В. О биологическом значении микроэлементов (обзор зарубежной литературы) / Е.В. Печенникова, В.В. Вашкова, Е.А. Можаяев // Гигиена и санитария. – 1997.-№ 4. – С.41-43.
110. Полная энциклопедия народной медицины: В 2-х т. / Москва: Олмапресс, 1998. -466 с.
111. Поляков В.В. Биологически активные соединения растений рода *Populus* L. и препараты на их основе / В.В. Поляков, С.М. Адекенов. – Алматы: Гылым, 1999. – 160 с.
112. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья / В.Д. Пономарев.- Москва: Медицина,1976.-204с.

113. Потанина О.Г. Исследование анатомо-диагностических признаков сбора грудного №2 / О.Г. Потанина, И.А. Самылина // Фармация. – 2001. - № 5. – С. 23–24.
114. Потенциальная роль антимутагенного эффекта препарата ксимедона в модификации иммунореактивности / Г.В. Черепнев, К.В. Малышев, Ю.Д. Слабнов и др. // Эксперим. и клин. фармакол. – 2000. – Т.63.-№6. С.43-48.
115. Прибыткова Л.Н. Флавоноиды растений рода *Artemisia* / Л.Н. Прибыткова, С.М. Адекенов. – Алматы: Гылым, 1999. – 180 с.
116. Пшуков Ю.Г. Методика одновременного определения коэффициентов поглощения, образования внутреннего сока и увеличения объема при растворении экстрактивных веществ / Ю.Г. Пшуков // Фармация. – 1990. - № 4. – С. 24-27.
117. Растительные фенолы – перспективные источники эффективных лекарственных препаратов / С.М. Николаев // Тез. докл. пятого всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям. – Таллин. – 1987. С.78-79.
118. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; семейства Magnoliaceae – Limoniaceae./ Л.: Наука, 1984. – 460 с.
119. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). / Спб.: Наука, 1993. – 352с.
120. Ратахина Л.В. Некоторые фармакологические свойства настоя крапивы двудомной / Л.В. Ратахина, Н.И. Суслов, В.Г. Пашинский // Тез.докл.на науч. – исслед. конф. по актуальным проблемам фармакологии и поиску новых лекарственных препаратов, 1987 г. – Томск, -Т.3.-С.31-33.
121. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ / Гигиенические критерии состояния окружающей среды, - №51. – М.,1989. – С. 116-117.
122. Сайтембетова А.Ж. Природные фенольные соединения – перспективный источник антиоксидантов / А.Ж. Сайтембетова, С.М. Адекенов. – Алматы: КазгосИНТИ, 2001. – 165 с.

123. Салихова Р. А. Антимутагены как средства, снижающие отрицательные воздействия на организм факторов окружающей среды / Р. А. Салихова., И.В. Александрова., Г.Г. Порошенко // Туберкулез и экология. - 1995.- N 1.- С. 9-12.
124. Салихова Р.А. Изучение антимутагенных свойств дудника лекарственного (*Angelica archangelica* L.) микроядерным тестом / Р.А. Салихова., Ш.Н. Дулатова., Г.Г. Порошенко.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - Москва, Медицина. – 1993. -№4. – С.371-372.
125. Салихова Р.А. Изучение антимутагенности биоженъшеня / Р.А. Салихова, Н.В. Умнова, М.М. Фомина, Г.Г. Порошенко // Известия РАН – серия биологическая. - 1994.-№1.- С.48-55.
126. Севостьянова Н.В. Антимутагенный эффект гумизоля в культурах Т-лимфоцитов крови, подвергнутых воздействию циклофосфана / Н.В. Севостьянова // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 1998. – № 4. – С.46-47.
127. Семагина Н.В. Изучение экстракции биологически активных веществ из лекарственного сырья под действием ультразвука / Н.В. Семагина, М.Г. Сульман, Э.М. Сульман, Т.В. Анкудинова // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. - № 2.– С. 26-29.
128. Семенов В.В. Модификация адреналином мутагенного действия этилметансульфоната / В.В. Семенов, М.Я. Ибрагимова, Б.И. Барабанщиков / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1998. Том 126,- №10.– С.427-429.
129. Семенов В.В. Рецепторно-регуляторные механизмы действия антимутагенов / В.В. Семенов // Вестник РАМН. -М.:Медицина. – 1997. -№7. – С.28-32.
130. Семенов В.В. Количественные и качественные критерии оценки эффективности антимутагенов в эксперименте / В.В. Семенов, И.А. Студенцова // Вестник РАМН. – Москва, Медицина. – 1993. -№3. – С.16-20.

