

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БОРИСОВ МИХАИЛ ЮРЬЕВИЧ

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРНЕВИЩ
КУРКУМЫ ДЛИННОЙ (*CURCUMA LONGA L.*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор Е.В. Авдеева

Самара, 2017

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Современное состояние изучения куркумы длинной.....	16
1.1. Характеристика куркумы длинной	16
1.1.1. Ботаническое описание	19
1.1.2. Культивирование	20
1.1.3. Сбор и заготовка	21
1.1.4. Применение куркумы длинной в медицине и других сферах народного хозяйства 21	
1.1.5. Химический состав и стандартизация корневищ куркумы длинной. 28	
1.2. Характеристика куркуминоидов как самостоятельной группы биологически активных соединений.....	33
1.2.1. Структура и физико-химические свойства куркуминоидов.....	33
1.2.2. Фармакологические свойства куркуминоидов	40
1.2.3. Проблемы и пути решения в разработке лекарственных препаратов, содержащих куркуминоиды	44
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	49
2.1. Объекты исследования	49
2.2. Методы исследования.....	50
Глава 3. Морфолого-анатомическое исследование куркумы длинной	56
3.1. Морфологическое исследование корневищ куркумы длинной	56
3.2. Микроскопическое исследование корневищ куркумы длинной.....	56
Глава 4. Фитохимическое изучение корневищ куркумы длинной	62
4.1. Изучение химического состава хроматографическими методами	62
4.2. Препаративное изучение БАС куркумы, установление структуры и физико-химических характеристик куркуминоидов; разработка отечественного стандартного образца куркумина.....	72
Глава 5. Исследования по стандартизации корневищ куркумы длинной	84
5.1. Обоснование применения куркумина в качестве отечественного стандартного образца в анализе куркуминоидов в корневищах куркумы длинной	84
5.1.1. Изучение батохромных комплексов куркумина (руброкуркумина)..	86
5.1.2. Использование куркумина в качестве стандартного образца в количественной оценке суммы куркуминоидов методом дифференциальной спектрофотометрии.....	88

5.2. Анализ содержания куркуминоидов в сырье куркумы длинной.....	91
5.2.1. ТСХ-анализ корневищ куркумы длинной	91
5.2.2. Обоснование параметров методики количественного определения куркуминоидов	92
5.2.3. Определение содержания куркуминоидов в различных образцах сырья куркумы длинной	96
Глава 6. Исследования по разработке экстракта куркумы густого и ректальных суппозиторий на его основе.....	100
6.1. Разработка технологического способа получения «Куркумы экстракта густого»	101
6.2. Оценка антиокислительной активности «Куркумы экстракта густого»	104
6.2.1. Изучение влияния экстракта куркумы густого и препаратов сравнения на генерацию активных форм кислорода	105
6.2.2. Оценка действия экстракта куркумы густого и препаратов сравнения на перекисное окисление липидов	109
6.3. Разработка суппозиторий на основе экстракта куркумы густого	113
6.3.1. Получение суппозиторий на липофильной и гидрофильной основах.....	115
6.3.2. Исследование фармацевтической биодоступности суппозиторий	116
Заключение	121
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	122
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	125
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	141

Введение

Актуальность темы. Одним из перспективных и динамично развивающихся направлений современной медицины и фармации является обращение к пищевым растениям как к источнику биологически активных соединений (БАС) и их применение в лечебно-профилактических целях. На этапе обоснования их использования в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) наиболее наукоемкими этапами являются изучение химического состава, решение вопросов стандартизации и обоснование путей рационального использования сырья для получения лекарственных препаратов (Шретер А.И., 2002; Самылина И.А., Баландина И.А., 2004; Киселева Т.Л., 2007).

В ряду таких пищевых растений, перспективных для рассмотрения в качестве официального вида сырья и использования в отечественной научной фармации, выделяется популярная в нашей стране пряность - куркума длинная (*Curcuma longa* L., *C. domestica* Vahl), сем. Имбирные (*Zingiberaceae*). Данное растение является ценным источником БАС с разноплановой биологической и фармакологической активностью (Горчакова Н.К., 1984; Орловская Т.В., 2011; Gupta S.C., Patchva S., Bharat B., 2013). Пищевая и лекарственная ценность куркумы связана с высоким содержанием куркуминоидов – гептадиеновых соединений фенольной природы (на уровне 2%-4%, но может превышать 5%); заслуживает внимания и эфиромасличная составляющая БАС (Reem Ibraheem Al-Wabli, 2006). В некоторых странах растение включено в национальные фармакопеи (в России данный вид куркумы входил в фармакопею 1-3 изданий), корневища куркумы служат сырьем для получения ряда лекарственных препаратов (из наиболее известных в нашей стране - желчегонные монопрепараты «Соларен» и «Фебихол», лекарственные препараты комбинированного действия «Холивер», «Гепатофальк планта», «Холагогум», сироп от кашля «Суприма-бронхо»). Но в настоящее время на российском фармацевтическом рынке зарегистрированных препаратов курукумы нет (отечественные разработки не были представлены), при этом

зарубежные ученые активно работают над созданием лекарственных средств с разноплановой фармакологической активностью (Sreejayan N., 1994; Jayaprakasha G.K., 2002; Xu Y., 2009; Gupta A., 2015).

Хотя к началу собственных исследований целесообразность рассмотрения корневищ куркумы в качестве официального вида ЛРС была очевидна, оставался нерешенным ряд вопросов, касающихся изучения параметров качества сырья, уточнения данных по идентичности химического состава импортируемых образцов (природных ареалов произрастания) и отечественных образцов сырья (культивируемых растений на территории Северного Кавказа), обоснование путей переработки сырья для получения отечественных лекарственных препаратов и собственно составление фармакопейной статьи «Куркумы длинной корневища» в соответствии с современными требованиями к фармацевтическому анализу. В этом плане актуальным представлялось выявление диагностически значимых анатомических признаков для сырья разной степени измельчения, разработка отечественного стандартного образца (СО) куркумина – на настоящее время в этом качестве используется куркумин с квалификацией от 80% (Merck, Sigma-Aldrich, Fluka). Проведение комплексных исследований по обозначенной проблематике и явилось основными этапами настоящей работы.

Степень разработанности темы. История применения куркумы в пищу в качестве специи и в народной медицине Индии и Китая уходит далеко в древность (Самылина И.А., Сорокина А.А., 1998.). В мировой литературе опубликованы результаты многочисленных исследований различных субстанций из данного сырья – от собственно измельченного сырья, смеси куркуминоидов разной степени очистки до индивидуальных доминирующих веществ растения (в основном - куркумин и его производные) (Duke J.A., 2002; Sinha R., 2003; Gupta S.C. с соавт., 2010; Yallapu M.M., 2012).

Спектр выявленной активности препаратов куркумы весьма обширен: антибактериальная активность была установлена еще в 1949 г., в последующие 30-40 лет было доказано противовоспалительное, гипогликемическое,

антиоксидантное, ранозаживляющее и желчегонное действие, а последние десятилетия внимание исследователей главным образом сосредоточено на использовании куркумы в профилактике и лечении онкологических заболеваний. В частности, показана активность куркуминоидов в отношении колоректального рака, рака поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, легких, миеломы и других. Установлено, что широкий спектр их терапевтического воздействия на организм во многом обусловлен влиянием на систему «прооксидант – антиоксидант», а именно мощными антиоксидантными свойствами (Ahsan H., 1999; Jayaprakasha G.K., 2002; Fibach E., 2008; Li Y., 2013).

В отношении официального статуса сырья: использование корневищ куркумы в качестве лекарственного растительного сырья отражено в различных фармакопеях зарубежных стран. Следует выделить фармакопею КНР (Pharmacopoeia of the people's Republic of China, 2005), которая наряду с корнями и корневищами *C. longa* L. включает *C. kwangsiensis* S.G. Lee et C.F. Liang, *C. phaeocaulis* Val. и *C. wenyujin* Y.H. Chen et C. Ling.; *C. longa* L. также входит в Американскую травяную фармакопею; *C. xanthorrhiza* Roxb. нашла отражение в фармакопеях ряда европейских государств (European Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, Pharmacopée Francais, Deutsche Arzneibuch); *C. zedoaria* Roscoe отражена единственно в фармакопее Японии. Примечательно, что в фармакопею Индии виды куркумы не включены (Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А., 2009). Ранее в России корневища куркумы являлись фармакопейным сырьем. Так, в Государственную фармакопею I, II, III изданий были включены корневища куркумы следующих видов: к. длинная (*C. longa* L.), к. зеленоцветковая (*C. viridiflora* Roxb.), к. зедоария (*C. zedoaria* Roscoe), последняя оставалась фармакопейным сырьем вплоть до фармакопеи 7 издания (Кочанов В.С., 2016).

Среди научных исследований, проведенных в Российской Федерации за последние годы, по фармакогностическому изучению пищевых растений для

разработки на их основе новых видов ЛРС, и в частности, в отношении корневищ куркумы длинной, можно выделить исследования пятигорских ученых (Орловская Т.В., Челомбитько В.А., Гаврилин М.В., 2008-2011). Полученные ими данные не только продемонстрировали перспективность рассмотрения исследуемого сырья в качестве официального вида ЛРС, наметили пути решения вопросов стандартизации, но и показали возможность расширения сырьевой базы путем интродукции куркумы длинной на территории Северного Кавказа с благоприятным для выращивания климатом. В настоящей работе, отчасти являющейся продолжением работ коллег, указанным культивируемым образцам как объектам исследования отведена значительная роль.

Таким образом, опираясь на данные отечественных и зарубежных ученых, в нашей работе получило продолжение сравнительное изучение химического состава корневищ растения природных ареалов и культивируемых в Российской Федерации с акцентом на основную группу БАС (куркуминоиды); на основе полученных данных – решение вопросов подлинности и доброкачественности сырья различного происхождения и разработка для этих целей отечественного СО куркумина; совершенствование оценки анатомо-гистологических признаков ЛРС разной степени измельчения; обоснование рациональных путей использования сырья для получения оригинальных лекарственных препаратов и ряд других вопросов, касающихся формирования представлений с позиций доказательной фармации о корневищах куркумы длинной как официальном виде лекарственного растительного сырья.

Цель и задачи исследования: экспериментальное обоснование использования корневищ куркумы длинной в качестве официального вида лекарственного растительного сырья.

Для достижения указанной цели было необходимо решить следующие задачи:

1) провести морфолого-анатомическое исследование для выявления диагностически значимых признаков корневищ куркумы длиной разной степени измельчения (сырье цельное, измельченное, порошкованное);

2) провести сравнительное фитохимическое изучение импортируемого сырья и отечественных образцов корневищ куркумы (выращенной на территории Северного Кавказа); в отношении соединений куркуминоидной природы провести препаративное выделение основных соединений, установить их структуру и изучить физико-химические характеристики;

3) разработать способ получения и изучить параметры качества куркумина для его использования в качестве отечественного стандартного образца в методиках качественного и количественного анализа по содержанию куркуминоидов в сырье и соответствующих препаратах куркумы;

4) определить содержание куркуминоидов в отечественных образцах корневищ куркумы длиной, провести сравнительную оценку с сырьем природных ареалов произрастания и решить вопрос об эквивалентности использования отечественного сырья;

5) обосновать критерии подлинности и показатели качества сырья «Куркумы длиной корневища», заготавливаемого от культивируемых растений, и на этой основе разработать проект фармакопейной статьи для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации;

6) разработать способ получения лекарственного растительного препарата «Куркумы экстракта густого», содержащего сумму куркуминоидов, и изучить его антиоксидантную активность в модельных системах свободно-радикального окисления;

7) обосновать использование лекарственной формы «суппозитории» для дальнейшего клинического применения «Куркумы экстракта густого».

Научная новизна. Образцы сырья культивируемой куркумы длиной на территории Российской Федерации (заготовленные на территории Северного Кавказа в 2007-2014 гг.) были подвергнуты фармакогностическому

изучению впервые. При этом исследования были проведены в сравнительном плане с импортируемым сырьем из природных ареалов (Индия, Вьетнам, Китай).

В результате морфолого-анатомических исследований корневищ куркумы были выявлены характерные диагностические признаки для цельного, измельченного и порошоканного сырья. К таковым отнесены следующие: для цельного сырья - наличие в паренхиме клеток с извилистыми стенками и окрашенным, структурированным содержимым, разбросаны закрытые коллатеральные пучки, проводящие элементы которых состоят из узкопросветных волокон, встречаются пигментные клетки, есть они (с каплями эфирного масла красно-оранжевого цвета) и в основной паренхиме; измельченное и порошоканное сырье содержит фрагменты всех этих элементов, также встречаются многочисленные клетки с желтым содержимым и фрагменты сосудов лестничного типа.

В ходе фитохимических исследований корневищ куркумы длиной с помощью комбинации экстракционных методов и колоночной адсорбционной хроматографии были выделены три основных куркуминоида – куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин. Для них на основании данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-, масс-, ИК- и УФ-спектров установлены химические структуры, изучены физико-химические свойства. Куркумин (доминирующее соединение) предложен в качестве отечественного СО, для него разработана схема получения, изучены параметры качества и обосновано использование в методиках качественного и количественного анализа куркуминоидов в сырье.

Выделенные индивидуальные куркуминоиды в качестве достоверно известных образцов веществ были использованы для изучения химического состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тонкослойной хроматографии ряда отечественных и импортируемых образцов корневищ куркумы длиной. Подобраны оптимальные условия хроматографического разделения основных куркуминоидов, проведено их

количественное определение, оценено суммарное содержание: для культивируемых образцов - не менее 2,0 % (что подтверждает и спектрофотометрическая оценка). Выявлено характерное соотношение куркуминоидов: куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин (63%:22%:15%), что доказывает таксономическую принадлежность производящего растения, и в итоге - равноценную возможность использования в качестве ЛРС отечественного сырья (наряду с импортируемым).

При решении вопросов стандартизации сырья и экстракционных препаратов куркумы (на примере разрабатываемого густого экстракта) по содержанию куркуминоидов были использованы ранее предложенные (Орловская Т.В., 2011) методики ТСХ-анализа и количественного определения суммы куркуминоидов в варианте дифференциальной спектрофотометрии окрашенного комплекса куркуминоидов - руброкуркумина при аналитической длине волны 545 нм. При внедрении данных методик в анализ сырья культивируемых растений нами были уточнены некоторые параметры. В частности, дополнительно предложено оценивать характер электронного спектра спиртового извлечения из ЛРС (максимум поглощения куркуминоидов находится при 425 нм \pm 2 нм), обосновано использование куркумина в качестве отечественного СО, внесены уточнения в расчетную формулу количественного содержания суммы куркуминоидов (в части объема получаемого извлечения).

Для создания отечественных лекарственных средств на основе изучаемого ЛРС была разработана технологии получения «Куркумы экстракта густого» методом циркуляционной экстракции с использованием 95% спирта этилового, подкисленного хлороводородной кислотой, что обеспечивает содержание суммы куркуминоидов в готовом продукте - не менее 45 %. Подтверждена высокая антиоксидантная активность данного экстракта в двух модельных системах (перекисного окисления липидов и образования активных форм кислорода), превосходящая препараты сравнения (α -токоферола ацетат, сумма антоциановых соединений из черники

обыкновенной, экстракт куркумы жидкий). С учетом крайне низкой стабильности куркуминоидов в желудочно-кишечном тракте и очень малой биодоступности для дальнейшего использования экстракта в медицинской практике (его применение перспективно для лечения колоректального рака) в качестве лекарственной формы обоснован выбор ректальных суппозиторий; при оценке фармацевтической биодоступности показаны преимущества образцов на гидрофильной основе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенные исследования компонентного состава БАС корневищ куркумы длинной показывают целесообразность их рассмотрения и использования в качестве лекарственного растительного сырья в отечественной научной фармации.

При углубленном изучении образцов сырья растений, культивируемых на территории Северного Кавказа, на основании полученных данных по химическому составу и решению на этой основе вопросов стандартизации (с использованием выделенного куркумина в качестве СО) показано, что отечественное сырье не уступает по параметрам качества импортируемому сырью.

Разработанные показатели качества и методы их оценки нашли отражение в проекте фармакопейной статьи (ФС) «Куркумы длинной корневища», распространяющейся на цельное, измельченное и порошкованное сырье культивируемых растений (проект принят к рассмотрению в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» с целью включения в дополнения к Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания).

С учетом данных ряда зарубежных авторов (Jayaprakasha G.K., 2002; Ibraheem R., 2006; Gupta S.C., 2013; Aggarwal V.V., 2009) проведены собственные исследования по созданию лекарственных средств: предложена схема получения и изучены некоторые параметры качества густого экстракта, показана возможность получения ректальных суппозиторий на его основе; оформлен патент РФ на изобретение «Антиоксидантное средство «Куркумы

экстракт густой»» (приоритетная справка по заявке № 2016145500 от 21.11.2016 г.).

Методология и методы исследований. Методология диссертационного исследования основана на анализе отечественных и зарубежных источников литературы по фармакогностическому исследованию куркумы длинной, оценке степени изученности и актуальности темы. Согласно цели и задачам исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами исследования служили образцы корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.), сем. Имбирные (*Zingiberaceae*), разных мест произрастания: сырье растений природных ареалов - порошки куркумы (специи) фирм «Galeo», «Cukoria S.A.», «SAI», «Patanjali Ayurved» и других производителей, сырье растений, выращенных на территории Северного Кавказа. Объектами исследования также служили выделенные в индивидуальном виде БАС, рабочие стандартные образцы куркумина, полученный густой экстракт куркумы и препараты сравнения (в исследованиях антиоксидантной активности).

В диссертационной работе использованы методы морфолого-анатомического и фитохимического анализа, в частности, микроскопического исследования, хроматографического анализа – тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ/МС), колоночной адсорбционной хроматографии (КХ), ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, спектрофотометрии. Кроме того, применены различные технологические методы экстракции, оценка антиоксидантной активности в модельных системах (МС) *in vitro*, определение фармацевтической биодоступности (разделительный метод и диффузии в гель). Статистическую обработку данных проводили в соответствии с ГФ РФ XIII издания.

Положения, выносимые на защиту:

– результаты морфолого-анатомического изучения корневищ куркумы длинной;

- данные изучения химического состава корневищ куркумы длинной;
- данные по качественному и количественному содержанию куркуминоидов;
- показатели качества корневищ куркумы длинной и методы их оценки;
- схема получения, данные изучения структуры и физико-химических характеристик куркумина и других доминирующих куркуминоидов;
- данные по разработке антиоксидантного средства «Куркумы экстракт густой» и обоснование выбора суппозиторий в качестве лекарственной формы;
- нормативная и патентная документация на ЛРС «Куркумы длинной корневища» и экстракционный препарат «Куркумы экстракт густой».

Степень достоверности. Степень достоверности представленных результатов исследований определяется достаточными по своему объему данными и количеству материала, использованием современных методов исследования. Для обработки результатов исследований использованы методы статистической обработки, которые проводили в соответствии с ГФ РФ XIII издания с применением программ «Excel 7.0» (MS Office, USA), «Statistica 6.0» (StatSoft, USA). Для разработанных методик количественного анализа проведена валидационная оценка. Выводы, сформулированные в диссертации, аргументированы и логически вытекают из полученных экспериментальных результатов.

Апробация результатов. Основные результаты исследований доложены и обсуждены на Всероссийской конференции с международным участием «Молодые учёные - медицине» (Самара, 2012, 2013, 2016); на IV научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2016), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики (Уфа, 2016), на IV и V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2016, 2017), на

Международной научно-практической конференции «Инновационные внедрения в области медицины и фармакологии (Москва, 2017).

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедр фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (г. Самара), кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (г. Уфа), а также в работу предприятия ЗАО "Самаралектравы" (Самарская обл., с. Антоновка) и Института ботаники Академии наук Абхазии (г. Сухуми).

Личный вклад автора. Автор диссертационной работы лично принял участие в выборе направления исследований, проведении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов, а также в подготовке научных публикаций. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии и выполнении морфолого-анатомических, фитохимических, аналитических и технологических исследований, включая изучение фармацевтической доступности, а также в расчете доз и подготовке образцов препаратов для определения антиоксидантной активности.

Связь задач исследования с проблемами фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России по проблеме: «Комплексные исследования по проблеме создания новых лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения» (№ гос. регистрации 115042810034).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02-Фармацевтическая химия, фармакогнозия (пунктам 2, 3, 6 и 7).

Публикации. Основное содержание работы отражено в 12 печатных работах, из них 3 статьи - в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертационных

исследований, получена приоритетная справка на патент РФ на изобретение «Антиоксидантное средство «Куркумы экстракт густой».

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 140 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, общих выводов, списка литературы; некоторые материалы вынесены в приложения. В работе содержатся 14 таблиц, 37 рисунков. Список цитируемой литературы включает 150 библиографических источников, 112 из которых - на иностранных языках. Во введении сформулированы актуальность, цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость работы, положения, выдвигаемые на защиту. Глава 1 посвящена обзору отечественной и зарубежной литературы по состоянию исследований куркумы длинной (ботаническое описание, культивирование и заготовка, химический состав корневищ растения, структура и свойства куркуминоидов, применение в медицине и др.). Глава 2 включает описание объектов и методов исследования. Глава 3 отражает данные морфолого-анатомического анализа. Глава 4 посвящена фитохимическому исследованию куркумы длинной как источника БАС, углубленному изучению куркуминоидов и, в частности, куркумина в качестве отечественного СО. Глава 5 включает данные исследований по стандартизации корневищ куркумы длинной, обоснование параметров качества и методов их оценки. Глава 6 отражает предложенные подходы по использованию сырья куркумы для получения лекарственных препаратов на примере разработки куркумы экстракта густого, обсуждается его антиоксидантная активность, обосновывается выбор лекарственной формы (суппозитории) как наиболее перспективной для дальнейшего применения экстракта куркумы в лечении колоректального рака.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕНИЯ КУРКУМЫ ДЛИННОЙ

(обзор литературы)

1.1. Характеристика куркумы длинной

Одной из ярких тенденций современной медицины является поиск возможностей внедрения в медицинскую практику пищевых растений и получения на их основе лекарственных препаратов. Причинами возникновения данного направления являются, во-первых, открытие фармакологической активности многих пищевых растений, во-вторых, их крайне низкая токсичность и изученность практически всех возможных побочных эффектов, в связи с тем, что пищевые растения применяются человеком уже многие тысячелетия.

Среди таких растений выделяется куркума длинная (*Curcuma longa* L., *C. domestica* Vahl), сем. Имбирные (*Zingiberaceae*). История ее применения в пищу в качестве специи, а также в народной медицине Индии и Китая, уходит далеко в древность.

Родиной растения считают Юго-Восточную Индию, где выращивается и употребляется наибольшее количество этой пряности. Благодаря арабским купцам, которые постоянно хотели чем-то удивить Европу, куркума стала известна европейцам еще в средние века. Чаще ее называли «индийским шафраном». В Западной Европе также распространено название «Турмерик» (от лат. *terra marita* – достоинство земли). Куркума была известна и популярна в древних времен. Такие целители, как Авиценна, Амасиацы и их последователи применяли куркуму как эффективное противовоспалительное, желчегонное, мочегонное, ранозаживляющее, болеутоляющее средство. Есть такие рекомендации: если съесть 3,5 г корня, с таким же количеством аниса и белого вина, улучшится зрение, откроются закупорки печени, излечится водянка, желтуха [1].

В народной медицине, а также в официальной медицине Индии показаниями для назначения куркумы являются мигрень, язвенный колит, желчно-каменная болезнь, артрит, сахарный диабет, атеросклероз и другие.

При желудочно-кишечных заболеваниях куркуму применяют как антисептик, при хронической диарее и метеоризме. Для лечения рекомендуется принимать порошок, смешанный с водой (1 чайная ложка на стакан воды), при ожоге используют пасту из куркумы с соком алоэ. В Китае куркуму назначают при аменорее, дисменорее, колющих болях в груди, подреберной области и животе, при потере сознания во время лихорадочных заболеваний, а также при эпилепсии, маниях (помешательствах), желтухе, сопровождаемой темной мочой, ревматических болях в плечевом поясе, отеках и боли при травмах [36]. В африканской народной медицине препараты куркумы применяют для лечения заболеваний сердца, сердцебиений, повышения артериального давления, женских заболеваний и некоторых других [48, 82]. В различных русскоязычных литературных источниках, а также в сети Интернет содержится огромное число рекомендаций по применению в домашних условиях этого ценного растения. В частности, при заболевании десен - полоскание: 1 чайная ложка порошка куркумы на стакан теплой воды - для снятия воспалительного процесса, кровоточивости десен, укрепления десен, при простуде и кашле: 0,5 чайной ложки куркумы смешивают с 30 мл теплого молока, принимают 3-4 раза в день, при фарингите: 1 чайную ложку меда смешивают с 1/2 чайной ложки куркумы, держат во рту 3-4 раза в день по несколько минут.

Американские исследователи, изучавшие статистику заболеваемости раком кишечника в различных регионах, отметили крайне низкий процент данного заболевания в Индии [75]. Проводя более глубокий анализ, они предположили, что это может быть связано с компонентами постоянной диеты жителей страны. При проведении скрининга возможных вариантов обнаружилось, что корневища куркумы длинной помимо известных свойств обладают также противоопухолевым действием. С этого момента началось активное изучение куркумы длинной учеными многих стран (Индия, Япония, США, Германия) как перспективного сырья для получения лекарственных препаратов для лечения онкологических заболеваний, сейчас за рубежом

завершаются клинические испытания первых противораковых препаратов растения. Также в настоящее время разрабатываются препараты на основе куркумы длинной для лечения болезни Альцгеймера [2]. Препараты из куркумы длинной проявляют обезболивающее, антиоксидантное, бактерицидное, антисептическое, спазмолитическое, противоотечное, желчегонное действия. В высоких концентрациях оказывают раздражающее действие. Фототоксический эффект отсутствует. Нет ограничений IFRA на применение в парфюмерии и косметике [88].

В нашей стране корневища куркумы реализуются только как пищевое сырье, стандартизованные в соответствии с требованиями и стандартами пищевой промышленности по ТУ 9199-022-57097479-11 (некоторые продаются без маркировки), а также в качестве гомеопатического средства официальным средством является куркумы экстракт сухой. Хотя корневища куркумы длинной в Российской Федерации являются весьма доступным и популярным сырьем, а лекарственные препараты на основе корневищ куркумы известны в нашей стране (раздел 1.4), только отдельные коллективы отечественных ученых приступили к систематическому изучению куркумы как официального вида лекарственного растительного сырья в отечественной фармации и медицине [19]. Были также проведены работы по интродукции растения на территории Северного Кавказа, кроме того, в Абхазии проводятся работы по культивированию [22]. Однако, к началу настоящей работы оставались или не полными, или противоречивыми данные по химическому составу и решению вопросов химической стандартизации, также с позиций доказательной медицины и фармации не были четко обозначены подходы к разработке отечественных лекарственных препаратов из корневищ куркумы длинной. Указанные и некоторые другие обстоятельства, оговоренные во введении к работе, требовали критического осмысления и разрешения ряда вопросов - систематизации данных по ценному растительному сырью как официального вида ЛРС и разработки современной нормативной документации.

коры [13, 21].

Вкус слабжгучий, пряный, слегка горьковатый, приятный. Запах специфический, пряный.

Фенология. Цветет и плодоносит в августе-ноябре.

Природный ареал. Юго-Восточная Азия. Растет на лугах, лесных полянах и опушках [86].

Семейство Имбирные включает 49 родов и 1300 видов многолетних травянистых растений, из которых наиболее широкое применение в медицинской практике получили представители рода имбирь (до 90 видов), куркума (80 видов), кардамон (7 видов). Род куркума (*Curcuma*) принадлежит к отделу *Magnoliophyta*, классу *Liliopsida*, подклассу *Liliidae*, надпорядку *Zingiberanae*, порядку *Zingiberales*, семейству *Zingiberaceae*, трибе *Hedychieae* [35].

1.1.2. Культивирование

Наибольшее распространение в медицине и народном хозяйстве разных стран мира получила куркума длинная (*Curcuma longa* L.) или домашняя (*Curcuma domestica* Val.).

Куркума растет в Индии, Южном и Восточном Китае, на Тайване, Филиппинах, в Индонезии (о. Ява), на Гаити, Ямайке, в Перу, Южной Америке, Камбодже, Шри-Ланке.

Наиболее благоприятным для культивирования куркумы является субтропический климат. Отмечено, что растение прекрасно растет и на высоте 2000 м над уровнем моря.

Индия, особенно Южная и Центральная, обладает наибольшими мировыми запасами растения: ежегодно выращивает (и потребляет ее основную часть) более 135000 т корневищ, а экспортируют только около 10% сырья, при этом являясь основным поставщиком на мировом рынке.

В России освоена культура лишь в оранжереях. Как отмечалось, проведены опыты по культуре куркумы в открытом грунте в районе Сухуми (Абхазия) и на территории Северного Кавказа (Пятигорск). С 1976 г. освоено

промышленное культивирование в Азербайджане [10].

1.1.3. Сбор и заготовка

Подземную часть куркумы выкапывают после увядания надземных органов (в декабре-январе), то есть примерно после 10 месяцев вегетации. Корневище и ответвления от него очищают от корней, погружают в кипяток и сразу же высушивают на солнце. Высушенное корневище иногда приобретает вид рогов. При ошпаривании красящее вещество (куркуминоиды) из специальных клеток распределяется по всей массе, что придает сырью желтую окраску. Подсушенные корневища освобождают от шелухи. Они достаточно тверды, а при разрезе/разломе блестят. Для продажи их растирают в порошок. Хранят в герметичной таре в сухом месте.

1.1.4. Применение куркумы длинной в медицине и других сферах народного хозяйства

В научной медицине разных стран куркума применяется очень широко. На сегодняшний день нет области медицины, где бы не применялся куркумин: от обширного нозологического спектра соматических заболеваний до психических расстройств [101, 143]. Экспериментальные исследования показывают, что куркумин является плеiotропной молекулой, особо, на наш взгляд, важно, что куркума обладает выраженными антиоксидантными свойствами, предупреждает развитие оксидативного напряжения в митохондриях [97, 149]. Многие лечебные свойства куркумы связывают с данным механизмом, причем, с каждым годом число открываемых биологических и фармакологических эффектов динамично возрастает. Придавая особую значимость факту высокой антиоксидантной активности куркуминоидного комплекса, мы в собственных исследованиях по разработке лекарственных препаратов из куркумы провели изучение их влияния в модельных системах на процесс свободно-радикального окисления и влияния на образование активных форм кислорода (глава 6).

Вторым значимым обстоятельством, обуславливающим широкий диапазон применения препаратов куркумы, является установленный факт взаимодействия куркумина с молекулярными мишенями, участвующими в процессах воспаления. Куркумин модулирует воспалительную реакцию, снижая активность ферментов циклооксигеназы-2, липоксигеназы и индуцибельных синтаз оксида азота, а также ингибирует ряд других ферментов, участвующих в механизмах воспаления; в некоторых своих звеньях данный механизм причастен и к опухолевому процессу [69].

Из куркумы выпускается огромное число лекарственных препаратов, в основном относящихся к фармакотерапевтическим группам желчегонных, противовоспалительных, антимикробных и других лекарственных средств; активно разрабатываются на основе куркумы длинной противоопухолевые лекарственные средства, а также препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний и других патологических состояний головного мозга [112, 124, 146]. Различные фитосубстанции из корневищ куркумы длинной входят в состав многокомпонентных лекарственных средств. Из них на фармацевтическом рынке Российской Федерации достаточно длительный период присутствовали лекарственные препараты и БАД ряда европейских производителей и Индии: «Оригинальный большой Бальзам Биттнера» и «Бальзам Маурера Оригинальный» (Австрия), «Панкурмен», «Хологогум» и «Холафлукс» (Германия), «Соларен» (Польша, Украина), «Холивер» (Украина), «Фебихол» (Словакия), «Холагол» (Чехия, Великобритания), «Суприма-бронхо» и «Сироп доктор МОМ» (Индия), «Темюлавак» (Нидерланды) и др. [37,38]. В настоящее время указанные лекарственные препараты куркумы не зарегистрированы в Российской Федерации (<http://www.grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>).

На сегодняшний день при всей популярности и ценности растения, анализ ассортимента различных фитосубстанций из куркумы на российском рынке показывает доминирование продуктов функционального питания или биологически активных добавок к пище («лекарством не являются»), причем

зарубежного производства. Единственно, экстракт куркумы был включен в отечественный препарат «Овесол».

При этом огромное число ученых из различных стран активно занимается разработкой лекарственных средств, и эти исследования носят глубокий и системный характер, о чем свидетельствуют многочисленные работы зарубежных авторов в мировом публикационном потоке, включая отчеты по многоцентровым рандомизированным двойным слепым, плацебо-контролируемым клиническим исследованиям различных фаз, в т.ч. постмаркетинговые исследования [116].

Не ставя в настоящей работе цели осветить весь широчайший нозологический спектр, по поводу которого исследуются и применяются различные фитосубстанции куркумы, на наиболее принципиальных и интересных с исследовательской точки зрения данных в качестве ориентира для отечественных разработок необходимо остановиться подробнее. В качестве таковых, на наш взгляд, особого внимания заслуживает онкопатология. К настоящему времени уже имеются многочисленные сведения (первые систематические исследования, как отмечалось, были проведены американскими учеными) о том, что куркумин, либо самостоятельно, либо в сочетании с другими средствами, демонстрирует высокую эффективность в отношении колоректального рака (КРР), рака поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, множественной миеломе, раке легких, полости рта, плоскоклеточном раке головы и шеи [56,59,104,105,138]. Причем исследуемые учеными и затем рекомендуемые диапазоны доз существенно разнятся, что во многом, по нашему мнению, связано с вопросом биодоступности (как известно, исходно низкой) куркуминоидного комплекса, а также, по всей видимости, в проявлении дозозависимого эффекта в сложном и не до конца изученном взаимодействии антиоксидантного воздействия и опухолевого роста. По данному аспекту опубликовано интересное исследование: при сравнении 500 мг и 6000 мг куркумина антиоксидантный потенциал двух доз отличался

незначительно, даже меньшая дозировка имела некоторые преимущества (незначительного увеличения AUC при исследовании антиоксидантных свойств, измеренных с помощью адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам). Объясняется это возможным прооксидантным эффектом куркумина в более высоких дозировках, наблюдаемым в присутствии других антиоксидантов [144]. Однако, по мнению большинства исследователей допускается дозировка до 10 г - 12 г куркумы в сутки в течение 3-х месяцев (т.е. без выраженных побочных эффектов). Другие исследователи ограничивают безвредный прием у здоровых лиц 8,0 г (при превышении дозы наиболее часто упоминают диарею, тошноту, головную боль, сыпь, желтый стул); если речь идет о лицах из групп риска предраковых поражений, то есть сведения, что куркумин в дозах от 0,45 до 3,6 г/сут. в течение от 1 до 4 месяцев у таких пациентов может приводить к увеличению в сыворотке крови щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы [108]; в еще одном исследовании пациентов с раком поджелудочной железы - у 5 из 17 пациентов, получавших куркумин в дозе 8 г/сут. в комбинации с гемцитабином, наблюдались сильные боли в животе от нескольких дней до 2 недель (Приложение 5). Эти и другие сведения показывают, что в вопросах назначения и дозировки даже такого пищевого, априори безопасного растения как куркума вопрос об ограничениях и противопоказаниях при применении ее препаратов должен решаться в обязательном порядке.

Помимо отсутствия единого мнения по диапазону терапевтических доз в ряду: сырье - суммарный экстракт - куркуминоидный комплекс - индивидуальное вещество (не говоря уже об их вариациях и формах), с фармакогностических позиций в части химического состава также не до конца ясно, что подразумевается под обозначением «куркумин», «куркумы экстракт» и некоторыми другими исследуемыми субстанциями. В этой связи, та часть источников литературы, в которой содержатся достаточно определенные указания на исследования именно индивидуальных веществ или их очищенной суммы, обсуждены отдельно в разделе 1.2.2.

В данном разделе приводятся сведения по экстракционным препаратам куркумы, в названиях которых, как отмечалось, может использоваться по сложившейся в ряде стран практике обозначение «куркумин». Некоторая систематизация сведений в данном разрезе нам представляется целесообразной, поскольку является отражением традиционных подходов Европейской медицины (начиная с эпохи Галена), включая отечественные подходы в работе с лекарственным растительным сырьем. В частности, наши дальнейшие исследования во многом были обращены к решению ряда вопросов по получению нативного комплекса БАС в форме густого экстракта (глава 6).

Сводная информация по широчайшему спектру биологической и фармакологической активности лекарственных субстанций и препаратов куркумы, в основном базирующаяся на аналитическом обзоре данных клинических исследований Subash C. Gupta с соавторами (2013), вынесена в Приложение 5 и ввиду терминологической разницы обозначений состояний и фармакологических эффектов в отечественной и зарубежной экспериментальной и клинической медицине приведена в исходной редакции со ссылками на публикации. В приведенных далее сведениях, выделенных нами как интересные и перспективные для отечественных ученых, все обозначения даны в переводе также авторской редакции.

В экспериментальном исследовании в отношении пациентов с КРР, резистентных к стандартной химиотерапии, была произведена оценка фармакокинетики и фармакодинамики «стандартизированного куркумы экстракта» в виде капсул с возрастанием дозы от 440 до 2200 мг/сут., содержащих 36-180 мг куркумина [94]. Прием 440 мг/сут. куркумы экстракта в течение 29 дней сопровождалось снижением на 59 % активности лимфоцитарной глутатион-S-трансферазы. Дальнейшее увеличение дозы статистически значимых изменений не выявило. В других исследованиях (в т.ч. на основании оценки уровня простагландина E₂ и M1Г) делается вывод, что суточная доза 3,6 г куркумина является фармакологически эффективной у

больных КРР [134]. В еще одном недавнем исследовании больным КРР после установления диагноза и до операции куркумин вводили в дозе 360 мг в форме капсул три раза в день в течение 30 дней. Куркумин вызывал повышение массы тела, снижение сывороточного уровня ФНО- α , увеличение количества апоптотических клеток и повышенную экспрессию p53 в опухолевой ткани. Исследователи пришли к выводу, что куркумин эффективен в лечении исследуемой категории пациентов за счет реализации механизма увеличения экспрессии белка p53 в пораженных клетках [54].

Куркумин было признан эффективным, безопасным и хорошо переносимым в дозе 8 г в сутки во II фазе клинических исследований у больных раком поджелудочной железы [126], выявлены антимуtagenные свойства куркумы в исследованиях 16 хронических курильщиков [111]; при приеме 1,5 г/сут. в течение 30 дней (значительно снижается выделение с мочой мутагенов).

Одной из сильных фундаментальных работ, посвященных изучению противоопухолевого действия куркуминоидного комплекса, на наш взгляд, является исследование механизмов хемопротективного эффекта куркумина путем ингибирующего действия на ядерный фактор каппа-В - протеин, который может влиять на генетическое кодирование и транскрипцию при активации. В норме TNF- α (провоспалительный цитокин) имеет положительное влияние на активность ядерного фактора каппа-В и индуцирует рост, выживаемость и воспаление клеток. Куркумин, по всей видимости, ингибирует взаимодействие между двумя молекулами без снижения уровня TNF- α и кроме ингибирования цитопротекции при увеличенном уровне TNF- α может вызывать гибель клеток посредством протеина, связанного с синтазой жирных кислот и каспазой-8. Этот механизм сенсibiliзирует клетки для гибели клеток, вызванной TNF- α посредством ингибирования выживаемости клеток с помощью ядерного фактора каппа-В и наиболее вероятно за счет способности куркумина предотвращать или снижать активацию p38 в присутствии других активаторов [57]. Второй

возможной молекулярной мишенью куркумина, как считают авторы, является семейство протеинов, известное как специфичные протеины, которые включают Sp1, Sp3 и Sp4. Эти протеины являются факторами транскрипции, вовлеченными в регуляцию роста и клеток и выживаемость. 10-25 мМ куркумина *in vitro* увеличивали уровень всех трех этих протеинов в культуре клеток мочевого пузыря, что в итоге приводило к гибели клеток. Механизм действия куркумина еще не полностью изучен, но, как минимум, частично включает стимуляцию протеасомной деградации этих факторов транскрипции.

Достаточно много работ опубликовано зарубежными авторами и в отношении влияния «куркумина» на процесс метастазирования опухолей различного генеза, что отдельно в настоящей работе не рассматривается.

Подводя промежуточные итоги, учитывая уровень и интенсивность экспериментальных и клинических исследований (часто в составе международных групп ученых) препаратов куркумы длинной в отношении противоопухолевой активности, в ближайшее время следует ожидать выход на мировой фармацевтический рынок ряда зарубежных разработок, что тем более показывает актуальность отечественных разработок [39-42, 93, 122].

Применение в других отраслях народного хозяйства связано, прежде всего, с тем, что куркума является классическим пряно-ароматическим растением. В Индии и ряде других, ранее отмеченных регионах, с древних времен куркуму используют в пищу, но помимо этого и в качестве красителя в косметике. В средние века в Европе такого широкого применения, как, например, ваниль и гвоздика, куркума не имела. Исключение, пожалуй, составляла Англия. Сейчас куркуму в России и Европе знают, любят и ценят, также широко используется эта пряность в США.

Куркума применяется в пищевой промышленности разных стран для окрашивания сливочного масла, сыров и других продуктов. Примечателен и тот факт, что при тепловой обработке мяса образуются гетероциклические

амины, оказывающие мутагенное воздействие; добавление куркумы предотвращает образование этих вредных веществ [109]. Если учитывать ранее изложенные варианты мнений по терапевтическим дозировкам и особо – о проявлениях нежелательных эффектов куркумы, то, по нашему мнению, можно дать следующую рекомендацию по использованию корневищ куркумы, как таковых, в качестве приправы в пищу: 2 г – 4 г в день. С учетом низкой биодоступности нативного комплекса куркуминоидов, органопротекторные свойства в более низких концентрациях не проявятся, также в рекомендуемой дозировке будут практически исключены нежелательные эффекты [74,114].

