

УДК 615.322:582.734.4:581.45]07[

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО СРЕДСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ – ГРАНУЛЫ “НЕФРОФИТ”

А.А. Маркарян<sup>1</sup>, А.А. Абрамов, Т.Д. Даргаева<sup>2</sup>, Г.Г. Николаева<sup>3</sup>, С.М. Николаев<sup>3</sup>

(кафедра радиохимии; e-mail: Aaa@radiochem.msu.ru)

**Разработана новая растительная композиция – гранулы “Нефрофит”. На основании экспериментальных данных фитохимического анализа предложены критерии контроля качества. Определена острая токсичность и фармакологическая активность гранул. Полученные при комплексном изучении “Нефрофита” результаты, использовались при разработке нормативной документации, находящейся на утверждении в Министерстве здравоохранения РФ.**

Патологии мочевыводящей системы представляют серьезную проблему для современного общества. Тяжелое протекание хронических форм и частая инвалидизация делают необходимым разработку и внедрение в медицинскую практику новых синтетических и растительных лекарственных средств, а также биологически активных добавок к пище (БАД) [1, 2].

При получении гранул “Нефрофит” использовали сухие экстракты горца птичьего, ортосифона тычиночного, толокнянки обыкновенной [3].

Выбор состава препарата обусловлен результатами фармакологических исследований, показавших, что в комплексе экстракты указанных трав обладают более сильным терапевтическим эффектом, чем каждый по отдельности. Количественное соотношение экстрактов (4:4:2) в препарате подобрано с учетом данных о высокой токсичности экстракта толокнянки (2 части) по сравнению с ортосифоном и спорышем. Основное действующее соединение толокнянки – арбутин, вызывает сильное раздражение паренхимы почек, что может привести к развитию воспалительных процессов [4].

### Экспериментальная часть

При изготовлении гранул были использованы вспомогательные вещества (лактоза, сахар-рафинад, сахар-песок, крахмал картофельный). В качестве связывающих средств использовали: спирт (30 и 70%-й), сироп сахарный, 10%-й раствор метилцеллюлозы; 10, 15 и 20%-й раствор поливинилпирролидона.

На основании экспериментальных данных наиболее оптимальными наполнителями признаны лактоза и сахар-рафинад, которые в соотношении (5:4,5:0,25)

со смесью сухих экстрактов позволяют получить гранулы, соответствующие требованиям Государственной фармакопеи XI издания (ГФ). Экспериментальным путем был подобран увлажнитель для грануловочной массы – 20%-й раствор поливинилпирролидона.

В результате проведенных исследований была разработана технологическая схема изготовления гранул.

Изучение химического состава и разработку методов контроля качества гранул проводили с помощью современных физико-химических и инструментальных методов (тонкослойная, газожидкостная, высокоэффективная жидкостная хроматографии и спектральные методы анализа).

Использование тонкослойной и бумажной хроматографии позволило обнаружить в гранулах препарата “Нефрофит” фенольные соединения: рутин, лютеолин, гиперозид, авикулярин, кверцетин, гиперозид, лютеолин-7-гликозид, фенолкарбоновые кислоты (кофейную, хлорогеновую, галловую), фенологликозид (арбутин), дубильные вещества.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии удалось подтвердить идентифицированный ранее фенольный комплекс, а также разработать методику количественного определения по сумме фенольных соединений в пересчете на рутин-стандарт [3].

Определение показателей качества гранул препарата “Нефрофит” проводили на пяти полученных по разработанной нами технологии сериях образцов. Характеристику гранул предложено проводить по следующим показателям: внешний вид, органолептические пробы, подлинность, размер гранул, распадаемость, потеря в массе при высушивании, содержание суммы флавоноидов в пересчете на ГСО рутина [5].

При определении подлинности проводили качественные реакции на флавоноиды (реакция комплексобразования с хлоридом алюминия и цианидиновая проба). Учитывая тот факт, что фармакологическая активность гранул “Нефрофит” обусловлена фенольным комплексом, проводить контроль качества готового продукта целесообразно по содержанию флавоноидов (ГФ XI изд. вып. 2, с. 324). В связи с тем, что УФ-спектр спиртового раствора анализируемого образца совпадает с УФ-спектром ГСО рутин, пересчет при определении содержания суммы флавоноидов проводили на рутин-стандарт.

Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов представлена в табл. 1. Относительная ошибка определения флавоноидов в гранулах не превышает  $\pm 1,25$  %.

Острую токсичность гранул изучали в соответствии с “Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия фармакологических средств” (1998) [6].