131. Серебряный А.М. Стимулированная репопуляция как основа феноменов антимуtagenеза и адаптивного ответа у растений / А.М. Серебряный, Н.Н. Зоз // Генетика.- 2002. –Т.38.-№3.-С.340-346.
132. Сокольник И.Г. Антиоксидантные свойства некоторых биофлавоноидов в радиационной защите организма: Автореф. дис. ...канд.мед.наук / И.Г. Сокольник. – Минск, 1991г. – 14 с.
133. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М., 1990. – 464 с.
134. Спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов в сборе «Гепифит» / Г.И. Миназова, С.Б. Денисова, В.Т. Данилов и др. // Фармация. – 1997. - № 1. – С. 27–28.
135. Сравнительное изучение антимутагенной активности лечебно-профилактических напитков и каротинсодержащих препаратов / М.А. Шлянкевич, А.В. Сергеев, З.Ф. Голубева и др. // Вестн. онкол. науч. центра АМН СССР. – 1993. - №1. –С.8-10.
136. Стимуляция репарации ДНК у рабочих, контактирующих с хлористым кадмием, витаминами, используемыми в качестве антимутагенов / И.М. Васильева, В.В. Чекова, Г.Н. Львова и др. // Доклады АН СССР. - 1991.-Т.418.- №2. – С.440-445.
137. Стрельчук С.И. Противомутагенное действие экстрактов элеутерококка на растениях, обработанных этиленметансульфонатом / С.И. Стрельчук // Цитология и генетика. -1987., Т. 21.- №2. – С.136.
138. Терновая С.В. Фармакологическая защита генома кроветворных клеток при действии циклофосфана в эксперименте: Дис...канд.мед.наук. / С.В. Терновая.– Томск, 2001. – 168 с.
139. Тонкослойная хроматография флавоноидов: Метод.рекомендации / Сост. В.А.Бандюкова, А.Л.Шинкаренко.- Пятигорск, 1973.- 15с.
140. Тутельян В.А. Селен как эссенциальный и дефицитный фактор в питании населения России / В.А. Тутельян, С.А. Хотимченко // Вестник РАМН. – 2001. - №6. – С.31-34.

141. Фенольные антиоксиданты – модификаторы метаболизма, токсического, мутагенного и канцерогенного действия бенз (а)-пирена / У.Э. Кирсо, А.Х. Лопп, В.В. Ершов и др. // Тез. докл. пятого всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям. – Таллин. – 1987. С. 52-53.
142. Фомичева Е.А. Изучение компонентного состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот хроматографическими методами / Е.А. Фомичева, З.П. Костенникова // Фармация. –2001. - № 3. – С. 17-19.
143. Фомичева Е.А. Количественное определение флавоноидов методом спектрофотометрии / Е.А. Фомичева, М.Н. Лякина, З.П. Костенникова // Фармация. – 2001. - № 5. – С. 13-15.
144. Хабибулина В.М. Антимутагенные свойства бета-каротин содержащих препаратов: Автореф.дис... канд. биол. наук. / В.М. Хабибулина. – Казань, 1998. – 20с.
145. Хефтман Э.П. Хроматография: практическое приложение метода. В 2-х частях / Э.П. Хефтман, Т.А. Кастер, А.А. Нидервизер - М.: Мир, 1986. – 336с.
146. Хромосомы человека (атлас). / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская - М., Медицина, - 1982, 264 с.
147. Худолей В.В. Модификация мутагенеза и антиканцерогенез / В.В. Худолей // Вестник РАМН. – 1992. – №6. – С.34-41.
148. Худолей В.В. Антимутагены и профилактика рака / Худолей В.В., Мизгирев И.В., Майорова И.Г. // Актуальные вопросы онкологии – Сборник научных трудов посвященных пятидесятилетию кафедры онкологии АГМИ. – Барнаул – 1992. – С.66-88.
149. Шатц В.Л. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В.Л. Шатц, О.В. Сахартова. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
150. Шашкина М.Я. Биодоступность каротиноидов / М.Я.Шашкина, П.Н.Шашкин, А.В.Сергеев // Вопросы медицинской химии.-1999.-№2.-С.22-26.
151. Шлянкевич М.А. Использование пищевых продуктов и лекарственных растений для профилактики злокачественных опухолей/ Шлянкевич М.А.,