Классификация турмерика в системе «Codex Alimentarius» (пищевые красители) — E100; Куркумин может также называться NCB-02 (нормализованная смесь куркуминоидов). Используется и в парфюмерии как компонент духов [34].

1.1.5. Химический состав и стандартизация корневищ куркумы длинной

Данные из различных литературных источников достаточно сильно варьируют. Особенно это касается не столько наличия определенных соединений в химическом составе корневищ куркумы, сколько их процентного соотношения.

Так, фармакопея КНР приводит следующие данные: корневища содержат эфирное масла, богатое сесквитерпенами и тритерпенами: турмероны, в основном, ар-турмерон, дигидротурмерон, куркумен, гермакрон, артуркумен, цинеол, б-терпинен, курзеренон, курдион, а-пинен, б-пинен, лимонен, линалоол, кариофиллен, борнеол, зингиберин, α-атлантон, β-атлантон; углеводороды (сабинен, (+)-α-фелландрен) и каприловая кислота. Кроме того, в корневищах обнаружены: кампестерин, стигмастерин, b-ситостерин, жирные кислоты, микроэлементы [51, 100].

Исследования, проведенные пятигорскими учеными, показали наличие в химическом составе корневищ куркумы длинной (вьетнамские образцы) комплекса фенольных соединений, в частности производных и близких

аналогов оксикоричных кислот. С использованием ВЭЖХ ими было установлено содержание хлорогеновой, кофейной, галловой, феруловой, неохлорогеновой и других кислот [22].

Основной группой биологически активных соединений (БАС), обуславливающие желто-оранжевый цвет сырья и в основном определяющей фармакологический спектр препаратов растения, являются куркуминоиды. По структуре данные соединения являются диарилгептаноидами (также в литературе употребляются термины – диферуоилметан, дициннамоилметан-производные, гептадиеновые производные). Доминирующими соединениями являются куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин, также в незначительных количествах содержатся куркумон, 1'-метил-1',2',3',6'-тетрагидроацетофенон и ряд других гептадиеновых производных [77].

Куркумин может существовать в нескольких таутомерных формах, в том числе в виде 1,3-дикето и двух эквивалентных енольных форм; енольная форма является более энергетически стабильной в твердом и в растворенном состоянии [83]. Из отечественных работ последнего времени, обращающихся к структурному анализу куркуминоидов, можно выделить работу московских авторов [29], которые с использованием данных ИК- и УФ-спектров также показали доминирование в растворах енольной формы куркумина или в равновесии с кетонной формой, что зависит от полярности растворителя: в полярных растворителях, стабилизирующих карбонильные группы (сольватация) присутствуют обе формы, а в неполярных только одна – енольная (это мы подтверждаем по данным полученных ^1H -ЯМР спектров в хлороформе и ДМСО). Авторы также делают вывод о доминировании цис-енольной формы в твердом состоянии вещества (что мы не можем ни опровергнуть, ни подтвердить, поскольку не указан точно объект исследования и особенности его подготовки; однако, вывод об обусловленности окраски только данной таутомерной формой нам представляется спорным).

Структурные особенности, биосинтез и профиль фармакологической

активности куркуминоидов делает целесообразным их отнесение к самостоятельному классу соединений полифенольной природы (очевидны различия по строению углеродного скелета в сравнении с простыми фенольными соединениями, флавоноидами, стильбенами и другими классами), как вариант - к одной из групп самостоятельного класса фенилпропаноидов, а именно к производным гидроксикоричных кислот (коричной, феруловой) по типу неолигнанов [15].

Учитывая определяющий вклад куркуминоидного комплекса в спектр фармакологической активности препаратов куркумы, анализировать сырье и соответствующие препараты прежде всего необходимо по данной группе БАС. Важно отметить, что куркумин также обнаружен в ограниченных количествах в куркуме буростебельной (0,098 мг/г) и в минорных количествах - в имбире лекарственном. Учитывая данные факты куркуминоиды нельзя считать специфичными БАС для куркумы длинной (но доминируют они только в этом растении). Данное обстоятельство учитывалось нами при выработке подходов к химической стандартизации изучаемого сырья, начиная с исследования химического состава куркуминоидного комплекса и определения соотношения доминирующих компонентов хроматографическими методами. При этом методологические возможности метода ВЭЖХ по данному аспекту были успешно продемонстрированы и зарубежными и отечественными учеными [78, 80, 90, 92, 136, 148], а также были применены и в ходе собственных исследований (глава 4).

Не смотря на достаточно хорошо изученный компонентный состав основных групп БАС куркумы длинной, мнения и сложившиеся в разных странах подходы к стандартизации сырья растения различаются, начиная с выбора анализируемой группы соединений [45]. Так, по требованиям Фармакопеи КНР, регламентируется содержание эфирных масел: должно быть не менее 7,0% [141]. Но с учетом широкой распространенности ранее указанных компонентов эфирного масла в растительном мире, и, в частности, в других представителях семейства Имбирные вряд ли такой подход можно

считать оптимальным. Кроме того, не учитывается содержание куркуминоидного комплекса. В этом плане в Европейской фармакопее (в которую, как ранее отмечалось, также включена куркума желточерешковая) для куркумы длинной регламентируется содержание и эфирного масла (не менее 5 %), и дициннаоилметана в пересчете на куркумин (не менее 1 %, что несколько по нашим сведениям занижено); качественный анализ предусматривает обнаружение бисдезметоксикуркумина методом ТСХ-анализа (а не доминирующего куркумина, что было бы логичнее) [71]. Аналогичный подход используется и в фармакопее Японии.

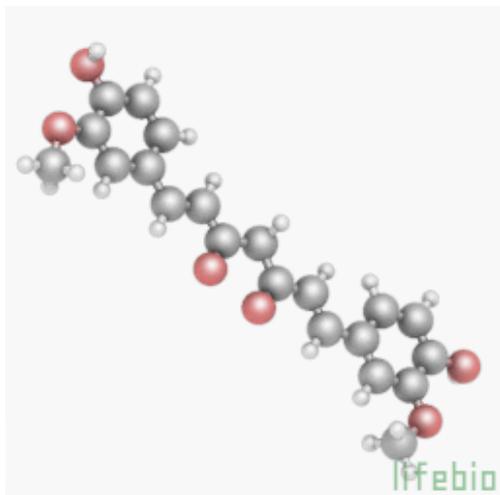
При этом, на наш взгляд, уровень зарубежной нормативной базы, регламентирующей качество сырья куркумы длинной, значительно уступает уровню фитохимических исследований, масштабно и интенсивно проводимых целым рядом зарубежных исследовательских коллективов, в т.ч. международных [79]. И что еще более странно, приоритет и наибольшие успехи в изучении куркумы достигнуты в тех странах, где ранее указанные фармакопее и составляются (а в фармакопею Индии растение вообще не входит).

В этом плане очевидна необходимость выработки собственных подходов к решению проблемы стандартизации сырья куркумы длинной, исходя из современных требований к фармацевтическому анализу, и разработки соответствующей нормативной документации [17, 28]. Данная проблема к началу собственных систематических исследований, по нашему мнению, во многом была корректно решена пятигорскими исследователями [4,5]. В частности, было предложено для целей качественной оценки обнаружение пятен доминирующих куркуминоидов в предложенных условиях ТСХ-анализа, для количественной оценки также куркуминоидного комплекса обосновано определение суммы куркуминоидов в варианте дифференциального спектрофотометрического анализа батохромного комплекса (руброкуркумина) аналитов с борной и щавелевой кислотами с использованием удельного показателя поглощения указанного комплекса СО

куркумина [20]. Однако, при выборе методики для решения проблемы стандартизации сырья авторы отдают предпочтение методике ВЭЖХ-анализа, о чем подробнее речь пойдет в экспериментальной части (глава 5). В продолжение данных исследований в настоящей работе (при анализе предоставленных пятигорскими коллегами для углубленных исследований культивируемых образцов растений) нами были уточнены некоторые параметры методик качественного и количественного анализа и предложен к использованию куркумин в качестве отечественного стандартного образца (глава 5). Кроме того, потребовалась разработка разделов «Внешние признаки» и «Микроскопические признаки».

Некоторые аспекты изучения куркумы длинной как перспективного источника получения БАС и экстракционных препаратов на ее основе были рассмотрены московскими исследователями [13]. В частности, для 3-х коммерческих образцов ими установлено содержание экстрактивных веществ (значения колеблются в диапазоне 12% - 18%) и содержание дубильных веществ (от 3,3% до 4,6%); данные сведения нами также принимались во внимание, наряду с многочисленными работами зарубежных авторов и некоторых отечественных ученых [10,11].

1.2. Характеристика куркуминоидов как самостоятельной группы биологически активных соединений



Куркумин

1.2.1. Структура и физико-химические свойства куркуминоидов

Доминирующим соединением группы является куркумин. Впервые он был выделен из корневищ куркумы в 1815 г. [145], а первый вариант его структуры был предложен в 1910 г. учеными J. Miłobędzka, Stanisław Kostanecki и Wiktor Lampe [66].

В ряде литературных источников совокупность производных куркумина (куркуминоидный комплекс) называют просто «куркумин», подразумевая при этом суммарную фракцию, получаемую при производстве пищевого красителя, что было оговорено ранее (раздел 1.1.4).

Пути биосинтеза куркуминоидов являются достаточно сложными для исследования [83]. В 1973 г. Roughly и Whiting предложили два механизма биосинтеза куркумина. Первый механизм включает цепную реакцию расширения при участии коричной кислоты (группа коричных кислот в классификации фенилпропаноидов) и 5 молекул малонил-КоА, что в конечном итоге приводит к образованию куркуминоида. Второй механизм включает в себя два структурных фрагмента коричной кислоты, соединенные вместе с помощью малонил-КоА. В обоих механизмах в качестве отправной точки рассматривается коричная кислота, что является редкостью по сравнению с более распространенным путем биосинтеза ряда фенольных соединений на основе пара-кумаровой кислоты. Экспериментального подтверждения биосинтетической реакции не было представлено вплоть до 2008 г., когда было предложено использовать цепочки реакций, реализующих одновременно оба механизма (предложенные Roughley и Whiting). Однако, в идентифицируемых промежуточных продуктах подтверждается первый механизм (в котором молекулы 5 малонил- CoA вступают в реакцию с

коричной кислотой, образуя куркумин). Тем не менее, последовательность, в которой функциональные группы, спиртовая и метокси-группа представлены на куркуминоиде, больше указывает на второй из предложенных механизмов. Таким образом, был сделан промежуточный вывод о том, что второй путь, предложенный авторами, является природным.

В нашем исследовании значимым из приведенных зарубежных данных является факт происхождения от фенилпропаноидов (группы гидроксикоричных кислот), который обозначил в качестве самостоятельного класса БАС В.А. Куркин (1996 г. – первая монография автора по классификации фенилпропаноидов), а также особенности фрагментации молекул куркуминоидов [15,91], о чем пойдет речь далее и будет подтверждаться данными структурных исследований в экспериментальной части работы (раздел 4.2).

Существует три основных компонента «куркумина» представленных в различных пропорциях в разных видах рода *Curcuma*, для *Curcuma longa* наиболее часто приводится следующее соотношение: 70±5% куркумина, 20±5% дезметоксикуркумина и 10±5% бисдезметоксикуркумина [68].

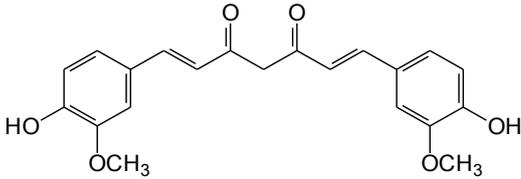
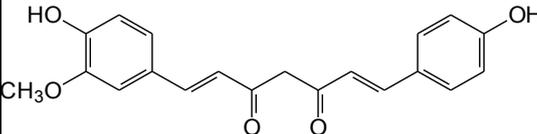
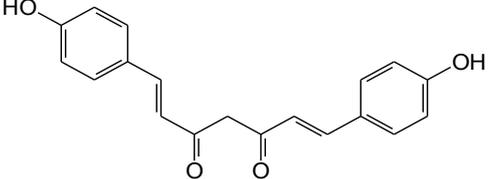
В настоящее время этой группе соединений приписывают большинство биологических и фармакологических эффектов, которыми обладает куркума. Однако до конца не ясно - какие конкретно эффекты в большей степени обусловлены тем или иным веществом [113]. В одних источниках указывается куркумин, как основной действующий компонент [43,98], в других – бисдезметоксикуркумин отмечается как наиболее активное вещество [135], либо приводятся данные о большей эффективности совокупности трех куркуминов по сравнению с отдельными субстанциями [132].

При этом химическая группировка, сочетающая в себе сопряженную цепь и две енольные группы (кето-енольные, кетонные), обеспечивающая, по-видимому, все характерные эффекты куркуминоидов, находится в структуре всех трех. Отсюда вытекает и разделяемый нами подход по суммарной оценке куркуминоидного комплекса в сырье и соответствующих экстракционных

препаратах (глава 4).

Характеристика куркуминоидов приведена в табл. 1.

Таблица 1 - Характеристика доминирующих куркуминоидов

Название (тривиальное, химическое по номенклатуре IUPAC)	Химическая структура, брутто-формула, молекулярная масса	Описание, физико- химические константы
Куркумин (1), диферулоилметан; 1,7-бис(4-гидрокси-3- метоксифенил)-гепта-1,6- диен-3,5-дион-(1E,6E)	 C ₂₁ H ₂₀ O ₆ М.м. 368,38	Порошок оранжевого цвета. $\lambda_{\max}(\text{EtOH})$ 425 нм ± 3 нм; т. пл. 183 °С ± 3 °С
Дезметоксикуркумин (2), 4-гидроксициннамоилметан; 1-(4-гидрокси-3- метоксифенил)-7-(4- гидроксифенил)-гепта-1,6- диен-3,5-дион- (1E,6E)	 C ₂₀ H ₁₈ O ₅ М.м.338,35	Порошок желтого цвета. $\lambda_{\max}(\text{EtOH})$ 424 нм ± 3 нм; т. пл. 172 °С ± 3 °С
Бисдезметоксикуркумин (3), бис (4-гидроксициннамоил); 1,7-бис(4-гидроксифенил)- гепта-1,6-диен-3,5-дион- (1E,6E)	 C ₁₉ H ₁₆ O ₄ М.м. 308,33	Порошок желтого цвета. $\lambda_{\max}(\text{EtOH})$ 420 нм ± 3 нм; т. пл. 222 °С ± 3 °С

Помимо этих основных компонентов, существуют соединения, встречающиеся в минорных количествах, являющиеся геометрическими изомерами куркуминоидов.

Один из них, например, считается геометрическим изомером куркумина, имеющим транс-транс конфигурацию (рис. 1).

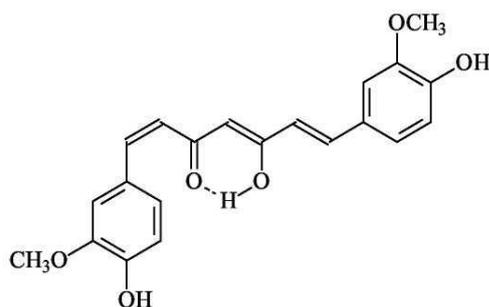


Рисунок 1 - Цис-транс изомер куркумина (1)

В «куркумин» также могут входить небольшие количества эфирных масел и смолистых веществ. Основной составляющей этих масел являются сексвитерпеновые кетоны и спирты: α -турмерон, β -турмерон, цирлон, зингиберен и др.

Куркумин – липофильный пигмент, практически не растворимый в воде при кислой и нейтральной pH и растворимый в щелочах, также растворим в большинстве органических растворителей, в том числе в этаноле, метаноле, ацетоне, диэтиловом эфире, хлороформе, четыреххлористом углероде, ацетонитриле и др. [119,125].

Имеются данные о получении водных растворов куркумина с помощью включения в различные сурфактант-мицеллярные системы, такие как додецил сульфат натрия, цетилпиридин бромид, желатин, полисахариды, полиэтиленгликоль, циклодекстрины и др. [117,133,142].

В растворе основные красящие компоненты куркумина проявляют кето-енольную таутомерию и, в зависимости от растворителя, до 95% находятся в енольной форме (рис. 2).

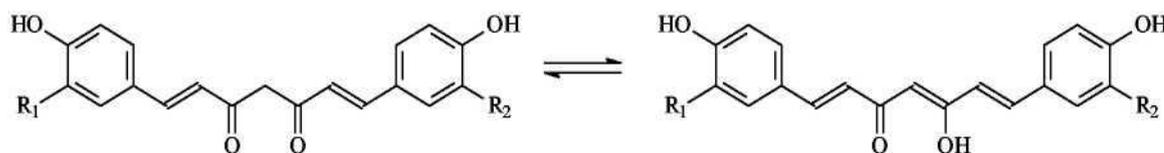


Рисунок 2 - Кето-енольная таутомерия

Кинетика реакций гидролитического разложения куркумина (**1**) при различных рН от 1 до 11 изучалась с помощью ВЭЖХ [53]. При рН<1 водные растворы диферулоилметана имеют красный цвет, определяемый протонированной формы (H_4A^+).

При рН от 1 до 7, основная часть диферулоилметана находится в нейтральной форме (H_3A). Растворимость в воде в этом интервале рН очень низка, раствор окрашен в желтый цвет. При рН>7,5 цвет раствора меняется на красно-бурый. Значения рКа диссоциации трех протонов в куркумине (**1**) (формы H_2A^- , HA^{2-} и A^{3-}) определены в 7,8, 8,5 и 9,0 соответственно (рис. 3).

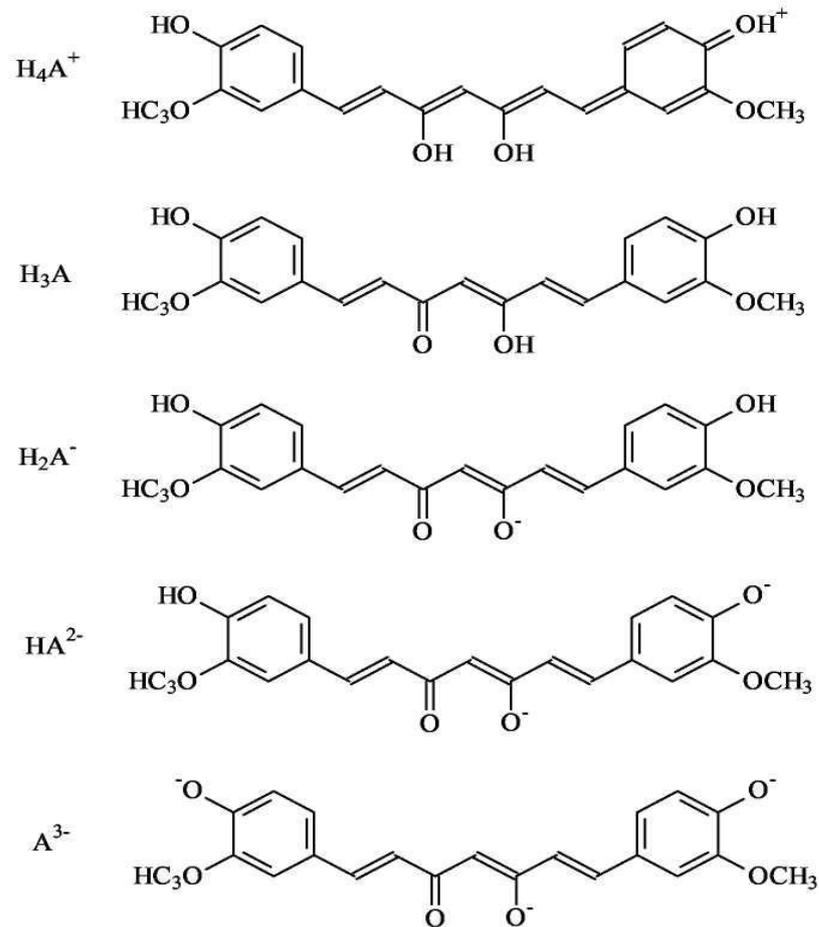


Рисунок 3 - Формы куркумина при различных значениях рН

Основные компоненты «куркумина» относительно стабильны при кислой рН, но быстро разлагаются при рН выше нейтральной. При изучении разрушения куркумина (**1**) в щелочной среде, были определены продукты распада при рН 7-10. Продукты первоначального разрушения, появившиеся

через 5 минут, и хроматографическая модель, полученная через 28 часов при $\text{pH} = 8,5$, показательны для щелочного расщепления. Вначале формируются феруловая кислота и ферулоилметан. Последний определяет цвет (от желтого до коричнево-желтого) продуктов конденсации. Продукты распада, образующиеся при гидролизе ферулоилметана, – это ванилин и ацетон, количество которых зависит от времени гидролиза (рис. 4).

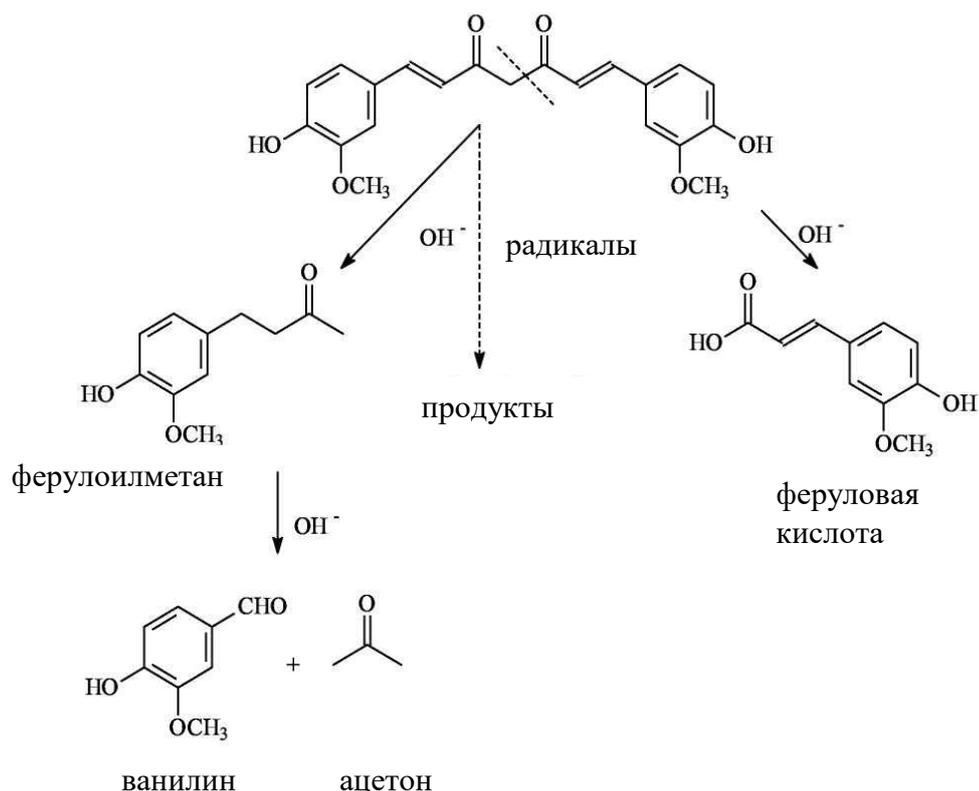


Рисунок 4 - Щелочной гидролиз куркумина

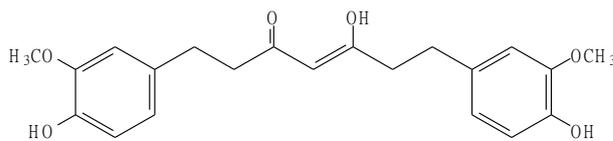
В другом исследовании «куркумин» был помещен в 0,1 М фосфатного буфера, $\text{pH} 7,2$ при 37°C , и около 90% разложилось в течение 30 минут. Транс-6-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2,4-диокси-5-гексенал был определен как основной продукт распада, в то время как ванилин, феруловая кислота, ферулоилметан находились в минорных количествах.

В нативной форме куркумин не подходит в качестве красящего агента в водных растворах при $\text{pH} > 7$.

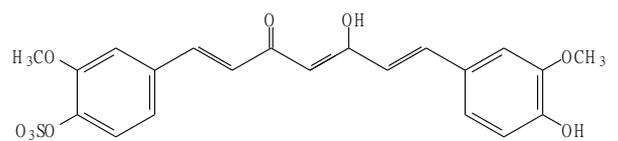
Куркумины не стабильны на свету, особенно в растворах. После облучения светом куркумина (1), был обнаружен продукт циклизации, также

как и продукты разложения (ванильная кислота, ванилин и феруловая кислота).

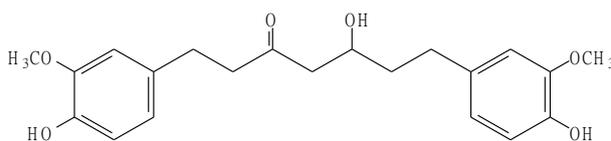
Особый интерес представляют метаболиты куркуминоидов. При поступлении куркуминоидов через желудочно-кишечный тракт они проходят метаболизирование с образованием конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами. В то же время при введении куркуминоидов внутривенно или внутривнутрибрюшинно их метаболизм идет по пути восстановления с образованием тетрагидрокуркумина, гексагидрокуркумина и гексагидрокуркумола [106, 107]. При этом тетрагидрокуркумин проявляет биологическую активность, иногда превосходящую сам куркумин, например по антиоксидантному действию [50]. Структурные формулы метаболитов куркумина приведены на рис. 5.



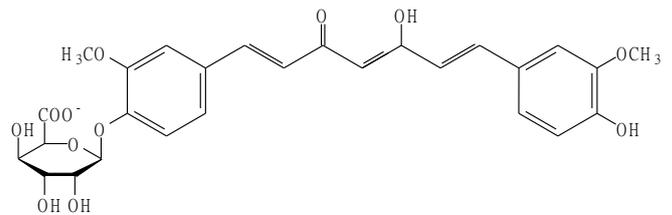
Тетрагидрокуркумин



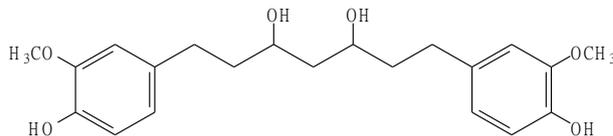
Сульфокуркумин



Гексагидрокуркумин



Куркумина глюкуронид



Гексагидрокуркумол

Рисунок 5 - Метаболиты куркумина

Среди работ отечественных авторов следует отметить публикацию Берзина В. Б. и соавт. [11], в которой установлены основные направления фрагментации куркуминов и их метиловых эфиров при масс-спектрометрическом анализе, что позволяет идентифицировать эти соединения в экстрактах, выделяемых из природных источников. В частности, предложено определение куркуминов в виде О-ме-тилпроизводных с применением ВЭЖХ-анализа. Однако, нам представляется трудоемким подход к выделению анализируемой группы веществ - экстракция хлороформом с последующей однократной или двуступенчатой экстракцией этанолом и в свете ранее изложенных данных зарубежных авторов по нестабильности куркуминоидов, – дающий заниженные результаты.

1.2.2. Фармакологические свойства куркуминоидов

К известным свойствам куркумина относят его противораковую, противоамилоидную, антиоксидантную, противовоспалительную и противовоспалительную активность, а также он является эффективным временным средством при лечении метаболического синдрома.

По данным различных источников, активность и механизм(ы) реакции, обеспечивающей антиоксидантный эффект, на сегодняшний день представляются весьма спорными; так, одни авторы утверждают, что антиоксидантная активность связана с гидроксильной частью [43, 85], в то время, как другие - указывают на двойную карбонильную группу, по отдельности или вместе, с пара-гидрокси группами [132]. Тем не менее, исследования показали, что куркумин обладает очень мощным антиоксидантным эффектом [60,127,130]. Антиоксидантный эффект куркумина в 8 раз более сильный, чем витамина Е [106], что было уточнено в ходе дальнейших исследований (глава 6). Также значительно большим эффектом он обладает в отношении предупреждения образования пероксидных форм липидов, чем синтетический антиоксидант ВНТ [68].

По сравнению с другими известными антиоксидантами, куркумин более

активен в защите от действия афлатоксина В₁ на печень. Жировые перерождения, некрозы и гиперплазия желчного пузыря вызванные афлатоксином В₁ полностью восстанавливаются куркумином.

Куркуминоиды обезвреживают свободные радикалы, за счет собственного преобразования в свободные радикалы. Согласно отчету о научно-исследовательской работе [95], эти новообразованные свободные радикалы - мало реакционноспособные и коротко живущие продукты (в отличие от синтетических полифенолов, таких как ВНТ или ВНА) и не оказывают токсического действия на организм.

Имеются данные о том, что в органических растворителях и некоторых сурфактант-мицеллярных системах куркуминоиды действуют как фотосинтезаторы синглетного кислорода, супероксидов и свободных радикалов [128]. Эта способность также может оказывать дестабилизирующий эффект на куркумин-содержащие продукты (например, приправленные карри) и лекарственные формы. С другой стороны, светоиндуцированное окисление отчасти объясняет бактерицидные свойства куркумы.

Куркумин может быть эффективен при лечении малярии, предупреждении рака шейки матки. Имеются сведения о том, что куркумин обладает способностью подавлять репликацию вируса ВИЧ, по-видимому, связано это с ингибированием Р300/CREB-строительного белка (СВР) - его обратной транскриптазы [58].

Куркумин действует как антиоксидант, ингибируя пероксигенацию липидов и окислительное повреждение ДНК. Куркуминоиды индуцируют глутатион S-трансферазу и ингибируют цитохром Р₄₅₀.

Противоопухолевые свойства могут быть связаны с ингибированием биосинтеза эйкозаноидов. Противораковый эффект куркуминоидов также связывают с их способностью вызывать апоптоз клеток опухоли, не оказывая при этом цитотоксического действия на здоровые клетки. Куркумин также влияет на деятельность фактора NF-κB, который связывают со многими видами рака [55].

Обнаружена и исследована способность куркуминоидов угнетать синтез онкопротеина MDM2 через PI3K/mTOR/ETS2 путь, который связывается с p53. В мартовском номере за 2007 год «Cancer Research» Мао ЛИ и соавт. из «Центра по изучению рака Университета Алабамы» сообщают об исследовании молекулярного механизма противоракового действия куркумина на модели рака предстательной железы [95].

На линии клеток PC-3 рака простаты человека, выращенных *in vitro*, было показано, что куркумин снижает экспрессию иРНК и белков MDM2 и увеличивает экспрессию модулятора p21. Это запускает апоптоз и угнетает пролиферацию культуры клеток PC-3.

Мыши с ксенотрансплантатами клеток PC-3 получали куркумин перорально 5 дней в неделю в течение 4 недель, тогда как контрольная группа получала только хлопковое масло. Мыши были поделены на 4 группы по 5 в каждой: 1 - получавшие только куркумин, 2 - получавшие гемцитабин внутривенно, 3 - получавшие лучевую терапию и 4 - контрольная группа. В конце эксперимента оценивали размер опухоли. По сравнению с контрольной группой, во всех группах, получавших куркумин, уменьшился рост опухоли и увеличилась эффективность радиотерапии и лечения гемцитабином.

Исследования, проведенные в 2004 году UCLA-Veterans Affairs, с использованием генетически измененных мышей, показали, что куркуминоиды ингибируют образование и накопление бета-амилоидов в мозге при болезни Альцгеймера и также разрушает существующие тромбоциты, обусловленные этой болезнью [47].

Куркумин снижает риск развития гипертрофии миокарда и инфаркта. К таким выводам пришли канадские ученые из кардиологического центра имени Питера Мунка, изучившие действие вещества на мышцах. Подопытные животные показали снижение степени гипертрофии, а главное - практически полное отсутствие фиброза при повреждении мышцы сердца. Как было установлено, куркумин блокирует фенилэфрин-индуцируемую гипертрофию,

а кроме того, разобщает воспалительный цикл за счет «выключения» реакций ацетилирования гистоновых белков хромосом [139].

Сообщается, что куркумин обладает достаточно сильным противовоспалительным действием. Один из механизмов противовоспалительного действия куркумина связывают с его способностью блокировать синтез про-воспалительной арахидоновой кислоты. Еще более интересны работы, изучающие взаимодействие противовоспалительной активности и опухолевых клеток. Группа ученых Гупта С.К., Ким И.Н., Прасад С, Аггарвал Б.Б. зарегистрировала открытие «Регуляции выживаемости, пролиферации, инвазии, ангиогенеза и метастазирования опухолевых клеток посредством модуляции воспалительных путей, нутрицевтики» (Откр. 2010;29(3):405-434. doi: 10.1007/s10555-010-9235-2) [113].

Широко известно, что высокоэффективными и нашедшими широкое применение в лечении больных с хроническими диффузионными заболеваниями печени и желчного пузыря являются препараты на основе экстракта из корневищ куркумы длинной (препарат «Фебихол»), а также лекарственные средства комбинированного действия, в состав которых входит куркума («Холивер», «Гепатофальк планта», «Холагогум») [3, 38].

Наиболее выраженными терапевтическими свойствами обладают куркумины 1 и 2, на основе которых получены активные субстанции - фенилбутилкарбинол (фенипентол) и мезитилкарбонат. Действующие вещества, содержащиеся в куркуме, оказывают холеретический и холекинетический эффекты. Холеретическое действие характеризуется дозозависимым повышением секреции желчи. Обнаруженные в эксперименте на животных холеретический и холекинетический эффекты экстракта куркумы подтверждены и при его применении в клинической практике. Следует отметить, что на фоне приема препаратов куркумы наблюдалось повышение выделения не только жидкой части желчи, но и билирубина [3]. Выявлено гипохолестеринемическое действие фенипентола, которое проявляется при повышенном содержании холестерина в диете больных.

Сообщается, что «Фенипентол» увеличивает концентрацию желчных кислот и не снижает при этом содержание холестерина в желчи, что приводит к уменьшению осадочного выпадения солей холестерина, предупреждая развитие холестеринового калькулеза. Антиоксидантные свойства действующих веществ куркумы способствуют нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса, обуславливают гепатопротекторный эффект. Описано положительное их влияние и на процессы полостного пищеварения, реализующееся за счет рефлекторного увеличения продукции кислоты в желудке и экзокринной функции поджелудочной железы [62].

У куркуминоидов также обнаружена бактерицидная и бактериостатическая активность в отношении микроорганизмов - *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma* и *Leishmania species* [65, 87, 118].

1.2.3. Проблемы и пути решения в разработке лекарственных препаратов, содержащих куркуминоиды

В мировом публикационном потоке и в сети Internet представлена широкая продуктовая линейка от собственно корневищ куркумы до разнообразных масляных, углекислых, спирто-водных, а в основном – водных извлечений из сырья, в т.ч. в форме сухих и густых экстрактов (хотя в последнем случае в технологическом смысле, как правило, подразумевается размешивание измельченного порошка корневищ или растворение сухого экстракта). При этом важно отметить, что имеющиеся, в т.ч. запатентованные, технологические решения, на наш взгляд, не позволяют эффективно извлечь всю нативную гамму БАС: экстракция липофильными растворителями (маслами и сжиженными газами) обуславливает частичную потерю полифенольной фракции, экстракция полярными растворителями – водой и водными спиртами не позволяет исчерпывающе экстрагировать терпеноидную гамму (эфирное масло). Кроме того, возникают проблемы с последующей стабильностью продукта, причем начиная со стадии извлечения БАС: не учитывается нестабильность куркуминоидов (они легко подвергаются

гидролитическим процессам, особенно в щелочной среде, светочувствительны). Также известна низкая биодоступность куркуминоидов при пероральном применении (в кислой среде желудка не успевают всосаться, а в щелочной тонкого кишечника – подвергаются деструкции, характерен быстрый метаболизм). Данный спектр существующих проблем в наиболее полной мере освещен в монографии индийских авторов [75] и ряде других зарубежных работ [81, 89, 102].

Предложены некоторые варианты решения данной проблемы: получение липосом [115], комплексов с другими веществами, например, фосфолипидных комплексов [52], получение производных, в частности, полимерного аналога – «нанокуркумина» и других [53].

Соответственно перечисленным подходам, в целях системного воздействия при пероральном приеме куркумина в дозировке 80-500 мг необходимо присутствия следующих стимулирующих (повышающих биодоступность) средств:

- Прием куркумина совместно с адьювантами (экстракт черного перца - пиперином, некоторыми флавоноидами – кверцетин и другими соединениями);
- Фитосомы куркумина в виде комплекса с фосфатидил холином (Мерива или ВСМ-95);
- Наночастицы куркумина (ТЕРАКУМИН);
- Водорастворимый куркумин (поливинилпирролидон) [70,84].

Куркумин по своей природе плохо всасывается при пероральном приеме и обладает низкой биоактивностью частично за счет низкой скорости всасывания в кишечнике и частично за счет быстрого метаболизма (глюкуронирования). Данная особенность соединения выражена в такой степени, что 8000 мг принятого перорально куркумина иногда незначительно увеличивают уровень в сыворотке крови (хотя в других исследованиях отмечаются небольшие пиковые потенциалы при дозировке 4000 мг или 8000 мг с возможностью достигать 22-41 нг/мл) [54].

Использование адъювантов, которые могут блокировать метаболический путь куркумина является наиболее распространенной стратегией для повышения биодоступности куркумина. В частности, эффект объединения с пиперином, известным ингибитором процесса глюкуронизации в печени и кишечнике, оценивали на биодоступность куркумина на здоровых добровольцах [85]. У людей, получающих дозу 2 г куркумина на прием в нативном виде, в сыворотке крови куркумины либо не обнаруживались, либо в очень низкой концентрации. Одновременное назначение 20 мг пиперина с куркумином позволило добиться гораздо более высоких концентраций в крови в течение 30 мин до 1 ч после применения препарата: пиперин увеличивал биодоступность куркумина на 2000%.

Сочетание куркумина с фосфолипидами (комплекс фосфатидилхолин-куркумин, известный как Мерива) может увеличивать его встраивание в липофильные мембраны, увеличивая C_{макс} и AUC в пять раз у крыс и приравнивая эффективность 450 мг Меривы к 4 г куркумина для человека. Было отмечено, что фосфолипидный комплекс увеличивает всасывание в 3,4 раза по сравнению с отдельно взятым куркумином у крыс, мицеллярный сурфактант (полисорбат) в 9 раз, фитосомы в 19,2 раза и комбинация сурфактантов с маслами или ПЛГА-ПЭГ увеличивали всасывание в 20 и более раз по сравнению с референтными растворами куркумина. В качестве альтернативы всасывание может быть увеличено посредством параллельного приема куркумина с другими липофильными веществами, такими как эфирные масла, в естественном виде содержащиеся в растении куркума (в 6,9 раз) или традиционное приготовление с камедью гхатти (в 27,6 раз после обработки) или путем увеличения первоначально слабой растворимости в воде куркумина посредством совместного приема с водорастворимыми переносчиками (поливинилпирролидоном) и антиоксидантами, при этом всасывание может быть далее увеличено путем добавления еще одного липофильного переносчика [46].

Другие исследования предполагают увеличение всасывания в 29 раз в

организме человека, хотя заявленное улучшенное всасывание скорее обусловлено деметоксикуркумином, чем куркумином [52].

Эмульсия ТЕРАКУМИН (наночастицы) имеет в 40 раз большее значение AUC (площадь под фармакокинетической кривой) по сравнению с основным действием куркумина на крыс и в 27 раз большее значение AUC для человека, хотя в другом исследовании было обнаружено всего лишь 10-кратное увеличение AUC и 40-кратное увеличение C_{макс} у грызунов. Эта повышенная биодоступность, в частности, обусловлена увеличенной растворимостью в воде [67].

Использование наночастиц может достигать дозировки до 210 мг без очевидного насыщения при всасывании, и наблюдается увеличение C_{макс} до 275 ± 67 нг/мл, AUC до 3649 ± 430 нг/мл/ч и периода полувыведения до $13 \pm 3,3$ часа [150].

Однако, при использовании куркумина для желудочно-кишечного тракта всасывание из кишечника в кровь необязательно, в некоторых случаях, например, при лечении и профилактике рецидивов рака толстого кишечника, системная абсорбция вообще не предполагается; данные обстоятельства принимались нами во внимание (в числе прочих факторов) в качестве исходных оснований для собственных разработок (глава 6).

Выводы к главе 1:

1. Корневища куркумы длинной являются ценным лекарственным растительным сырьем, которое целесообразно ввести в номенклатуру отечественных официальных видов сырья и включить в Государственную фармакопею РФ.
2. Актуальны разработка отечественной нормативной документации, регламентирующей качество лекарственного растительного сырья «Куркумы длинной корневища» с позиций требований к современному фармацевтическому анализу, и создание отечественного стандартного образца куркумина.
3. Необходимо решить вопрос с фармакогностических позиций (морфолого-анатомическое и фитохимическое изучение, изучение параметров качества и стандартизация) об эквивалентности сырья природных ареалов произрастания и интродуцируемой на территории Российской Федерации куркумы длинной.
4. Сырье куркумы длинной целесообразно рассматривать как перспективный источник для создания отечественных лекарственных препаратов с разноплановой фармакологической активностью; при этом -высокая лабильность и низкая биодоступность основных биологически активных соединений куркумы - куркуминоидов требует новых подходов в создании лекарственных средств.
5. С учетом доказанной высокой антиоксидантной активности лекарственных субстанций и препаратов на основе куркуминоидного комплекса (во многом определяющей широкий спектр фармакологической активности) целесообразно при разработке отечественных лекарственных средств ориентироваться на получение нативного, стабильного куркуминоидного комплекса с высокой антиоксидантной активностью и обеспечением биодоступности путем выбора лекформы, пути введения, дозировки и других параметров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В работе использовались следующие объекты и образцы:

1. Цельные корневища куркумы длинной (*Curcuma longa* L.), семейство Имбирные (*Zingiberaceae*), выращенной на территории Северного Кавказа (заготовлены в 2007-2014 гг.), предоставленные кафедрой фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета.