Опыты проводили на 20 беспородных половозрелых мышах обоего пола массой 18–20 г и 16 беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 180–200 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных РАМН.

Общая продолжительность наблюдения за животными контрольных и опытных групп составляла 14 сут. Регулярно фиксировали общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координации движений, мышечный тонус, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания, потребление корма и воды, изменение массы тела и другие показатели, которые могли быть использованы для выявления токсического эффекта.

Мышам и крысам обоего пола однократно в максимально возможном количестве вводили “Нефрофит” (в виде раствора) в желудок через металлический зонд диаметром 1 мм, а также внутрибрюшинно. В результате наблюдений было установлено, что в течение 1 ч после введения исследуемого раствора у животных появлялись угнетенное состояние и адинамичность, что,

по-видимому, можно объяснить большим объемом введенного вещества. Температура тела не изменялась. На следующий день поведение животных становилось нормальным, и они не отличались от интактных. В дальнейшем каких-либо отклонений, а также гибели животных не наблюдалось [6].

Кроме того, согласно классификации токсичности веществ по К.К. Сидорову “Нефрофит” при введении крысам в желудок в максимально возможной дозе (20 г/кг) является относительно безвредным веществом, т.е. соответствует 6 классу токсичности. При внутрибрюшинном введении показатель LD50 составлял 1466,7 мг/кг, что также свидетельствует об отсутствии токсического действия “Нефрофита”.

Для определения фармакологической активности были использованы наиболее адекватные модели и информативные методики [1, 2, 7]. Эксперименты выполнены на 1255 беспородных белых крысах обоего пола массой 160–220 г, 170 беспородных белых мышах обоего пола массой 18–22 г. Исследования проводили в сравнении с известным многокомпонентным растительным сбором “Бруснивер” [7].

Животным опытной группы водный раствор “Нефрофит” вводили внутрижелудочно зондом в экспериментально-терапевтической дозе (150 мг/кг) 1 раз в сутки в течение всего эксперимента. Препарат сравнения “Бруснивер” вводили белым крысам в форме настоя внутрижелудочно зондом в объеме 10 мл на 1 кг массы. Контрольная группа по аналогичной схеме получала в соответствующем объеме дистиллированную воду.

При оценке влияния препарата “Нефрофит” на течение воспалительной реакции установлено, что испытуемый объект обладает антифлогистической активностью (табл. 2–4). Из данных, представленных в табл. 2–4 следует, что “Нефрофит” в дозе 150 мг/кг оказывает антиальтеративное действие, снижая степень повреждения тканей при воздействии флогогенного агента. При этом наиболее выраженный эффект у “Нефрофита” появляется на седьмые сутки эксперимента. В этом случае площадь повреждения тканей была на 54,1 % меньше, чем в контроле. У препарата сравнения “Бруснивер” процент угнетения альтерации при аналогичных условиях был меньше.

Таблица 1

Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов в гранулах “Нефрофит”

$f$	$x$	$\Delta x$	$S \bar{x}$	$P, \%$	$t(p; f)$	$\pm \epsilon, \%$
4	0,16	0,002	0,0008	95	2,78	1,25

Т а б л и ц а 2

**Влияние “Нефрофита” на течение альтеративной фазы воспаления у белых крыс  
(M ± m; n = 10)**

Показатели	Сроки, сут	Группы животных		
		Контрольная	«Нефрофит», 150мг/кг	«Бруснивер», 10мг/кг
Площадь альтерации, см <sup>2</sup>	7	3,88±0,13	1,78±0,09*	2,77±0,17*
	14	1,87±0,12	1,49±0,06*	1,81±0,12*
	21	1,84±0,10	1,35±0,08*	1,56±0,04*
Угнетение альтерации, %	7	–	54,1	28,6
	14	–	20,3	3,2
	21	–	26,6	15,2

\*Различие достоверно по сравнению с контролем при P ≤ 0,05.

“Нефрофит” в дозе 150 мг/кг оказывает достоверное антиэкссудативное действие, угнетая развитие отека на 59,4%, по сравнению с показателями у животных контрольной группы. При этом степень выраженности антиэкссудативного действия “Нефрофита” превосходит эффект “Бруснивера”. Изучаемый объект не оказывает существенного влияния на процесс развития грануляционно-фиброзной ткани в отличие от препарата сравнения, который обнаруживает тенденцию к стимулированию образования гранулемы. Полученные данные позволяют сделать вывод, что “Нефрофит” в экспериментально-терапевтической дозе обладает выраженным противовоспалительным действием, что весьма необходимо как для лечения, так и для профилактики патологий мочеполовой системы.