Сергеев А.В., Голубева З.Ф. // Актуальные вопросы онкологии – Сборник научных трудов посвященных пятидесятилетию кафедры онкологии АГМИ. – Барнаул – 1992. С.109-140.

152. Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage / D. Anderson // *Mutat.Res.*-1996.-Vol.350.-№1.-P.103-108.

153. Ahn B-Y. Antimutagenic effect of tanshen (Salvia miltiorrhiza Bunge) / B-Y Ahn; D-G Kim; D-S Choi // *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* -1999;27(3):- P.197-202.

154. Antimutagenesis of beta-carotene to mutations induced by quinolone on *Salmonella typhimurium* / M. Arriaga-Alba, R. Rivera-Sanchez, G. Parra-Cervantes et al. // *Arch. Med. Res.*- 2000, Mar-Apr;31(2):-P.156-161.

155. Antimutagenesis studies of magnesium and calcium salts / G. Bronzetti, P. Aretini, C. Ambrosini et al. // *Environmental Pathology Toxicology Oncology* - 2000;19(4):-P. 401-413.

156. Antimutagens in food plants eaten by Polynesians: micronutrients, phytochemicals and protection against bacterial mutagenicity of the heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline / K.J. Botting, M.M.Young, A.E. Pearson et al. // *Food. Chem. Toxicol.*-1999 Feb-Mar;37(2-3):-P. 95-103.

157. Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food / R. Edenharder, A. Worf-Wandelburg, M. Decker, K.L. Platt // *Mutat. Res.*-1999.- Jul 21;444(1)-P. 235-248.

158. Antimutagenesis and anticancer effects / G. Bronzetti, C. Della Croce, P. Aretini, R. Fiorio // *Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*- 1996;15(2-4):-P. 59-64.

159. Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L. / R. Elias, M. De Meo, E. Vidal-Ollivier et al. // *Mutagenesis*.— 1990.— Vol. 5, № 4.— P. 327–331.

160. Boucaud-Maitre Y. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts / Y Boucaud-Maitre, O Algernon, J Raynaud // *Pharmazie*.— 1988.— Vol. 43,- № 3. – P. 220–221.
161. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: A review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. / R. Dashwood, T. Negishi, H. Hayatsu et al. // *Mutat. Res.*-1998 Mar 20;399(2):- P. 245-53.
162. Chromosomal peripherations of leukocytes cultured from human peripheral blood / P.S. Moorhead, P.C. Nowell, W.J. Mellman et al. // *Exp.Cell. Res.*-1960 - v.20- P. 613-616.
163. De Flora S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and cancerogenesis / S. De Flora // *Mutat.Res.* -1998.-Vol.402, №1-2. – P.158-162.
164. Effects of chlorophyllin on acetaldehyde: lack of modulation of the rate of sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow, and of complex formation in aqueous solution. / R. Torres-Bezauri, E. Madrigal-Bujaidar, RI. Alvarez-Gonzalez et al. // *Food. Chem. Toxicol.* -2002 Oct;-40(10):-P. 1507-1513.
165. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. / J.M. Gentile, S. Rahimi, J. Zwiesler et al. // *Mutat Res.* 1998 Jun -18;402(1-2): -P.289-298.
166. Effect of cobaltous chloride on spontaneous mutation induction in a *Bacillus subtilis* mutator strain / T. Inoue, Y. Ohta, Y. Sadaie, T. Kada. // *Mutat.Res.*-1981.- Vol.91.- №1.- P.41-45.
167. Ferguson L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet / L.R. Ferguson // *Prospects for cancer prevention* - 1999;-428(1-2):- P.329-338.
168. Goncharova R.I. A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster* / R.I. goncharova, T.D. Kuzhir // *Mutat.Res.*1989.-Vol. -214. -№2.-P. 257-265.
169. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography / A. Hasler, O. Slicher, B. Meier et al. // *J. Chromatogr.* -1992.-Vol.605.-P. 41-48.