2. Измельченные корневища указанного сырья до размера 7 мм. (основная фракция).

3. Порошки корневищ куркумы длинной (специи) фирм «Cukorgia», «Galeo», «SAI», «Alibaba», «CYKORIA S.A.», «Patanjali Ayurved», выращенной в различных климатических зонах Индии, Китая, Вьетнама.

4. Индивидуальные соединения:

– Выделенные самостоятельно при препаративном изучении сырья куркумы – образцы куркумина, дезметоксикуркумина и бисдезметоксикуркумина;

– Стандартные образцы (СО) куркумина (Merck, № 820354, Sigma-Aldrich, CAS Number: 458-37-7; Fluca, GA 13376 и др.).

5. Лекарственные препараты:

- полученные самостоятельно: густой экстракт куркумы длинной и суппозитории с экстрактом куркумы длинной;

- препараты-сравнения, использованные в исследовании антиоксидантной активности: альфа-токоферола ацетат, куркумы экстракт жидкий (1:2), полученный нами аналогично густому экстракту методом циркуляционной экстракции на 95 % спите этиловом, антоциановый комплекс плодов черники (сумма антоцианов в пересчете на цианидин - 45,7%), предоставленный каф. фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ.

2.2. Методы исследования

Морфолого-анатомическое изучение.

Изучение морфологических признаков проводили по общепринятым правилам (невооруженным глазом и под лупами с увеличением $\times 5$, $\times 10$). Микродиагностические признаки исследовались с помощью цифрового микроскопа со встроенной цифровой камерой «Motic DM111» (Корея) (увеличение: $\times 40$, $\times 400$, $\times 1000$) и цифрового стереоскопического микроскопа «Motic DM-39C-N9GO-A» (Корея) (увеличение: $\times 40$, $\times 400$). Для выявления диагностических признаков были сделаны различные микропрепараты и получены их цветные микрофотографии.

Хроматографическое изучение.

Для тонкослойно-хроматографического (ТСХ) анализа экстрактов из растительного сырья и индивидуальных соединений использовали пластинки «Силуфол УФ-254» (Чехия) и «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия). Системы растворителей:

- хлороформ-метанол-вода 26:14:3
- хлороформ-этанол 2:1, 4:1, 9:1, 19:1
- бензол-ацетон 4:1
- *n*-бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:2.

Получение извлечений для анализа проводили по следующей методике: в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 г измельченного сырья с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм (ГОСТ 214-83), прибавляли 25 мл экстрагента и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр («Красная полоса»).

Хроматографирование осуществляли по следующей методике: на линию старта пластинки микропипеткой наносили около 0,01 мл экстракта или анализируемого раствора. Хроматографическую пластинку помещали в камеру, которую предварительно насыщали 2 ч смесью растворителей и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителей

доходил до 1 см до края пластинки, ее вынимали из камеры и сушили на воздухе в течение 5 минут.

Детектирование проводили при дневном свете и при УФ-облучении (254 и 366 нм) как исходные, так и после обработки раствором диазобензолсульфокислоты в насыщенном растворе карбоната натрия и растворе борной и лимонной/щавелевой кислот 1:1.

Для колоночной адсорбционной хроматографии применялись сорбенты «Силикагель» марки L 40/100 мкм (Чехия) и «Полиамид» марки «Woelm» (Германия). В качестве элюентов использовались смеси растворителей н-гексан – хлороформ в различных соотношениях (100:0 → 20:80) и хлороформ – спирт этиловый (100:0 → 20:80). Хроматографирование осуществляли по следующей методике: стеклянную хроматографическую колонку с внутренним диаметром 25 мм заполняли сорбентом (массой 6,0 г) таким образом, чтобы он образовал ровный слой. На чистый сорбент помещали сорбент с нанесенным на него экстрактом. Далее через полученную систему непрерывно пропускали элюент, собирая отдельные фракции. Полученные во время элюирования фракции дополнительно очищали с помощью рехроматографии и перекристаллизации из спирта этилового и ацетона.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) использовалась для изучения химического состава корневищ куркумы длинной.

Использовались следующие условия:

- 45-55% ацетонитрил, модифицированный кислотой фосфорной (рекомендованы некоторыми зарубежными учеными) [83,90];
- водно-ацетонитрильная смесь: 37-35% ацетонитрил с 1-2% кислоты муравьиной (рекомендованы пятигорскими авторами, проводившими исследования на колонке Luna C-18 размером 4,6×150 мм (Phenomenex, США) на хроматографической системе Стайер (ЗАО Аквилон) [4];
- подобранные в ходе собственных исследований условия для анализа куркуминоидного комплекса - колонка Phenomenex Luna® 5 мкм C18(2) 100

Å, 250 x 3 мм, система: ацетонитрил - 0,03М фосфатный буфер с рН 3,0 1:1, скорость потока 0,5 мл/мин; детекция при 425 нм. Использован хроматограф марки «Diotronic» НИУ Самарский государственный университет им. акад. С.П. Королева (г. Самара).

Газовая хроматография с масс-селективным детектированием.

Фрагмент работы по хроматографическому изучению терпеноидной фракции, полученной методом колоночной хроматографии на силикагеле при элюировании суммарного извлечения из корневищ куркумы на *n*-гексане, выполнен на хроматографе «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором. Оборудование установлено на базе НИИ гигиены и экологии человека СамГМУ (г. Самара).

Спектрофотометрия.

Спектрофотометрия осуществлялась на приборах «Specord 40» фирмы «Analytik Jena» и «Heliosa» фирмы «Thermo Spectronic Company». Диапазон длин волн: от 200 нм до 600 нм. Скорость сканирования 60 нм/мин. Использовались кюветы с толщиной слоя 1,0 см.

Структурные методы исследования.

ИК-спектрометрия проводилась на ИК-Фурье-спектрометре «Nikolet iS10» фирмы «Thermo Spectronic Company». ИК-спектры снимались в диапазоне длин волн от 4000 до 600 см⁻¹ с разрешением в 0,4 см⁻¹. Использовалась приборная база Центра контроля качества лекарственных средств Самарской области.

¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР- спектроскопия проводилась на ЯМР-спектрометре «Bruker AM 300» (300 МГц), также ¹H-ЯМР - спектры записаны на приборе «Gemini-200» фирмы «Varian» с рабочей частотой 200 МГц. Величины химических сдвигов приведены в шкале δ. Внутренний стандарт - тетраметилсилан (δ=0). Использовалась приборная база Института

органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва).

Масс-спектрометрия выполнена на установке Kratos MS-30 (UK), 70 eV, T=200°C. Использовалась приборная база Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва).

Технологические методы.

Использовались различные общепринятые экстракционные методы (мацерация, ремацерация, перколяция, реперколяция, циркуляционная экстракция) и их вариации (деление сырья и экстрагента на равные и неравные части, варьирование времени экспозиции, включение термических стадий и по другим параметрам).

Получение экстракта куркумы густого, как наиболее перспективного для дальнейших углубленных исследований, проводилось с использованием метода циркуляционной экстракции, по следующей методике: отвешенную массу сырья неплотно упаковывают в бумажный патрон во избежание спрессовывания материала. Патрон помещают в аппарат Сокслета. В аппарат заливают достаточное количество экстрагента до полного слива, затем вновь заливают экстрагент до уровня сливной трубки. Герметично соединяют все части аппарата и включают нагрев испарителя. Продолжают экстрагирование до обесцвечивания слива, то есть до максимального истощения сырья. Полученное извлечение остужают при комнатной температуре и отстаивают в прохладном месте 24 часа. Затем фильтруют через двойной бумажный фильтр («Красная полоса») и упаривают при температуре не превышавшей 60°C в роторном испарителе до объема приблизительно по массе равного половине массы взятого сырья. Далее оставшуюся вытяжку выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане до консистенции густого экстракта.

Фармацевтическая биодоступность.

Исследовалась биофармацевтическая доступность ректальных свечей на основе густого экстракта куркумы двумя методами - разделительным и диффузии в гель.

При использовании разделительного метода эксперимент осуществлялся по следующей методике: 1 мелкоизмельченный суппозиторий помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл. К нему добавляли 25 мл воды, сверху наслаивали 25 мл ацетона. При периодическом осторожном перемешивании колбу нагревали на водяной бане, поддерживая температуру на уровне 37°C. Через каждые 15 мин из слоя органического растворителя отбиралась проба в объеме 1 мл, вместо которой сразу возвращали 1 мл ацетона. Пробы анализировали по методике количественно определения суммы куркуминоидов в ЛРС (начиная с фразы: «1 мл полученного извлечения...» Приложения б).

При исследовании фармацевтической доступности методом диффузии в гель для целей эксперимента был приготовлен 2% агаровый гель на стандартном растворителе (натрия хлорида - 8,9 г, калия хлорида – 0,3 г, кальция хлорида – 0,33 г, воды очищенной - до 1 л). Приготовленный раствор разливали в чашки Петри по 20 мл. Гель формировался в течение 24 часов.

Методы исследования антиоксидантной активности.

В настоящей работе за меру оценки антиоксидантной активности разрабатываемого густого экстракта куркумы (и препаратов сравнения) взято определение прямого антиоксидантного действия в опытах *in vitro* по влиянию на Fe^{2+} – индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ). Для этого использован отечественный аппаратно-программный комплекс «ХЛМ-003» и две тест-системы, инициирующие свободно-радикальное окисление (СРО) – образование активных форм кислорода (АФК) и перекисного окисления липидов (ПОЛ). Исследования выполнены на базе ЦНИЛ Башкирского государственного медицинского университета (г. Уфа).

Методика 1. В качестве модельной системы (МС), где генерировались АФК, использовали 20 мл фосфатного буфера (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl) с добавлением раствора люминола (10^{-5} М) и цитрата натрия (50 мМ). Величину рН полученного раствора доводили до 7,45 ед. титрованием насыщенным раствором калия гидроксида. Для инициирования реакций,

сопровождающихся образованием АФК, вводили 1 мл 50 мМ раствора солей Fe^{2+} . Конечная концентрация ионов Fe^{2+} в среде инкубации составила 2,5 мМ. Регистрация свечения продолжалась в течение 5 минут при постоянном перемешивании.

Методика 2. МС, в которой протекают реакции ПОЛ, основана на высокой окисляемости липидов куриного желтка, сходных по составу с липидами крови. Липиды получают путем гомогенизирования куриного желтка в фосфатном буфере в соотношении 1:5 и последующим разбавлением в 20 раз, отбирали 20 мл. Добавление в систему 1 мл 50 мМ раствора Fe^{2+} ведет к иницированию окисления ненасыщенных жирных кислот, что сопровождается ХЛ. По интенсивности свечения судят о процессах ПОЛ [30].

Все результаты химических экспериментов подвергнуты статистической обработке в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII издания [24], результаты изучения антиоксидантной активности в опытах *in vitro* даны по результатам 3-х измерений [9-11].

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КУРКУМЫ ДЛИННОЙ

Для определения анатомических и микродиагностических признаков корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.), сем. Имбирные (*Zingiberaceae*) с помощью луп с 5-ти и 10-кратным увеличением, а также невооруженным глазом и с использованием цифровых микроскопов «Motic DM111» и «Motic DM-39C-N9GO-A» было изучено цельное, измельченное и порошоканное сырье куркумы различного происхождения.

3.1. Морфологическое исследование корневищ куркумы длинной

В результате изучения внешних признаков образцов импортируемого и отечественного сырья культивируемых растений было сформулировано следующее описание лекарственного растительного сырья куркумы длинной: корневище клубневидное, округлое на поперечном сечении, до 4 см в диаметре, желтовато-серое, с кольцевыми коричневыми рубцами от отмерших листьев; из боковых почек развиваются подземные, относительно цилиндрические побеги – корневища 3 – 10 см длиной и 0,5 – 1,5 см в диаметре, суживающиеся к обоим концам; цвет корневищ снаружи от желто-оранжевого до желто-коричневого; излом ровный, красновато-желтый или желтый.

Также в целях определения подлинности сырья были определены некоторые органолептические параметры: запах корневищ специфический, сильно ароматный; вкус водного извлечения слабжгучий, пряный, слегка горьковатый, приятный.

3.2. Микроскопическое исследование корневищ куркумы длинной

Полученные микрофотографии позволили определить ряд морфолого-анатомических признаков, характерных для куркумы длинной. В целом они соответствуют признакам, выделенным для всего семейства Имбирных.

При изучении поперечных срезов всех образцов выявлено, что корневище

пучкового типа, с поверхности оно покрыто экзодермой (рис. 6). Периферическая часть коры сложена крупными многоугольными клетками с небольшими треугольными межклетниками. Ближе к центральному цилиндру клетки паренхимы с извилистыми стенками и структурированным, окрашенным содержимым (рис. 7.1, 7.2). В некоторых клетках встречаются мелкие крахмальные зерна овальной формы (рис. 7.3). Вокруг центрального цилиндра хорошо различима однослойная эндодерма, состоящая из тонкостенных вытянутых клеток (рис. 8.1). По периферии стели и в паренхиме корневища разбросаны закрытые коллатеральные пучки. Проводящие элементы ксилемы — сосуды с механической обкладкой, состоящей из узкопросветных волокон (рис. 8.2). На продольном срезе диагностируются сосуды лестнично-сетчатого типа (рис. 9.1). Проводящие пучки кроме сосудов содержат пигментные клетки (рис. 9.2), значительно более мелкие по сравнению с размерами сосудов, с оранжево-коричневым содержимым, разделенным поперечными трещинами. В основной паренхиме встречаются пигментные клетки с каплями эфирного масла красно-оранжевого цвета (рис. 9.3).

При анатомо-гистологическом изучении измельченного сырья обнаруживаются фрагменты клеток экзодермы, проводящих пучков в виде сосудов лестнично-сетчатого типа. Встречаются одиночные клетки паренхимы с сильно извилистыми стенками, иногда они располагаются небольшими группами. Некоторые фрагменты паренхимы содержат пигментные клетки с протопластом красно-оранжевого цвета. При обработке раствором Люголя в клетках обнаруживаются мелкие крахмальные зерна. В измельченном сырье встречаются капли эфирного масла красно-оранжевого цвета.

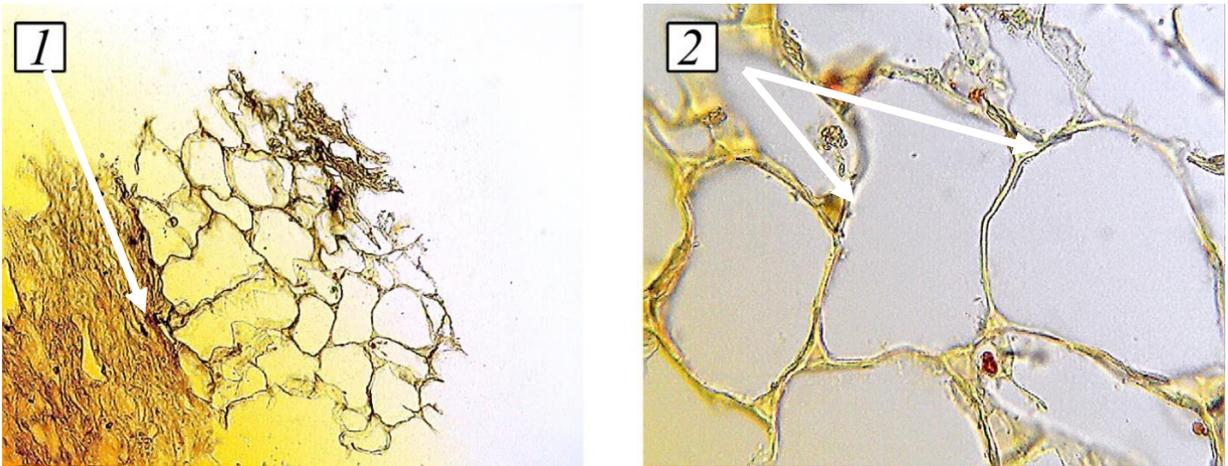


Рисунок 6 - Поверхность корневища на поперечном сечении: 1 – экзодерма ($\times 100$); 2 – клетки экзодермы с треугольными межклетниками ($\times 400$).

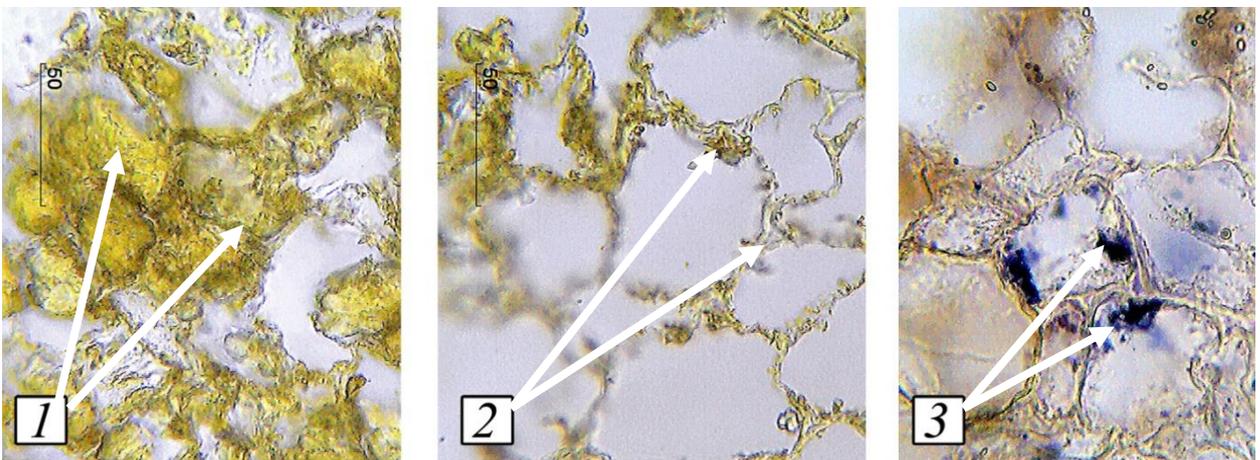


Рисунок 7 - Паренхима корневища на поперечном сечении ($\times 400$): 1 – клетки паренхимы со структурированным содержимым; 2 – извилистые стенки клеток паренхимы; 3 – крахмальные зерна, окрашенные раствором Люголя.

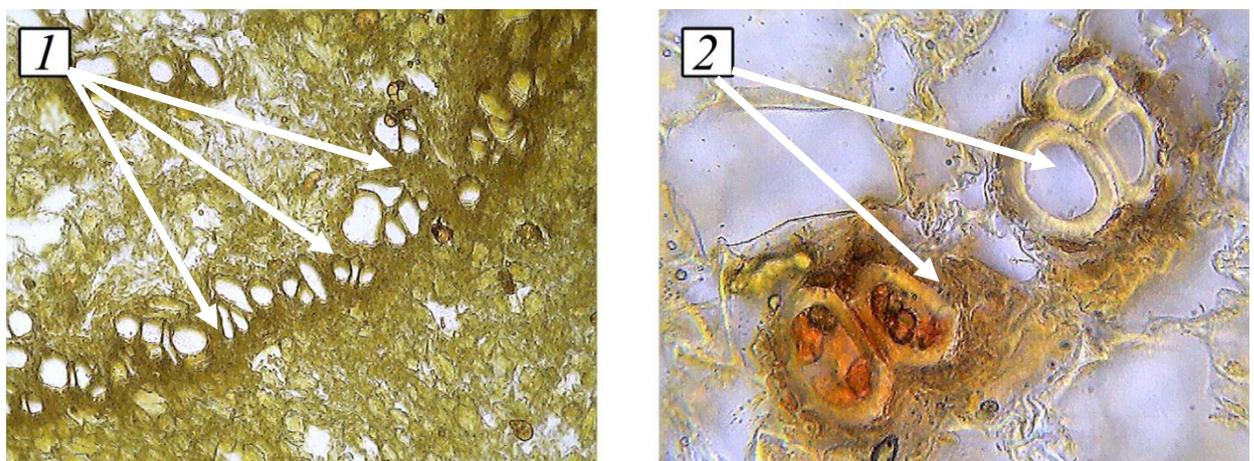


Рисунок 8 - Проводящие пучки корневища на поперечном сечении: 1 – область эндодермы ($\times 100$), 2 – закрытые коллатеральные пучки ($\times 400$).

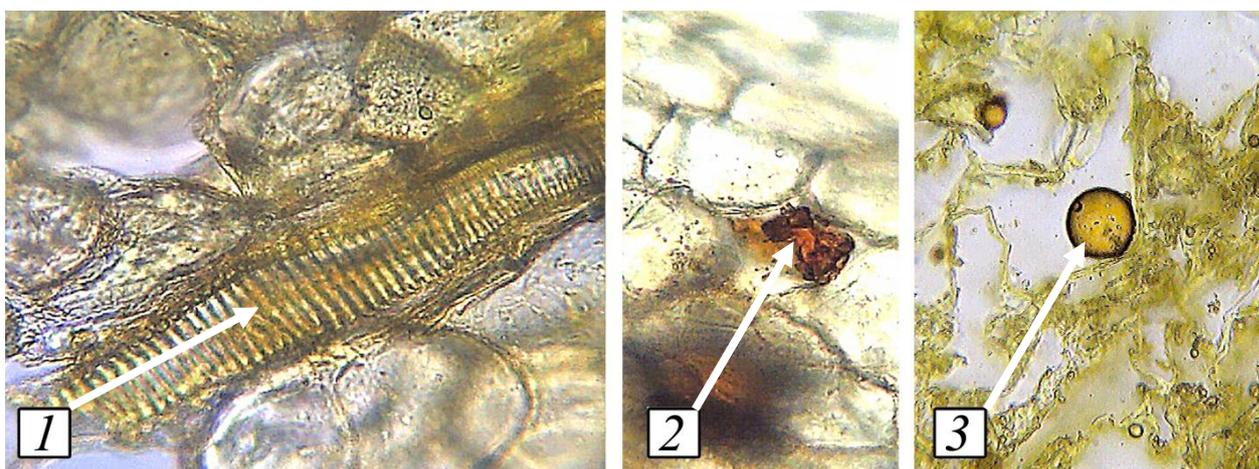


Рисунок 9 - Гистологические элементы корневища на поперечном и продольном сечениях ($\times 400$): 1 – сосуды лестнично-сетчатого типа; 2 – пигментные клетки; 3 – капли эфирного масла в секреторных клетках.

К основным диагностическим признакам порошка можно отнести многочисленные клетки с желтым содержимым. Клетки паренхимы крупные, округлые, встречаются многоугольные и вытянутые обрывки экзодермы с треугольными межклетниками, попадаются обрывки сосудов различного типа (лестничные, спиральные, сетчатые). В клетках паренхимы обнаруживаются крахмальные зерна.

Характерное строение клеток паренхимы со структурированным, окрашенным содержимым в виде складчатости, определено лишь для образцов куркумы длинной, выращенной в условиях Северного Кавказа (предоставлена кафедрой фармакогнозии Пятигорской государственной фармацевтической академии). В то же время микроскопическое исследование групп клеток паренхимы в порошке куркумы фирмы “Сукогiа” и других фирм показало, что их содержимое равномерно окрашено, и имеет менее выраженную складчатую структуру. Это объясняется тем, что выращиваемая в промышленных масштабах куркума в процессе сбора и заготовки обрабатывается горячей водой и сушится под прямыми солнечными лучами, что приводит к повреждению пигментных клеток и равномерному окрашиванию всего корневища. Заготовленные на территории Северного Кавказа образцы корневищ собирались и сушились в значительно более мягких условиях, что позволило лучше сохранить нативную структуру клеток и тканей корневищ.

Данный факт показывает, что с помощью микроскопии можно косвенно определять способ заготовки и первичной переработки сырья куркумы длинной.

Таким образом, в результате проведенного анатомо-гистологического исследования корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.), определены признаки, имеющие диагностическое значение. Полученные результаты были использованы при разработке разделов «Внешние признаки» и «Микроскопические признаки» проекта фармакопейной статьи «Куркумы длинной корневища».

Выводы к главе 3:

1. В диагностически значимым внешним признакам следует отнести следующие: корневище клубневидное, округлое на поперечном сечении, до 4 см в диаметре, желтовато-серое, с кольцевыми коричневыми рубцами от отмерших листьев; из боковых почек развиваются подземные, относительно цилиндрические побеги – корневища 3 – 10 см длиной и 0,5 – 1,5 см в диаметре, суживающиеся к обоим концам; цвет корневищ снаружи от желто-оранжевого до желто-коричневого; излом ровный, красновато-желтый или желтый.
2. К микродиагностическим признакам цельного сырья относятся наличие в паренхиме клеток с извилистыми стенками и структурированным, окрашенным содержимым, в паренхиме разбросаны закрытые коллатеральные пучки, проводящие элементы которых (сосуды, преимущественно лестнично-сетчатого типа, с механической обкладкой) состоят из узкопросветных волокон. В сосудах встречаются пигментные клетки, более мелкие по сравнению с размерами сосудов. В основной паренхиме также встречаются пигментные клетки с каплями эфирного масла красно-оранжевого цвета.
3. Измельченное и порошоканное сырье содержит фрагменты всех этих элементов, в т.ч. встречаются многочисленные клетки с желтым содержимым, клетки паренхимы имеют менее выраженную складчатую структуру. И в измельченном, и в порошоканном сырье обнаруживаются фрагменты сосудов.
4. Следует отметить, что выявленные диагностически значимые признаки не зависят от регионов произрастания и культивирования исследуемых объектов; некоторые отличия в окраске клеток паренхимы связаны с часто используемым приемом первичной обработки сырья - промывка горячей водой и сушка под солнцем приводит к равномерной окраске и меньшей структурности содержимого клеток.

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОРНЕВИЩ КУРКУМЫ ДЛИННОЙ

С акцентом на куркуминоидный состав проведено изучение химического состава указанных в главе 2 образцов сырья куркумы длинной с использованием методов ТСХ, ВЭЖХ, ГХ/МС (фрагмент исследований) и в препаративных целях для выделения индивидуальных куркуминоидов - метода адсорбционной колоночной хроматографии.

Основной задачей данного этапа явилось получение данных по химическому составу, определение эквивалентности и устойчивости компонентного состава куркуминоидов для изучаемых образцов сырья растений разных мест произрастания, наработка индивидуальных куркуминоидов (для аналитических целей), разработка способа получения и изучение параметров качества куркумина, предлагаемого нами в качестве отечественного СО, выработка подходов к решению вопросов химической стандартизации сырья.

4.1. Изучение химического состава хроматографическими методами

Тонкослойная хроматография извлечений из куркумы длинной

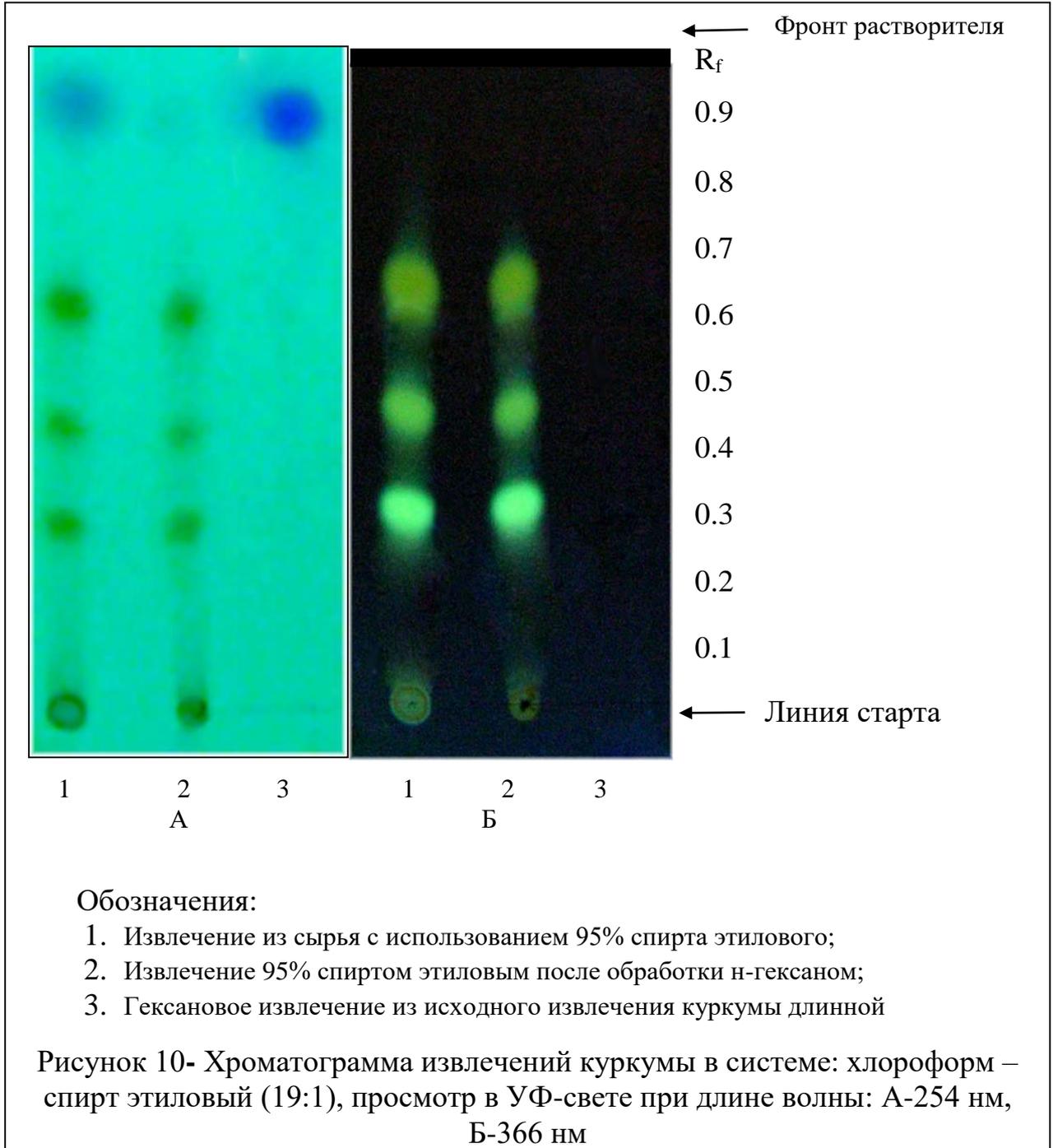
Для предварительного изучения химического состава, а также последующего определения подлинности ЛРС была проведена серия сравнительных исследований импортируемых корневищ и отечественных культивируемых растений.

Для определения оптимальной системы растворителей для хроматографирования, в которой происходило бы максимально эффективное разделение компонентов доминирующей группы БАС - куркуминоидов был проведен ряд экспериментов с использованием различных смесей растворителей (глава 2). Также для предварительного установления лучшего экстрагента для извлечения целевой группы БАС использовались различные растворители (хлороформ, вода очищенная, спирт этиловый, водно-спиртовые смеси). Как показали проведенные эксперименты, растворителями, позволяющими в наибольшей степени извлечь куркуминоиды, являются

спирто-хлороформные смеси, а также спирт этиловый в концентрации от 70% и выше; при этом наиболее эффективная целевая экстракция достигается при использовании спирта этилового в диапазоне концентраций от 80% до 95,6% (в минорных количествах извлекаются гидроксикоричные кислоты, некоторые гептадиеновые производные и другие сопутствующие соединения), в связи с чем нами в качестве экстрагента был выбран (во избежание дополнительной операции разведения) наиболее крепкий спирт фармакопейной концентрации. Важным обстоятельством является и тот факт, что для стабилизации куркуминов необходимо экстрагент подкислять (путем добавления нескольких капель разведённой хлороводородной кислоты).

Наиболее полное разделение куркуминоидов в данном извлечении достигается в системе растворителей: хлороформ - спирт этиловый (19:1), как и было предложено ранее [22]. Одна из полученных в данной системе хроматограмм для образцов отечественного сырья культивируемых растений приведена на рис. 10.

На фотографиях видно, что в извлечении на 95% спирте этиловом присутствуют три фракции куркуминов с R_f в диапазоне от 0,3 до 0,7 (что укладывается в аналитическую область хроматограмм) при просмотре как в видимом, так и в УФ-свете при 366 нм. Дополнительно при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм обнаруживается фракция более липофильного характера – фиолетовое пятно с R_f около 0,9 (как было установлено в ходе дальнейших исследований – терпеноидной природы с доминированием артурмерона). Очевидно, что в обозначенных на рис. 10 условиях диаметр пятен меньше, чем расстояния между ними. Эффективность разделения подтверждается значениями разрешения R_s : при просмотре в УФ-свете при 366 нм показатель для нижнего и среднего пятен куркуминоидов составляет 2,13, а для среднего и верхнего пятна куркуминоидов составляет 2,35; при просмотре в УФ-свете при 254 нм разрешение между верхним пятном куркуминоида и самым верхним пятном на хроматограмме составляет 3,33.



Для уточнения природы липофильной фракции (в частности для последующего решения вопросов стандартизации) была осуществлена ее жидкость-жидкостная экстракция *n*-гексаном из спиртового извлечения из сырья. На хроматограмме (рис. 10, А) при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм видно, что в точке нанесения 2 фиолетовое пятно практически отсутствует, это говорит о том, что данный компонент почти полностью перешел из спиртового извлечения в *n*-гексан. Это также видно по наличию интенсивно-фиолетового пятна с R_f около 0,9 в точке 3, где было нанесено полученное *n*-гексановое извлечение, в котором, соответственно, почти полностью отсутствуют куркуминоиды. Данная фракция, как было установлено в ходе дальнейшего изучения химического состава сырья методом ГХ/МС, представляет собой компактный выход веществ терпеноидной природы с доминированием ар-турмерона.

Таким образом, система растворителей хлороформ - спирт этиловый (19:1) может считаться наиболее подходящей для проведения качественного анализа извлечений на подкисленном 95 % спирте этиловом куркумы длинной, как импортируемых, так и отечественных образцов сырья культивируемых растений. Обработка пластинок проявителями: борно-лимоной/щавелевой кислотами или любыми другими реактивами (растворами диазобензолсульфокислоты, солей железа, алюминия, сурьмы и др.), на наш взгляд, дополнительной информации не несет.

С учетом всех изложенных обстоятельств, считаем целесообразным внедрение методики ТСХ-анализа в предложенных условиях в анализ отечественного сырья и включение ее в проект ФС на сырье культивируемой куркумы длинной в части «Определение основных групп биологически активных веществ» (Приложение б).

При последующем изучении куркуминоидного состава и терпеноидной фракции методами ВЭЖХ и ГХ и препаративном исследовании химического состава удалось идентифицировать выделенные соединения и уже с их использованием соотнести обнаруживаемые пятна куркуминоидов в варианте

ТСХ-анализа (R_f куркумина около 0,65, R_f дезметоксикуркумина около 0,45, R_f бисдезметоксикуркумина около 0,30) и пики в варианте ВЭЖХ-анализа, что важно при определении подлинности сырья.

ВЭЖХ и ГХ/МС исследование компонентного состава БАС корневищ куркумы длинной

Для сравнительного изучения компонентного состава куркуминоидного состава в сырье растений разных мест произрастания в эксперименты были отобраны следующие образцы: культивируемые растения, выращенные на территории Северного Кавказа, образцы сырья природных ареалов произрастания - фирмы «Сукориа S.A.» (страна-производитель Вьетнам) и фирмы «Patanjali Ayurved» (страна-производитель Индия). Из них были получены извлечения на 95 % спирте этиловом (этот же экстрагент, как отмечалось, был выбран для получения извлечения для ТСХ-анализа, а также в последующих исследованиях был использован для получения циркуляционным способом густого экстракта из ЛРС).

Обращение к уже известным для куркумы длинной условиям ВЭЖХ-анализа (глава 2), к сожалению, не дало удовлетворяющего нас разделения аналитов, видимо, по причине несколько различающегося компонентного состава получаемых нами извлечений и инструментальной базы. В этой связи были проведены собственные исследования по подбору условий хроматографического разделения куркуминоидов с акцентом на состав подвижной фазы. В частности, варьировались системы растворителей: вода : ацетонитрил с добавлениями уксусной кислоты, метанола (например, в соотношении 44:35:1:20); ацетонитрил : 0,01 М фосфатный буфер pH=3 (30:70), (50:50) и (60:40).

В результате удалось подобрать оптимальные условия хроматографического разделения основных куркуминоидов: колонка Phenomenex Luna® 5 мкм C18(2) 100 Å, 250 x 3 мм, система: ацетонитрил - 0,03М фосфатный буфер с pH 3,0 1:1, скорость потока 0,5 мл/мин; детекция при 425 нм (максимум поглощения всех доминирующих куркуминоидов).

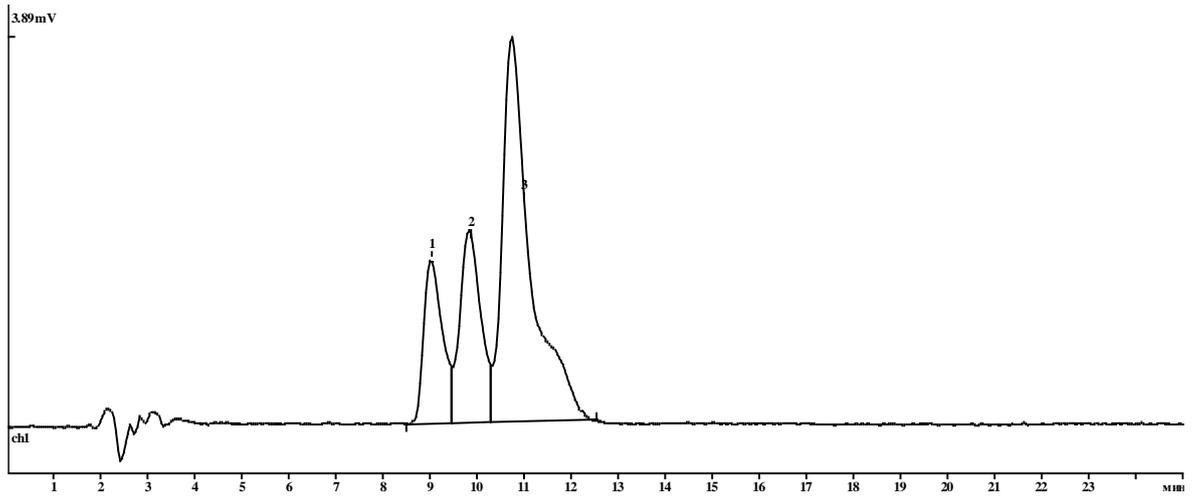


Рисунок 11 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из культивируемых корневищ куркумы длинной

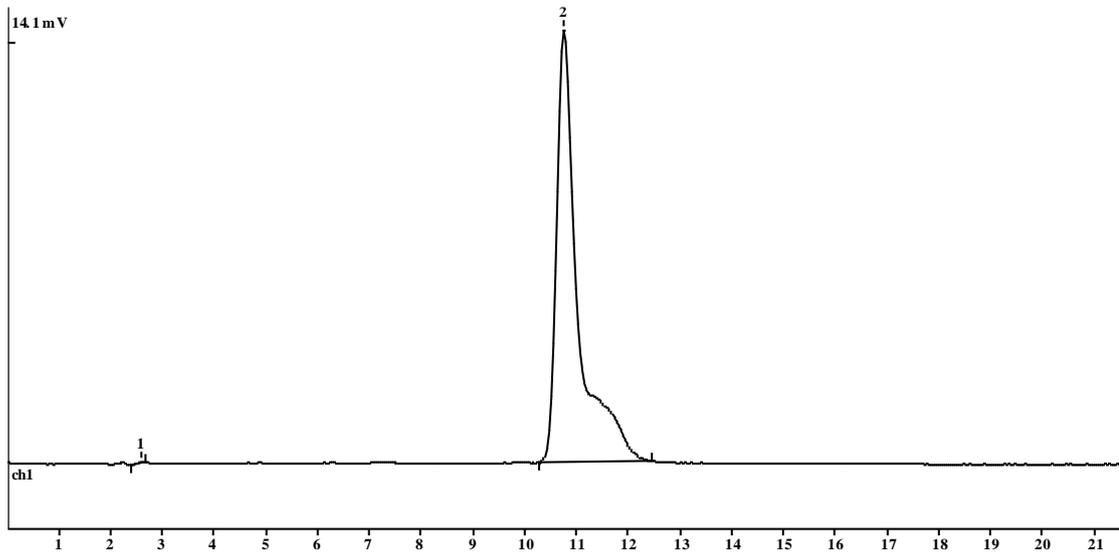


Рисунок 12 - ВЭЖХ-хроматограмма куркумина

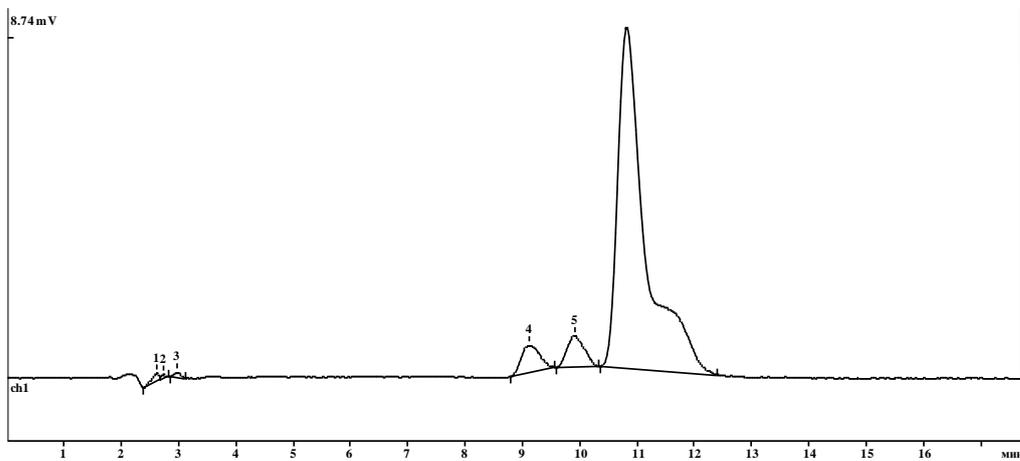


Рисунок 13 - ВЭЖХ-хроматограмма извлечения с добавкой куркумина

С помощью метода добавок достоверно известных образцов индивидуальных куркуминоидов (описание их выделения и изучения представлены в разделе 4.2.) дано отнесение обнаруживаемых пиков: пик № 1 соответствует бисдезметоксикуркумину, пик № 2 – дезметоксикуркумину, пик № 3 – доминирующему соединению – куркумину (рис. 11).