При изучении влияния гранул на сосудистую проницаемость выявлено, что его курсовое введение в дозе 150 мг/кг на фоне повышенной сосудистой проницаемости, вызванной иммобилизацией животных, способствовало уменьшению импрегнации туши в брыжейку, что свидетельствует об уменьшении проницаемости сосудов под действием исследуемого объекта.

Изучение антистессорной активности гранул в экспериментально-терапевтической дозе показало, что их двухкратное введение на фоне иммобилизационного стресса препятствовало развитию катаболических изменений у белых крыс, о чем свидетельствовало снижение выраженности гипертрофии надпочеч-

ников, уменьшение инволюции тимуса и предупреждение развития язвенных поражений слизистой оболочки желудка животных. Установлена антибактериальная активность “Нефрофита” по отношению к условно-патогенным бактериям, наиболее часто вызывающим заболевания мочевыводящих путей. Доказательством выраженной антиоксидантной активности препарата служило уменьшение скорости генерации супероксидного анион-радикала на 90% по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что гранулы препарата “Нефрофит” обладают выраженной противовоспалительной активнос-

Т а б л и ц а 3

**Влияние “Нефрофита” на экссудативную фазу воспаления при формалиновом отеке у белых крыс (M ± m; n = 10)**

Группы животных	Разность массы лапок, г	Угнетение отека, %
Контрольная	1,55±0,11	–
«Нефрофит», 150 мг/кг	0,63±0,03*	59,4
«Бруснивер», 10 мг/кг	0,90±0,03*	41,9

Т а б л и ц а 4

**Влияние “Нефрофита” на образование грануляционно-фиброзной ткани в очаге воспаления у белых крыс ( $M \pm m$ ;  $n = 10$ )**

Группы животных	Масса образовавшейся грануляционно-фиброзной ткани, мг	Прирост массы по сравнению с контролем, мг	Стимуляция образования гранулемы, %
Контрольная	21,0±1,7	–	–
“Нефрофит”, 150 мг/кг	22,4±4,4	0,9	4,3
“Бруснивер”, 10 мг/кг	25,7±1,5	4,7	22,4

тью, антибактериальным и антистессорным действием, а также способностью ингибировать процессы перекисного окисления липидов, а также стабилизировать мембраны при хронических заболеваниях почек, что можно объяснить преимущественным содержанием комплекса фенольных соединений, обладаю-

щих выраженными антиоксидантными и мембрано-стабилизирующими свойствами.

Широкий спектр фармакологической активности гранул, аргументирует целесообразность их применения в профилактике и при комплексном лечении хронических заболеваний мочеполовой системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лоншакова К.С., Убашев И.О., Шантанова Л.Н., и др. // Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов. Томск, 1997. Т. 9. С. 66.
2. Лоншакова К.С., Шантанова Л.Н., Мондодоев А.Г. и др. // Экологические проблемы микробиологии и биотехнологии Байкальского региона. Улан-Удэ, 1995. С. 54.
3. Маркарян А.А. Абрамов А.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2003. 44. С. 356.
4. Нагаслаева Л.А., Охотникова В.Ф. // Первый межд. науч. конгресс. Традиционная медицина и питание: теоретические и практические аспекты. М., 1994. С. 187.
5. Государственная фармакопея 11-е изд. Вып. 1, 2. М., 1990.
6. Мондодоев А.Г., Глызин В.И., Даргаева Т.Д. и др. // Фитотерапия и рефлексотерапия заболеваний. Улан-Удэ, 1992. С. 35.
7. Мондодоев А.Г., Глызин В.И., Даргаева Т.Д. // Биологические ресурсы и ведение государственных кадастров Бурятской АССР. Улан-Удэ, 1991. С. 153.

Поступила в редакцию 08.04.03

## DEVELOPMENT OF METHODS OF QUALITY CONTROL AND PHARMACOLOGICAL STUDY OF THE COMPLEX HERBAL ORIGIN – “NEPHROPHYT” GRANULES

A.A. Markarian, A.A. Abramov, T.D. Dargaeva, G.G. Nikolaeva, S.M. Nikolaev

(Division of Radiochemistry)

New herbal composition has been designed – “Nephrophyt” granules. Criteria of quality control based on the grounds of experimental data of phytochemical analysis have been worked out. Severe toxicity and pharmacological activity of granules have been defined. Results obtained under complex study of “Nephrophyt”, were used for the normative documentation development, which have been sent to the Ministry of health of the Russian federation for verification.