170. Kuroda Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols / Y. Kuroda, Y. Hara // *Mutat. Res.*-1999 Jan;-436(1):-P.69-97
171. Lim-Sylianco C.Y. Antimutagenic effect of expressions from twelve medicinal plants / C.Y. Lim-Sylianco, J.A. Concha, A.P. Jocano // *Philip.J.Sci.* – 1986. – 115,- №1. – P.23-30.
172. Nefic. H. Anticlastogenic effect of Vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. / H. Nefic. // *Mutat Res.*-2001- Nov.- 15;498(1-2):-P.89-98.
173. Preliminary study on the antimutagenesis of vegetables and fruits / H.Z. Luo, S.J. Cheng, Y.Z. Jang et al. // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*- 1987.- Sep; 9 (5):-P.328-332.
174. Schmid W. The micronucleus test for cytogenic analysis / W. Schmid // *Chem. Mutagens.*- 1976. -V. 4. -№1.- P.103-108.
175. Shinn-Nen J. The correlation between the antioxidation and the antimutagenicity of carotenoids from chili against food mutagen IQ / J. Shinn-Nen, L.H. Rosa; L. Huei, T. Shun-Jen / *Nutritional Sciences Journal.*- 1998;23(4):- P.357-375.
176. Stoner G.D. Polyphenols as cancer chemopreventive agents / G.D. Stoner, H. Mukhtar. / *Cell Biochemistry Supply.*- 1995;22:-P.169-80.
177. Study of antioxidant properties by voltammetry. / E. I. Korotkova, Yu. A. Karbainov, A. V. Shevchuk. // *J. Electroanal. Chem.* – 2002.- V. 508. № 1. – P.56-60.
178. Villasenor I.M. A new antimutagen from *Mentha cordifolia* Opiz./ I.M. Villasenor, D.E. Echegoyen, J.S. Angelada. // *Mutat Res.*- 2002.- Mar 25;515(1-2):-P.141-146.
179. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action / A.P.Odin // *Mutation Reaseach.*-1997.Vol.386,№1.-P.39-67.
180. Waters M.D. / M.D. Waters, H.F. Stack, M.S. Jackson // *Mutat.Res.*-1996. - Vol.350.- P. 109-129.

181. Weisburger J.H. Antimutagens, anticarcinogens, and effective worldwide cancer prevention / J.H. Weisburger / Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology - (United States;1999,- 18(2):-P.85-93
182. Zhang H. A. Antimutagenic property of an herbal medicine, Polygonum multiflorum Thunb. Detected by the Tradescantia micronucleus assay /. H.A. Zhang., B.A. Jeong., T.H. Ma // Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology (United States;1999, 18(2):-P.127-130.

ПРИЛОЖЕНИЕ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Департамента
контроля лекарственных средств
и медицинской техники
_____ В.Е. Акимочкин
«_____» _____ 2004 г.

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

сбор антимутагенный
species

ФСП 42-
Вводится впервые

Срок введения установлен
с" ____ " _____ 200_ г.
до" ____ " _____ 200_ г.

Настоящая фармакопейная статья предприятия (ФСП) распространяется на сбор антимутагенный, изготовленный из измельченного лекарственного растительного сырья, расфасованный в пачки, применяемый в качестве лекарственного средства.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

СПЕЦИФИКАЦИЯ

№ п/п	ПОКАЗАТЕЛИ	НОРМЫ	МЕТОДЫ
1	2	3	4
1.	Внешние признаки	Соответствует ФСП	Визуальный (с помощью стереомикроскопа или лупы), органолептический, ГФ XI
2.	Микроскопия	Соответствует описанию и микрофотографиям ФСП	ГФ XI, вып.1
3.	Качественные реакции	R _f на уровне достоверного образца (рутин)	качественные реакции, ТСХ-анализ
Числовые показатели			
4.	Количественное определение	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1%; сумма водорастворимых полисахаридов не менее 8%	УФ-спектрометрия, гравиметрический метод
5.	Содержание экстрактивных веществ	Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 20% этанолом не менее 20%	Весовой
6.	Влажность	Не более 14,00 %	ГФ XI, вып.1
7.	Золы общей	Не более 13,00 %	ГФ XI, вып.2
8.	Золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты	Не более 4,00 %	ГФ XI, вып.2
9.	Частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм	Не более 1,00 %	ГФ XI, вып.1