На рис. 11-13 приведен фрагмент данных исследований на примере использования куркумина, предлагаемого в качестве стандартного образца.

Для целей количественного анализа суммы куркуминоидов в сырье в плане пригововления анализируемых извлечений основывались на ранее разработанной методике [70], а также на подтвержденном в собственных исследованиях факте целесообразности использования для извлечения куркуминоидов 95% спирта этилового.

Методика. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1 г (т.н.) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 95% спирта этилового, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Горячее извлечение процеживали через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл. Исползованную вату помещали в колбу для экстрагирования. Экстракцию повторяли еще один раз 50 мл 95% спирта этилового в описанных условиях, фильтруя извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводили 95% спиртом этиловым до метки. 20 мкл раствора хроматографировали на жидкостном хроматографе не менее 3 раз. После анализа извлечения из сырья колонку промывали 20 мл 100% ацетонитрила. Затем в течение 20 мин уравнивали подвижной фазой. После этого, в тех же условиях хроматографировали раствор достоверно-известного образца куркуминоида (куркумин, дезметоксикуркумин, бисдезметоксикуркумин). Затем определяли площади каждого пика (и на хроматограмме извлечений и индивидуальных соединений). Полученные для каждой инъекции результаты усредняли.

Содержание индивидуальных куркуминоидов, в процентах, вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_i \cdot C \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{S_s \cdot a \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

S_i – площадь пика аналита (индивидуального куркуминоида) на хроматограмме извлечения из сырья;

S_s – площадь пика соответствующего куркуминоида на хроматограмме раствора достоверно-известного образца вещества (бисдезметоксикуркумина, дезметоксикуркумина и куркумина);

C – концентрация раствора достоверно-известного образца вещества, г/мл;

V – объем мерной колбы, мл;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Также были проведены опыты с добавками достоверно-известных образцов индивидуальных куркуминоидов (выделенных и охарактеризованных в результате препаративного изучения отечественного сырья - раздел 4.2) в исследуемые извлечения указанных образцов сырья для количественной оценки доминирующих куркуминоидов.

Суммарное содержание куркуминоидов рассчитывалось алгебраическим сложением полученных результатов по трем индивидуальным веществам или в пересчете общей площади 3-х пиков на куркумин, предложенный в качестве отечественного СО.

В результате в отечественных образцах сырья установлено содержание (в пересчете на сухо-воздушное сырье) куркумина $1,51 \pm 0,12$ %, дезметоксикуркумина – $0,52 \pm 0,04$ %, бисдезметоксикуркумина – $0,36 \pm 0,03$ %; алгебраическая сумма составляет: 2,20 % - 2,58 % (суммарное содержание куркуминоидов в сырье, в %).

При анализе соотношения куркуминоидов в образцах отечественного сырья культивируемых растений установлено, что $63,0 \pm 3,0\%$ приходится на куркумин, $22,0 \pm 2,5\%$ - на дезметоксикуркумин и $15,0 \pm 2,0\%$ - бисдезметоксикуркумин (что также подтверждается методом внутренней

нормализации). Данное обстоятельство однозначно указывает на отнесение исследуемых образцов к куркуме длинной (а не к другим представителям семейства и рода), что согласуется с литературными данными и может служить надежной характеристикой подлинности ЛРС и его качества.

Учитывая близость спектральных характеристик доминирующих куркуминоидов при аналитической длине волны 425 нм, по общей площади 3-х пиков в пересчете на куркумин также найдены суммарные значения содержания куркуминоидов в исследуемых образцах: в культивируемых отечественных образцах – $2,4 \pm 0,2$ %; в сырье вьетнамского происхождения – $1,9 \pm 0,1$ %; в сырье индийского происхождения – $3,2 \pm 0,2$ %.

Однако, из-за оставшихся вопросов к межлабораторной воспроизводимости нами ВЭЖХ-анализ для целей количественного определения куркуминоидов в нормативную документацию не предлагается. В этом качестве заявляется спектрофотометрическая методика количественного определения, как более простая и надежная в выполнении и имеющая преимущества по воспроизводимости (Гл. 5).

Фрагмент дальнейших исследований был посвящен уточнению компонентного состава эфирного масла образцов сырья культивируемых растений на территории Северного Кавказа. В связи с этим для исследования с помощью ГХ/МС была выбрана фракция, полученная с помощью колоночной хроматографии извлечения из сырья на 95% спирте этиловом на *n*-гексане (раздел 4.2) и соответствующая пятну с R_f около 0,9 на пластине при анализе методом ТСХ. Выбор в пользу изучения данного объекта сделан на том основании, что данная фракция входит в состав разрабатываемого препарата, обнаруживается при выполнении качественного анализа сырья методом ТСХ, вносит вклад в кривую светопоглощения при прямой спектрофотометрии извлечения из сырья на 95 % спирте этиловом (глава 5).

Для идентификации компонентов определяли линейные индексы удерживания, сопоставляли полученные результаты и полные масс-спектры с библиотечными (библиотеки масс-спектров «NIST 2.0») и литературными

данными. Определено, что исследованная фракция представляет собой комплекс соединений терпеноидной природы, доминирующим компонентом которого является сесквитерпеновый кетон ар-турмерон (примерно 25%); дальнейшие исследования терпеноидного состава будут продолжены в рамках отдельных работ.

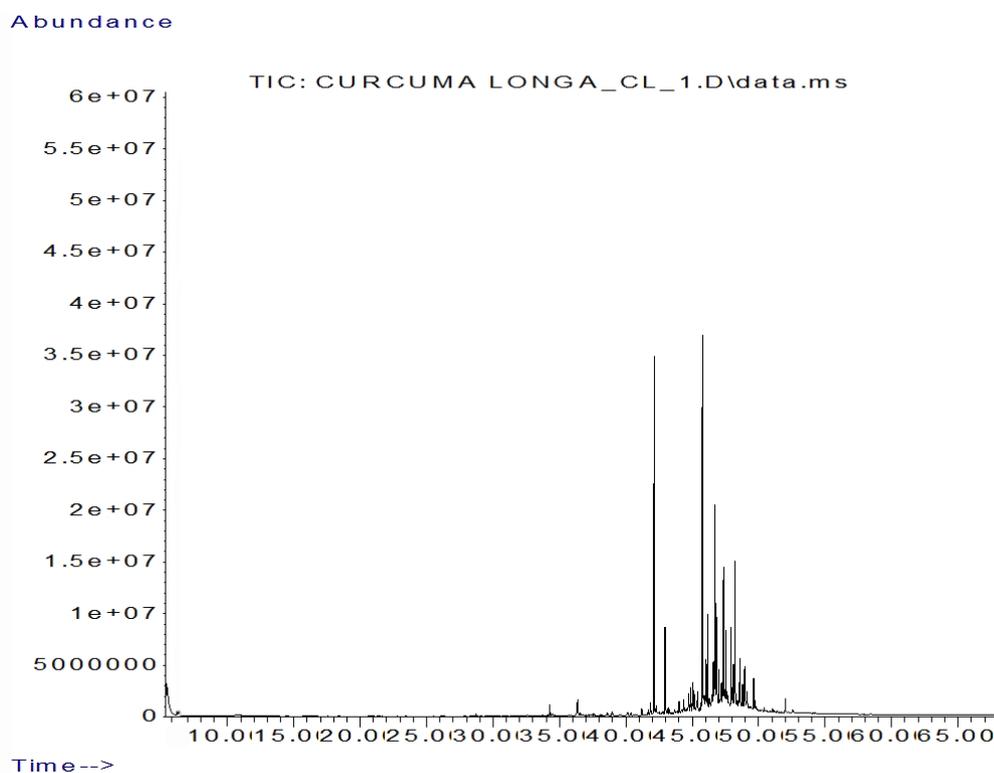


Рис. 14. ГХ/МС - хроматограмма терпеноидной фракции

Определение суммарного содержание эфирного масла (по ГФ РФ XIII изд., метод 1, время перегонки 3-4 часа) для того же сырья, которое изучалось методом ВЭЖХ, показало следующие значения: в отечественных культивируемых образцах – 5,1 % ± 0,3 %; в сырье вьетнамского происхождения - 3,8 % ± 0,2 %; в сырье индийского происхождения – 6,0 % ± 0,4 %.

Таким образом, проведен комплекс исследований по изучению химического состава корневищ, заготовленных от культивируемых на территории Северного Кавказа образцов куркумы длинной в сравнении с сырьем растений природных ареалов произрастания. С применением различных методов хроматографии были идентифицированы три

доминирующих куркуминоида отечественного сырья (куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин), а также сесквитерпеновый кетон ар-турмерон. Проведенное исследование химического состава хроматографическими методами послужило основой для дальнейшего решения вопросов стандартизации и разработки проекта фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье «Куркумы длинной корневища».

4.2. Препаративное изучение БАС куркумы, установление структуры и физико-химических характеристик куркуминоидов; разработка отечественного стандартного образца куркумина

Для препаративного выделения и очистки ведущей группы БАС – куркуминоидов было использовано сырье культивируемых растений, выращенных на территории Северного Кавказа, и образцов сырья природных ареалов произрастания фирмы «Сукориа S.A.» (страна-производитель Вьетнам) и фирмы «Patanjali Ayurved» (страна-производитель Индия).

Методом циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета из 50,0 г порошкованного сырья с размером частиц до 0,5 мм было получено суммарное извлечение (по отдельности для указанных образцов корневищ) с использованием 95% спирта этилового, подкисленного 0,1 М кислотой хлороводородной в соотношении: 1 мл раствора кислоты на 100 мл экстрагента (для стабильности куркуминоидов). После отгонки на вакуумном роторном испарителе извлечений до половинного объема, упаренный экстракт высушили при перемешивании на 4,0 г силикагеля марки L 40/100 мкм (Чехия).

Силикагель с нанесенным суммарным извлечением наслаивали на слой силикагеля 6,0 г, сформированный в хроматографической колонке с диаметром 25 мм в виде взвеси в *n*-гексане. Далее осуществляли элюирование БАС смесями растворителей *n*-гексан – хлороформ в различных соотношениях (100:0 → 0:100). Контроль за ходом хроматографического разделения осуществляли методом ТСХ в системе растворителей хлороформ-этанол

(19:1) с детектированием при дневном и УФ-свете с длиной волны 254 и 366 нм.

Фракции, полученные на *n*-гексане, позволили компактно элюировать группу БАС терпеноидной природы (с доминированием α -турмерона по данным ГЖХ/МС - раздел 4.1.). Фракции, полученные при дальнейшем элюировании смесью растворителей хлороформ - *n*-гексан (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50), содержали разнообразные липофильные моно- и дифенилгептаноиды (на основании данных ^1H -ЯМР и масс-спектров), рассматриваемые нами как сопутствующие вещества к основным куркуминоидам.

Дальнейшее элюирование позволило разделить группу целевых веществ – доминирующих куркуминоидов (рис. 15). Фракции, полученные с использованием смеси растворителей хлороформ - *n*-гексан (60:40), содержали технический куркумин и были дополнительно очищены рехроматографией на силикагеле марки L 40/100 мкм и перекристаллизацией из спирта этилового 95%.

В результате были получены от 0,30 г до 0,35 г (в зависимости от исходного сырья) хроматографически чистых образцов куркумина, который нами рассматривается в качестве отечественного СО (на схеме обозначен как рабочий стандартный образец – РСО). Структура соединения была подтверждена с использованием комплекса структурных методов анализа (рис. 16-20), а также установлены физико-химические характеристики с использованием традиционного набора инструментальных методов анализа.

Фракции, полученные при элюировании смесью растворителей хлороформ - *n*-гексан (80:20), содержащие дезметоксикуркумин, были дополнительно очищены перекристаллизацией из спирта этилового 95 %. Фракции, элюированные смесью растворителей хлороформ - *n*-гексан (90:10), содержащие бисдезметоксикуркумин, были очищены аналогичным образом. Их структура и физико-химические константы были изучены аналогично куркумину.

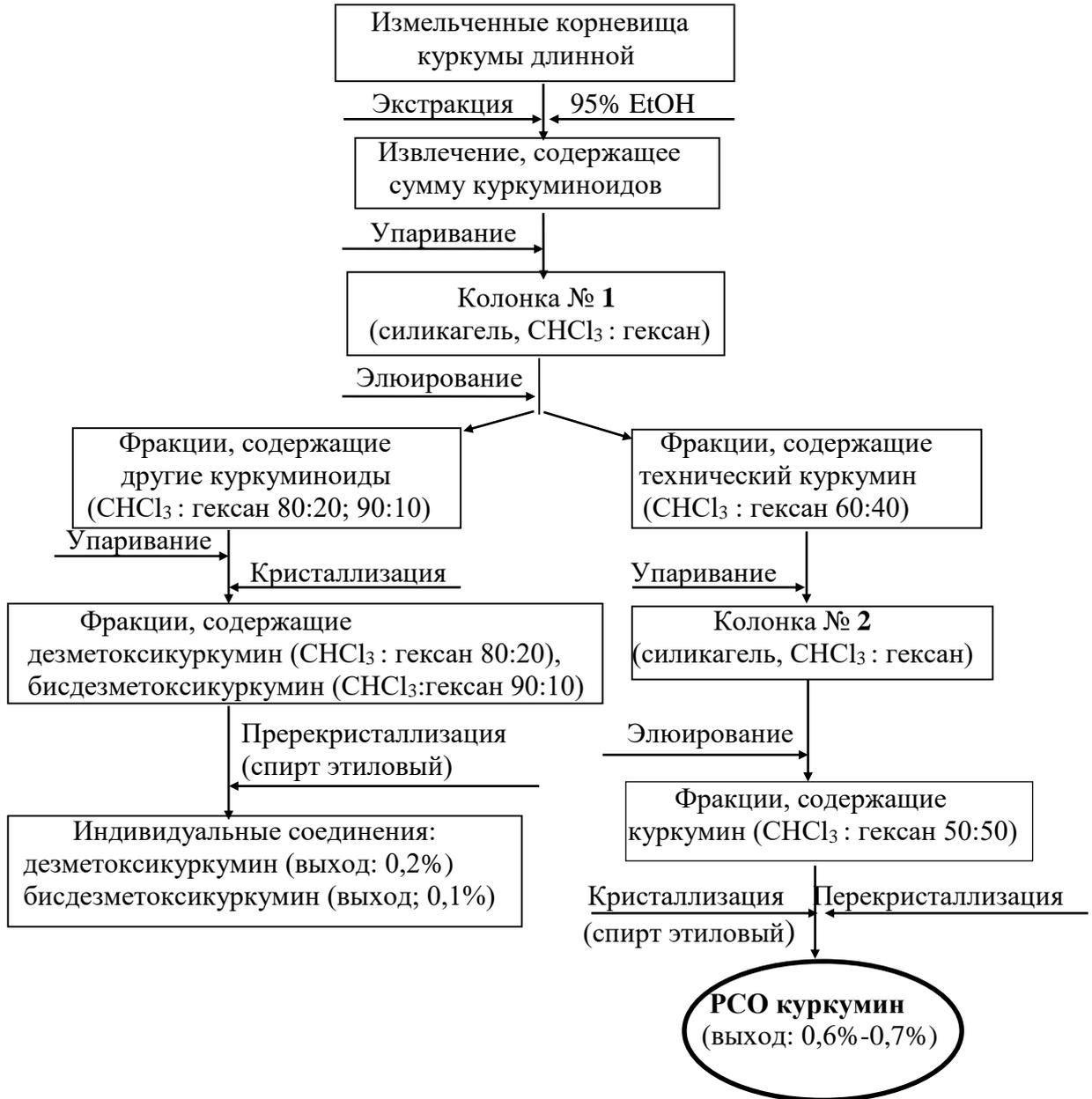


Рисунок 15 - Схема выделения куркуминоидов и получения PCO куркумина

Важно отметить, что выход индивидуальных веществ – доминирующих куркуминоидов по предложенной схеме выделения (рис.15), согласуется с данными литературы по соотношению куркумина, дезметоксикуркумина и бисдезметоксикуркумина и близки к данным проведенного ВЭЖХ-анализа (с использованием полученных достоверно известных образцов 3-х доминирующих куркуминоидов).

Структура куркумина (1,6-гептадиен-3,5-дион-1,7-бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)) была установлена на основании данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-, ИК- и масс-спектров. Так, в спектре протонного магнитного резонанса обнаруживаются шестипротонный синглетный сигнал 2-х метоксильных групп при 3,84 м.д. и уширенный синглетный сигнал 2-х ароматических групп - ОН при 9,65 м.д. фенольных фрагментов молекулы, а также в сигналы протонов гептадиенового фрагмента (рис. 16). В пользу данной структуры также свидетельствуют и данные ^{13}C -ЯМР-спектра с сигналами 2-х OCH_3 – групп при 56,2179 м.д. и С-4 при 101,4313, а также масс-спектра, где обнаруживается пик молекулярного иона с m/z 368 (рис. 18).

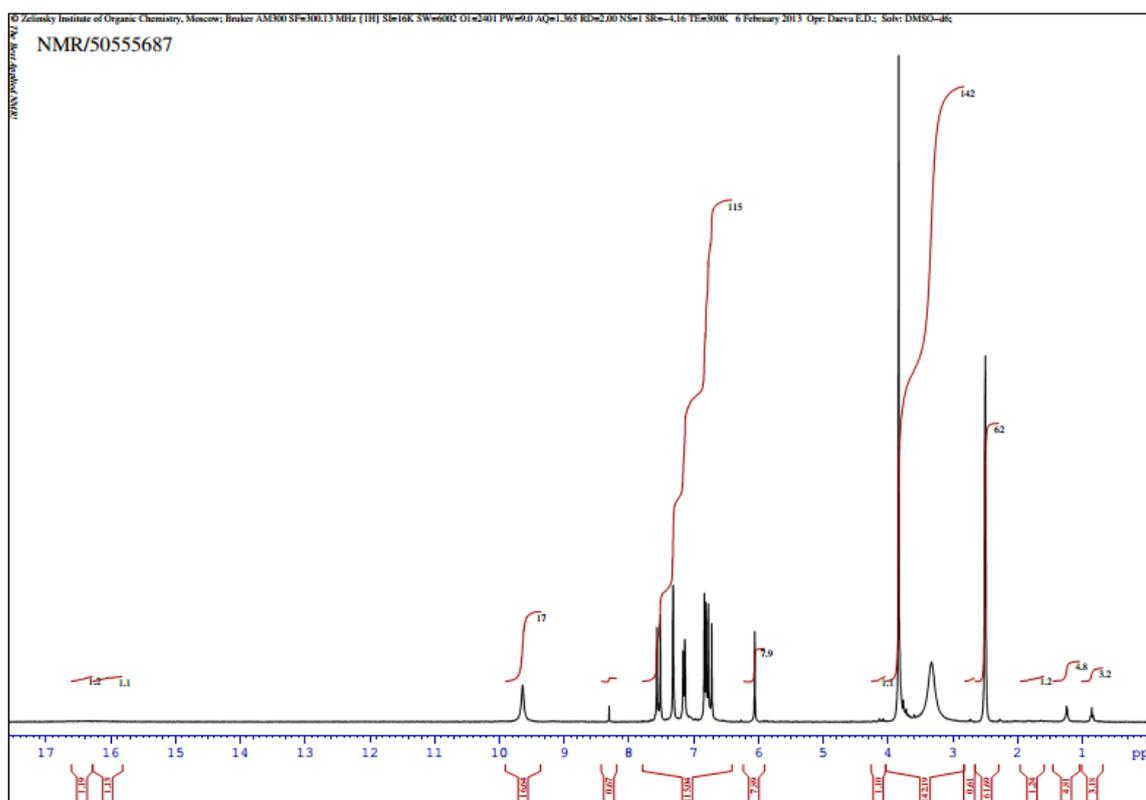


Рисунок 16 - ^1H -ЯМР-спектр РСО куркумина в DMSO-d_6

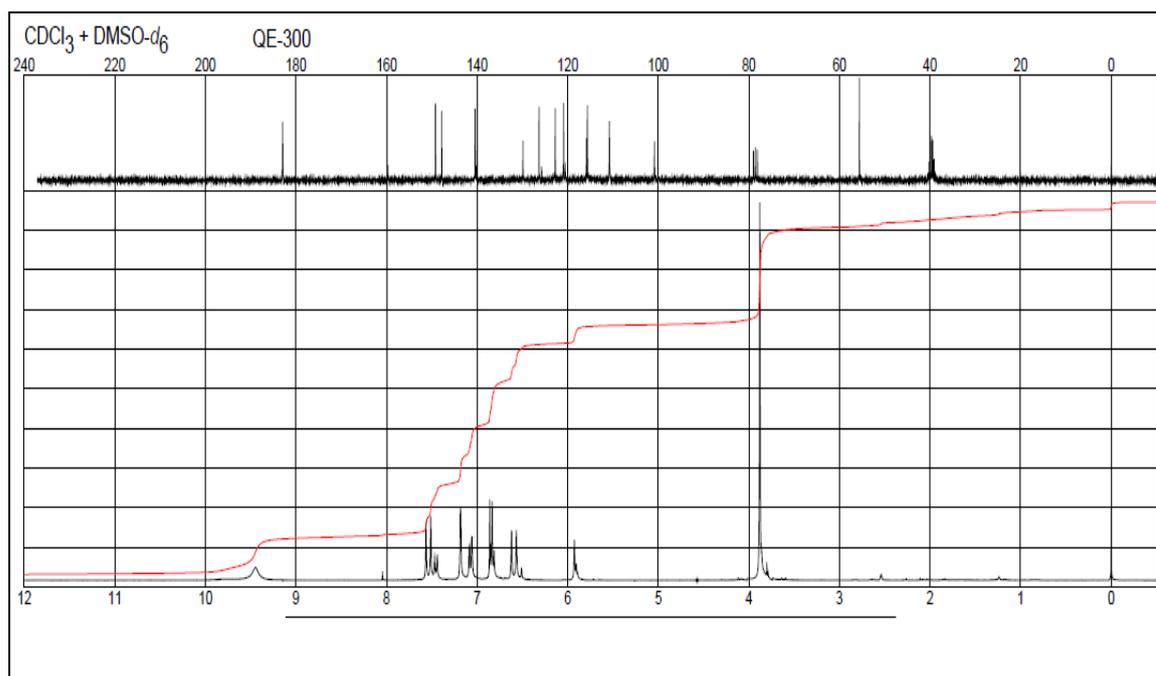


Рисунок 17 - ¹H-ЯМР-спектр куркумина по данным фирмы «Sigma-Aldrich»

Важно также отметить, что ¹H-ЯМР- и ИК- спектры РСО куркумина были сопоставлены с данными фирмы «Sigma-Aldrich» (США) (www.sigmaaldrich.com) и базой «Human Metabolome Database» Version 2.5 (Канада) (www.hmdb.ca) и совпали с таковыми (рис. 17, 20).

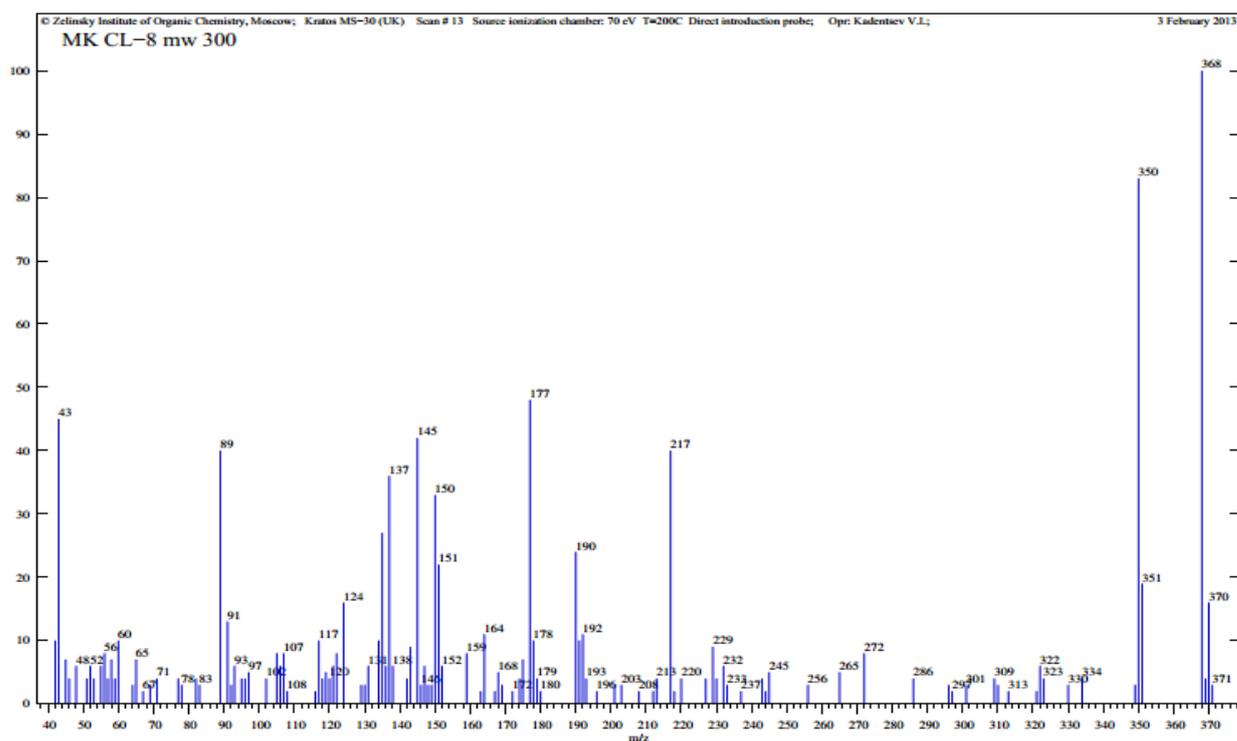


Рисунок 18 - Масс-спектр РСО куркумина

В ИК-спектре куркумина (рис. 19) наблюдается характерная зона поглощения гидроксильных групп при $3468,5 \text{ см}^{-1}$, а также сигналы, характерные для $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$ групп.

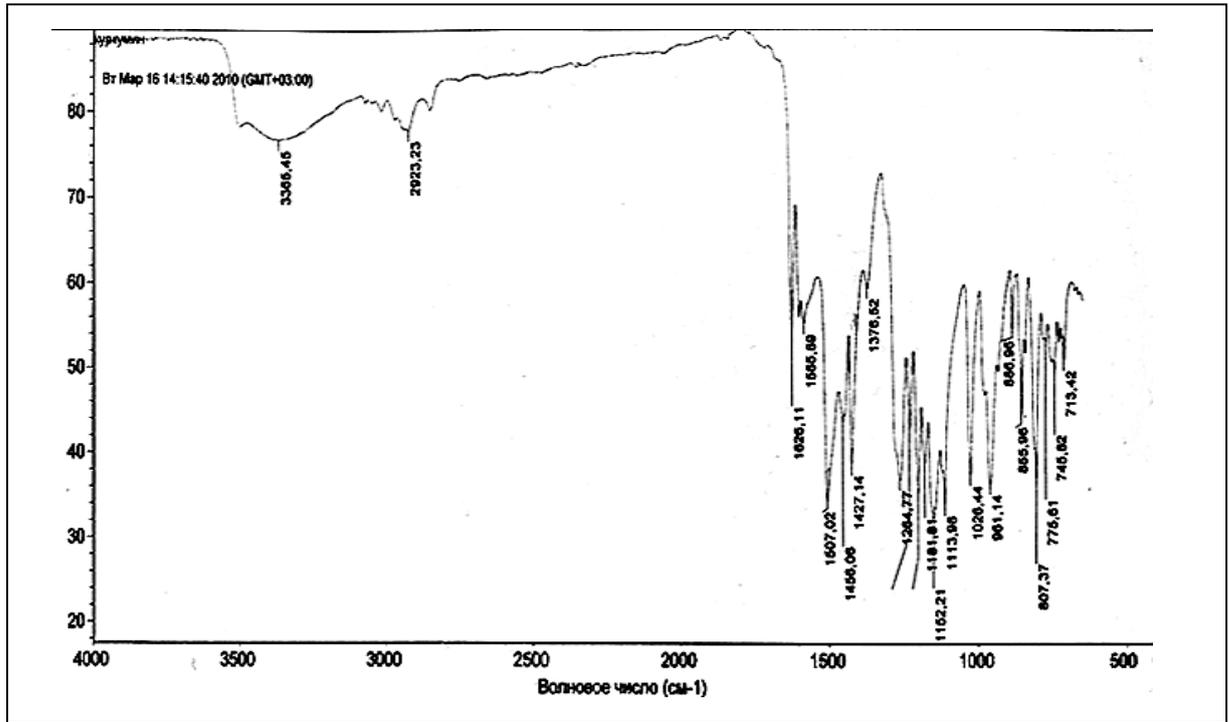


Рисунок 19 - ИК-спектр РСО куркумина

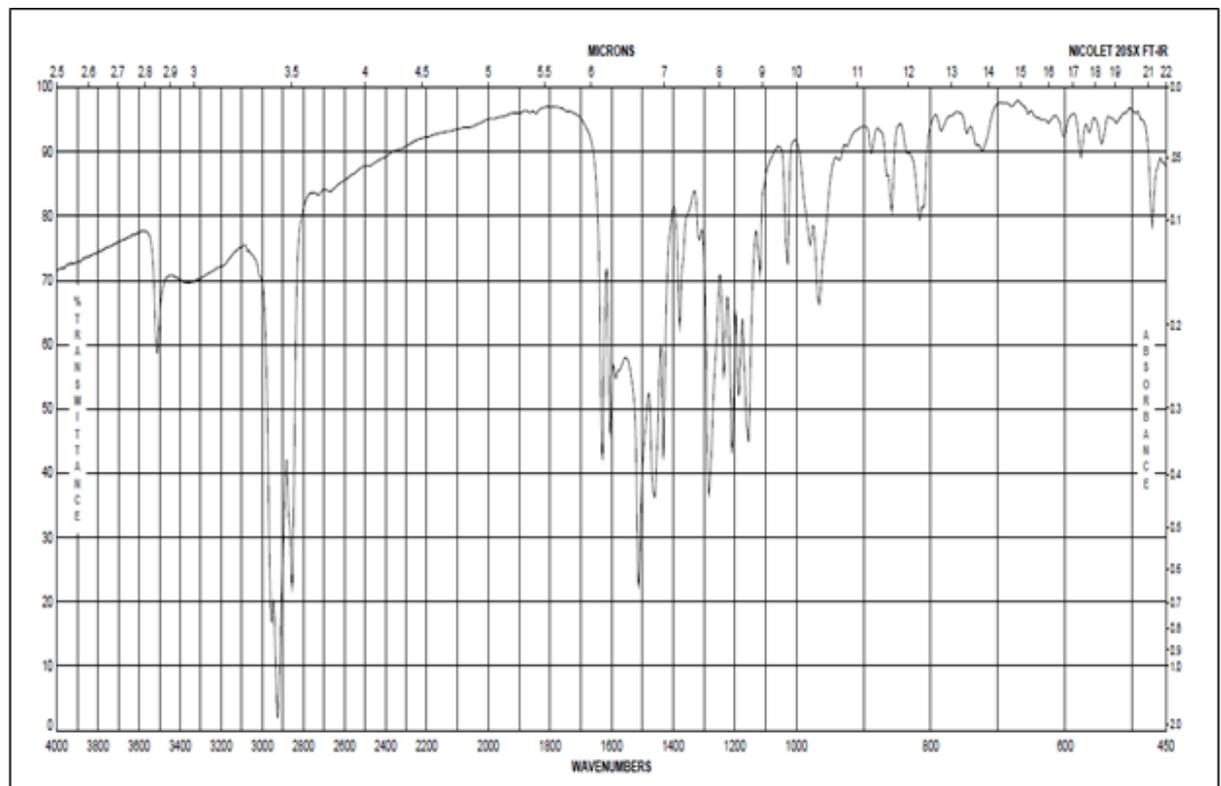


Рисунок 20 - ИК-спектр куркумина по данным фирмы «Sigma-Aldrich»

Куркумин [(1,7-бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)-гепта-1,6-диен-3,5-дион-(1E,6E)] – оранжевый мелкокристаллический порошок состава $C_{21}H_{20}O_{16}$ с т. пл. 182-184 °С, $\lambda_{\max}(\text{EtOH})$ 425 нм. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): M^+ 368 (100%).

^1H -ЯМР (DMSO-d_6 , δ (м.д.), 300 МГц): 3,84 (с, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 6,05 (с, 1H, H-4), 6,73 (д, 2H, $J=16$ Гц, H-2,6), 6,80 (д, 2H, $J=2$ и 9 Гц, H-6',6''), 7,14 (д, 2H, $J=9$ Гц, H-5',5''), 7,32 (д, 2H, $J=2$ Гц, H-2',2''), 7,53 (д, 2H, $J=16$ Гц, H-1,7), 9,65 (с, 2H, 2-х фенольных OH-групп).

^{13}C -ЯМР (DMSO-d_6 , δ (м.д.), 300 МГц): 56,2179 ($2 \times \text{OCH}_3$), 101,4313 (C-4), 111,8205 ($2 \times \text{C-2}'$), 116,2327 ($2 \times \text{C-5}'$), 121,6219 ($2 \times \text{C-6}'$), 123,7059 ($2 \times \text{C-1}'$), 126,8662 (C-2 + C-6), 141,2783 (C-1 + C-7), 148,5301 ($2 \times \text{C-3}'$), 149,8889 ($2 \times \text{C-4}'$), 183,7664 (C-3 + C-5).

ИК-спектр, ν (cm^{-1}): 3468,5 (OH), 1627,8 (C=O), 1604,4, 1508,1 (C=C), 1282,4, 1027,3 (ν_{as} and ν_{s} C-O-C).

Как отмечалось, разрабатываемый СО куркумина имеет то принципиальное отличие от зарубежных аналогов, что является индивидуальным веществом (по данным структурных исследований, ВЭЖХ-анализа и установленной температуры плавления); предлагаемые даже по каталогам фирм «Sigma» и «Fluka» СО куркумина являются смесью трех доминирующих куркуминоидов с преобладанием куркумина (что и заявлено в каталогах фирм в части «квалификация»).

Спектр поглощения куркумина (рис. 21) в диапазоне от 200 нм до 600 нм имеет единственный максимум при 425 нм \pm 2 нм.

Оптические характеристики (характер кривой и удельный показатель поглощения) в сочетании с химическими свойствами позволяют использовать СО в методиках количественного определения как в варианте спектрофотометрической оценки (прямой и дифференциальный вариант), так и для ВЭЖХ-анализа со спектрофотометрическим детектированием (пример использования был обсужден разделе 4.1).

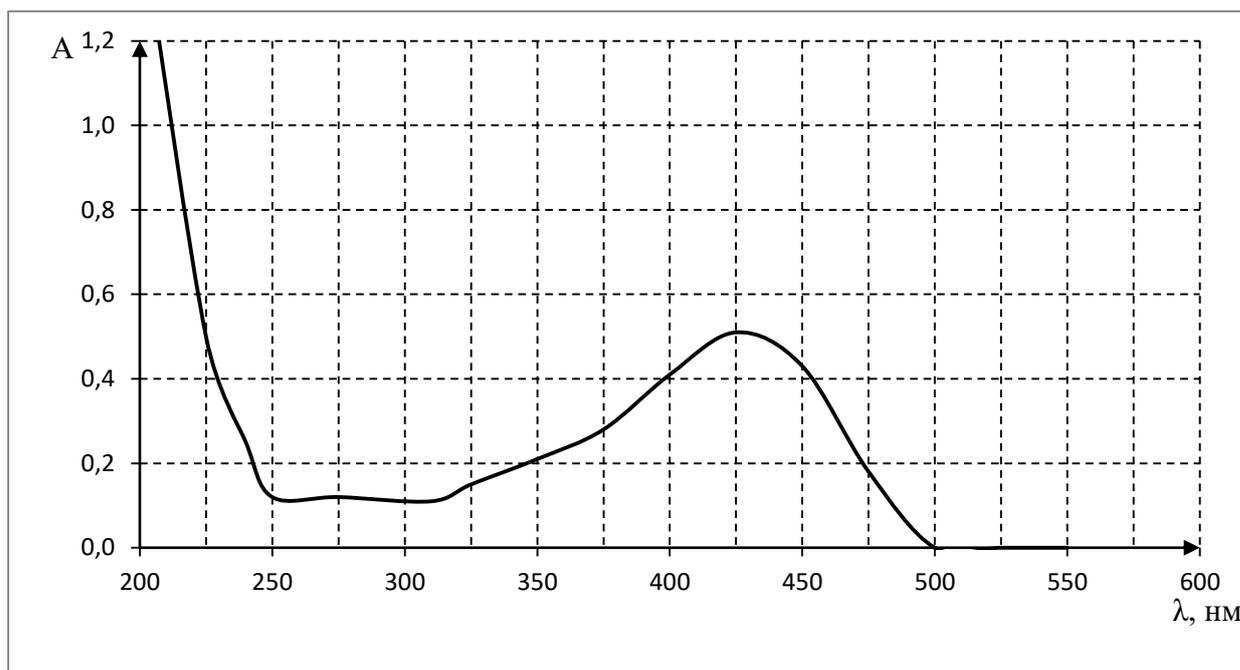


Рис. 21. Спектр поглощения РСО куркумина (разведение 1: 1500)

Аналогично куркумину было изучено строение и определены физико-химические константы для двух других доминирующих куркуминоидов; некоторые данные структурных исследований приведены на рис. 22-25.

^{13}C -ЯМР и ИК-спектры дезметоксикуркумина и бисдезметоксикуркумина, снятые в тех же условиях, что и для куркумина, по характеру кривых не отличаются от таковых куркумина, за исключением соответственно меньшей интенсивности или полного отсутствия сигнала резонанса углерода группы $-\text{OCH}_3$ в ^{13}C -ЯМР-спектре и трехпротонных сигналов в ^1H -ЯМР-спектре.

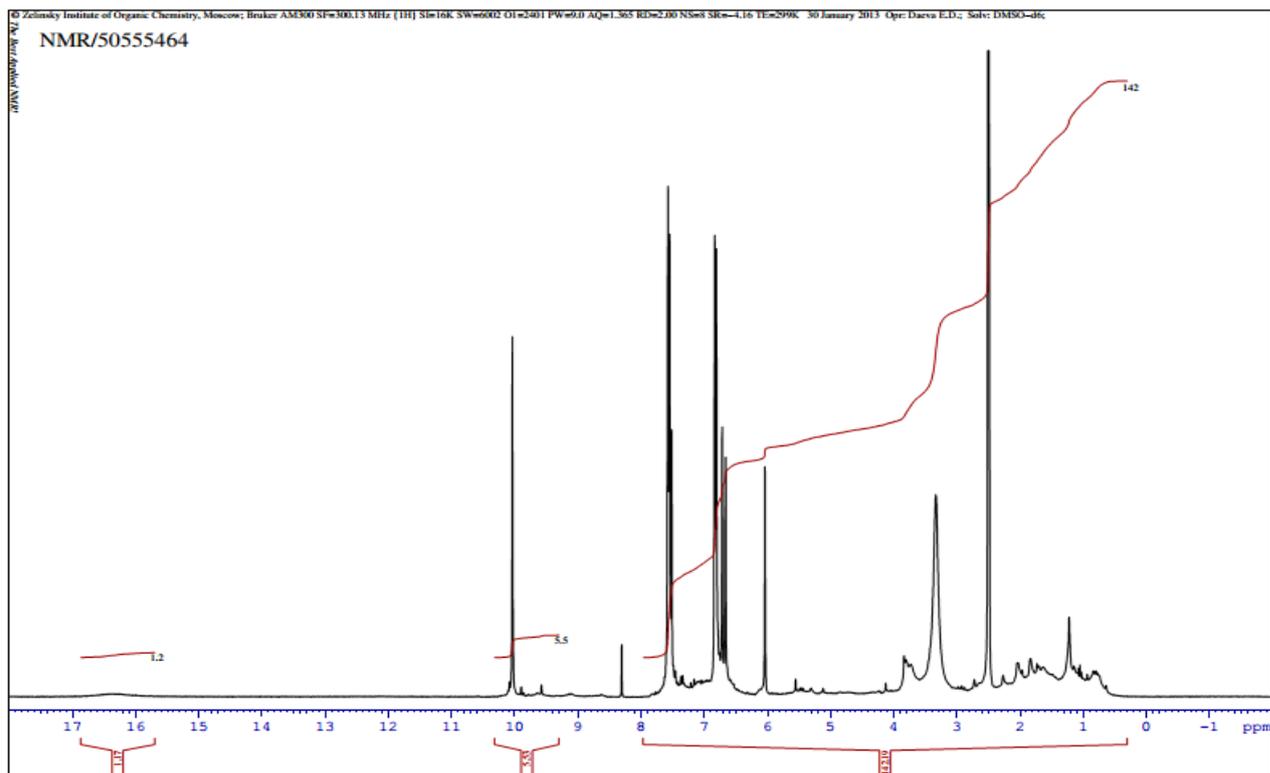


Рисунок 24 - ^1H -ЯМР-спектр бисдезметоксикуркумина в DMSO-d_6

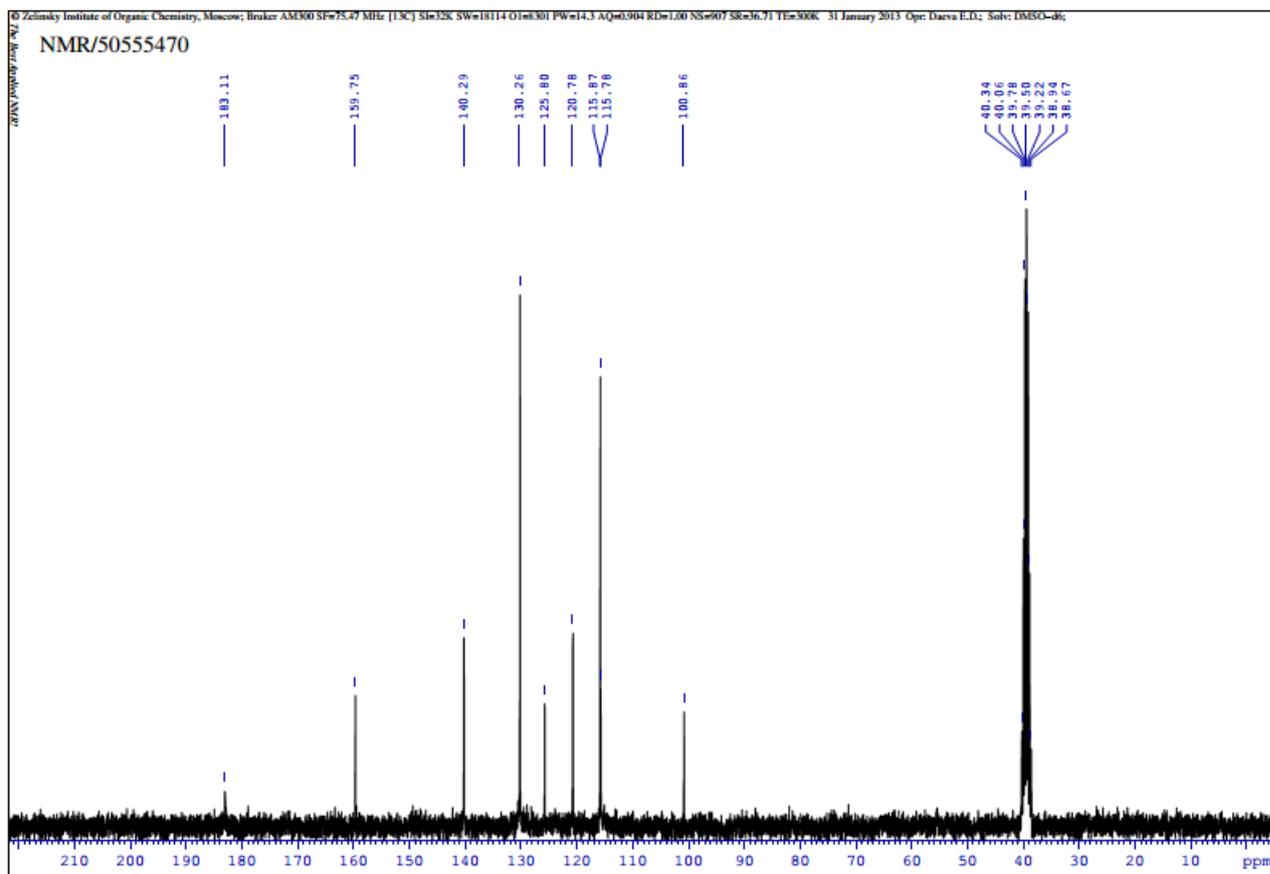


Рисунок 25 - ^{13}C -ЯМР-спектр бисдезметоксикуркумина

Дезметоксикуркумин [1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-7-(4-гидроксифенил)-гепта-1,6-диен-3,5-дион-(1E,6E)] – желто-оранжевый мелкокристаллический порошок состава $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ с т. пл. 170-172 °С, $\lambda_{\text{max}}(\text{EtOH})$ 424 нм. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): M^+ 338 (67%).

^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ (м.д.), 300 МГц): 3,82 (с, 3H, OCH_3), 6,05 (с, 1H, H-4), 6,70 (д, 2H, $J=16$ Гц, H-2,6), 6,85 (д, 2H, $J=9$ Гц, H-6',6''), 7,19 (дд, $J=2$ и 9 Гц, 3H, H-5',3'',5''), 7,34 (д, 2H, $J=9$ Гц, H-2',2''), 7,55 (д, 2H, $J=16$ Гц, H-1,7), 9,70 (с, 2H, 2-х фенольных OH-групп).

Бисдезметоксикуркумин [1,7-бис(4-гидроксифенил)-гепта-1,6-диен-3,5-дион-(1E,6E)] - желто-оранжевый мелкокристаллический порошок состава $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ с т. пл. 221-223 °С, $\lambda_{\text{max}}(\text{EtOH})$ 420 нм. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): M^+ 308 (100%).

^1H -ЯМР (DMSO- d_6 , δ (м.д.), 300 МГц): 6,10 (с, 1H, H-4), 6,69 (д, 2H, $J=16$ Гц, H-2,6), 6,87 (д, 2H, H-6',6''), 7,17 (д, 4H, $J=9$ Гц, H-3',5',3'',5''), 7,35 (д, 2H, $J=9$ Гц, H-2',2''), 7,56 (д, 2H, $J=16$ Гц, H-1,7), 9,68 (с, 2H, 2-х фенольных OH-групп).

Таким образом, качественный состав доминирующих куркуминоидов и их количественное соотношение показали идентичность образцов сырья растений природного ареала и культивируемых на территории Северного Кавказа, что позволяет на равных использовать корневища куркумы длинной в качестве ЛРС. Рабочий стандартный образец куркумина, схема получения которого воспроизводится для всех исследованных образцов сырья, позволяет решить проблему стандартизации для сырья «Куркумы длинной корневища», рассматриваемого нами как перспективный официальный вид ЛРС для отечественной медицины и фармации.

Выводы к главе 4:

1. С применением различных методов хроматографии были выделены и на основании данных структурных исследований идентифицированы три доминирующих куркуминоида (куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин), а также сесквитерпеновый кетон (ар-турмерон).
2. Химический состав корневищ, заготовленных от культивируемых на территории Северного Кавказа растений куркумы длинной, идентичен по составу и соотношению компонентов куркуминоидной природы сырью, заготовленному в местах природного местообитания (Индия, Вьетнам).
3. Предложена схема получения, установлена структура и изучены физико-химические свойства куркумина, предлагаемого в качестве отечественного стандартного образца.
4. Изученные хроматографические параметры куркуминоидов явились основой для определения подлинности и доброкачественности ЛРС «Куркумы длинной корневища».

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ

КОРНЕВИЩ КУРКУМЫ ДЛИННОЙ

5.1. Обоснование применения куркумина в качестве отечественного стандартного образца в анализе куркуминоидов в корневищах куркумы длинной

В отношении качественной оценки изучаемого сырья, на наш взгляд, следует считать логически завершенными исследования пятигорских коллег по разработке методики ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил» и «Силуфол» спиртового извлечения, позволяющем в системе хлороформ – спирт этиловый (19:1) эффективно разделить и четко соотнести пятна веществ на хроматограммах с тремя доминирующими куркуминоидами, дополнительно обнаружить терпеноидную фракцию БАС куркумы.

Наши данные по оптимизации некоторых параметров методики для достижения полной объективности анализа были обсуждены в разделе 4.1. и нашли отражение в соответствующем разделе проекта ФС «Куркумы длинной корневища» (Приложение 6). Кроме того, нами в качестве подтверждающей характеристики подлинности сырья предложено использовать данные спектра поглощения раствора извлечения из сырья, предназначенного для количественного определения (раствор А), в частности, наличие характерного максимума поглощения при $425 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ (куркуминоиды).

В отношении количественной оценки содержания куркуминоидного комплекса, как отмечалось в обзоре литературы и при обсуждении собственных результатов изучения химического состава корневищ куркумы длинной, отечественные и зарубежные ученые в основном используют два метода – ВЭЖХ и спектрофотометрию (реже хроматоспектрофотометрию и фотоэлектроколориметрию). Учитывая ранее обозначенные соображения *pro et contra*, и в частности, по поводу недостаточной межлабораторной воспроизводимости, ВЭЖХ-анализ данного сырья для рутинной практики не является оптимальным (табл. 3), хотя и имеет методологические преимущества в определении таксономической принадлежности изучаемого

сырья к виду *Curcuma longa* L.). С другой стороны, использование прямой спектрофотометрии не позволяет правильно оценить сумму куркуминоидов (целесообразность определение всего нативного комплекса куркуминоидов целесообразно на том основании, что все они вносят вклад в фармакологическую активность) из-за наличия вклада в поглощение при 425 нм других соединений. Например, как нами показано в варианте хроматоспектрофотометрической оценки (с пластинки для ТСХ-анализа количественно перенесена фракция с показателем R_f 0,9), а также прямого спектрофотометрического анализа *n*-гексановой фракции при препаративном изучении БАС методом колоночной хроматографии (рис.15), терпеноидные соединения могут вносить существенный вклад в величину светопоглощения в анализируемой области (рис. 26).

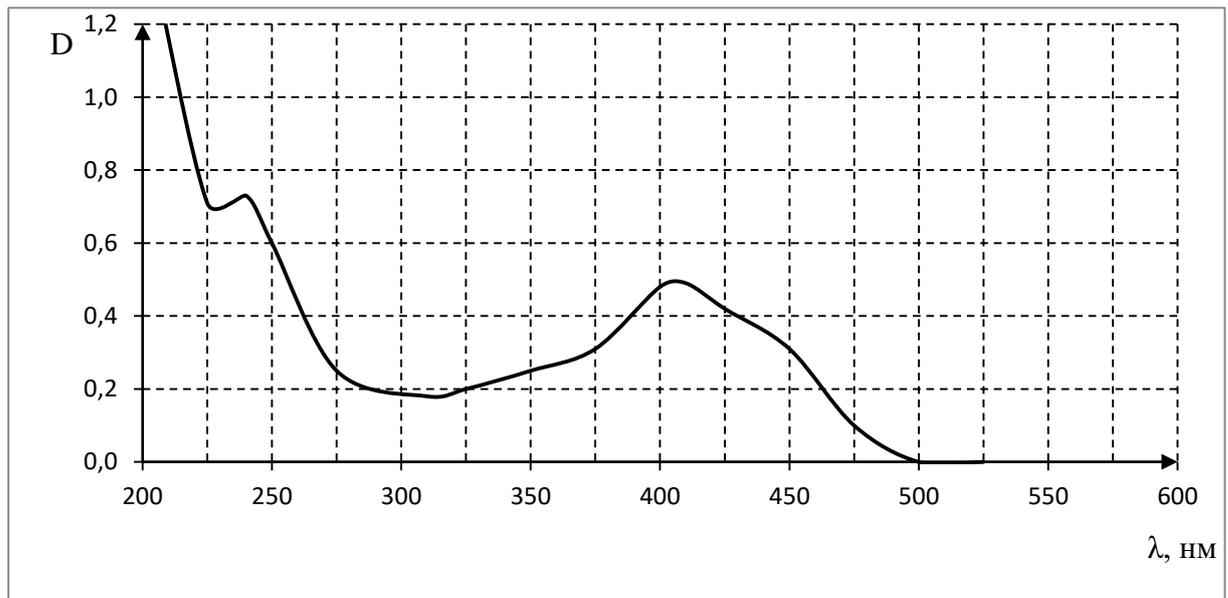
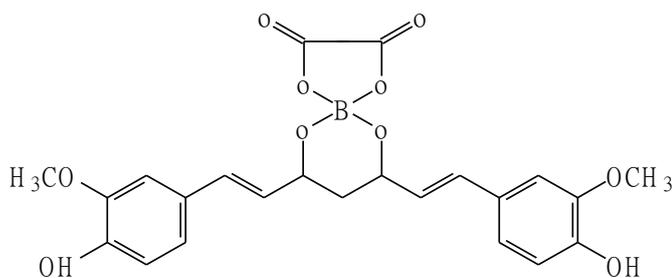


Рисунок 26 - Спектр поглощения терпеноидной фракции в видимой и УФ области

Данную проблему ряд авторов предлагают решать путем получения комплексных соединений куркуминоидов с другим максимумом поглощения и обращаются к специфической для куркуминоидов реакции взаимодействия с борной кислотой в присутствии щавелевой кислоты (терпеноиды не взаимодействуют), используемой в металлургической промышленности для определения бора в стали с помощью фотоэлектроколориметрии. При этом образуется комплекс бора с куркумином, называемый «рубрукуркумин».



Руброкуркумин

Полностью разделяя данный подход, наша задача по стандартизации культивируемых образцов сырья, свелась к получению батохромных комплексов извлечений из сырья и предложенного в качестве СО куркумина и изучению свойств последних для аналитических целей.

5.1.1. Изучение батохромных комплексов куркумина (руброкуркумина)

Реакция образования руброкуркумина протекает в условиях избытка борной и щавелевой кислот (возможна замена на лимонную), которые должны быть взяты в соотношении 1:1. Наибольшей точностью и воспроизводимостью обладают результаты определения в случае проведения процесса при упаривании извлечения или индивидуальных куруминоидов при температуре 50-60°C с последующим растворением сухого остатка в спирте этиловом.

Определение удельного показателя поглощения

Для установления зависимости оптической плотности раствора руброкуркумина от его концентрации было осуществлено определение удельного показателя поглощения батохромного комплекса разрабатываемого отечественного СО куркумина в растворах различных концентраций.

Фрагмент проведенных исследований для одной из серий экспериментов рассмотрим для навески куркумина (m) 0,0625 г. Указанную навеску растворили в мерной колбе вместимостью 25 мл в 10 мл спирта этилового 95%, объем раствора довели до метки (раствор А). 1 мл раствора развели в мерной колбе до 25 мл спиртом этиловым 95% (раствор В). 1 мл раствора В поместили в чашку из ПВХ, добавили 1 мл спиртового раствора реактива, содержащего на 100 мл по 1,0 г кислот борной и щавелевой. Смесь выпарили на водяной

бане при температуре 50-60°C. Сухой остаток количественно перенесли 10 мл спирта этилового 95 % в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем полученного раствора довели до метки спиртом этиловым 95 % (раствор С).

Далее из раствора С был приготовлен ряд рабочих стандартных растворов. Параллельно 1 мл раствора В довели в мерной колбе до 25 мл спиртом этиловым 95% и с получившимся раствором приготовили аналогичный ряд разведений.

Оптическую плотность (D) полученных растворов измерили на спектрофотометре «Specord 40» при длине волны 545 нм в кювете с толщиной слоя 1 см (*l*), раствор сравнения – соответствующее разведение раствора куркумина (в качестве РСО).

Результаты измерений представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Результаты определения удельного показателя поглощения батохромного комплекса куркумина (руброкуркумина)

№	Объем раствора С, мл	Объем спирта этилового 95%, мл	Конц. раствора, %	Оптическая плотность
1	10	0	0,00040	0,821
2	9	1	0,00036	0,728
3	7	3	0,00028	0,558
4	5	5	0,00020	0,403
5	3	7	0,00012	0,237
6	2	8	0,00008	0,162

На основании полученных результатов построен график линейной зависимости оптической плотности раствора руброкуркумина от концентрации (рис. 27).

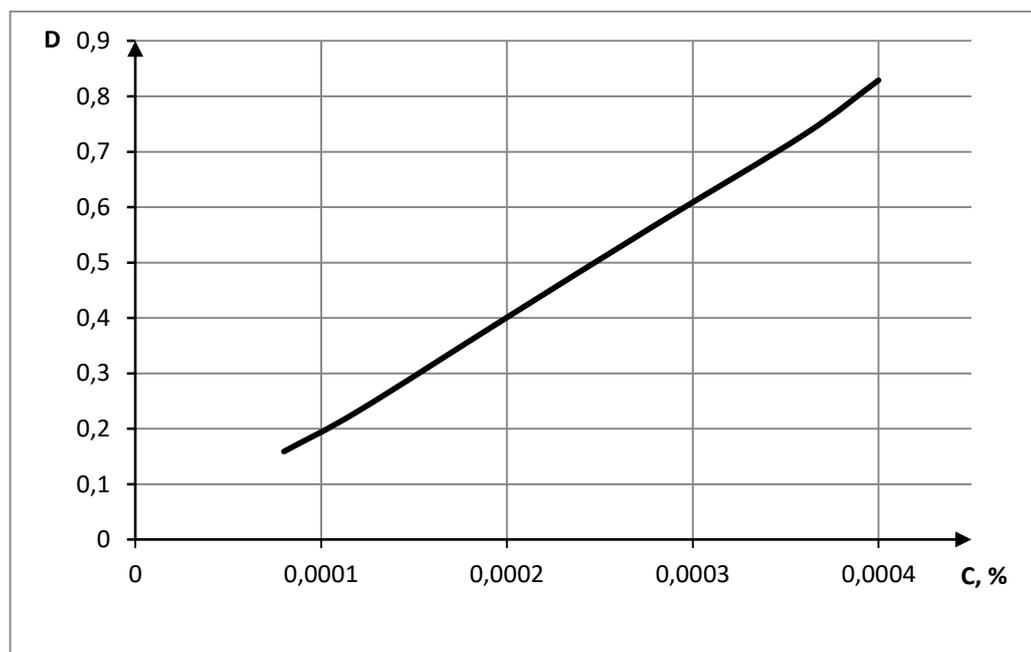


Рисунок 27 - Градуировочный график руброкуркумина

Коэффициент корреляции составил 0,999.

Закон Бугера-Ламберта-Бера соблюдается в диапазоне концентраций от 0,0001% до 0,0004%.

Уравнение линейной зависимости принимает вид: $y = 2050 \cdot x - 0,002$

Таким образом, удельный коэффициент поглощения руброкуркумина в приведенном эксперименте составил 2050.

По результатам всех серий экспериментов данное значение составило: 2050 ± 5 .

5.1.2. Использование куркумина в качестве стандартного образца в количественной оценке суммы куркуминоидов методом дифференциальной спектрофотометрии

Для ряда извлечений из ЛРС культивируемых растений на 80 % спирте этиловом (как одного из эффективных экстрагентов, имеющих преимущества при извлечении всего нативного комплекса куркуминоидов) была отснята серия электронных спектров в вариантах прямой и дифференциальной спектрофотометрии. На рис. 28 показан в сравнительном аспекте характер изменений: приведен спектр поглощения исходного извлечения из сырья

(график 1) и после реакции с борной кислотой в присутствии щавелевой кислоты (график 2). Очевиден сдвиг в длинноволновую область спектра раствора прореагировавшего извлечения, что совпадает и с максимумом поглощения руброкуркумина, соответственно, значение $545 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ может служить аналитической длиной волны в методике количественного определения суммы куркуминоидов в пересчете на куркумин в варианте дифференциального спектрофотометрического анализа.

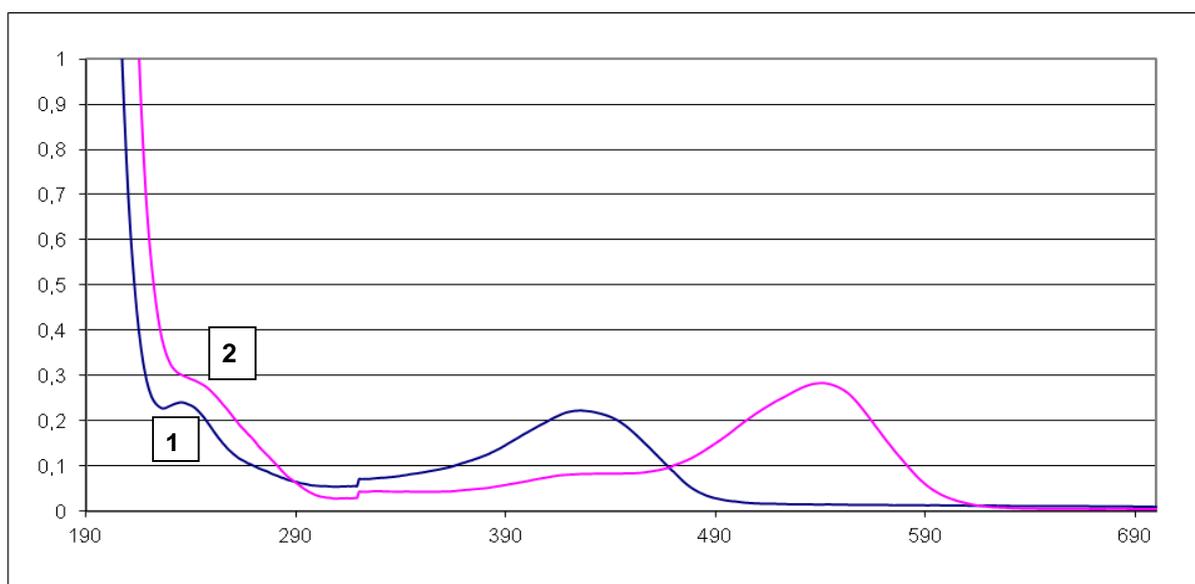


Рисунок 28 - Электронные спектры поглощения исходного извлечения из корневищ куркумы длиной на 80 % спирте этиловом (1) и его батохромного комплекса (2)

Приведенные данные также показывают, что в коротковолновой области спектра максимум при 240 нм под влиянием реагентов практически не изменился. Учитывая, что данный максимум обусловлен в основном поглощением соединений терпеноидной природы (рис. 26), в предлагаемом варианте количественной оценки (при 545 нм) вклад данной группы БАС исключен (что также доказывается отсутствием аналитических эффектов для терпеноидной фракции в варианте пробирочных реакций и при обработке ТСХ-пластин соответствующими реагентами).

В соответствии с ОФС.1.1.0013.15, включенной в ГФ РФ XIII изд., для сравнительной метрологической оценки двух методов анализа: метод 1 -

ВЭЖХ-анализ (по высотам пиков) и метод 2 - дифференциальная спектрофотометрия (для руброкуркумина) по количественному определению куркуминоидов с применением куркумина (μ – истинные значения измеряемой величины) при приготовлении стандартных растворов были получены результаты (табл. 3), свидетельствующие о том, что данные, полученные и первым, и вторым методом, являются правильными, т.е. они не отягощены систематическими ошибками ($t_{\text{выч}} < t_{\text{табл}}$), при этом по воспроизводимости спектрофотометрический метод превосходит ВЭЖХ-анализ ($F_{\text{выч}} > F_{\text{табл}}$).

Таблица 3 - Данные сравнительной метрологической характеристики двух методов анализа количественного содержания куркумина (P=95, $t_{\text{табл}}=2,23$, n=11)

Метод	\bar{x} , %	S^2	S	$\Delta \bar{x}$	$t_{\text{выч}}$	$\bar{\varepsilon}$, %	$F_{\text{табл}}$	$F_{\text{выч}}$
1. ВЭЖХ-анализ	99,88	0,055	0,235	3,78	1,69	3,78	4,85	5,50
2. Спектрофотометрия	100,05	0,010	0,102	2,38	1,62	2,38		

С учетом данных факторов, а также ранее упомянутых, для дальнейших аналитических исследований использовалась методика, основанная на спектрофотометрической оценке батохромного комплекса суммы куркуминоидов (в пересчете на куркумин).

5.2. Анализ содержания куркуминоидов в сырье куркумы длинной

5.2.1. ТСХ-анализ корневищ куркумы длинной

В результате изучения хроматографического поведения основных групп БАС сырья куркумы (раздел 4.1, рис. 10) была внедрена методика ТСХ-анализа извлечений из сырья, ранее предложенная пятигорскими коллегами для сырья растений природных ареалов. В результате изучения отечественного сырья культивируемых растений (в сравнении с образцами сырья, заготовленных в природных ареалах) были подтверждены предложенные параметры методики: экстрагент, условия хроматографирования, при этом дано соотнесение пятен веществ на хроматограммах с конкретными соединениями.

Методика. Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл спирта 95 %, содержащего хлороводородной кислоты 1 %, и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса» (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора в виде точки диаметром около 5 мм. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 24 ч смесью растворителей: хлороформ - спирт 95 % (19:1), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей и просматривают в дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 3 зоны адсорбции ярко желтого цвета в диапазоне значений R_f от 0,3 до 0,7

(примечание: $R_f \approx 0,65$ - куркумин, $R_f \approx 0,45$ - дезметоксикуркумин, $R_f \approx 0,30$ - бисдезметоксикуркумин).

При детектировании УФ-светом с длиной волны 365 нм соответствующие зоны имеют жёлто-зелёную флуоресценцию; при детектировании УФ-светом с длиной волны 254 нм помимо зон адсорбции имеющих желтую окраску, обнаруживается дополнительное пятно фиолетового цвета, выше всех зон адсорбции.

5.2.2. Обоснование параметров методики количественного определения куркуминоидов

Подходы к решению вопроса количественной оценки отечественных образцов корневищ куркумы были обсуждены в разделе 5.1. и, в частности, для внедрения была выбрана методика спектрофотометрической оценки суммы куркуминоидов в пересчете на куркумин, разработанная пятигорскими учеными для сырья вьетнамского происхождения. При этом понадобилось внести некоторые уточнения в параметры методики.

Выбор экстрагента

Для определения оптимального экстрагента для количественного анализа суммы куркуминоидов в сырье растений, выращенных на территории Северного Кавказа, с учетом липофильных свойств куркуминоидов варьировались следующие растворители: спирт этиловый 95%, спирт этиловый 90%, спирт этиловый 80%, спирт этиловый 70%, смесь спирт 95% – хлороформ (1:1), смесь спирт 95% – хлороформ (7:3), смесь спирт 95% – хлороформ (9:1), хлороформ и ацетон. Влажность использовавшегося сырья, измеренная на приборе «Sartorius MA30» составила 5,03 %.

Анализ полученных извлечений проводился по методике, аналогичной использованной для изучения батохромных комплексов СО куркумина.

Методика. Около 1,0 г (точная навеска) порошка корневищ куркумы длиной (m) помещали в колбу объемом 100 мл, добавляли 50 мл экстрагента и нагревали в течение 30 мин на кипящей водяной бане при периодическом перемешивании, предварительно закрыв колбу обратным воздушным

холодильником. Затем извлечение фильтровали через бумажный фильтр (Красная полоса») в приемную колбу на тарирных весах, и после отжима сырья, доводили объем до 30 мл (*в исходной редакции – мерная колба на 25 мл, что может быть недостаточно для полученного извлечения*). 1 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки тем же экстрагентом (раствор А). 2 мл раствора А помещали в выпарительную чашку из ПВХ (*в исходной редакции – в фарфоровой чашке, что не исключает реагирование БАС фенольной природы с компонентами фарфора*), добавили 1 мл спиртового раствора реактивов, содержащего на 100 мл по 1,0 г кислот борной и щавелевой. Смесь выпаривали на водяной бане при температуре 50-60°C. Сухой остаток количественно перенесли 10 мл спирта этилового 95% в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем полученного раствора доводили до метки спиртом этиловым 95% (раствор В).

Параллельно 2 мл раствора А вносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили экстрагентом до метки (раствор С).

Оптическую плотность раствора В определяли на спектрофотометре при длине волны 545 нм в кювете с толщиной слоя 1 см (l), раствор сравнения – раствор С.

Для сравнения экстракционной способности рассчитывали содержание куркуминоидов ($X_{\%}$) в сырье для различных экстрагентов по формуле (2):

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора В;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения окрашенного комплекса куркумина при длине волны 545 нм, равный 2050;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Результаты анализов (среднее из 3-х определений) сведены в табл. 4.

Таблица 4 - Результаты определения оптимального экстрагента для спектрофотометрического определения куркуминоидов

№	Экстрагент	Навеска, г	Содержание куркуминоидов, %
1	70% спирт этиловый	1,0650	2,02± 0,2
2	80% спирт этиловый	1,0275	2,48± 0,2
3	90% спирт этиловый	0,9987	2,51± 0,2
4	95% спирт этиловый	0,9981	2,52± 0,2
5	95% спирт этиловый - хлороформ (9:1)	0,9901	2,47± 0,2
7	95% спирт этиловый - хлороформ (7:3)	1,0124	2,39± 0,1
8	95% спирт этиловый - хлороформ (1:1)	1,0608	2,38± 0,1
9	хлороформ	1,0297	1,98± 0,1
10	ацетон	1,0176	2,05± 0,1

Как видно из представленных данных, наиболее полное извлечение куркуминоидов обеспечивало использование спирта этилового в диапазоне концентраций 80% - 95%. Учитывая данные пятигорских коллег, которые в аналогичных экспериментах для сырья природных ареалов (орбазцы фирмы «Cusorgia»), установили некоторое преимущество в экстракции при использовании спирта этилового в концентрации 80 %, мы в своих дальнейших аналитических исследованиях с целью гармонизации методик также использовали в качестве экстрагента спирт этиловый 80%.

Определение других параметров методики количественного определения

При сравнении данных экспериментальных исследований в отношении отечественных образцов сырья культивируемых растений с данными по сырью растений природных ареалов произрастания, отмечена высокая сходимость результатов (очевидно, ввиду установленного стабильного компонентного состава куркуминоидов – раздел 4.1), в связи с чем в качестве рекомендуемых параметров методики также считаем оптимальным для извлечения время экстракции - 30 мин, соотношение сырье – экстрагент - 1:30.

Определение метрологических характеристик методики

По указанной методике проводилось количественное определение содержания куркуминоидов в пересчете на куркумин в 6 образцах сырья культивируемых растений.

Метрологические характеристики представлены в табл. 5.

Таблица 5 - Метрологические характеристики методики анализа содержания куркуминоидов в корневищах куркумы длинной

m	f	$\bar{x}_{cp\%}$	s^2	s	s_x	P	$t_{(95\%, 5)}$	ϵ_{cp}
6	5	2,481	0,0213	0,1459	0,0596	95%	2,57	2,40%

При оценке правильности методики с использованием добавок куркумина в качестве СО (табл. 6) установлено, что ошибка определения куркуминоидов в ЛРС не превышает ошибку единичного определения, т.е. систематическая ошибка определения отсутствует.

Таблица 6 - Результаты количественного определения куркуминоидов в корневищах куркумы длинной с использованием метода добавок РСО куркумина

№	Исходное содержание куркуминоидов в сырье, %	Количество добавленного РСО куркумина, г на 100 г сырья	Содержание куркуминоидов, %		Относительная ошибка, %
			теоретическое	определенное	
1	2,548	0,650 (добавлено к сырью)	3,198	3,205	-2,19
2	2,548	0,650 (добавлено к раствору)	3,198	3,132	-2,06
3	2,548	1,250 (добавлено к сырью)	3,798	3,874	+2,00
4	2,548	1,250 (добавлено к раствору)	3,798	3,726	-1,90
5	2,548	1,900 (добавлено к сырью)	4,448	4,539	+2,11
6	2,548	1,900 (добавлено к раствору)	4,448	4,541	+2,09

Разработанная методика в ходе дальнейших исследований была применена и для оценки содержания суммы куркуминоидов в разрабатываемом густом экстракте из корневищ куркумы.

В результате в нормативную документацию нами внесена методика количественного определения суммы куркуминоидов с незначительными изменениями: исходно объем извлечения следует получать в объеме 30 мл после доведения 80% этанолом (а не в мерной колбе на 25 мл – извлечение может не уместиться). По технике исполнения - рекомендовано на этапе проведения реакции с упаренной аликвотой при получении комплекса руброкуркумина использование ПВХ-посуды, а также для определения удельного показателя поглощения куркумина предложен в качестве СО отечественный куркумин, представляющий собой индивидуальное вещество (раздел 4.2).

Полный текст методики во избежание почти полного дублирования с таковым при выборе оптимального экстрагента приведен в Приложении 6 (проект ФС «Куркумы длинной корневища»).

5.2.3. Определение содержания куркуминоидов в различных образцах сырья куркумы длинной

С использованием разработанной методики количественной оценки содержания куркуминоидов в пересчете на куркумин было проведено сравнительное исследование ряда образцов сырья растений естественных ареалов обитания и сырья, заготовленного в различные годы от культивируемых растений на территории Северного Кавказа. При этом все образцы соответствовали по параметру «Подлинность» и другим показателям (влажность, примеси и др. нормируемые для ЛРС).

Результаты (среднее из 3-х определений) приведены в табл. 7.

Таблица 7 – Данные по содержанию куркуминоидов в сырье куркумы длинной природных ареалов произрастания и культивируемых на территории Российской Федерации

№ п/п	Исследуемый образец сырья (фирма-производитель)	Содержание суммы куркуминоидов, %
	Сырье культивируемых растений (Пятигорск, 2008)	2,52 ± 0,15
	Сырье культивируемых растений (Пятигорск, 2009)	2,70 ± 0,17
	Сырье культивируемых растений (Пятигорск, 2010)	2,15 ± 0,11
	Сырье культивируемых растений (Пятигорск, 2011)	2,34 ± 0,12
	Сырье культивируемых растений (Пятигорск, 2012)	2,59 ± 0,20
	Сырье культивируемых растений (Пятигорск, 2013)	2,63 ± 0,21
	Сырье культивируемых растений (Пятигорск, 2014)	2,55 ± 0,16
	«Сукориа»	2,21 ± 0,14
	«Сукориа S.A.»	2,06 ± 0,15
	«Alibaba»	2,30 ± 0,19
	«Patanjali Ayurved»	3,43 ± 0,28
	«Galeo»	3,15 ± 0,22
	«SAI»	2,12 ± 0,17

Следует отметить, что полученные данные с использованием спектрофотометрической методики несколько выше таковых, полученных по результатам ВЭЖХ-анализа (было установлено: в культивируемых отечественных образцах – $2,4 \pm 0,2$ %; в сырье вьетнамского происхождения – $1,9 \pm 0,1$ %; в сырье индийского происхождения – $3,2 \pm 0,2$ %). Это можно объяснить вкладом в величину светопоглощения не только 3-х доминирующих куркуминоидов, но и других гептадиеновых производных, которые также входят в куркуминоидный комплекс.

На основании данных приведенных анализов обоснована норма содержания в сырье суммы куркуминоидов в пересчете на куркумин: данный параметр для сырья (цельного, измельченного, порошка) – не ниже 2,0 %.

При этом сроки годности для изучаемого сырья при определении данного

и других показателей качества в условиях естественного хранения были определены на уровне 3-х лет.

Цельное отечественное сырье соответствовало норме более 5 лет. Примечательно, что сырье, заготовленное на территории Северного Кавказа, даже в 2008 г. и 2009 г. по результатам анализа, проведенного в начале 2017 г., показало содержание куркуминоидного комплекса на уровне 1,6 %, что свидетельствует о высокой стабильности данной группы БАС в цельном сырье, правильно заготовленном и приведенным в стандартное состояние без обработки горячей водой (при соблюдении условий хранения).

Также обращает на себя внимание тот факт, что проанализированный образец сырья вьетнамского происхождения по параметру содержания куркуминоидов нельзя считать доброкачественным, что, конечно, не означает, что все сырье данного региона неудовлетворительного качества. Также более уязвимо в процессе хранения оказалось все измельченное сырье вне зависимости от фирмы-производителя (отсюда и срок годности сырья – 3 года). Видимо, это связано не только с фактом измельчения, но и используемыми приемами работы с сырьем: обработка горячей водой и сушка сырья под прямыми солнечными лучами, что приводит к повреждению пигментных клеток и выходу из них куркуминоидов.

Таким образом, показано, что сырье культивируемых на территории Северного Кавказа растений может полноценно заменить сырье импортируемое. При этом с учетом того обстоятельства, что и в природных ареалах произрастания растение культивируется в промышленных масштабах (и поставляется в нашу страну в качестве специи), предложенный проект ФС «Куркумы длинной корневища» корректно рассматривать для всего культивируемого сырья, вне зависимости от региона происхождения.

Обсужденные и другие нормируемые для ЛРС параметры качества, вошедшие в указанную нормативную документацию, приведены в Приложении 6.

Выводы к главе 5:

1. Для совершенствования сложившихся подходов в стандартизации сырья куркумы длинной разработан способ получения и изучены показатели качества куркумина, предлагаемого нами в качестве стандартного образца и обосновано его использование в методиках качественного анализа и количественного определения куркуминоидов.
2. Проведено внедрение ранее разработанных методик качественного и количественного анализа куркуминоидного комплекса для сырья культивируемых растений на территории Российской Федерации (г. Пятигорск); при этом уточнен ряд параметров (показатели удерживания при ТСХ-анализе, объем получаемого извлечения в методике дифференциального спектрофотометрического анализа и некоторые другие). В качестве дополнительного подтверждения подлинности сырья предложено оценивать характер спектра поглощения раствора А, приготовленного для количественного определения (наличие основного максимума при длине волны 425 нм).
3. Проанализирован ряд образцов сырья куркумы, произрастающих в природных ареалах и культивируемых на территории Северного Кавказа, по содержанию куркуминоидов, и на этом основании предложены нормы качества для культивируемого сырья: не менее 2% (вне зависимости от степени измельчения); установлены сроки годности для сырья – не менее 3-х лет.
4. Обоснована возможность использования наряду с импортируемым сырьем корневищ куркумы, заготовленных на территории Северного Кавказа.
5. Изученные параметры качества, касающиеся разделов химической стандартизации, и другие установленные показатели, нормируемые для ЛРС, легли в основу разработанного проекта ФС «Куркумы длинной корневища», распространяющуюся на сырье культивируемых растений.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ ЭКСТРАКТА КУРКУМЫ ГУСТОГО И РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА ЕГО ОСНОВЕ

В качестве первого шага в создании отечественных лекарственных средств на основе куркумы нами предлагается получение экстракционных препаратов, и, с учетом перспектив включения нативного комплекса куркуминоидов в лекарственные формы, предпочтение было отдано получению «Куркумы экстракта густого» (превосходящего, как показали дальнейшие исследования антиоксидантной активности, экстракт жидкий).

В связи с тем, что куркуминоиды светочувствительны, а также во избежание увлечения выхода балластных веществ из корневищ, необходимо проводить экстракцию в течение минимального промежутка времени, но достаточного для извлечения целевых БАС. Для ускорения процесса, увеличения эффективности экстракции и экономии экстрагента, предложено использовалась метод циркуляционной экстракции. Для целого ряда видов ЛРС показана целесообразность получения (путем удаления экстрагента) сухих или густых экстрактов с последующем хранением в сухом, прохладном, защищенном от света месте в плотно укупоренной таре.

Поскольку куркуминоиды очень нестабильны в водных растворах, для получения экстрактов потребуется использование органических растворителей (глава 1). Однако высокая токсичность большинства из них, требующая как повышенных требований к условиям экстракции и концентрирования, так и полного их удаления из готового продукта, делает их в нашем случае непригодными. К тому же использование смесей органических растворителей, или спирта этилового с водой, в условиях циркуляционной экстракции будет приводить к нарушению пропорций смеси и неконтролируемому изменению условий экстракции. Поэтому наиболее оптимальным может считаться использование 95% спирта этилового.

Следует также учитывать высокую лабильность куркуминоидов по отношению к рН среды (глава 1). В слабощелочной среде может происходить

быстрый гидролиз БАС, что ведет к значительным потерям. В связи с этим возникает необходимость подкисления используемого экстрагента. Однако наличие кислоты в готовом продукте нежелательно, как по причине изменения биодоступности, так и в связи с возможным нежелательным раздражающим или даже токсичным действием. Поэтому предлагается использовать в качестве стабилизирующего агента на время экстракции минимальное количество хлороводородной кислоты, так как она будет испаряться вместе с экстрагентом в процессе концентрирования и ее накопления в экстракте не произойдет.

6.1. Разработка технологического способа получения «Куркумы экстракта густого»

Применение циркуляционной экстракции для получения густого экстракта из корневищ куркумы длинной (отечественное сырье культивируемых растений) позволяет использовать наиболее эффективный для целевых БАС малополярный экстрагент – 95 % спирт этиловый (глава 4), подкисленный хлороводородной кислотой с целью придания стабильности куркуминоидам на этапе получения (в процессе последующей отгонки растворителя она полностью испаряется из готового продукта), достичь выхода целевых БАС на уровне 85 % от исходно содержащихся в сырье и обеспечить содержание суммы куркуминоидов в готовом продукте не менее 45% (значения получены с использованием разработанных для ЛРС методики определения суммы куркуминоидов в пересчете на куркумин), дополнительно извлечь терпеноидный комплекс растения (раздел 4.1).

В лабораторных условиях эксперименты проведены с использованием аппарата Сокслета из расчета времени процесса 3,0 часа для экстрагирования 100,0 г сухо-воздушного сырья (содержание суммы куркуминоидов 2,5 %, влажность – 5,1 %) с использованием 95 % спирта этилового, подкисленного 0,1 М раствором кислоты в соотношении: 1,0 мл раствора кислоты на 100,0 мл экстрагента и последующего сгущения извлечения на ротационном испарителе под вакуумом до остаточной влаги в продукте не более 25 %.

Способ приготовления. 100,0 г измельченного сухо-воздушного сырья (размер частиц не более 3.0 мм) упаковывают в патрон из фильтровальной бумаги или в специальную гильзу, помещают в цилиндрическую часть аппарата Сокслета и после герметичного соединения колбы для экстрагента (приемная колба) с экстрактором наливают растворитель – 96 % спирт этиловый, подкисленный 0,1 М раствором кислоты хлороводородной в соотношении: 1,0 мл раствора кислоты на 100,0 мл экстрагента, до тех пор, пока экстрагент не начнет стекать по сифонной трубке в приемную колбу. Когда растворитель стечет полностью, его добавляют еще раз в половинном объеме от уже налитого в экстрактор, затем герметично присоединяют обратный холодильник с водяным охлаждением, приемную колбу с экстрагентом устанавливают на нагревательный прибор (плитку с асбестовой сеткой / погружают в водяную баню) и начинают нагревать.