10.	Частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 0,1 мм	Не более 1,00 %	ГФ XI, вып.1
11.	Органическая примесь	Не более 2,00 %	ГФ XI, вып.1
12.	Минеральная примесь	Не более 3,00 %	ГФ XI, вып.1
<i>Другие показатели качества</i>			
13.	Микробиологическая чистота	Категория 4.2.	ГФ XI, вып.2, с. 187 и изменение к ГФ XI от 01.06.96г.
14.	Содержание радионуклидов	В соответствии с требованиями ВДУ ГН 2.6.005-93	Радиационный контроль
15.	Масса содержимого упаковки	Отклонение от номинальной массы (50,0 г) в пачке не должно быть более $\pm 5,00\%$	ОСТ 64-492-85
16.	Упаковка	По 50,0 г в пачку картонную с внутренним пакетом из бумаги оберточной марки А или марки Д или подпергаменту или из бумаги упаковочной влагопрочной, или из полипропилена вместе с инструкцией по применению	
17.	Маркировка	Соответствует ФСП	
18.	Хранение	В сухом, защищенном от света месте	
19.	Срок годности	2 года	

Состав.

Листья крапивы двудомной (ГФ XI, вып.2, стр. 274)	- 20 %
Трава хвоща полевого (ГФ XI, вып.2, стр. 318)	- 20 %
Цветки календулы лекарственной (ГФ XI, вып.2, стр. 237)	- 20 %
Корни одуванчика лекарственного (ГФ XI, вып.2, стр. 356)	- 20 %
Семена льна обыкновенного (ГФ XI, вып.2, стр. 372)	- 20 %

Внешние признаки. Смесь неоднородных частиц (кусочков листьев, черешков, стеблей, ветвей, цветков, корней, семян) светло-зеленого, темно-зеленого, серовато-зеленого, серо-белого с темно-бурыми и желтыми вкраплениями, светло-коричневого, темно-коричневого, оранжевого, бледно-желтого, желто-коричневого цветов, проходящих сквозь сито диаметром 6 мм.

При просмотре сбора под стереомикроскопом (увеличение 8х; 16х; 32х) видны кусочки листьев, черешков, стеблей, ветвей, цветков, корней, семян:

- кусочки листьев и черешков темно-зеленого цвета с морщинистой поверхностью, по крупным жилкам хорошо заметны жгучие волоски (листья крапивы);

- кусочки стеблей и ветвей частично с узлами и влагалищами серовато-зеленого цвета (трава хвоща полевого);

- кусочки языковых цветков оранжевого цвета, бесплодные трубчатые цветки оранжево-желтого цвета, кусочки листочков обертки или цельные листочки серовато-зеленого цвета, опушенные, заостренные, узколанцетные (цветки календулы)

- кусочки корней различной формы серо-белого цвета с темно-бурыми и желтыми вкраплениями (корни одуванчика);

- семена сплюснутые, яйцевидной формы, заостренные с одного конца и округлые с другого, неравнобокие, темно-коричневого цвета, поверхность семян гладкая, блестящая, со светло-желтым, ясно заметным семенным рубчиком (семена льна).

Запах характерный. Вкус водного извлечения сладковато-горький.

Микроскопия. Проводится в соответствии со статьей “Сборы” (ГФ XI, вып. 1, с. 266-267). Часть аналитической пробы для определения подлинности (10 г) помещают на чистую гладкую поверхность и с помощью стереомикроскопа по внешнему виду из нее выделяют составные компоненты сбора, из которых готовят микропрепараты по методикам ГФ XI, вып. 1, с. 277-282.