Растворитель в колбе нагревают на водяной бане до кипения (интенсивность желательно увеличить с использованием магнитной мешалки или других «кипелок»). Пары растворителя через пароотводную трубку поступают в экстрактор и далее в холодильник, там конденсируются и стекают в цилиндрическую часть аппарата Сокслета, где процесс экстракции сырья протекает в циркуляционном режиме (по достижении уровня извлечения верхнего перегиба сифонной трубки экстрактора все извлечение полностью сливается в приемную колбу, где процесс парообразования растворителя продолжается с его последующей конденсацией в обратном холодильнике и стеканием в экстрактор), до полного обесцвечивания извлечения в экстракторе (куркуминоиды имеют яркий желто-оранжевый цвет), что по времени занимает 2,5-3,0 часа. После последнего слива, установку разбирают, полученное извлечение остужают при комнатной температуре и отстаивают 24 часа в прохладном месте (при температуре 8-10 °С). Затем извлечение фильтруют (в лабораторных условиях - через двойной бумажный фильтр «Красная полоса») и упаривают при температуре не превышавшей 60°С в роторном испарителе до консистенции густого экстракта (продукт по массе

составляет приблизительно 40% от массы взятого сырья). Проверяют параметры качества готового продукта: содержание суммы куркуминоидов – не менее 45 %, содержание влаги – не более 25 % и по другим фармакопейным параметрам качества, нормируемым для густых экстрактов. Упаковку и хранение готового продукта проводят по общепринятым требованиям (срок годности – 2 года).

В производственных условиях также возможно в зависимости от имеющегося оборудования использование двух других экстракционных методов, также апробированных нами в лабораторных условиях:

– реперколяция (последовательность и время стадий по Босину или Чулкову) с использованием 80 % раствора спирта этилового и более высоких концентраций, подкисленного 0,1 М раствором кислоты хлороводородной в соотношении: 1,0 мл раствора кислоты на 100,0 мл экстрагента; с последующем сгущением извлечения до содержания остаточной влаги в готовом продукте не более 25 %.

– модифицированная мацерация с делением сырья и экстрагента на три равные части (две нетермические стадии: при комнатной температуре, время экспозиции – 24 часа) и включением заключительной термической стадии (третья стадия: при температуре 70 °С, время экспозиции 30 мин) с использованием 80 % раствора спирта этилового и более высоких концентраций, подкисленного 0,1 М раствором кислоты хлороводородной в соотношении: 1,0 мл раствора кислоты на 100,0 мл экстрагента; с последующем сгущением извлечения до содержания остаточной влаги в готовом продукте не более 25 %.

Однако, такие показатели как выход целевых БАС с использованием метода реперколяции составляет 75 % - 80 % и для модифицированной мацерации – 70 % - 75 % от исходно содержащихся в сырье, а содержание суммы куркуминоидов в готовом продукте в обоих случаях составляет 40%-43%, что несколько уступает предложенному способу получения (табл. 8).

Таблица 8 – Сравнительная оценка эффективности экстракции куркуминоидов из корневищ куркумы длинной различными способами

Технологический способ	Используемый экстрагент	Эффективность экстракции
Циркуляционная экстракция	95 % спирт этиловый, подкисленный 0,1 М раствором кислоты хлороводородной в соотношении: 1,0 мл раствора кислоты на 100,0 мл экстрагента	85 % - 87 %
Реперколяция	80 % спирт этиловый и более высоких концентраций, подкисленный 0,1 М раствором кислоты хлороводородной в соотношении: 1,0 мл раствора кислоты на 100,0 мл экстрагента	75 % - 80 %
Модифицированная мацерация (с делением сырья и экстрагента на три равные и заключительной термической стадией)	аналогично	70 % - 75 %

6.2. Оценка антиокислительной активности «Куркумы экстракта густого»

В сравнительном аспекте было изучено влияние экстракта куркумы густого, экстракта куркумы жидкого (1:2), полученного аналогично густому методом циркуляционной экстракции, антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной (в качестве препарата сравнения - альфа-токоферола ацетат) на процессы свободнорадикального окисления (СРО) в модельных системах (МС) *in vitro* с использованием экспресс-метода определения антиоксидантной активности, основанного на регистрации хемилюминесценции (ХЛ) – свечения, возникающего при взаимодействии свободных радикалов.

6.2.1. Изучение влияния экстракта куркумы густого и препаратов сравнения на генерацию активных форм кислорода

Первоначально оценку влияния исследуемых образцов на процессы СРО проводили на МС, генерирующих активные формы кислорода (АФК). В качестве МС, где генерировались АФК, использовали 20 мл фосфатного буфера (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl) с добавлением раствора люминола (10^{-5} М) и цитрата натрия (50 мМ). Величину рН полученного раствора доводили до 7,45 ед. титрованием насыщенным раствором калия гидроксида. Для инициирования реакций, сопровождающихся образованием АФК, вводили 1 мл 50 мМ раствора солей Fe^{2+} . Регистрация свечения продолжалась в течение 5 минут при постоянном перемешивании.

ХЛ регистрировали на установке ХЛМ-003 (Россия). ХЛ МС характеризовалась спонтанным свечением, быстрой вспышкой и развивающейся затем медленной вспышкой. Основными, наиболее информативными, характеристиками ХЛ служили интенсивность свечения, определяющаяся по интенсивности излучения, и амплитуда максимального свечения (глава 2).

В первой серии экспериментов в 20 мл модельной системы добавляли по 0,1 мл и 0,01 мл исследуемых образцов. Далее готовили их 10% растворы в диметилсульфоксиде (ДМСО) и в тех же объемах добавляли в модельные системы. Тем самым объем исследуемого вещества в МС колебался в пределах 0,001 мл, 0,01 мл и 0,1 мл.

Масляный раствор альфа-токоферола ацетата незначительно удлинял латентный период и уменьшал величину интенсивности свечения ХЛ МС. После того как его развели в ДМСО, эффект усилился (рис. 29).

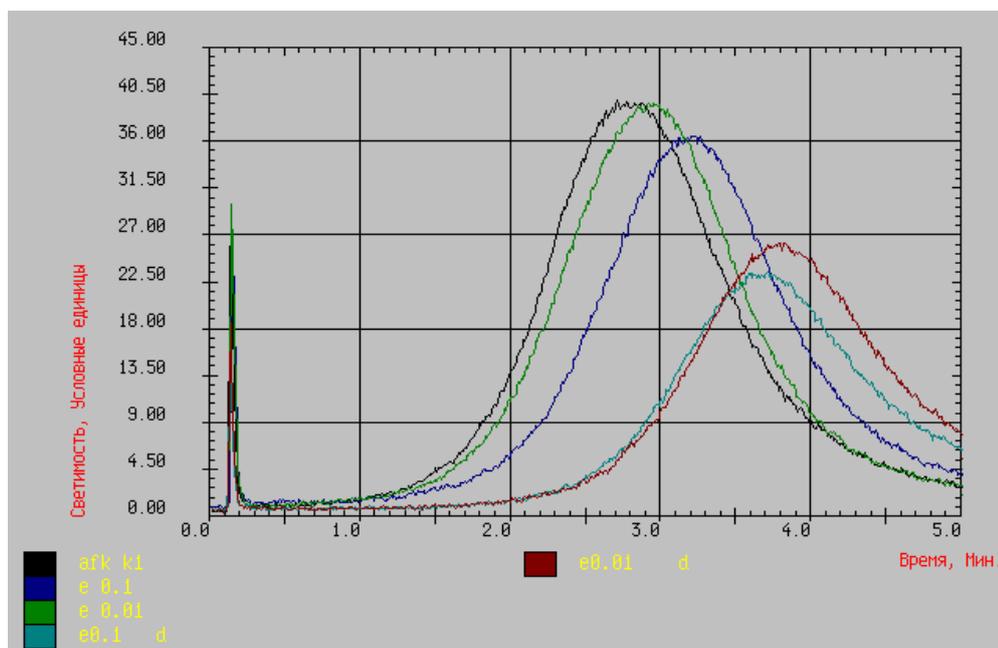


Рисунок 29 - Влияние альфа-токоферола ацетата на процессы СРО в модельной системе АФК

Данные о влиянии антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной на ХЛ МС АФК представлены на рис. 30, экстракта куркумы жидкого на рис. 31, экстракта куркумы густого на рис. 32.

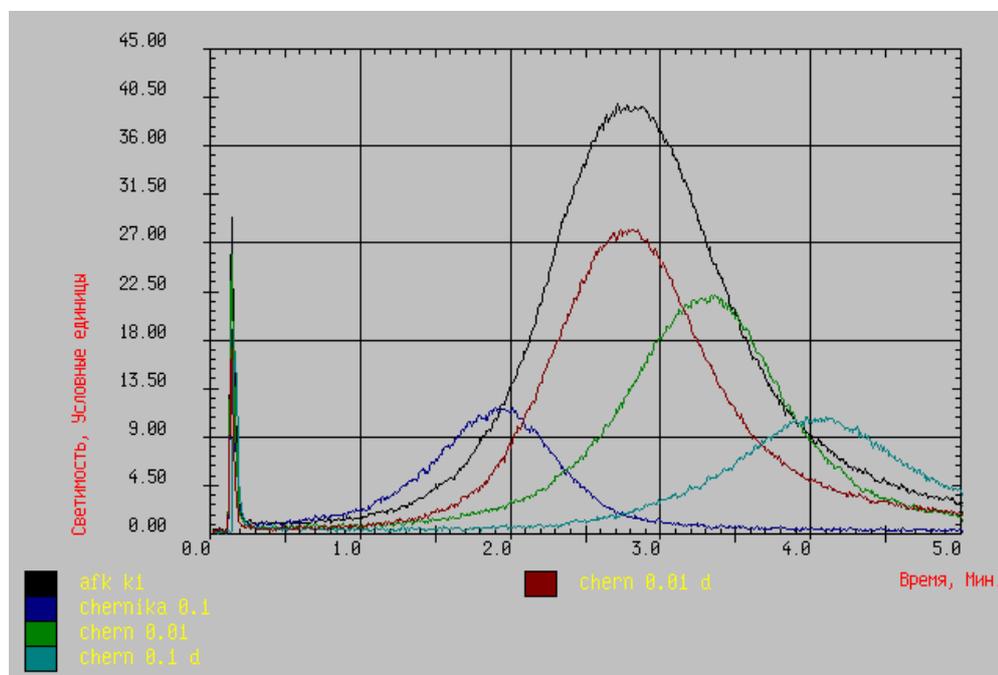


Рисунок 30 - Влияние антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной на процессы СРО в модельной системе АФК

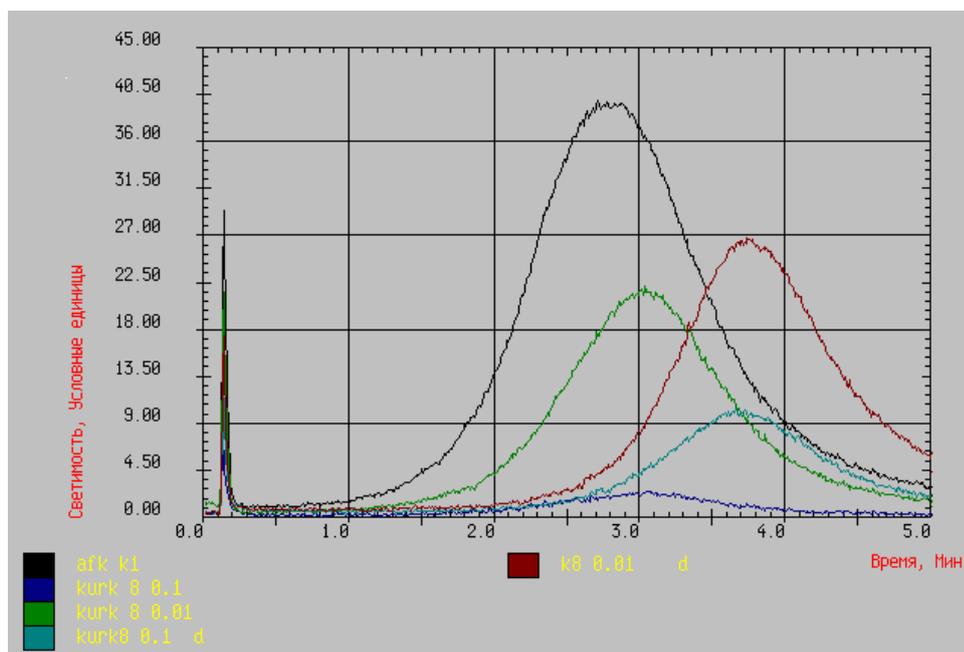


Рисунок 31 - Влияние экстракта куркумы жидкого на процессы СРО в модельной системе АФК

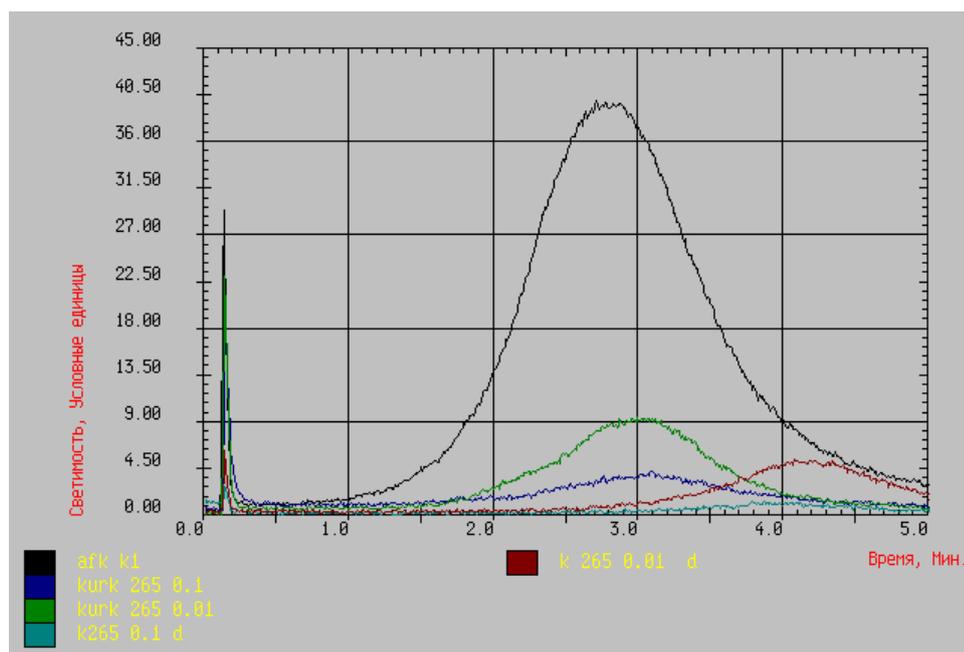


Рисунок 32 - Влияние экстракта куркумы густого на процессы СРО в модельной системе АФК

В табл. 9 и 10 представлены показатели ХЛ МС АФК при добавлении исследуемых образцов до и после их разведения в ДМСО. Наибольший антиоксидантный эффект выявлен у экстракта куркумы густого.

Таблица 9 - Влияние экстракта куркумы жидкого, экстракта куркумы густого, антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной на ХЛ в МС, генерирующей АФК

№ п/п	Объект	Объем, мл	Интенсивность свечения	Спонт. светимость	Вспышка	Макс. светимость
1	Контроль		65,15	0,45	29,44	39,89
2	Экстракт куркумы жидкий	0,1 0,01	4,24 33,32	0,37 1,29	6,83 21,61	2,44 22,09
3	Экстракт куркумы густой	0,1 0,01	9,66 15,37	0,58 0,18	18,19 22,99	4,19 9,37
4	Антоциановый комплекс из плодов черники обыкновенной	0,1 0,01	14,85 33,13	0,22 0,17	18,96 25,95	11,72 22,20
5	Альфа-токоферола ацетат (масляный раствор)	0,1 0,01	60,52 64,22	0,86 0,62	27,90 29,90	36,53 39,69

Таблица 10 - Влияние экстракта куркумы жидкого, экстракта куркумы густого, антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной, разведенных в ДМСО, на ХЛ в МС, генерирующей АФК

№ п/п	Объект	Объем, мл	Интенсивность свечения	Спонт. светимость	Вспышка	Макс. светимость
1	Контроль		60,80	0,92	29,68	37,98
2	Экстракт куркумы жидкий	0,01 0,001	15,87 38,31	0,44 0,45	11,42 17,39	10,38 26,76
3	Экстракт куркумы густой	0,01 0,001	2,25 7,95	1,23 0,28	2,78 6,21	1,33 5,29
4	Антоциановый комплекс из плодов черники обыкновенной	0,01 0,001	17,25 41,01	0,20 0,30	16,89 17,20	10,91 28,28
5	Альфа-токоферола ацетат (масляный раствор)	0,01 0,001	38,12 42,21	0,58 0,55	16,44 18,58	23,37 26,24

6.2.2. Оценка действия экстракта куркумы густого и препаратов сравнения на перекисное окисление липидов

На следующем этапе исследования была использована МС, в которой протекают реакции ПОЛ. Влияние исследуемых водных экстрактов на ПОЛ изучали в липидах куриного желтка, сходных по составу с липидами крови. Липиды получали путем гомогенизирования куриного желтка в фосфатном буфере в соотношении 1:5 и последующим разбавлением в 20 раз, отбирали 20 мл. Добавление в систему 1 мл 50 мМ раствора Fe^{2+} вело к инициированию окисления ненасыщенных жирных кислот, что сопровождалось ХЛ. По интенсивности свечения судили о процессах ПОЛ.

Окисление липидов инициировалось введением сернокислого железа, катализирующего окисление ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов, и образование продуктов перекисного окисления. Уровень спонтанного свечения характеризует интенсивность перекисного окисления липидов до введения катализатора; амплитуда быстрой вспышки отражает скорость окисления ионов Fe^{2+} и образования АФК и гидроперекисей липидов; длительность латентного периода коррелирует с антиокислительной активностью изучаемого образца. Величина интенсивности свечения определяет способность липидов подвергаться окислению.

Во второй серии экспериментов в 20 мл модельной системы ПОЛ добавляли по 0,1 мл и 0,01 мл исследуемых объектов. Затем готовили их 10% растворы в диметилсульфоксиде (ДМСО) и в тех же объемах добавляли в МС. Как и в МС АФК, объем исследуемого вещества в МС ПОЛ колебался в пределах 0,001 мл, 0,01 мл и 0,1 мл.

Данные о влиянии масляного раствора альфа-токоферола ацетата представлены на рис. 33. В сравнении с данным веществом, внесение в МС желточных липопротеидов антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной, экстракта куркумы жидкого, экстракта куркумы густого даже в наименьшей концентрации сопровождалось уменьшением амплитуды быстрой и медленной вспышек, увеличением длительности латентного

периода, снижением значения максимальной светимости (рис. 34,35,36).

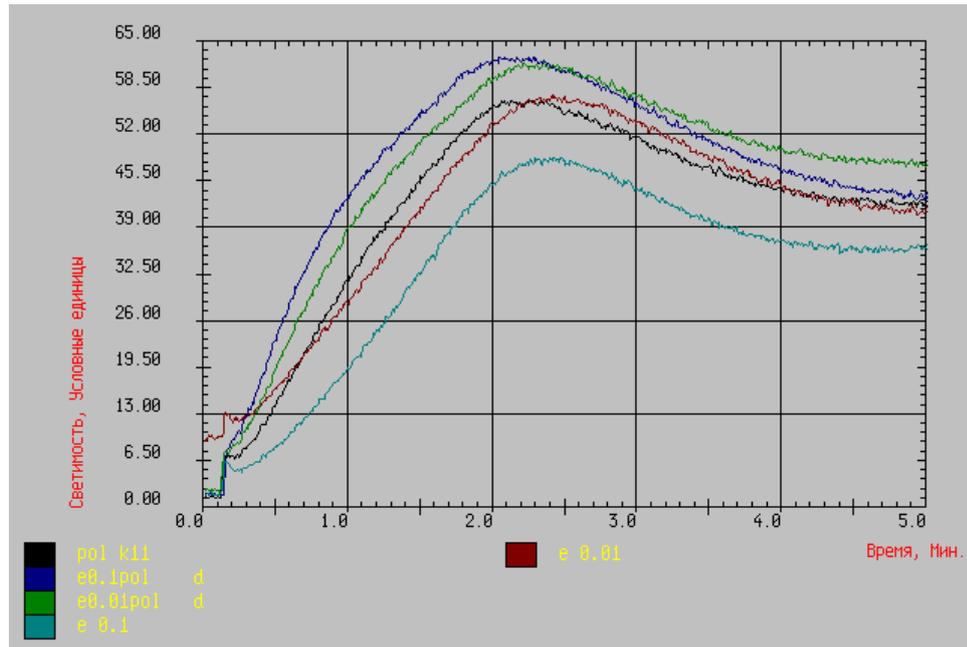


Рисунок 33 - Влияние альфа-токоферола ацетата на процессы СРО в модельной системе ПОЛ

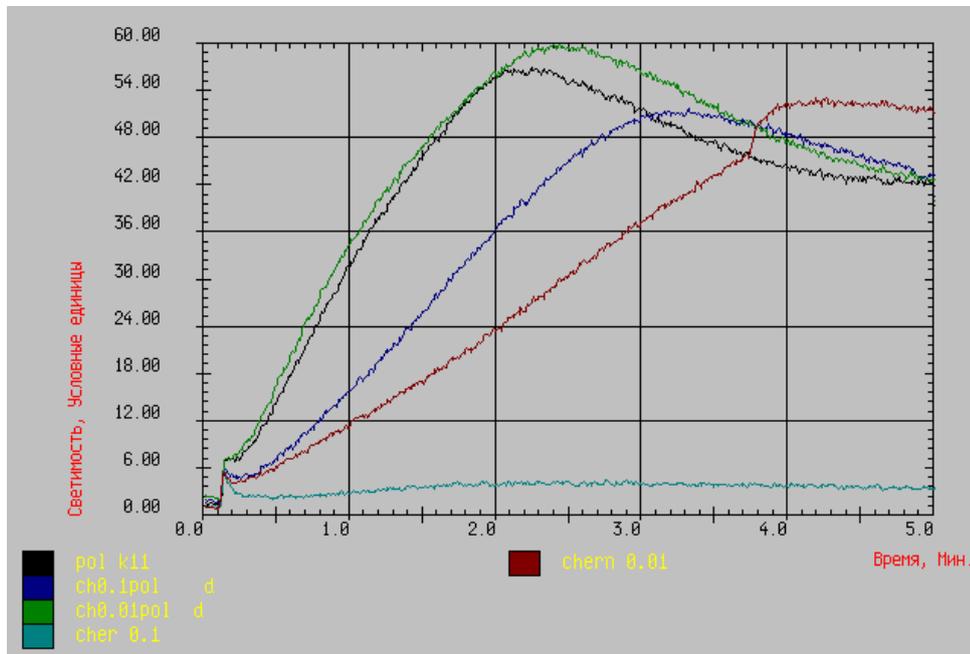


Рисунок 34 - Влияние антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной на процессы СРО в модельной системе ПОЛ

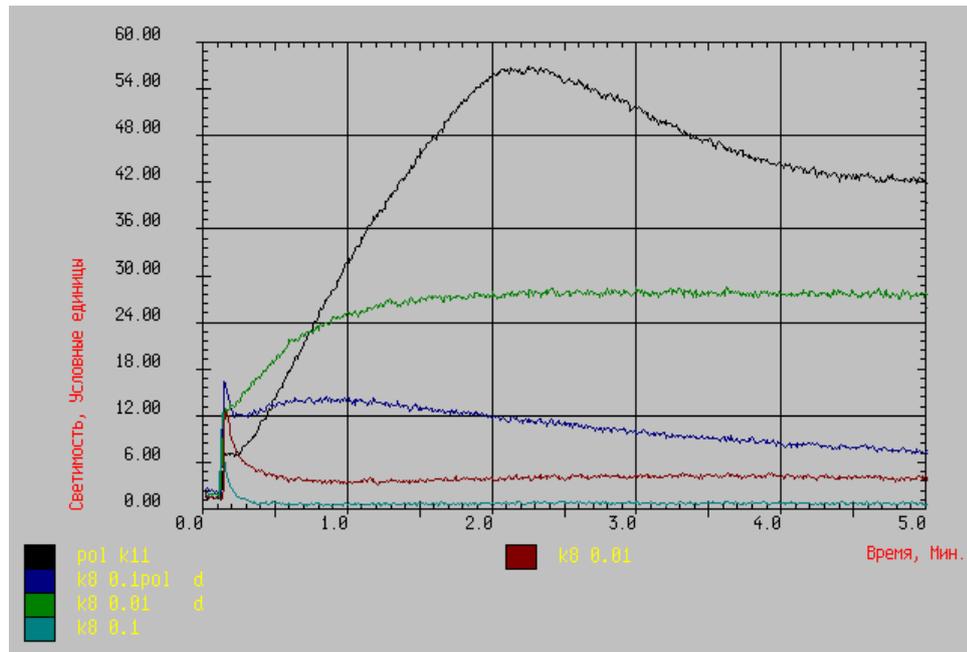


Рисунок 35 - Влияние экстракта куркумы жидкого на процессы СРО в модельной системе ПОЛ

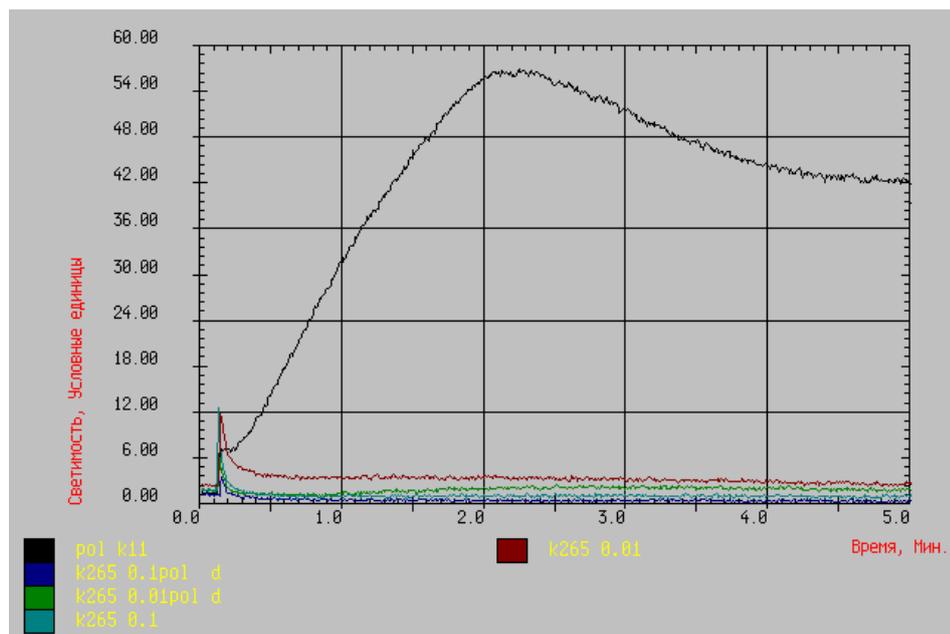


Рисунок 36 - Влияние экстракта куркумы густого на процессы СРО в модельной системе ПОЛ

Уровень свечения МС при добавлении экстракта куркумы жидкого, экстракта куркумы густого, антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной в объеме 0,01 мл подавлялся практически до нуля, следовательно, все исследуемые объекты могут рассматриваться как активные антиоксиданты перекисного окисления липидов.

Таблица 11 - Влияние экстракта куркумы длинной жидкого, экстракта куркумы длинной густого, антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной на ХЛ в МС ПОЛ

№ п/п	Объект	Объем, мл	Интенсивность свечения	Спонт. светимость	Вспышка	Макс. светимость
1	Контроль		119,81	2,19	7,75	9,21
2	Экстракт куркумы жидкий	0,1	4,21	1,64	12,39	1,17
		0,01	20,40	1,61	12,46	1,67
3	Экстракт куркумы густой	0,1	5,55	1,71	12,60	1,05
		0,01	16,36	2,41	11,68	0,77
4	Антоциановый комплекс из плодов черники обыкновенной	0,1	17,29	1,04	5,81	1,56
		0,01	150,48	0,93	5,39	10,42
5	Альфа-токоферола ацетат (масляный раствор)	0,1	165,42	1,82	6,33	17,48
		0,01	206,02	9,64	13,24	18,87

Таблица 12 - Влияние экстракта куркумы жидкого, экстракта куркумы густого, антоцианового комплекса из плодов черники обыкновенной, разведенных в ДМСО, на ХЛ в МС ПОЛ

№ п/п	Объект	Объем, мл	Интенсивность свечения	Спонт. светимость	Вспышка	Макс. светимость
1	Контроль		205,50	1,42	9,11	56,90
2	Экстракт куркумы жидкий	0,01	52,89	2,36	16,44	14,39
		0,001	127,39	1,96	16,34	28,54
3	Экстракт куркумы густой	0,01	2,36	1,22	3,44	0,93
		0,001	9,13	1,73	5,98	2,51
4	Антоциановый комплекс из плодов черники обыкновенной	0,01	174,29	1,82	5,97	51,78
		0,001	218,39	2,33	10,03	59,86
5	Альфа-токоферола ацетат (масляный раствор)	0,01	233,20	1,80	14,58	62,80
		0,001	231,82	2,37	12,21	62,00

В обеих МС исследуемые объекты - экстракт куркумы жидкий, экстракт куркумы густой, антоциановый комплекс из плодов черники обыкновенной действовали в одинаковом направлении: снижали процессы образования свободных радикалов; при этом наибольший эффект выявлен у экстракта куркумы длинной густого (табл. 9-12).

Таким образом, в данном исследовании методом регистрации ХЛ была выявлена способность «Куркумы экстракта густого» активно подавлять генерацию АФК и ПОЛ в модельных системах, что характеризует высокий уровень антиоксидантной активности и доказывает перспективность дальнейших исследований разработанного средства растительного происхождения в качестве самостоятельного лекарственного препарата или в составе других лекарственных форм (например, в форме свечей или мазей) для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний, связанных с ослаблением или нарушением антиоксидантной системы защиты организма.

Результаты данных исследований были использованы при оформлении патента «Антиоксидантное средство «Куркумы экстракт густой».

В качестве лекарственной формы в настоящей работе были выбраны ректальные суппозитории по причине крайне низкой стабильности куркуминоидов в желудочно-кишечном тракте и очень малой биодоступности пероральных лекарственных форм.

6.3. Разработка суппозиторий на основе экстракта куркумы густого

Как уже было отмечено, куркуминоиды обладают крайне низкой стабильностью и биодоступностью при пероральном приеме. Но существуют варианты их применения, когда системная адсорбция не только не предполагается, но и не желательна, например, при комплексном лечении и профилактике рецидивов колоректального рака.

Поэтому, как наиболее целесообразная в данном случае лекарственная форма, были предложены ректальные суппозитории.

Куркуминоиды высоко липофильные соединения, растворимые во

многих липидах. Однако данных количественных характеристик в литературных источниках обнаружено не было.

Известно, что основы, обеспечивающие легкое введение в них действующих веществ, зачастую тормозят или даже препятствуют их высвобождению.

Поэтому для оценки возможности использования той или иной суппозиторной основы, нами были выбраны две различные по свойствам, модельные основы, имитирующие используемые в производстве.

В качестве модельной липофильной основы был выбран «Бутирол», имеющий состав (%):

Масло какао	30
Гидрогенизированный жир ($t_{\text{плав}} = 36^{\circ}\text{C}$)	50
Гидрогенизированный жир ($t_{\text{плав}} = 49^{\circ}\text{C}$)	10
Парафин	10

В качестве модельной гидрофильной была выбрана желатино-глицериновая основа, состава (%):

Желатин	12,5
Глицерин	62,5
Вода	25

Для целей эксперимента использовались формы для выливания, рассчитанные на 2,0 г жировой основы.

В качестве субстанции использовался полученный густой экстракт корневищ куркумы длинной.

Поскольку предлагаемая нами лекарственная форма не имеет аналогов ни по номенклатуре препаратов, ни по данным исследований самих куркуминоидов, то задачей стало определение максимально допустимой дозы, которую возможно ввести в различные основы с учетом соблюдения параметров качества, предусмотренных для суппозиторий нормативной документацией.

6.3.1. Получение суппозиторий на липофильной и гидрофильной основах

Процесс изготовления суппозиторий *на липофильной основе* с использованием густого экстракта проводился по общим правилам.

В процессе эксперимента было выявлено, что густой экстракт куркумы возможно ввести в липофильную основу «Бутирол» лишь в дозировке до 0,025 г из расчета на 1 свечу, массой 2,0 г (1,25%). При этом критичным является соблюдение правила введения экстракта не в расплавленную, а в полуостывшую основу.

Использование в качестве эмульгатора ланолина безводного (в количестве 40-50% от массы взятого экстракта) позволило несколько увеличить дозировку – до 0,05 г на один суппозиторий (2,5%).

Однако попытки ввести большую массу экстракта в липофильную основу приводят к расслоению массы, конгломерации и флотации частиц экстракта, что нарушает дозирование и приводит к получению суппозиторий, не отвечающих фармакопейным требованиям.

Качество суппозиторий контролировалось по параметрам: температура плавления не выше 37°C (по фармакопейной методике) и однородность массы (отсутствие вкраплений на продольном срезе).

Получение суппозиторий *на гидрофильной основе*. Приготовление желатно-глицериновой основы производилось по общим правилам: предварительно желатин заливали водой для набухания, а затем добавляли отвешенный глицерин.

Однако использование стандартной методики позволило ввести в основу лишь 0,03 г экстракта на одну свечу (1,5%). Введение большей дозировки приводит к расслоению суппозиторной массы.

Для оптимизации технология была несколько видоизменена. В выпарительной чашке при небольшом нагревании (50-60°C) отвешенный экстракт растворяли в 3-х кратном по отношению к его количеству объеме спирта этилового 96%. Затем небольшими порциями при интенсивном перемешивании к нему прибавляли предварительно отвешенный глицерин.

Смесь продолжали нагревать при перемешивании до полного удаления спирта. При этом наблюдалось образование микросуспензии куркуминоидов в глицерине. Далее постепенно добавлялся уже набухший в воде желатин.

Используя такую методику, оказалось возможным получение суппозиторий, содержащих по 0,125 г густого экстракта (6,25%).

Качество суппозиторий контролировалось по параметрам: время растворения - не более 1 ч (по фармакопейной методике) и однородность массы (отсутствие вкраплений на продольном срезе).

6.3.2. Исследование фармацевтической биодоступности суппозиторий

Биологическая (физиологическая) доступность – это отношение количества неизмененного лекарственного вещества, абсорбированного и обнаруживаемого в крови после его назначения в виде исследуемой лекарственной формы, к его количеству после назначения в стандартной лекарственной форме. В связи со сложностью определения биологической доступности «*in vivo*», а также тем фактом, что в большинстве случаев скорость растворения и скорость всасывания препаратов коррелируют, в качестве первого этапа оценки биологической доступности, было проведено определение фармацевтической доступности «*in vitro*», для чего использовали разделительный метод определения полноты высвобождения, а также метод диффузии в гель.

Разделительный метод. Данный метод подразумевает исследование способности перехода высвобождающегося в водной фазе препарата в органический растворитель. По методике, приведенной в Гл. 2, анализировались две модельные лекарственные формы: суппозитории на липофильной основе («Бутирол» с добавлением ланолина безводного) и на гидрофильной основе, содержащие по 0,05 г густого экстракта на 1 свечу. Для эксперимента было взято по три свечи на каждой основе.

При расчетах учитывалась влажность использовавшегося экстракта (21%), содержание куркуминоидов в экстракте (43,5%), а также содержание экстракта в одной свече (0,05 г).

Высвобождение рассчитывалось по формуле:

$$X_{\%} = A/B \cdot 100\%;$$

где А – содержание куркуминоидов в слое органического растворителя, г;

Б – содержание куркуминоидов в одной свече;

X_% - степень высвобождения куркуминоидов.

Полученные результаты представлены в табл. 13 и 14.

Таблица 13 - Результаты определения высвобождения куркуминоидов из свечей на липофильной основе разделительным методом

№	Время	Среднее содержание куркуминоидов в органическом растворителе	Средняя степень высвобождения
1	10 мин	0,005318 г	30,95%
2	20 мин	0,009101 г	52,97%
3	30 мин	0,010643 г	61,94%
4	40 мин	0,010480 г	60,99%
5	50 мин	0,010363 г	60,31%
6	60 мин	0,010325 г	60,09%

Таблица 14 - Результаты определения высвобождения куркуминоидов из свечей на гидрофильной основе разделительным методом

№	Время	Среднее содержание куркуминоидов в органическом растворителе	Средняя степень высвобождения
1	10 мин	0,007207 г	41,94%
2	20 мин	0,015141 г	88,12%
3	30 мин	0,015124 г	88,03%
4	40 мин	0,015132 г	88,07%
5	50 мин	0,015063 г	87,92%
6	60 мин	0,015049 г	87,81%

Как видно из представленных табличных данных, максимальная степень высвобождения для суппозиторий на липофильной основе достигается через 30 мин и составляет в среднем 62%. Максимальная степень высвобождения

для суппозиторий на гидрофильной основе достигается через 20 мин и составляет в среднем 88%. Соответственно, можно сделать заключение, что высвобождение куркуминоидов из гидрофильной основы идет более интенсивно и полно, чем из липофильной.

Метод диффузии в гель. Данный метод моделирует процесс высвобождения действующего вещества из лекарственной формы при непосредственном контакте ее с тканями организма.

В сформированном 2% агаровом геле (технология приготовления приведена в главе 2) были вырезаны лунки диаметром 0,7 см, в которые помещались образцы суппозиторий. Готовую систему оставляли на одни сутки, после чего определяли параметры окрашенных в желто-оранжевый цвет (куркуминоиды) зон, вокруг каждой выемки, соответствующей свечи.

Результаты опыта представлены на рис. 37.

Как видно на приведенной фотографии, чистый экстракт имеет очень малую окрашенную зону, что может быть связано с локальным перенасыщением геля куркуминоидами и невозможностью их дальнейшей диффузии.

Лунки с образцами суппозиторий на липофильной основе также имеют очень малый диаметр окрашенной зоны, что свидетельствует о низкой способности «Бутирола» к высвобождению куркуминоидов.

Лунки с образцами суппозиторий на гидрофильной основе имеют достаточно большой диаметр окрашенной зоны – показатель интенсивного процесса диффузии. Сами выемки прозрачные, что говорит о практически полном высвобождении куркуминоидов.

Большая интенсивность и диаметр окрашенной зоны вокруг лунки с образцом суппозитория на гидрофильной основе, содержащего микросуспензию куркуминоидов, свидетельствуют о наилучшей, среди испытываемых модельных лекарственных форм, способности к высвобождению куркуминоидов.

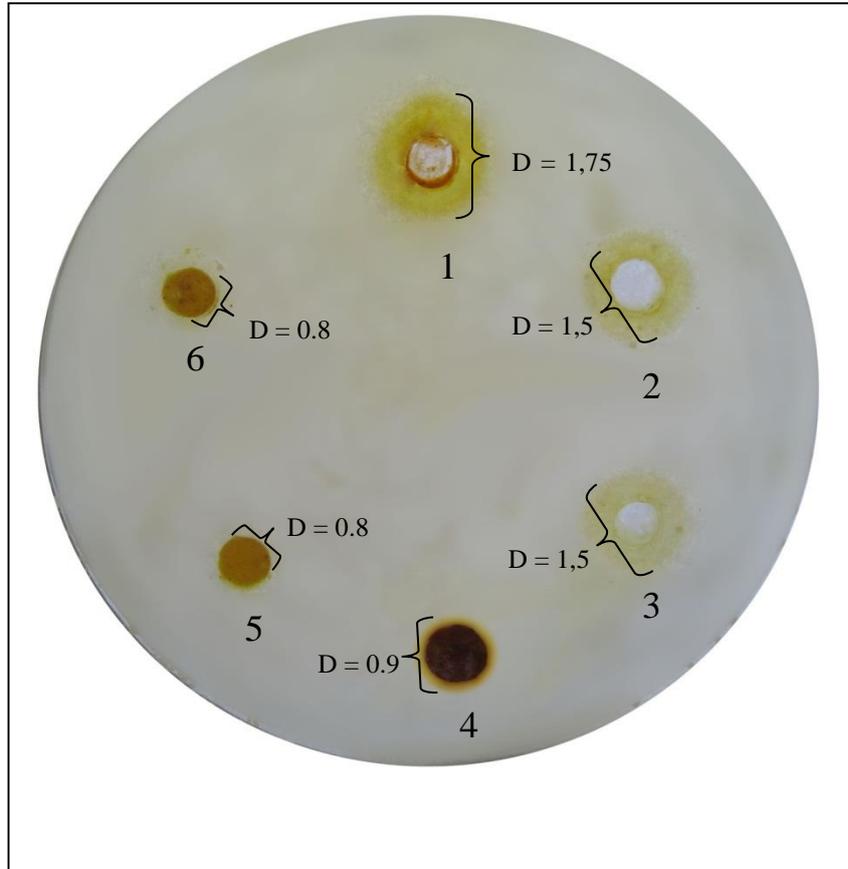


Рисунок 37 – Анализ фармацевтической доступности куркуминоидов из суппозитория методом диффузии в гель

Обозначения: Лунка 1 – образец суппозитория на гидрофильной основе с микросуспензией куркуминоидов, содержащий 0,07 г экстракта, диаметр окрашенной зоны 1,75 см. Лунка 2 - образец суппозитория на гидрофильной основе, содержащий 0,05 г экстракта, диаметр окрашенной зоны 1,5 см. Лунка 3 - образец суппозитория на гидрофильной основе, содержащий 0,03 г экстракта, диаметр окрашенной зоны 1,5 см. Лунка 4 – экстракт куркумы, диаметр окрашенной зоны 0,9 см. Лунка 5 - образец суппозитория на липофильной основе, содержащий 0,03 г экстракта, диаметр окрашенной зоны 0,8 см. Лунка 6 - образец суппозитория на липофильной основе, содержащий 0,05 г экстракта, диаметр окрашенной зоны 0,8 см.

Это дает основания полагать, что найденный технологический способ позволит решить проблему биодоступности путем достижения эффективной концентрации БАС на месте действия суппозитория (раздел 1.2.3).