При рассмотрении препаратов под микроскопом видны:

- клетки эпидермиса кусочков верхней стороны листа **крапивы** - многоугольные или слабо извилистые; нижней стороны листа – сильно извилистые. Устьица окружены 3-5 клетками эпидермиса, встречаются в основном на нижней стороне листа. Характерно наличие в клетках эпидермиса цистолитов в виде продолговато-округлых образований с зернистой структурой и небольшим в центре – ножка. Минеральную природу цистолитов доказали воздействием на микропрепарат концентрированной серной кислотой. На верхней и нижней стороне листа, по краю и жилкам хорошо видны одноклеточные ретортовидные волоски, имеющие расширенное основание и вытянутую заостренную верхушку. Кроме того, по крупным жилкам встречаются жгучие волоски, состоящие из многоклеточного основания (подставки) и крупной конечной клетки, которая заканчивается легко обламывающейся головкой. В крупных жилках расположены клетки с мелкими друзами оксалата кальция, образующими характерные цепочки;

- обрывки эпидермиса кусочков стеблей и ветвей **хвоща полевого** на ребрах сильно удлиненные с утолщенными прямыми или слегка извилистыми пористыми стенками, без устьиц; в бороздках и нередуцированных листьях – слегка удлиненные с более извилистыми пористыми стенками, с устьицами.

У обоих типов эпидермиса на стенках концов (стыков) некоторые клетки заметны характерные выросты, с поверхности имеющие вид спаренных

кружочков в продольном положении – закругленные или зубчатые с ясно выраженной перегородкой. Устьица слегка погруженные, с характерной лучистой складчатостью кутикулы, расположены обычно в 3 ряда, реже в 4, 2 и 1.

- удлинённые клетки эпидермиса язычковых **цветков ноготков** с оранжевыми округлыми хроматопластами, на зубчиках эпидермис с сосочками иногда с устьицами; трубка венчика густо опушена простыми и железистыми одно-двухрядными волосками; завязь также опушена: с выпуклой стороны железистыми, по краям вогнутой стороны – простыми двухрядными волосками. Головка железистых волосков состоит из 2, 4 или 8 клеток. Эпидермис трубчатых цветков такой же, как и язычковых, но у зубчиков он с более вытянутыми сосочками; нижняя часть трубки венчика и завязь густо опушены одно-двухрядными железистыми, реже двухрядными простыми волосками. Пыльца округлая, шиповатая. Эпидермис листочков обертки по краю представлен удлиненными клетками с прямыми стенками, в средней части – извилистыми стенками и устьицами; листочки обертки густо опушены: по краю - длинными одно-двухрядными простыми, двухрядными железистыми и ветвистыми волосками; в средней части – только железистыми волосками;

- пробка **корня одуванчика** тонкая, светло-коричневая. Кора широкая, состоит из крупных овальных клеток паренхимы, в которых проходят концентрические ряды, образованные группами мелких проводящих элементов – луба и млечников. Млечники заполнены желто-коричневым содержимым. Древесина рассеяно-сосудистая, состоящая из крупных сосудов и паренхимы.

- эпидермис **семян льна**, состоящий из крупных, четырехугольных клеток, покрытых толстым слоем кутикулы, содержащих слизь; боковые (радиальные) стенки клеток слегка извилистые. Под эпидермисом лежат 1 – 2

ряда паренхимных клеток. Третий слой представлен механической тканью, состоящей из одного ряда сильно утолщенных одревесневших желтых клеток, пронизанных поровыми канальцами. Под механической тканью расположены узкие тонкостенные клетки «поперечного слоя» (вытянуты поперек семени). Самый внутренний слой кожуры – пигментный, состоящий из одного ряда четырехугольных клеток с заметно утолщенными пористыми оболочками и темно-желтым содержимым. Эндосперм состоит из многоугольных клеток и содержит алевроновые зерна и капли жирного масла. Ткань семядолей отличается более мелкими клетками.

Мелкая фракция сбора. Частицы сбора, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, кипятят в 2,5% растворе щелочи 1-2 минуты, тщательно промывают водой и готовят микропрепараты. В качестве включающей жидкости используют глицерин и хлоралгидрат.

При исследовании мелкой фракции сбора под микроскопом видны фрагменты всех составных компонентов, причем в поле зрения наиболее часто встречаются частицы листьев крапивы и травы хвоща, немного реже элементы корней одуванчика, цветков календулы и семена льна:

- кусочки эпидермиса с цистолитами в клетках и ретортовидными волосками, цельные или части жгучих волосков, кусочки жилок с мелкими друзами оксалата кальция, образующими характерные цепочки; цельные или фрагменты околоцветника женских цветов, почти до основания рассеченные на неравные доли с коротко-волосистым опушением из ретортовидных волосков; хорошо заметны яйцевидные, тупозаостренные, сплюснутые семянки с таким же опушением (**листья крапивы**);

- кусочки эпидермиса с удлинёнными прямыми и извилистыми пористыми стенками с устьицами и без устьиц; сосочковидные выросты и воздухоносные полости (**трава хвоща**);

- кусочки эпидермиса с сосочками, цельные или части простых и железистых одно-двухрядных волосков; округлая, шиповатая пыльца (**цветки ноготков**);

- фрагменты коры – клетки овальной формы с концентрическими млечниками, обрывки сосудов (**корни одуванчика**);

Наряду с элементами сбора в поле зрения наблюдаются трудно диагностируемые мелкие частицы растительного сырья и отдельные, или сгруппированные в виде черных бесформенных масс, посторонние кристаллические включения (кремнезем).

Качественные реакции.

1 г измельченного сбора (см. раздел «Количественное определение») помещают в колбу вместимостью 25 мл и прибавляют 10 мл спирта 70%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин с момента закипания спирта в колбе. После охлаждения полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр. К 1 мл фильтрата прибавляют 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, появляется желтовато-зеленое окрашивание (флавоноиды).

1 г измельченного сбора (см. раздел «Количественное определение») помещают в колбу вместимостью 50 мл, заливают 10 мл этанола 70%. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин с момента закипания спирта в колбе.

После охлаждения извлечение декантируют и 0,02 мл раствора микропипеткой или микрокапилляром наносят на линию старта пластинки «Сорбфил» размером 7x15 см в виде точки, рядом наносят в виде точки - 0,005 мл 0,05% раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, затем помещают в камеру (предварительное насыщение камеры не менее 1 часа) со смесью растворителей этилацетат-уксусная кислота-вода (10:4:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт

растворителей пройдет 12 см, пластинку вынимают из камеры, высушивают в вытяжном шкафу в течении 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 360 нм. На уровне пятна ГСО рутина должно появиться пятно коричневого света $R_f \approx 0,58$. Затем пластинку опрыскивают 2% спиртовым раствором алюминия хлорида и нагревают ее в течении 2-3 мин в сушильном шкафу при температуре 100-105⁰С. При этом пятно приобретает желтую окраску, в видимом и яркую лимонно-желтую окраску в УФ-свете (рутин). Допустимо наличие других пятен.

Примечание. Приготовление 2% спиртового раствора алюминия хлорида: 2 г алюминия хлорида (ГОСТ 3759-75) растворяют в 40 мл спирта 95% в мерной колбе, вместимостью 100 мл и доводят объем раствора спиртом 95% до метки. Срок годности раствора 2 месяца.

Числовые показатели. Суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 1%; суммы водорастворимых полисахаридов не менее 7%; суммы экстрактивных веществ, извлекаемых 20% этанолом не менее 20%, влажность не более 14%; золы общей не более 13%; золы нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 4%; частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 6 мм не более 2%; частиц, проходящих сквозь сито по ГОСТ 4403 с размером отверстий 0,1 мм не более 1%; органической примеси не более 2%; минеральной примеси не более 3%.

Примечание. *Отбор средней и аналитических проб.* Отбор проб для анализа по ГФ XI, вып. 1, с.273. Масса средней пробы 600 г, масса аналитической пробы для определения подлинности, измельченности и примесей – 100 г, влажности и золы – 50 г, действующих веществ – 50 г, микробиологической чистоты – 50 г, содержания радионуклидов – 350 г.

Количественное определение. 1. Флавоноиды.