Выводы к главе 6:

1. Обосновано применение метода циркуляционной экстракции с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 96%, подкисленного кислотой хлористоводородной для получения густого экстракта корневищ куркумы длинной.
2. Методом регистрации хемилюминисценции была доказана выраженная способность «Куркумы экстракта густого» активно подавлять генерацию активных форм кислорода и перекисного окисления липидов в модельных системах.
3. Предложенный экстракционный препарат «Куркумы экстракт густой», обладая высокой антиоксидантной активностью, перспективен для разработки на его основе лекарственных форм.
4. Предложена лекарственная форма – суппозитории ректальные с экстрактом куркумы длинной; проанализирована возможность введения экстракта куркумы длинной в липофильную (до 2,5%) и гидрофильную (до 6,25%) суппозиторные основы.
5. Определены параметры высвобождения куркуминоидов из различных суппозиторных основ.
6. Установлено, что гидрофильная основа является оптимальной, поскольку не только позволяет вводить в один суппозиторий большую дозировку экстракта куркумы длинной, но и обеспечивает высокую скорость и степень высвобождения действующих веществ.

Заключение

На основе проведенных исследований доказано, что корневища куркумы длинной целесообразно рассматривать как официальный вид лекарственного растительного сырья и в этом качестве использовать его в отечественной научной фармации для получения лекарственных препаратов.

С применением различных хроматографических и структурных методов исследования изучен химический состав куркуминоидов сырья культивируемых растений, заготовленных на территории Северного Кавказа в 2007-2014 гг. При этом выделены три доминирующих куркуминоида – куркумин, дезметоксикуркумин и бисдезметоксикуркумин, для которых установлена структура, изучены физико-химические характеристики. Сравнительный анализ отечественного сырья с сырьем растений природных ареалов произрастания показал идентичность по качественному составу и соотношению компонентов куркуминоидной природы, что позволяет его на равных использовать с импортируемым сырьем в качестве ЛРС. Для решения вопросов стандартизации отечественного сырья были усовершенствованы ранее предложенные методики определения подлинности (микроскопия), качественно-го (ТСХ и спектрофотометрия) и количественного (дифференциальная спектрофотометрия) анализа по содержанию куркуминоидов. Разработан способ получения отечественного СО куркумина, изучены его параметры качества. Предложен способ получения густого экстракта корневищ куркумы на 95 % спирте этиловом методом циркуляционной экстракции и доказана его высокая антиоксидантная активность в двух модельных системах. Получена лекарственная форма – суппозитории с экстрактом куркумы. Установлены максимально возможное количество вводимого экстракта в различные основы, для достижения терапевтических доз при дальнейшем применении (по поводу колоректального рака). Определено, что оптимальной суппозиторной основой в плане фармацевтической доступности является гидрофильная. По результатам проведенных исследований разработан проект ФС «Куркумы длинной корневища», распространяющейся на культивируемое сырье.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ:

1. При изучении морфолого-анатомических признаков корневищ куркумы длиной разной степени измельчения (сырье цельное, измельченное, порошок) к диагностически значимым отнесены следующие: наличие в паренхиме клеток с извилистыми стенками и структурированным, окрашенным содержимым (куркуминоиды), встречаются пигментные клетки с каплями эфирного масла красно-оранжевого цвета, в паренхиме обнаруживаются закрытые коллатеральные пучки, проводящие элементы которых (сосуды, преимущественно лестнично-сетчатого типа, с механической обкладкой) состоят из узкопросветных волокон, в сосудах встречаются пигментные клетки, более мелкие по сравнению с размерами сосудов.
2. Изучение куркуминоидного состава сырья растений природных ареалов произрастания и культивируемых растений, заготовленных на территории Северного Кавказа, показало равноценность сырья по компонентному составу и количественному содержанию данной группы БАС (не менее 2,0 % по результатам определения методами ВЭЖХ-анализа и спектрофотометрии).
3. Из отечественных видов сырья выделены три доминирующих куркуминоида – куркумин, дезметоксикуркумин, бисдезметоксикуркумин; установлена их структура и физико-химические характеристики, определено количественное соотношение соединений (по результатам ВЭЖХ-анализа: $63,0 \pm 3,0\%$ куркумин, $22,0 \pm 2,5\%$ дезметоксикуркумин, $17,0 \pm 3,0\%$ - бисдезметоксикуркумин), что характеризует видовую принадлежность производящих растений.
4. Предложено рассмотрение куркумина в качестве отечественного стандартного образца (разработан способ его получения; изучены параметры качества; обосновано применение в методиках качественного и количественного анализа сырья и препаратов куркумы на основе

куркуминоидов).

5. Внедрены ранее разработанные методики качественного и количественного анализа куркуминоидов для оценки качества сырья культивируемых растений на территории Северного Кавказа; при этом уточнен ряд параметров и обосновано использование в фармакопейном анализе сырья куркумы методики дифференциальной спектрофотометрии ($\epsilon_{\text{ср}} 2,4\%$);
6. Изученные нормы качества, касающиеся содержания куркуминоидов, и другие установленные показатели, нормируемые для ЛРС, использованы при разработке проекта фармакопейной статьи «Куркумы длинной корневища», распространяющейся на сырье культивируемых растений.
7. Обосновано применение циркуляционного способа экстракции с использованием подкисленного 95 % спирта этилового для получения «Куркумы экстракта густого»; доказана его высокая антиоксидантная активность в модельных системах перекисного окисления липидов и генерации активных форм кислорода.
8. Предложено использование лекарственной формы «суппозитории» для дальнейшего применения «Куркумы экстракта густого» в медицинской практике.

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы доказывают целесообразность отнесения корневищ куркумы длинной к официальному виду сырья. Показана возможность использования в качестве дополнительного сырьевого источника растений, культивируемых на территории Российской Федерации. Полученные в ходе исследования данные по химическому составу куркуминоидов и разработанные параметры качества сырья культивируемых растений позволяют решать проблемы стандартизации сырья в соответствии с современными требованиями к фармацевтическому анализу, проводить работы по созданию отечественных лекарственных препаратов с разноплановой фармакологической активностью. Материалы исследования

могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также на фармацевтических производствах и в контрольно-аналитических лабораториях, осуществляющих стандартизацию и анализ лекарственных средств.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в проведении углубленных исследований корневищ куркумы длинной как сырьевого источника БАС, в разработке оригинальных лекарственных препаратов и расширении номенклатуры отечественных лекарственных средств.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

1. Арзуметов, Ю.С. Ибн Сина - выдающийся лекарствовед - Абу Али ибн Сина и естественные науки / Ю.С. Арзуметов // Материалы юбилейной научной сессии, посвященной 1000-летию со дня рождения Абу Али ибн Сины (Авиценны). - Бухара, Ташкент, Фан, 1981. – С. 186-190.
2. Бадриддинова, М.Н. Медицинское значение куркумы / М.Н. Бадриддинова, И.Д. Кароматов, С.И. Кароматов // В Кн.: НАУКА - ОБЩЕСТВУ XXI ВЕКА. Ставрополь: «Логос», 2015 - Книга 2, глава 7. – С. 202-242.
3. Дегтярева, И.И. Обоснование применения гепатопротекторов-антиоксидантов в комплексном лечении хронических гепатитов различной этиологии / И.И. Дегтярева, С.В. Скопиченко, И.Н. Скрыпник // Збірник наук. праць спывроб. КМАПО, 2000. - Вип. 9, кн. 4. - С. 64-68.
4. Гаврилин, М.В. Валидация методики определения куркуминоидов в корневищах куркумы длинной / М.В. Гаврилин, Т.В. Орловская, С.П. Сенченко // Фармация. - 2010. - № 6. - С. 18-22.
5. Гаврилин, М.В. Содержание куркуминоидов в корневищах куркумы длинной / М.В. Гаврилин, Т.В. Орловская, С.П. Сенченко // Фармация. - 2010. - № 3. - С. 30-32.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание, вып. 1, 2 и 3 - М.: МЗ РФ, 2015.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-ое издание. Ч. 1. - М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
8. Государственная фармакопея СССР. XI издание, вып. 1 и 2. - М.: Медицина, 1987; 1990.
9. Государственный реестр лекарственных средств. – Т. 1. Официальное издание. – М., 2002. – 1300 с.

10. Горчакова, Н.К. Фармакогностическое изучение куркумы длинной, интродуцированной в СССР: автореф. дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02 / Н.К. Горчакова - М., 1984. – 15 с.
11. Идентификация куркуминов природного происхождения В.Б. Берзин [и др.] // Биоорганическая химия. - 1996. - Т 22, № 10-11. - С. 823-831.
12. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова - М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
13. Кочанов, В.С. Современное состояние и перспективы использования корневищ куркумы длинной / В.С. Кочанов, О.В. Нестерова, Д.А. Доброхотов // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». - 2016. - Вып. 18, № 1. – С. 346-350.
14. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин - Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. - 1279 с.
15. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды - перспективные природные биологически активные соединения / В.А. Куркин - СамГМУ - Самара, 1996. - 79 с.
16. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Распространение, классификация, структурный анализ, биологическая активность / В.А. Куркин // Химия природ. соединений. – 2003. - № 2. – С. 87-110.
17. Куркин, В.А. Разработка государственных стандартных образцов веществ фенилпропаноидной природы / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, Е.В. Авдеева // Мед. вестн. Башкортостана. – 2006. - № 1, Т. 4 - С. 143-146.
18. Лечебные свойства пищевых растений / Т.Л. Киселева [и др.]; Под общ. ред. проф. Т.Л. Киселевой. – М.: Изд-во ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2007. – 533 с.

19. Методы стандартизации отечественного сырья куркумы длинной / Н.К. Горчакова и др. // Ресурсоведческое и фармакогностическое изучение лекарственной флоры СССР: Научные труды. Т. XXV. – М., 1987. – С. 164-170.
20. Немодрук, А.А. Аналитическая химия бора / А.А. Немодрук, З.К. Каралова / М.: Наука, 1964. - С. 69.
21. Орловская, Т.В. Морфолого-анатомическое изучение корневищ куркумы длинной / Т.В. Орловская, В.А. Челомбитько // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА. - Вып. 63. - Пятигорск, 2008. - С. 74-76.
22. Орловская, Т.В. Новый взгляд на пищевые растения, как на перспективные источники лекарственных средств / Т.В. Орловская, М.В. Гаврилин, В.А. Челомбитько – Пятигорск, 2011. – 240 с.
23. Орловская, Т.В. Фармакогностическое исследование некоторых культивируемых растений с целью расширения их использования в фармации: диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Т.В. Орловская - ГБОУ ВПО "Пятигорская государственная фармацевтическая академия". - Пятигорск, 2011.
24. ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» - Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/11/OFS.1.1.0013.15-Statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta.pdf>.
25. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. - С-Пб.: Наука, 1993.
26. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» // Фармация. – 2008. – № 4. – С. 3-10.
27. Самылина, И.А. Лекарственные растения тропиков и субтропиков / И.А. Самылина, А.А. Сорокина – М.: Мир бизнеса, 1998. – 104 с.
28. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А.Самылина, И.А. Баландина // Фармация. - 2004. - № 2.- С. 39-41.

29. Соколова, Ю.Д. Исследование структуры куркумина спектральными методами / Ю.Д. Соколова, П.Н. Челнакова, Е.В. Коновалов // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн.* - 2016. – 12(30). - Режим доступа: URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/4001>.
30. Фархутдинов, Р.Р. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминометре ХЛ-003 / Р.Р. Фархутдинов, С.И. Тевдорадзе // *Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения: Сборник докладов.* Под ред. проф. Е.Б. Бурлаковой. - М.: Изд-во РУДН, 2005. - С. 147-154.
31. Фармакопея США: Сборник стандартов: В 2-х т.Т.1: Пер с англ. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1720 с.
32. Фармакопея США: Сборник стандартов: В 2-х т.Т.2: Пер с англ. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1800 с.
33. Фенилпропаноиды как самостоятельный класс биологически активных соединений: монография / В.А. Куркин [и др.] - Самара: Офорт, 2005. - 126 с.
34. Харламова, О. А. Натуральные пищевые красители / О.А. Харламова, Б.В. Кафка. – Наука, 2003. – 398 с.
35. Черепанов, С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) / С.К. Черепанов. – СПб.: Мир и семья, 1995. – 992 с.
36. Шретер, А.И. Природное сырье китайской медицины / А.И. Шретер, Б.Г. Валентинов, Э.М. Наумова. – М, 2002. – 415 с.
37. Энциклопедия лекарств. Регистр лекарственных средств России / гл. ред. Г.Л. Вышковский. - М.: Изд-во РЛС-Медиа, 2010. - Вып. 18. - 1296 с.
38. Эффективность применения Холивера при заболеваниях гепатобилиарной системы / И.И. Дегтярева [и др.] // *Сучасна гастроентерологія.* - 2003. - №3 (13) - С. 80 – 85.
39. Aggarwal, V.V. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies / V.V. Aggarwal, A. Kumar, A.C. Bharti // *Anticancer Res.* – 2003. – N 23 (1 A). - P.

363-398.

40. Aggarwal, B.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases / B.B. Aggarwal, K.B. Harikumar // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2009. – N 41(1). – P. 40–59.
41. Aggarwal, B.B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets / B.B. Aggarwal, B. Sung // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2009. – N 30(2). – P. 85–94.
42. Aggarwal, B.B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe / B.B. Aggarwal, R.V. Vijayalekshmi, B. Sung // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – N 15(2). – P. 425–430.
43. Ahsan, H. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin / H. Ahsan, N. Parveen, N. U. Khan, S. M. Hadi // *Chem. Biol. Interact.* - 1999. – P. 161–175.
44. Akazawa, N. Curcumin ingestion and exercise training improve vascular endothelial function in postmenopausal women / N. Akazawa [et al.] // *Nutr. Res.* – 2012/ - N 32 (10). - P. 795-799.
45. American Herbal Pharmacopeia: botanical pharmacognosy – microscopic characterization of botanical medicines / edited by: Roy Upton ... [et al.], 2011.
46. A pilot cross-over study to evaluate human oral bioavailability of BCM-95CG (Biocurcumax), a novel bioenhanced preparation of curcumin / B. Antony [et al.] // *Indian J. Pharm. Sci.* – 2008. – N 70(4). – P. 445–449.
47. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease / J. M. Ringman [et al.] // *Curr. Alzheimer Res.* - 2005. – P. 131–136.
48. Boer, H.J. Medicinal plants for women's healthcare in southeast Asia: a meta-analysis of their traditional use, chemical constituents, and pharmacology / H.J. Boer, C. Cotingting // *J. Ethnopharmacol.* – 2014. – N 151(2). – P. 747-767.
49. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors / S. Chintharlapalli [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – N 11. – P. 371.

50. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production / Ireson, C. [et al.] // *Cancer Res.* - 2001. - N 61. – P. 1058–1064.
51. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.) / S. Li [et al.] // *Pharmaceutical Crops.* – 2011. - N 2. - P. 28-54.
52. Comparative absorption of a standardized curcuminoid mixture and its lecithin formulation / J. Cuomo [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2011. – N 74(4). – P. 664–669.
53. Components of turmeric oleoresin preparations and photo-stability of curcumin / S.S. Sasaki [et al.] // *Jpn. J. Food Chem.* - 1998. – P. 5 – 7.
54. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences / G. Garcea [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2005. – N 14 (1). - P. 120-125.
55. Curcumin inhibits activation of V γ 9V Δ 2 T-cells by phosphoantigens and induces apoptosis involving apoptosis-inducing factor and large scale DNA fragmentation / B. Cipriani [et al.] // *J. Immunol.*, 2001. – P. 3454.
56. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator / Y.L. Jiao [et al.] // *Blood.* 2009. – N 113 (2). - P. 462-469.
57. Camacho-Barquero, L. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis / L. Camacho-Barquero [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2007. – N 7 (3). - P. 333-342.
58. Curcumin, a dietary component, has anticancer, chemosensitization, and radiosensitization effects by down-regulating the MDM₂ oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway / L. Mao [et al.] // *Cancer Res.*, 2007. – № 5. - P. 1988 – 1996.
59. Curcumin-from molecule to biological function / T. Esatbeyoglu [et al.] // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* – 2012. – N 51 (22). - P. 5308-5332.

60. Curcumin down-regulates AR gene expression and activation in prostate cancer cell lines / K. Nakamura [et al.] // *Int. J. Oncol.*, 2002. – P. 825–830.
61. Curcumin inhibits platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell function and injury-induced neointima formation / X. Yang [et al.] // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – N 26 (1). - P. 85-90.
62. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial / H. Hanai [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2006. – N. 4 (12). – P. 1502-1506.
63. Curcumin modulates drug metabolizing enzymes in the female Swiss Webster mouse / S.P. Valentine [et al.] // *Life Sci.* – 2006. - 78 (20). - P. 2391-2398.
64. Curcumin reverses impaired cognition and neuronal plasticity induced by chronic stress / Y. Xu [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2009. – N 57 (4). - P. 463-471.
65. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania species* / C. Changtam [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2010. – N 45(3). - P. 941-956.
66. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities / S.C. Gupta [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2012. – N 39(3). - P. 283–299.
67. Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers / M. Kanai [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2012. – N 69 (1). - P. 65-70.
68. Duke, J. A. *CRC Handbook of Medicinal Spices* / J. A. Duke. - CRC Press., 2002. – P. 137–144.
69. Effect of *Curcuma longa* extract on the expression of proinflammatory cytokines / A. Bernd [et al.] // *Skin Pharmacol ApP. Skin Physiol.*, 2000. – P. 226 – 234.
70. Efficacy and safety of Meriva®, a curcumin-phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients / G. Belcaro [et al.] // *Altern Med. Rev.* – 2010. – N 15 (4). - P. 337-344.
71. *European Pharmacopeia* / European Directorate for the quality of medicines and healthcare. – 6-th edition, Supplement 6.5. – Council of Europe, Strasbourg, 2008.
72. Fibach, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia / E. Fibach, E.

- Rachmilewitz // *Curr. Mol. Med.* – 2008. – N 8(7). – P. 609–619.
73. Gaedeke, J. Curcumin blocks fibrosis in anti-Thy 1 glomerulonephritis through up-regulation of heme oxygenase 1 / J. Gaedeke, N.A. Noble, W.A. Border // *Kidney Int.* – 2005. – N 68 (5). - P. 2042-2049.
74. Gilani, A. H. Pharmacological basis for the use of turmeric in gastrointestinal and respiratory disorders / A. H. Gilani, A. J. Shah, M. N. Ghayur, and K. Majeed // *Life Sci*, 2005. – P. 3089–3105.
75. Gupta, S.C. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials / S.C. Gupta, S. Patchva, B. Bharat // *AAPS J.* – 2013. - No 15(1). – P. 195–218.
76. Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited / D.G. Hardie, S.A. Hawley // *BioEssays.* – 2001. – N 23 (12). - P. 1112-1119.
77. He, X.G. Liquid chromatography–electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*) / X.G. He, L.Z. Lin, L.Z. Lian, M. Lindenmaier // *J. Chromatogr. A.* – 1998. - N 818. – P. 127-132.
78. Hiroshi, I. Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in irradiated with γ -rays / I. Hiroshi, O. Makoto, I. Naoshi // *Carcinogenes.* – 1999. – Vol. 20. – № 6. – P. 1011-1018.
79. Hiserodt, R. Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography–mass spectrometry and gas-chromatography–mass spectrometry / R. Hiserodt, T.G. Hartman, C.T. Yj, R.T. Rosen // *J. Chromatogr. A.*, - 1996. - Vol. 740, N 1. – P. 51 – 63.
80. Huang, K.X. Studies on chemical constituents of *Curcuma aromatica salisb* / K.X. Huang, Z.M. Tao, A.J. Zhang // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* – 2000. – Vol. 25. – № 3. – P. 163-165.
81. Human Metabolome Database, Version 2.5, Curcumin [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB02269>. - Загл. с экрана.
82. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic

extract from *Curcuma longa* L. in rats / O.A. Adaramoye [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2009. – N 124(3). – P. 457-462.

83. Ibraheem, R. Synthesis of Curcumin Analogues Biconjugates as Potential Antitumor Agents in Isolated Human Cells / R. Ibraheem, R.I. Al-Wabli // B. Pharm. Sci. - 1426 A.H., 2006. – 150 p.

84. Ide, H. Combined inhibitory effects of soy isoflavones and curcumin on the production of prostate-specific antigen / H. Ide [et al.] // Prostate, 2010. – N 70 (10). - P. 1127-1133.

85. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers / G. Shoba [et al.] // Planta Med. – 1998. – N 64(4). – P. 353–356.

86. Jackson, B.P. Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices / B.P. Jackson, D.W. Snowdon. – London: Belhaven press, 2002. – P. 236 – 239.

87. Janeway Jr., C.A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self / C.A. Janeway Jr. // Immunol. Today, 1992. – P. 11.

88. Jayaprakasha, G.K. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin / G.K. Jayaprakasha, L.J. Rao, K. K. Sakariah // FOOD CHEMISTRY, 2006. - № 4. - P. 720-724.

89. Jayaprakasha, G.K. Chemistry and biological activities of *C. longa* / G.K. Jayaprakasha, L. Jagan Mohan Rao, K.K. Sakariah // Trends in Food Science and Technology, 2005. – N 16 (12). - P. 533-548.

90. Jayaprakasha, G.K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin / G.K. Jayaprakasha, L. Jagan Mohan Rao, K.K. Sakariah // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 20, № 13. – P. 3668-3672.

91. Kurkin, V.A. Phenylpropanoids: perspective biologically active compounds of medicinal plants / V.A. Kurkin // Physical-chemical Basis of Plant Physiology: absr. of Annual Sympos. - Pushchino, 1996. - P. 147.

92. Lechtenberg, M. Quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma* rhizomes and rapid differentiation of *Curcuma domestica* Val. And *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by capillary electrophoresis / M. Lechtenberg, B. Quandt, A.

- Nahrsted // *Phytochem. Anal.* – 2004. – Vol. 15. – N 3. – P. 152-158.
93. Li, Y. Hepatic protection and anticancer activity of curcuma: A potential chemopreventive strategy against hepatocellular carcinoma / Y. Li // *International Journal of Oncology.* – 2013. – N 221. – P. 505-513.
94. Liao, S. Growth suppression of hamster flank organs by topical application of catechins, alizarin, curcumin, and myristoleic acid / S. Liao // *Arch. Dermatol. Res.* – 2001. – N 293 (4). - P. 200.
95. Majeed, M. Research Report from Sabinsa Corporation In Curcuminoids / M. Majeed, V. Badmaev, U. Shivakumar, R. Rajendran // *Antioxidant phytonutrients*, 2000. – P. 113 - 115
96. Mandeville, J.S. Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin / J.S. Mandeville, E. Froehlich, H.A. Tajmir-Riahi // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2009. – N 49 (2). - P. 468-474.
97. Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin / J. Trujillo [et al.] // *Arch. Pharm. (Weinheim).* – 2014. - N 347(12). – P. 873-884.
98. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies / S.C.Gupta [et al.] // *Nat. Prod. Rep.* – 2011. - 28(12). – P. 1937–1955.
99. Na, L.X. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats / L.X. Na [et al.] // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* – 2011. – N 21 (7). - P. 526-533.
100. Ohshiro, M. Structures of sesquiterpenses from *Curcuma longa* / M. Ohshiro, M. Kuroyanagi, A. Ueno // *Phytochemistry.* – 1990. – Vol. 29, N 7. – P. 2201-2205.
101. Oppenheimer, A. Turmeric (curcumin) in biliary diseases / A. Oppenheimer // *Lancet.* – 1937. – N 229. –P. 619–621.
102. Anand, P. Bioavailability of curcumin: problems and promises / P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, B.B. Aggarwal // *Mol. Pharm.* – 2007. – N 4(6). – P. 807–818.
103. Oral supplementation of turmeric attenuates proteinuria, transforming growth factor- β and interleukin-8 levels in patients with overt type 2 diabetic nephropathy: a randomized, double-blind and placebo-controlled study / P. Khajehdehi [et al.] // *Scand. J. Urol. Nephrol.* – 2011. - 45 (5). - P. 365-370.

104. Osawa, T. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids / T. Osawa, Y. Sugiyama, M. Inayoshi, S. Kawakishi // *Biosci Biotech Biochem*, 1995. – P. 1609–1612.
105. Pan, W. AMPK mediates curcumin-induced cell death in CaOV3 ovarian cancer cells / W. Pan // *Oncol Rep.* – 2008. – N 20 (6). - P. 1553-1559.
106. Pari, L. Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity / L. Pari, P. Murugan // *Pharmacol Res* 49, 2004. – P. 481–486.
107. Pari, L. Protective role of tetrahydrocurcumin (THC) an active principle of turmeric on chloroquine induced hepatotoxicity in rats / L. Pari, D.R. Amali // *J. Pharm. Sci.*, 2005. – P. 115–123.
108. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions Cheng AL [et al.] // *Anticancer Res.* – 2001. - N 21 (4). - P. 2895-2900.
109. Puangsombat, K. Inhibitory activity of Asian spices on heterocyclic amines formation in cooked beef patties / K. Puangsombat, W. Jirapakkul, J.S. Smith // *J. Food Sci.* – 2011. - N 76(8). – P. 174-180.
110. Reddy, A.C. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron / A.C. Reddy, B.R. Lokesh // *Mol. Cell. Biochem.*, 1994. – P. 1–8.
111. Reinke, A.A. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility / A.A. Reinke, J.E. Gestwicki // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2007. – N 70 (3). - P. 206-215.
112. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection / R.W. Chen [et al.] // *J. Neurochem.* – 2003. – N 84(3). - P. 566-575.
113. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals / S.C. Gupta [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* – 2010. – N 29(3). – P. 405–434.
114. Reproductive effects of a pegylated curcumin / C.J. Murphy [et al.] // *Reprod.*

Toxicol. – 2012. – N 34 (1). - P.120-124.

115. Safety and pharmacokinetics of a solid lipid curcumin particle formulation in osteosarcoma patients and healthy volunteers / V.S. Gota [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2010. – N 58(4). – P. 2095–2099.

116. Sahebkar, A. Curcumin downregulates human tumor necrosis factor- α levels: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / A. Sahebkar [et al.] // Pharmacol. Res. – 2016. – N. 107. –P. 234-42.

117. Saw, C.L. Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid / C.L. Saw, Y. Huang, A.N. Kong // Biochem. Pharmacol. – 2010. – N 79 (3). - P. 421-430.

118. Schraufstatter, E. Antibacterial action of curcumin and related compounds / E. Schraufstatter, H. Bernt // Nature. – 1949. – N 164. – C. 456.

119. Scotter, M.J. Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review / M.J. Scotter // Food Addit Contam, Part A Chem. Anal. Control. Expo Risk Assess. – 2011. – N 28 (5). - P. 527-596,

120. Sehgal, A. Combined effects of curcumin and piperine in ameliorating benzo(a)pyrene induced DNA damage / Sehgal A. [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2011. – N 49 (11). - P. 3002-3006.

121. Sigma-Aldrich, C1368 Curcumin from *Curcuma longa* (Turmeric), powder [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. – Режим доступа: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=C1386|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO. - Загл. с экрана.

122. Singh, M. Curcumin counteracts the proliferative effect of estradiol and induces apoptosis in cervical cancer cells / M. Singh, N.Singh // Mol. Cell. Biochem. – 2011. – N 347 (1-2). - P.1-11.

123. Sharma, R.A. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels / R.A. Sharma [et al.] // Clin. Cancer. Res. – 2001. – N 7 (5). - pp. 1452-1458.

124. Sharma, S. Dietary curcumin supplementation counteracts reduction in levels of

molecules involved in energy homeostasis after brain trauma / S. Sharma [et al.] // Neuroscience. 2009. – N 161 (4). - P. 1037-1044.

125. Shiyou, L. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.) / L. Shiyou // Pharmaceutical Crops. – 2011. - № 2. - P. 28-54.

126. Skrzypczak-Jankun, E. Structure of curcumin in complex with lipoxygenase and its significance in cancer / E. Skrzypczak-Jankun / Int. J. Mol. Med. – 2003. – N 12 (1)/ - P. 17-24.

127. Sompamit, K. Curcumin improves vascular function and alleviates oxidative stress in non-lethal lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in mice / K. Sompamit // Eur. J. Pharmacol. – 2009. - 616 (1-3). - P. 192-199.

128. Spectral and photochemical properties of curcumin / C.F. Chignell [et al.] // Photochem. Photobiol., 1994. – P. 295 – 302.

129. Spindler S, et al. Influence on longevity of blueberry, cinnamon, green and black tea, pomegranate, sesame, curcumin, morin, Pycnogenol, quercetin and taxifolin fed isocalorically to long-lived, outcrossed mice . Rejuvenation Res. 16 (2) (2013) pp. 143-151.

130. Sreejayan, N. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation / N. Sreejayan, M. N. Rao // J. Pharm. Pharmacol., 1994. – P. 1013–1016.

131. Sreejayan, N. Free radical scavenging activity of curcuminoids / N. Sreejayan, M. N. Rao // Arzneimittelforschung, 1996. – P. 169–171.

132. Sreejayan, N. Nitric oxide scavenging by curcuminoids / N. Sreejayan, M. N. Rao // J. Pharm. Pharmacol., 1997. – P. 105–107.

133. Storka, A. Effect of liposomal curcumin on red blood cells *in vitro* / A. Storka [et al.] // Anticancer Res. – 2013. – N 33 (9). - P. 3629-3634.

134. Sung, B. Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals / B.Sung [et al.] // Nutr. Cancer. – 2012. – N. 64 (2). - P. 173-197.

135. Sugiyama, Y. Involvement of the diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin / Y. Sugiyama, S. Kawakishi, T. Osawa // Biochem. Pharmacol., 1996. – P. 519–525.

136. Syamkumar, S. Molecular marker based genetic diversity analysis of Curcumaspecies from India / S. Syamkumar, B.Sasikumar // *Sci. Hort.* – 2007. – N 112. – P. 235-241.
137. Thapliyal, R. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins *in vitro* and *in vivo* / R. Thapliyal, G.B. Maru // *Food Chem. Toxicol.*, 2001. – P. 541–547.
138. The antioxidant mechanism of curcumin: Classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity / L.R.C. Barclay [et al.] // *Org. Lett.* - 2000. – P. 2841–2843.
139. The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats / T. Morimoto [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. - 118 (3) - P. 868-878.
140. *The Flavonoids: Advances and Research* / Ed. by J.B. Harborne, T.J. Mabry. - London: Chapman and Hall, 1982. - 744 p.
141. *The Pharmacopoeia of People's Republic of China*. Chemical Industry Press: Beijing, 2005.
142. Tonnesen, H. H. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions / H.H. Tonnesen // *Pharmazie*, 2002. - P. 820-824.
143. Topical application of a sandal wood oil and turmeric based cream prevents radiodermatitis in head and neck cancer patients undergoing external beam radiotherapy: a pilot study / P.L. Palatty [et al.] // *Br. J. Radiol.*– 2014. –N. 87. – P. 490.
144. Total antioxidant capacity of blood plasma from healthy donors receiving vitamin and mineral complex / M.V. Voronin [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2004. – N 137 (5). - P. 457-459.
145. Vogel, A. Examen chimique de la racine de Curcuma / A. Vogel, J. Pelletier // *J. Pharm.* – 1815. –N 1. – P. 289–300.
146. Wu, A. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition / A. Wu, Z. Ying, F. Gomez-Pinilla // *Exp. Neurol.* – 2006. – N 197 (2). – P. 309-317.
147. Xavier, S. $\beta(2)$ -Adrenoceptor and insulin receptor expression in the skeletal

muscle of streptozotocin induced diabetic rats: Antagonism by vitamin D(3) and curcumin / S. Xavier // *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – N 687 (1-3) - P. 14-20.

148. Xia, W. Determination on chemical constituents of *Curcuma* L. produced in China. W. Xia, X. Xiao, F. Liu // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* – 1999. – Vol. 24. – № 7. – P. 423-434.

149. Xu, P. Curcumin protects rat heart mitochondria against anoxia-reoxygenation induced oxidative injury / P. Xu // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2013. - N 91(9). - P. 715-723.

150. Yallapu, M.M. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer / M.M. Yallapu, M. Jaggi, S.C. Chauhan // *Drug Discov Today.* – 2012. – N 17 (1-2). - P. 71-80.

В ЗАКЛЮЧЕНИЕ АВТОР ВЫРАЖАЕТ БЛАГОДАРНОСТЬ

- **коллегам из Самарского государственного медицинского университета:** заведующему кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ, профессору, д.фарм.н. В.А. Куркину и в его лице всем сотрудникам кафедры за систематическую помощь и содействие в выполнении диссертационного исследования, а также заведующей лабораторией санитарно-химических методов исследования НИИ гигиены и экологии человека СамГМУ, к.фарм.н. Т.К. Рязановой;
- **пятигорским коллегам:** профессору, д.фарм.н. В.А. Челомбитько, доценту, д.фарм.н. Т.В. Орловской за предоставленные образцы сырья культивируемых растений на территории Северного Кавказа, за оказанную консультационную помощь при выполнении работы;
- **коллегам из Башкирского государственного медицинского университета:** заведующему кафедрой послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования ИДПО БашГМУ, профессору, д.фарм.н. В.А. Катаеву; профессору той же кафедры, д.фарм.н. Г.М. Латыповой; старшему научному сотруднику Центральной научно-исследовательской лаборатории БашГМУ, д.м.н. Р.Р. Фархутдинову за оказанную помощь в выполнении эксперимента и консультирование при изучении антиоксидантной активности «Куркумы экстракта густого».

ПРИЛОЖЕНИЯ

- Приложение № 1. Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебную и научно-исследовательскую работу кафедр фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России;
- Приложение № 2. Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебную и научно-исследовательскую работу кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БашГМУ Минздрава России;
- Приложение № 3. Акт внедрения результатов диссертационной работы в работу ЗАО "Самаралектравы";
- Приложение № 4. Акт внедрения результатов диссертационной в работу Института ботаники Академии наук Абхазии;
- Приложение № 5. Сводные данные зарубежной научной литературы по изучению фармакологической активности лекарственных препаратов и субстанций корневищ куркумы длинной;
- Приложение № 6. Проект ФС «Куркумы длинной корневища», принятый в ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России;
- Приложение № 7. Приоритетная справка на патент РФ на изобретение "Антиоксидантное средство "Куркумы экстракт густой".

«Утверждаю»

Первый проректор

- проректор по учебно-воспитательной и социальной работе ФГБОУ ВО СамГМУ

Минздрава России,

Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ЩУКИН

«20» _____ 2017 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Борисова Михаила Юрьевича «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета: зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, д.б.н., профессора И.Ф. Шаталаева, доцента, к.фарм.н. А.В. Воронина, доцента, к.х.н. С.Х. Шариповой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Борисова М.Ю., посвященного изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов куркумы длинной, содержащих куркуминоиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего фенольные соединения. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе куркумы длинной.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета,
д. б. н., профессор

 И.Ф. ШАТАЛАЕВ

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. фарм. н.

 А.В. ВОРОНИН

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
к. х. н.

 С.Х. ШАРИПОВА

«Утверждаю»

Первый проректор

- проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор Ю.В. ЩУКИН

« 20 » 2017 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Борисова Михаила Юрьевича
«Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)»
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности
14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре
фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии: зав. кафедрой фармацевтической технологии, д.фарм.н., профессора С.В. Первушкина, доцента, к.фарм.н. Н.Н. Желонкина, старшего преподавателя, к.фарм.н. О.В. Бер подтверждает использование материалов диссертационного исследования Борисова М.Ю., посвященного изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и препаратов на основе куркумы длинной, содержащей куркуминоиды, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по созданию и производству лекарственных препаратов на основе куркуминоидного комплекса растения, в частности, предложенного диссертантом «Куркумы экстракта густого» и ректальных свечей на его основе. Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья и лекарственных препаратов являются методической и методологической основой для дальнейшей разработки отечественных лекарственных препаратов с разноплановой фармакологической активностью.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии,
д. фарм. н., профессор



С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.



Н.Н. ЖЕЛОНКИН

Старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.



О.В. БЕР

«Утверждаю»

Первый проректор
 - проректор по учебно-воспитательной и социальной
 работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
 Заслуженный работник высшей школы РФ,
 д.м.н., профессор Ю.В. ЩУКИН

« 20 » 02 2017 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Борисова Михаила Юрьевича «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, доцента, к.фарм.н. И.К. Петрухиной, доцента, к.фарм.н. Е.П. Гладуновой, доцента, к.фарм.н. Е.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Борисова М.Ю., посвященного изучению фармакогностическому изучению корневищ куркумы длинной как официального вида лекарственного растительного сырья и обоснованию (теоретическому и экспериментальному) получения отечественных лекарственных препаратов на основе куркуминоидного комплекса растения. В частности, используются результаты диссертационных исследований в научно-исследовательской работе кафедры в области фармакоэкономических исследований лекарственных препаратов, в основе механизма действия которых основополагающей является антиоксидантная активность. Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового для отечественной научной фармации вида лекарственного растительного сырья «Куркумы длинной корневища» и создания конкурентоспособных отечественных лекарственных средств для терапии актуального нозологического спектра заболеваний.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления и экономики фармации,
 к. фарм. н., доцент



И.К. ПЕТРУХИНА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,
 д. фарм. н.



Е.П. ГЛАДУНОВА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,
 к. фарм. н.



Е.Л. АБДУЛМАНОВА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

ул. Ленина, 3, г. Уфа, Республика Башкортостан, Российская Федерация,
450008

тел. (347) 272-41-73, факс 272-37-51

[http:// www.bashgmu.ru](http://www.bashgmu.ru), E-mail: rectorat@bashgmu.ru

ОКПО 01963597 ОГРН 1020202561136
ИНН 0274023088 КПП 027401001

№ _____

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Ректор федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации



В.Н. Павлов

2017 г.

АКТ

**внедрения в учебный процесс и научно-исследовательскую работу
результатов диссертации М.Ю. Борисова
на тему: «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы
длинной (*Curcuma longa* L.)»**

- 1. Наименование предложения для внедрения:** стандартизация корневищ куркумы длинной и пути рационального использования сырья.
- 2. Кем предложено (адрес исполнителя):** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89).
- 3. Источник информации:** публикации
 - Борисов М.Ю., Авдеева Е.В., Куркин В.А., Рязанова Т.К. Фитохимическое исследование корневищ куркумы длинной // Сеченовский вестник. 2016. № 2 (24). С. 41-43.
 - Борисов М.Ю., Серебрякова А.Д., Дударева Л.В. Разработка методик качественного и количественного определения куркуминоидов в корневищах куркумы длинной // В книге: Аспирантские чтения – 2016: Материалы научно-практической конференции с международным участием "Молодые учёные – от технологий XXI века к практическому здравоохранению". ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. 2016. С. 209-211.
 - Борисов М.Ю., Авдеева Е.В., Куркин В.А., Рязанова Т.К. Исследования по стандартизации корневищ куркумы длинной // Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / Под ред. В.А. Катаева – Уфа: Изд-во ООО АИНСИ, 2016. С. 32-35.

4. **Где и когда внедрено:** кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, март 2017 г.
5. **Форма внедрения:** использование в учебном процессе и выполнении учебно-исследовательских работ студентов и молодых ученых по дисциплинам фармакогнозия и основы фитотерапии.
6. **Эффективность внедрения:** повышение качества учебного процесса и уровня подготовки провизоров в сфере фармакогностического анализа; освоение аспирантами кафедры новых подходов в решении проблемы стандартизации растительного сырья и в обосновании рациональных путей его использования.
7. **Замечания и предложения:** целесообразно внедрение в образовательных организациях Российской Федерации, ведущих подготовку специалистов по специальности «фармация».

Члены комиссии:

Заведующая кафедрой фармакогнозии
с курсом ботаники и основ фитотерапии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор



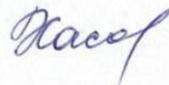
Кудашкина Наталья Владимировна

Профессор кафедры фармакогнозии
с курсом ботаники и основ фитотерапии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор



Пупыкина Кира Александровна

Профессор кафедры фармакогнозии
с курсом ботаники и основ фитотерапии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
доцент



Хасанова Светлана Рашитовна

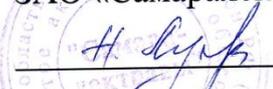


Приложение 3

«Утверждаю»

Генеральный директор

ЗАО «Самаралектравы»

 Н.Д. ЛУЖНОВ

« 12 » 10 2016 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Борисова Михаила Юрьевича на тему: «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загарянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования М.Ю. Борисова, посвященного фитохимическому и морфолого-анатомическому изучению сырья, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа по содержанию в сырье и различных фитосубстанций куркумы длинной основной группы действующих веществ - куркуминоидов апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных субстанций на основе куркумы длинной.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»



А.Н. ЗАГАРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»



А.В. НИКИТЕНКОВ

АԢСНЫ АҨҲЫНҘҚАРРА
АЕКОЛОГИЕИ
АԢСАБАРАХЬЧАРЕИ РЗЫ
АҨҲЫНҘҚАРРАТӘ ЕИЛАКЫ



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
РЕСПУБЛИКИ АБХАЗИЯ
ПО ЭКОЛОГИИ
И ОХРАНЕ ПРИРОДЫ

STATE COMMITTEE OF THE REPUBLIC ABKHAZIA
ON ECOLOGY AND NATURE PROTECTION

Ақәа, Академик Сахаров имәа
71/11
ател. 8 (840) 226-39-28; 226-69-54

Sukhum, academic Sakharova st.
71/11
Tel. 8 (840) 226-39-28; 226-69-54

Сухум, ул. Академика Сахарова
71/11
тел. 8 (840) 226-39-28; 226-69-54

« 14 » Исх. № 240
X 2016г

АКТ

**внедрения результатов диссертации М.Ю. Борисова
на тему: «Фармакогностическое исследование корневищ куркумы
длинной (*Curcuma longa* L.)»**

- 1. Наименование предложения для внедрения:** химический состав и морфолого-анатомические признаки корневищ куркумы длинной.
- 2. Кем предложено (адрес исполнителя):** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89).
- 3. Источник информации:** публикации
 - Борисов М.Ю., Куркин В.А., Авдеева Е.В., Сазонова О.В. Морфолого-анатомическое исследование корневищ куркумы длинной //Фундаментальные исследования. - 2014. - № 8-5. - С. 1114-1117.
 - Борисов М.Ю. Определение куркуминоидов в корневищах куркумы длинной / В книге «Аспирантские чтения– 2013»: материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Молодые учёные - медицине». Издательство: ООО Издательство «Книга». - 2013. - С. 270-271.
 - Борисов М.Ю. Оценка качества нового вида лекарственного растительного сырья «Куркумы длинной корневища» /В книге «Аспирантские чтения – 2012»: материалы докладов Всероссийской

конференции с международным участием «Молодые учёные - медицине». ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России. - 2012. - С. 195-198.

4. **Где и когда внедрено:** Лаборатория Абхазского Государственного центра экологического мониторинга при Государственном Комитете Республики Абхазия по экологии и охране природы, октябрь 2016 г.
5. **Форма внедрения:** изучение возможности культивирования куркумы длинной на территории Республика Абхазия и изучение параметров качества сырья.
6. **Эффективность внедрения:** объективное определение доброкачественности сырья, заготовленного от культивируемых образцов куркумы длинной с использованием предложенных норм качества.
7. **Замечания и предложения:** целесообразно внедрение в научно-исследовательских организациях и производственных предприятиях, специализирующихся на, изучении и переработке лекарственного растительного сырья, а также выращивании лекарственного растительного сырья.

Члены комиссии:

Директор Института ботаники Академии наук Абхазии,
кандидат с/х наук по специальности
06.01.05. - селекция и семеноводство


Губаз Э.Ш.

Заведующий отделом флоры и растительности
Института ботаники Академии наук Абхазии,
заслуженный деятель науки Республики Абхазия,
член-корреспондент Международной Академии
наук экологии, безопасности человека и природы,
кандидат биологических наук по специальности
03.00.05 – ботаника


Адзинба З.И.

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ

ЧИТАНАВА С.М.

Подпись Губаз Э.Ш. Адзинба З.И., Читанова С.М. заверяю

зав. канцелярией

Чернова Т.И.



Сводные данные зарубежной научной литературы по изучению фармакологической активности лекарственных препаратов и субстанций корневищ куркумы длинной

Disease (заболевание)	Pts (число пациентов)	Dosage; duration (доза, длительность приема)	Выявленный фармакологический эффект	Источник литературы
Cancer				
Colorectal cancer	15	0.036–0.18 g/day; 4 months	Reduced glutathione S-transferase activity	Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. <i>Clin Cancer Res.</i> 2001;7(7):1894–1900. [PubMed]
	15	0.45–3.6 g/day; 4 months	Reduced PGE ₂ production	Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. <i>Clin Cancer Res.</i> 2004;10(20):6847–6854. [PubMed] [Cross Ref]
	12	0.45–3.6 g/day; 7 days	Reduced the levels of M ₁ G	Garcea G, Berry DP, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, et al. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.</i> 2005;14(1):120–125. [PubMed]
	5	1.44 g/day; 6 months	Reduced the number and size of polyps without any appreciable toxicity	Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, Zhao R, Hyland LM, Wexner SD, et al. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. <i>Clin Gastroenterol Hepatol.</i> 2006;4(8):1035–1038. [PubMed] [Cross Ref]
	44	2 and 4 g/day; 1 month	Reduced ACF formation in smokers	Carroll RE, Benya RV, Turgeon DK, Vareed S, Neuman M, Rodriguez L, et al. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. <i>Cancer Prev Res (Phila)</i> 2011;4(3):354–364. [PMC free article][PubMed] [Cross Ref]
	126	1.08 g/day; 10–30 days	Improved body weight, reduced serum TNF- α , and induced p53 expression	He ZY, Shi CB, Wen H, Li FL, Wang BL, Wang J. Upregulation of p53 expression in patients with colorectal cancer by administration of curcumin. <i>Cancer Investig.</i> 2011;29(3):208–213. [PubMed] [Cross Ref]
	Pancreatic cancer	20	1.5 g/day; 6 weeks	Reduced the lipid peroxidation and increased GSH content in patients
25		8 g/day	Well-tolerated, limited absorption, and showed activity in some patients	Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL, et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. <i>Clin Cancer Res.</i> 2008;14(14):4491–4499. [PubMed] [Cross Ref]
17		8 g/day; 4 weeks	Not feasible for combination therapy	Epelbaum R, Schaffer M, Vizek B, Badmaev V, Bar-Sela G. Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. <i>Nutr Cancer.</i> 2010;62(8):1137–1141. [PubMed]

	21	8 g/day	Safe and well-tolerated in patients	Kanai M, Yoshimura K, Asada M, Imaizumi A, Suzuki C, Matsumoto S, et al. A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. <i>Cancer Chemother Pharmacol.</i> 2011;68(1):157–164. [PubMed] [Cross Ref]
Breast cancer	14	6 g/day; 7 day, every 3 weeks	Safe, well-tolerated, and efficacious	Bayet-Robert M, Kwiatkowski F, Leheurteur M, Gachon F, Planchat E, Abrial C, et al. Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. <i>Cancer Biol Ther.</i> 2010;9(1):8–14. [PubMed] [Cross Ref]
Prostate cancer	85	0.1 g/day; 6 months	Reduced the serum PSA content in combination with isoflavones	Ide H, Tokiwa S, Sakamaki K, Nishio K, Isotani S, Muto S, et al. Combined inhibitory effects of soy isoflavones and curcumin on the production of prostate-specific antigen. <i>Prostate.</i> 2010;70(10):1127–1133. [PubMed] [Cross Ref]
Multiple myeloma	26	4 g/day; 6 months	Decreased paraprotein load and urinary N-telopeptide of type I collagen	Golombick T, Diamond TH, Badmaev V, Manoharan A, Ramakrishna R. The potential role of curcumin in patients with monoclonal gammopathy of undefined significance—its effect on paraproteinemia and the urinary N-telopeptide of type I collagen bone turnover marker. <i>Clin Cancer Res.</i> 2009;15(18):5917–5922. [PubMed] [Cross Ref]
	29	2–12 g/day; 12 weeks	Safe, bioavailable, and efficacious against multiple myeloma	Vadhan-Raj S, Weber D, Wang M, Giralt S, Alexanian R, Thomas S, et al. Curcumin downregulates NF-KB and related genes in patients with multiple myeloma: results of a phase 1/2 study. <i>Blood.</i> 2007;110(11):357a.
Lung cancer	16	1.5 g/day; 30 days	Reduced the urinary excretion of mutagens in smokers	Polasa K, Raghuram TC, Krishna TP, Krishnaswamy K. Effect of turmeric on urinary mutagens in smokers. <i>Mutagenesis.</i> 1992;7(2):107–109. [PubMed] [Cross Ref]
Cancer lesions	62	Ointment	Produced remarkable symptomatic relief in patients with external cancerous lesions	Kuttan R, Sudheeran PC, Josph CD. Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy. <i>Tumori.</i> 1987;73(1):29–31. [PubMed]
	58	3.6 g/day, 3 months	Reduced the number of micronuclei in mucosal cells and in circulating lymphocytes	Hastak K, Lubri N, Jakhi SD, More C, John A, Ghaisas SD, et al. Effect of turmeric oil and turmeric oleoresin on cytogenetic damage in patients suffering from oral submucous fibrosis. <i>Cancer Lett.</i> 1997;116(2):265–269. [PubMed] [Cross Ref]
	25	8 g/day, 3 months	Improved the precancerous lesions	Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. <i>Anticancer Res.</i> 2001;21(4B):2895–2900. [PubMed]
	100	2 g/day; 7 weeks	Well tolerated, but not efficacious	Chainani-Wu N, Silverman S, Jr, Reingold A, Bostrom A, Mc Culloch C, Lozada-Nur F, et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of curcuminoids in oral lichen planus. <i>Phytomedicine.</i> 2007;14(7–8):437–446. [PubMed] [Cross Ref]
	75	1 g/day, 7 day	Increased vitamins C and E levels, decreased MDA and 8-OHdG contents in the serum and saliva	Rai B, Kaur J, Jacobs R, Singh J. Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress. <i>J Oral Sci.</i> 2010;52(2):251–256. [PubMed] [Cross Ref]

Head and neck cancer	39	2 tablets	Decreased IKK β kinase activity and IL-8 levels in the saliva	Kim SG, Veena MS, Basak SK, Han E, Tajima T, Gjertson DW, et al. Curcumin treatment suppresses IKKbeta kinase activity of salivary cells of patients with head and neck cancer: a pilot study. <i>Clin Cancer Res.</i> 2011;17(18):5953–5961. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
Inflammatory diseases				
Crohn disease	5	1.08 g/day, 1 month + 1.44 g/day, 2 months	Significant reductions in CDAI and inflammatory indices in patients	Holt PR, Katz S, Kirshoff R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. <i>Dig Dis Sci.</i> 2005;50(11):2191–2193. [PubMed][Cross Ref]
Ulcerative proctitis	5	1.1 g/day for 1 month + 1.65 g/day for 1 month	Significant reduction in symptoms as well as inflammatory indices in patients	Holt PR, Katz S, Kirshoff R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: a pilot study. <i>Dig Dis Sci.</i> 2005;50(11):2191–2193. [PubMed][Cross Ref]
Ulcerative colitis	89	2 g/day; 6 months	Prevented relapse of disease	Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, et al. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. <i>Clin Gastroenterol Hepatol.</i> 2006;4(12):1502–1506. [PubMed] [Cross Ref]
	1	0.5 g/day; 2–10 months	Associated with clinical and endoscopic remission of the disease	Lahiff C, Moss AC. Curcumin for clinical and endoscopic remission in ulcerative colitis. <i>Inflamm Bowel Dis.</i> 2011;17(7):E66. [PubMed] [Cross Ref]
Inflammatory bowel disease	<i>ex vivo</i>	5–20 μ M; 0.5–24 h	Suppressed p38 MAPK activation, reduced IL-1 β , and enhanced IL-10 levels in mucosal biopsies; suppressed MMP-3 in colonic myofibroblasts	Epstein J, Docena G, MacDonald TT, Sanderson IR. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. <i>Br J Nutr.</i> 2010;103(6):824–832. [PubMed] [Cross Ref]
Irritable bowel syndrome	207	0.072 and 0.144 g STE/day; 8 weeks	Produced significant reduction in the prevalence of symptoms	Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Booth J. Turmeric extract may improve irritable bowel syndrome symptomology in otherwise healthy adults: a pilot study. <i>J Altern Complement Med.</i> 2004;10(6):1015–1018. [PubMed][Cross Ref]
	8	0.5 g in food	Increased bowel motility and activated hydrogen producing bacterial flora in the colon	Shimouchi A, Nose K, Takaoka M, Hayashi H, Kondo T. Effect of dietary turmeric on breath hydrogen. <i>Dig Dis Sci.</i> 2009;54(8):1725–1729. [PubMed] [Cross Ref]
Rheumatoid arthritis	18	1.2 g/day; 2 weeks	Improved joint swelling, morning stiffness, and walking time	Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane) Indian <i>J Med Res.</i> 1980;71:632–634. [PubMed]
	45	0.5 g/day; 8 weeks	Improved the RA symptoms in patients alone and in combination with diclofenac sodium	Chandran B, Goel A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. <i>Phytother Res.</i> 2012;26(11):1719–25. [PubMed]

Osteoarthritis	50	0.2 g/day; 3 months	Efficacious in the management and treatment of osteoarthritis	Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, Pellegrini L, Ledda A, Grossi MG, et al. Product-evaluation registry of Meriva(R), a curcumin-phosphatidylcholine complex, for the complementary management of osteoarthritis. <i>Panminerva Med.</i> 2010;52(2 Suppl 1):55–62. [PubMed]
	100	1 g/day; 8 months	Efficacious in the long-term management of osteoarthritis	Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, Pellegrini L, Ledda A, Grossi MG, et al. Efficacy and safety of Meriva(R), a curcumin-phosphatidylcholine complex, during extended administration in osteoarthritis patients. <i>Altern Med Rev.</i> 2010;15(4):337–344. [PubMed]
Chronic anterior uveitis	53	1.125 g/day; 12 weeks	Efficacy and recurrence of the disease comparable to that for corticosteroid therapy without any adverse effect	Lal B, Kapoor AK, Asthana OP, Agrawal PK, Prasad R, Kumar P, et al. Efficacy of curcumin in the management of chronic anterior uveitis. <i>Phytother Res.</i> 1999;13(4):318–322. [PubMed] [Cross Ref]
Recurrent anterior uveitis	106	1.2 g/day; 12–18 months	Reduced the eye discomfort after a few weeks of treatment in more than 80% of patients	Allegri P, Mastromarino A, Neri P. Management of chronic anterior uveitis relapses: efficacy of oral phospholipidic curcumin treatment. Long-term follow-up. <i>Clin Ophthalmol.</i> 2010;4:1201–1206. [PMC free article] [PubMed]
Postoperative inflammation	46	1.2 g/day; 6 day	Exhibited superior anti-inflammatory property compared with phenylbutazone	Satoskar RR, Shah SJ, Shenoy SG. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. <i>Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.</i> 1986;24(12):651–654. [PubMed]
Gastric ulcer	60	1 g/day; 6–12 weeks	Reduced ulcer formation after 12 weeks	Kositichaiwat C, Kositichaiwat S, Havanondha J. <i>Curcuma longa</i> Linn. in the treatment of gastric ulcer comparison to liquid antacid: a controlled clinical trial. <i>J Med Assoc Thai.</i> 1993;76(11):601–605. [PubMed]
Peptic ulcer	45	3 g/day; 4 weeks	Reduced ulcer formation	Prucksunand C, Indrasukhsri B, Leethochawalit M, Hungspreugs K. Phase II clinical trial on effect of the long turmeric (<i>Curcuma longa</i> Linn) on healing of peptic ulcer. <i>Southeast Asian J Trop Med Public Health.</i> 2001;32(1):208–215. [PubMed]
<i>H. pylori</i> infection	25	0.06 g/day; 1 week	Improved dyspeptic symptoms and reduced serologic signs of gastric inflammation	Di Mario F, Cavallaro LG, Nouvenne A, Stefani N, Cavestro GM, Iori V, et al. A curcumin-based 1-week triple therapy for eradication of <i>Helicobacter pylori</i> infection: something to learn from failure? <i>Helicobacter.</i> 2007;12(3):238–243. [PubMed] [Cross Ref]
	36	0.12 g/day; 4 weeks	Insignificant effect on <i>H. pylori</i> eradication	Koosirirat C, Linpisarn S, Changsom D, Chawansuntati K, Wipasa J. Investigation of the anti-inflammatory effect of <i>Curcuma longa</i> in <i>Helicobacter pylori</i> -infected patients. <i>Int Immunopharmacol.</i> 2010;10(7):815–818. [PubMed] [Cross Ref]
Idiopathic inflammatory pseudotumor	8	1.125 g/day; 22 months	Patients recovered from the disease	Lal B, Kapoor AK, Agrawal PK, Asthana OP, Srimal RC. Role of curcumin in idiopathic inflammatory orbital pseudotumours. <i>Phytother Res.</i> 2000;14(6):443–447. [PubMed]
Skin conditions				

Vitiligo	10	Twice/day; 12 weeks	Improved the repigmentation in combination with NB-UVB	Asawanonda P, Klahan SO. Tetrahydrocurcuminoid cream plus targeted narrowband UVB phototherapy for vitiligo: a preliminary randomized controlled study. <i>Photomed Laser Surg.</i> 2010;28(5):679–684. [PubMed] [Cross Ref]
Psoriasis	40	1% in gel; 4 weeks	Anti-psoriatic activity in association with suppression in PhK activity	Heng MC, Song MK, Harker J, Heng MK. Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. <i>Br J Dermatol.</i> 2000;143(5):937–949. [PubMed] [Cross Ref]
	12	4.5 g/day; 12 weeks	Low response rate, but well-tolerated	Kurd SK, Smith N, VanVoorhees A, Troxel AB, Badmaev V, Seykora JT, et al. Oral curcumin in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: a prospective clinical trial. <i>J Am Acad Dermatol.</i> 2008;58(4):625–631. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
Neurodegenerative diseases				
Dejerine-Sottas disease	1	1.5 g/day; 4 months and 2.5 g/day; 8 months	Exhibited safety and efficacy	Burns J, Joseph PD, Rose KJ, Ryan MM, Ouvrier RA. Effect of oral curcumin on Dejerine-Sottas disease. <i>Pediatr Neurol.</i> 2009;41(4):305–308. [PubMed] [Cross Ref]
Alzheimer's disease	33	2–4 g/day; 24 weeks	Observations yet to be published	Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. <i>Curr Alzheimer Res.</i> 2005;2(2):131–136. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
	34	1–4 g/day; 6 m	Found safe and increased vitamin E level	Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, et al. Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. <i>J Clin Psychopharmacol.</i> 2008;28(1):110–113. [PubMed] [Cross Ref]
Cardiac conditions				
Acute coronary syndrome	70	0.045, 0.09, 0.18 g/day; 2 months	Reduced total cholesterol and LDL cholesterol, and increased HDL cholesterol and triglyceride content in patients	Alwi I, Santoso T, Suyono S, Sutrisna B, Suyatna FD, Kresno SB, et al. The effect of curcumin on lipid level in patients with acute coronary syndrome. <i>Acta Med Indones.</i> 2008;40(4):201–210. [PubMed]
Atherosclerosis	10	0.5 g/day; 7 days	Reduced serum lipid peroxides and total serum cholesterol levels, and increased HDL cholesterol	Soni KB, Kuttan R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. <i>Indian J Physiol Pharmacol.</i> 1992;36(4):273–275. [PubMed]
Metabolic diseases				
Diabetes	1	5 g/day; 3 months	Reduced the fasting blood sugar from 140 to 70 mg/dl	Srinivasan M. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. <i>Indian J Med Sci.</i> 1972;26(4):269–270. [PubMed]
	72	0.6 g/d; 8 weeks	Improved endothelial function and reduced	Usharani P, Mateen AA, Naidu MU, Raju YS, Chandra N. Effect of NCB-02, atorvastatin and placebo on endothelial function, oxidative stress and inflammatory markers in patients with type

			levels of oxidative stress and inflammatory biomarkers	2 diabetes mellitus: a randomized, parallel-group, placebo-controlled, 8-week study. <i>Drugs R D</i> . 2008;9(4):243–250. [PubMed] [Cross Ref]
	14	6 g, 15–120 min	Increased postprandial serum insulin levels, insignificant effect on plasma glucose levels and the glycemic index	Wickenberg J, Ingemansson SL, Hlebowicz J. Effects of <i>Curcuma longa</i> (turmeric) on postprandial plasma glucose and insulin in healthy subjects. <i>Nutr J</i> . 2010;9:43. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
	240	1.5 g/day; 9 months	Participants showed a better overall function of β cells, with higher HOMA- β and adiponectin, and lower C-peptide and HOMA-IR	Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Luechapudiporn R, Phisalaphong C, Jirawatnotai S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. <i>Diabetes Care</i> . 2012;35(11):2121–7. [PMC free article] [PubMed]
Diabetic nephropathy	40	1.5 g/day; 2 months	Attenuated proteinuria, TGF- β , and IL-8 in overt type 2 diabetic nephropathy	Khajehdehi P, Pakfetrat M, Javidnia K, Azad F, Malekmakan L, Nasab MH, et al. Oral supplementation of turmeric attenuates proteinuria, transforming growth factor-beta and interleukin-8 levels in patients with overt type 2 diabetic nephropathy: a randomized, double-blind and placebo-controlled study. <i>Scand J Urol Nephrol</i> . 2011;45(5):365–370. [PubMed] [Cross Ref]
Diabetic microangiopathy	25	1 g/day, 4 weeks	Improved the symptoms of disease	Appendino G, Belcaro G, Cornelli U, Luzzi R, Togni S, Dugall M, et al. Potential role of curcumin phytosome (Meriva) in controlling the evolution of diabetic microangiopathy. A pilot study. <i>Panminerva Med</i> . 2011;53(3 Suppl 1):43–49. [PubMed]
Lupus nephritis	24	500 mg/day, 3 months	Decreased proteinuria, hematuria, and systolic blood pressure in patients with relapsing or refractory lupus nephritis	Khajehdehi P, Zanjanejad B, Aflaki E, Nazarinia M, Azad F, Malekmakan L, et al. Oral supplementation of turmeric decreases proteinuria, hematuria, and systolic blood pressure in patients suffering from relapsing or refractory lupus nephritis: a randomized and placebo-controlled study. <i>J Ren Nutr</i> . 2012;22(1):50–57. [PubMed][Cross Ref]
Renal conditions				
Renal transplantation	43	480–960 mg/day; 1 month	Improved early outcomes in cadaveric renal transplantation	Shoskes D, Lapierre C, Cruz-Correa M, Muruve N, Rosario R, Fromkin B, et al. Beneficial effects of the bioflavonoids curcumin and quercetin on early function in cadaveric renal transplantation: a randomized placebo controlled trial. <i>Transplantation</i> . 2005;80(11):1556–1559. [PubMed][Cross Ref]
Viral diseases				
Acquired immunodeficiency syndrome	40	2.5 g/day; 8 weeks	Viral load and CD4 cells count were unaffected	James JS. Curcumin: clinical trial finds no antiviral effect. <i>AIDS Treat News</i> . 1996;(no 242):1–2. [PubMed]
Others				
β -Thalassemia	21	0.5 g/day; 12 months	Improved the oxidative	Kalpravidh RW, Siritanaratkul N, Insain P, Charoensakdi R, Panichkul N, Hatairaktham S, et al.

			stress parameters	Improvement in oxidative stress and antioxidant parameters in beta-thalassemia/Hb E patients treated with curcuminoids. Clin Biochem. 2010;43(4–5):424–429. [PubMed] [Cross Ref]
Biliary dyskinesia	76	Extract; 3 weeks	Relieved pain due to biliary dyskinesia	Niederau C, Gopfert E. The effect of chelidonium- and turmeric root extract on upper abdominal pain due to functional disorders of the biliary system. Results from a placebo-controlled double-blind study. Med Klin (Munich) 1999;94(8):425–430. [PubMed] [Cross Ref]
Gallbladder contraction	12	0.02 g, 0.5–2 h	Reduced the gallbladder volume	Rasyid A, Lelo A. The effect of curcumin and placebo on human gall-bladder function: an ultrasound study. Aliment Pharmacol Ther. 1999;13(2):245–249. [PubMed] [Cross Ref]
Recurrent respiratory tract infections	10	3 g/day; 4 weeks	Reduced the infections and produced beneficial immunomodulatory effects	Zuccotti GV, Trabattoni D, Morelli M, Borgonovo S, Schneider L, Clerici M. Immune modulation by lactoferrin and curcumin in children with recurrent respiratory infections. J Biol Regul Homeost Agents. 2009;23(2):119–123. [PubMed]
Cholecystitis	67	0.1–0.25 g/day; 3 months	Relieved the patients from disease	Oppenheimer A. Turmeric (curcumin) in biliary diseases. Lancet. 1937;229:619–621. [Cross Ref]
Hepatoprotection	528	1 g/day; 6 months	Prevented ATT-associated hepatotoxicity	Adhvaryu MR, Reddy N, Vakharia BC. Prevention of hepatotoxicity due to anti tuberculosis treatment: a novel integrative approach. World J Gastroenterol.2008;14(30):4753–4762. [PMC free article] [PubMed][Cross Ref]
Chronic arsenic exposure	286	1 g/day; 3 months	Exhibited activities against As-induced genotoxicity	Biswas J, Sinha D, Mukherjee S, Roy S, Siddiqi M, Roy M. Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal. Hum Exp Toxicol.2010;29(6):513–524. [PubMed] [Cross Ref]
Alcohol intoxication	7	0.03 g, single dose	Inhibited alcohol intoxication	Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, et al. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. Biol Pharm Bull.2011;34(5):660–665. [PubMed] [Cross Ref]
Chronic bacterial prostatitis	143	0.2 g/day; 2 weeks	Enhanced the efficacy of prulifloxacin in combination with other phytochemicals	Cai T, Mazzoli S, Bechi A, Addonisio P, Mondaini N, Pagliai RC, et al. Serenoa repens associated with urtica dioica (ProstaMEV) and curcumin and quercetin (FlogMEV) extracts are able to improve the efficacy of prulifloxacin in bacterial prostatitis patients: results from a prospective randomised study. Int J Antimicrob Agents. 2009;33(6):549–553. [PubMed] [Cross Ref]

Обозначения: 8-OHdG - 8-гидроксидеoxyguanosine, ACF - aberrant crypt foci, As - arsenic, ATT - antituberculosis treatment, CDAI - Crohn disease activity index, CD4 - cluster of differentiation 4, GSH - glutathione, HDL - high-density lipoprotein, H. pylori - Helicobacter pylori, HOMA - homeostasis model assessment, IKK - IκB kinase, IL - interleukin, IR - insulin resistance, LDL - low-density lipoprotein, M₁G - pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one, MAPK - mitogen-activated protein kinase, MDA - malondialdehyde, MMP-3 - matrix metalloproteinase-3, NB-UVB - narrowband UVB, PGE₂ - prostaglandin E₂, PhK phosphorylase kinase, PSA - prostate-specific antigen, RA - rheumatoid arthritis, STE - standard turmeric extract, TGF-β - transforming growth factor beta, TNF-α - tumor necrosis factor-α

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», доктор фармацевтических наук, профессор

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«___» _____ 20__ г.

**СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

Производитель: ЗАО Самаралектравы (пос. Антоновка, Самарская область)

Заявитель и Разработчик: государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Куркумы длинной корневища
Curcumae longae rhizomata

ФС 42-
вводится впервые

Срок введения установлен
с “___” _____ г.

до “___” _____ г.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на зрелые и высушенные, цельные и измельченные (порошкованные) корневища культивируемого растения куркумы длинной – *Curcuma longa* L., семейство имбирные – *Zingiberaceae*.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80.

Хранение. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI изд., вып. 1, с. 296.

Срок годности. 3 года.

Сырье для получения желчегонных и гепатопротекторных средств.

Примечание. Реактивы и методики определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи СССР X и XI издания, вып. 1,2.

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава
России, академик РАМН, профессор

«14»

2013 г.

Г.П. Котельников

Зав. кафедрой фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России,
профессор

«14»

2013 г.

В.А. Куркин

Профессор кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

«14»

2013 г.

Е.В. Авдеева

Аспирант кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

«14»

2013 г.

М.Ю. Борисов

Аспирант кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

«14»

2013 г.

Т.К. Рязанова

Генеральный директор
ЗАО «Самаралектравы»

«14»

2013 г.

Н.Д. Лужнов

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

Куркумы длинной корневища

ФС

Curcumae longae rhizomata

Вводится впервые

Собранные после цветения и высушенные корневища культивируемого растения куркумы длинной – *Curcuma longa* L., сем. Имбирные – *Zingiberaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Корневище клубневидное, округлое на поперечном сечении, до 4 см в диаметре, желтовато-серое, с кольцевыми коричневыми рубцами от отмерших листьев. Из боковых почек развиваются подземные, относительно цилиндрические побеги – корневища 3 – 10 см длиной и 0,5 – 1,5 см в диаметре, суживающиеся к обоим концам. Цвет корневищ снаружи от желто-оранжевого до желто-коричневого; излом ровный, красновато-желтый или желтый.

Запах специфический, сильно ароматный. Вкус водного извлечения слабозгучий, пряный, слегка горьковатый, приятный.

Корневище на поперечном сечении пучкового типа (рис. 3.1.). С поверхности покрыто экзодермой. Периферическая часть коры сложена крупными многоугольными клетками с небольшими треугольными межклетниками. Глубже клетки паренхимы с извилистыми стенками и структурированным, окрашенным содержимым (рис. 2.1., 2.2.). В некоторых клетках паренхимы встречаются мелкие крахмальные зерна овальной формы (рис. 2.3.).

Вокруг центрального цилиндра хорошо различима однослойная эндодерма, состоящая из тонкостенных вытянутых клеток (рис. 3.1.) По периферии стели и в паренхиме корневища разбросаны закрытые коллатеральные пучки. Проводящие элементы ксилемы - сосуды с механической обкладкой, состоящей из узко-просветных волокон (рис. 3.2.).

На продольном срезе диагностируются сосуды лестнично-сетчатого типа (рис. 4.1.).

Проводящие пучки кроме сосудов содержат пигментные клетки (рис. 4.2.), значительно более мелкие по сравнению с размерами сосудов, с оранжево-коричневым содержимым, разделённым поперечными трещинами. В основной паренхиме встречаются пигментные клетки с каплями эфирного масла красно-оранжевого цвета (рис. 4.3.).

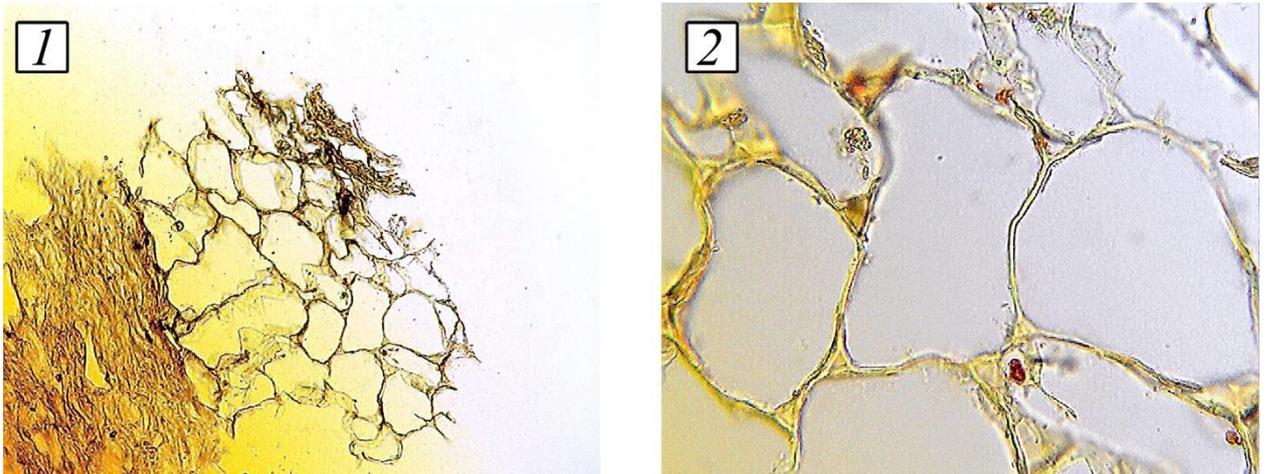


Рисунок 1 – Поверхность корневища на поперечном сечении: 1 – экзодерма (x 100), 2 – клетки экзодермы с треугольными межклетниками (x 400).

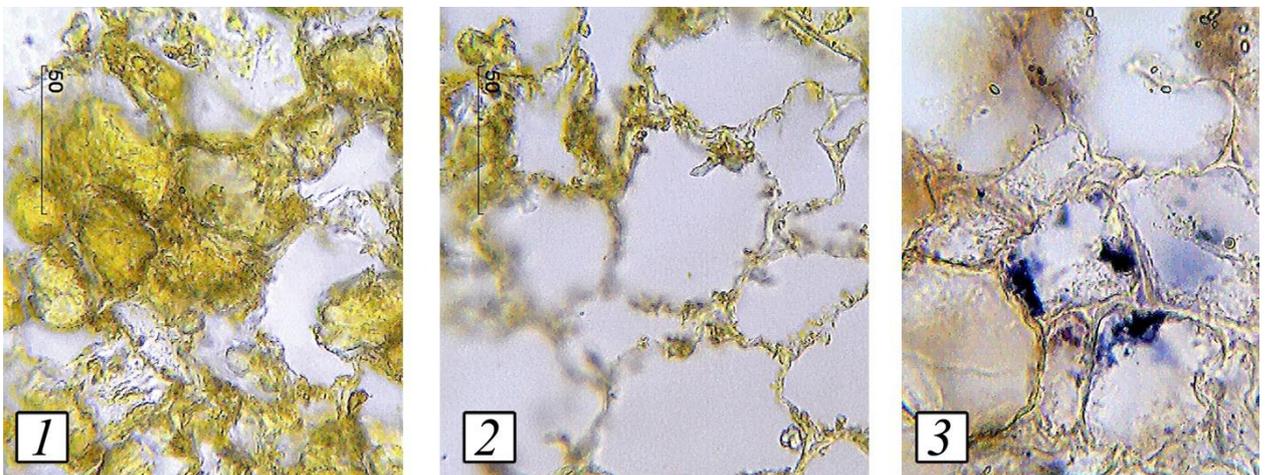


Рисунок 2 – Паренхима корневища на поперечном сечении (x 400): 1 – клетки паренхимы со структурированным содержимым, 2 – Извилистые стенки клеток паренхимы, 3 – крахмальные зерна, окрашенные раствором Люголя.

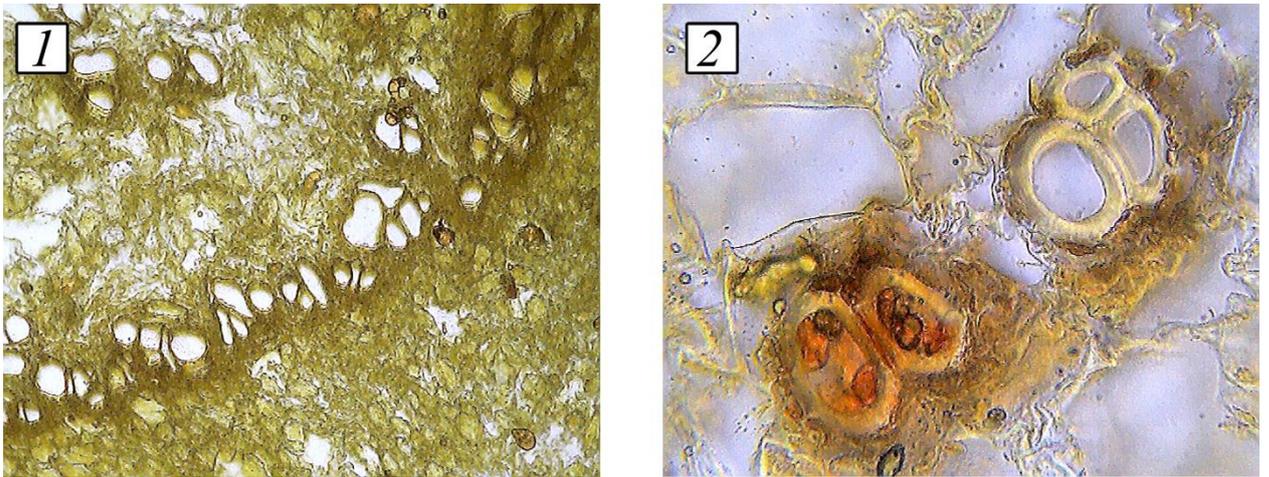


Рисунок 3 – Проводящие пучки корневища на поперечном сечении: 1 – область эндодермы (x 100), 2 – закрытые коллатеральные пучки (x 400).

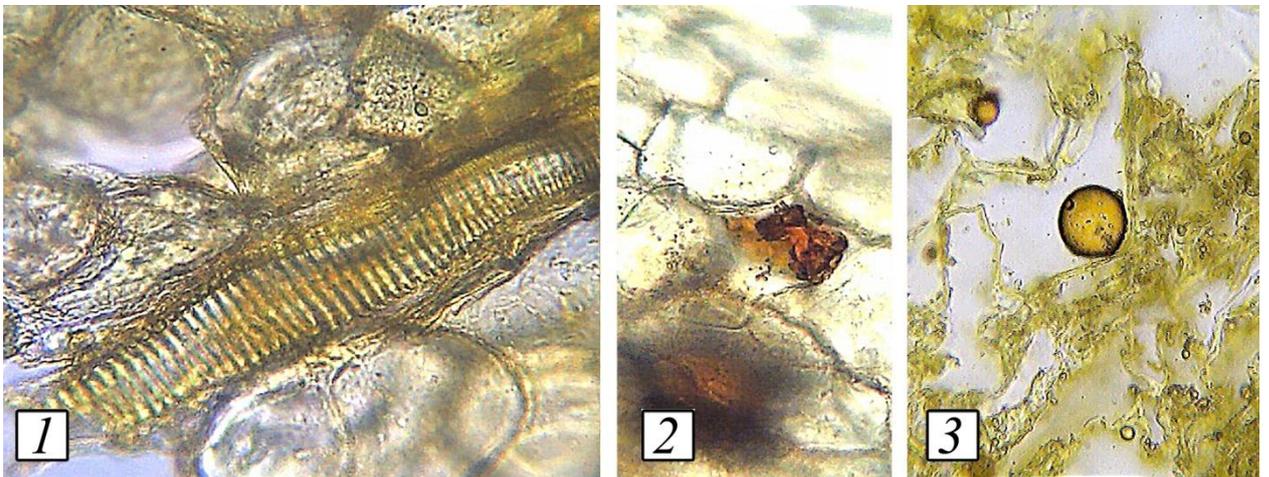


Рисунок 4 – Гистологические элементы корневища на поперечном и продольном сечениях (x 400): 1 – сосуды лестнично-сетчатого типа, 2 – пигментные клетки, 3 – капли эфирного масла в секреторных клетках.

Измельченное сырье. Фрагменты клеток экзодермы, проводящих пучков в виде сосудов лестнично-сетчатого типа. Одиночные клетки паренхимы с сильно извилистыми стенками и их небольшие группы. При обработке раствором Люголя в клетках обнаруживаются мелкие крахмальные зерна. Фрагменты паренхимы с пигментными клетками, содержащими протопласт красно-оранжевого цвета. В измельченном сырье также встречаются капли эфирного масла красно-оранжевого цвета.

Порошок. Фрагменты паренхимы с крахмалом. Клетки паренхимы крупные округлые, обрывки экзодермы многоугольные и вытянутые с треугольными межклетниками, обрывки сосудов (лестничные, спиральные, сетчатые) и многочисленные клетки с желтым содержимым, а также отдельные части пигмента.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Около 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл спирта 95 %, содержащего хлороводородной кислоты 1 %, и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса» (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 10 мкл испытуемого раствора в виде точки диаметром около 5 мм. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 24 ч смесью растворителей: хлороформ - спирт 95 % (19:1), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе сушат до удаления следов растворителей и просматривают в дневном свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 3 зоны адсорбции ярко желтого цвета.

При детектировании УФ-светом с длиной волны 365 нм соответствующие зоны имеют жёлто-зелёную флуоресценцию; при детектировании УФ-светом с длиной волны 254 нм помимо зон адсорбции имеющих желтую окраску, обнаруживается дополнительная зона адсорбции фиолетового цвета, выше всех зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 8 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 6 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 1 %;

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5 %. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих через сито с отверстиями размером 7 мм, не более 5 %. Частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 5 %, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси

Других частей растения. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 3 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). *Цельное сырье* – не более 3 %.

Органических примесей. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 2 %.

Минеральной примеси. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* - не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* содержание суммы куркуминоидов в пересчете на куркумин - не менее 2 %.

Реактив. В мерную колбу на 100 мл помещают по 1,0 г борной кислоты и щавелевой кислоты и доводят до метки спиртом 80 %.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 30 мл спирта 80 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент спиртом 80 %. Затем извлечение фильтруют через бумажный фильтр марки «красная полоса». 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом 80 % до метки и перемешивают (раствор А).

2,0 мл раствора А помещают в выпарительную чашку из ПВХ, добавляют 1 мл реактива. Смесь выпаривают на водяной бане при температуре 50 – 60 °С до суха. Сухой остаток количественно переносят 10 мл спирта 80 % в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем полученного раствора доводят тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор Б).

2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 80 % до метки и перемешивают (раствор В).

Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 545 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор В.

Содержание суммы куркуминоидов в пересчете на куркумин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения окрашенного комплекса куркумина при длине волны 545 нм, равный 2050;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

**«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

21.11.2016	073125	2016145500
<i>Дата поступления</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ оригиналов 21 НОЯ 2016 ФИПС ОТД 17	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
<input type="checkbox"/> (86) <i>(регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные национальным законодательством)</i> <input type="checkbox"/> (87) <i>(номер и дата международной публикации международной заявки)</i>	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ <small>(полный почтовый адрес, или его сокращенный вариант)</small> РФ, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д.89. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Телефон: 333-29-76 Факс: _____ E-mail: info@samsmu.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ <small>(используется при подаче заявки на открытие изобретения)</small>	
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение	В ФГБУ Федеральный институт промышленной собственности Бережковская наб., 30, корп.1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: АНТИОКСИДАНТНОЕ СРЕДСТВО «КУРКУМЫ ЭКСТРАКТ ГУСТОЙ»		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ <small>(Указывается полное имя или наименование (согласно учредительному документу), место расположения или место нахождения, включая почтовый адрес)</small> РФ, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д.89. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Указанное лицо является <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком, исполнитель работ _____ <small>(указать наименование)</small> <input type="checkbox"/> исполнителем работ по <input type="checkbox"/> государственному <input type="checkbox"/> муниципальному контракту, заказчик работ _____ <small>(указать наименование)</small> Контракт от _____ № _____		ОГРН 1026301426348 КОД страны по стандарту ВОИС СТ. 3 <small>(если он установлен)</small>
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ Указывается ниже лицо(а) патентной(патентных) запиской(записками) для ведения дел по получению патента от своего имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам Фамилия, имя, отчество (если оно имеется) Адрес: _____		Является <input type="checkbox"/> Патентным(и) поверенным(и) <input type="checkbox"/> Иным представителем Телефон: _____ Факс: _____ E-mail: _____
Срок представительства <small>(указывается в срок или иными иными представителями без предоставления доверенности)</small>		Регистрационный (и) номер (и) патентного(их) поверенного(их)

ОТД 17

23 НОЯ 2016

24 0 00 16



Бланк заявки ИЗ лист 1

53/1.

Общее количество документов в листах	53	Лицо, зарегистрировавшее документы Сергеева Н.Н.
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		