Аналитическую пробу сбора измельчали до размера частиц проходящих через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 (т.н.) измельченного сбора помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 30 мл 70% этанола. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сбора со стенок. Горячее извлечение профильтровывали через вату в мерную колбу на 50 мл так, чтобы частицы сбора не попадали на фильтр. Вату помещали в колбу для экстрагирования и прибавляли 20 мл 70% этанола, экстракцию повторяли в описанных выше условиях еще два раза, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем доводили 70% этанолом до метки и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл раствора алюминия хлорида в 95% спирте, 2 мл раствора А и доводили объем раствора 95% спиртом до метки. Через 20 и 40 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 2 мл раствора А, 1 капли разведенной уксусной кислоты и доведенный 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора Государственного стандартного образца (ГСО) рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухой сбор в % (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D * m_0 * 50 * 100 * 100}{D_0 * m * 25 * (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D₀ – оптическая плотность ГСО рутина;

M – масса сбора, в г;

M_0 – масса ГСО рутина, в г;

W – влажность сбора, в %.

Примечание. 1. *Приготовление раствора ГСО рутина:* Около 0,0125 (т.н.) ГСО рутина, предварительно высушенного при температуре 130-135⁰С в течение 3 часов, растворяли в 95% спирте в мерной колбе на 25 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали, доводили объем раствора до метки 95% спиртом и перемешивали.

2. *Приготовление 1% раствора алюминия хлорида в 95% этаноле:* 1,0 г алюминия хлорида (ГОСТ 3759-75, ЧДА) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 95% этаноле и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. Срок хранения реактива 3 месяца.

2. *Полисахариды.* Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито по ТУ 23. 2. 2068-89 с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды очищенной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяют еще четыре раза по 100 мл в течение 30 мин каждый раз. Водное извлечение центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через пять слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм предварительно

смоченную водой. Фильтр промывают водой очищенной и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл 95% этанола, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60°C в течение 5 мин. Через 30 мин 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 105°C стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 15 мл смеси 95% этанола и воды (3:1). Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100-105°C до постоянной массы. Содержание суммы водорастворимых полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

m_1 – масса фильтра, в г;

m_2 – масса фильтра с осадком, в г;

m – масса сырья, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья (влажность), в %.

Микробиологическая чистота. В соответствии с ГФ XI, вып.2, с. 187 и изменением к ГФ XI от 01.06.96 г., категория 4.2.

Масса содержимого упаковки. По ОСТ 64-492-85 со следующими нормами допустимых отклонений: пачки 50,0 г±5%.

Упаковка. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГОСТ 17768-90. Измельченное сырье фасуют по 50,0 г в пачку тип 2 по ГОСТ 12303-80, изготовленную из картона типа “хром-эрзац” импортного, сертифицированного органами Госсанэпиднадзора РФ или картона

отечественного марки МОО по ТУ 5453-015-04766356-95, с внутренним пакетом тип 1-8 по ГОСТ 24370-80 из бумаги оберточной марки А или марки Д по ГОСТ 8373-75, или из подпергамента марки П или марки ПЖ по ГОСТ 1760-86, или из бумаги упаковочной влагопрочной марки ВП по ТУ 5435-004-00278971-99, или с внутренним пакетом тип 1-4а по ГОСТ 24370-80 из полипропилена марки УП-2 по ТУ 2245-036-00203536-99.

В каждую пачку вкладывают инструкцию по применению. Допускается нанесение текста инструкции на пачку.

Транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Брутто транспортной упаковки не более 10 кг.

Маркировка. В соответствии с ГОСТ 17768-90. На пачке указывают предприятие-изготовитель, его товарный знак, адрес, телефон/факс, название лекарственного средства на русском языке, состав сбора, массу при влажности 13%, условия хранения, регистрационный номер, штрих-код, номер серии, “Годен до...”, “Продукция прошла радиационный контроль по СанПин 2.3.2.560-96”, “Отпускается без рецепта”.

Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 6077-80, ГОСТ 17768-90 и ГФ XI изд., вып.2, с. 381.

Хранение. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI изд., вып. 1, с. 296. В сухом, защищенном от света месте.

Срок годности. 2 года.

Сбор используется для приготовления водного извлечения, применяемого в качестве антимуtagenного средства.

Примечание. Реактивы и методы определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах ГФ XI изд., вып. 1, 2.