

УХОД ЗА СОВРЕМЕННЫМИ КОНТАКТНЫМИ ЛИНЗАМИ И ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ТРАВ С ЭТОЙ ЦЕЛЬЮ

Бирюкова Н. М., химик, директор по производству ООО «Чистая река», Республика Беларусь, г. Минск

Введение

Использование контактных линз для большинства пациентов до сих пор связано с дискомфортом. Обычно ношение можно прервать в любое время до выяснения причин, вызывающих раздражение глаз; при этом пациент просто возвращается к ношению очков. Однако вопрос комфорта и ухода за КЛ принципиально важен для тех людей, чья профессиональная деятельность исключает возможность ношения очков, особенно для пользователей контактных линз, изготовленных по индивидуальному заказу. В этих случаях зрительная работа и качество жизни пациента очень сильно зависят от КЛ, которые являются незаменимым средством оптической коррекции.

Чтобы устранить дискомфорт при ношении КЛ и обращении с ними, индустрия контактной коррекции предлагает перейти либо на однодневные мягкие контактные линзы, не требующие ухода, либо на пролонгированное ношение силиконгидрогелевых МКЛ с высокой газопроницаемостью, которые иногда можно не снимать на ночь. Это частично облегчает уход за линзами, поскольку СГКЛ для расширенного режима ношения можно надевать и снимать реже. Но совокупность разных факторов, связанных с использованием специальных (сугубо индивидуальных) КЛ, предполагает не только соответствующий комфорт при ношении в самых разных экстремальных ситуациях, но и высококачественную очистку линз после снятия [1]. Помимо тщательного ухода за контактными линзами (дезинфекции, очистки от белковых отложений, промывки и т. д.) необходимо проводить профилактику осложнений, возникающих при ношении.

Осложнения при контактной коррекции зрения принято разделять на следующие группы:

- механические (повреждение тканей глазного яблока линзами и расположенными под ними инородными телами);
- гипоксические (отек роговицы, васкуляризация роговицы);
- токсико-аллергические (папиллярный конъюнктивит);
- воспалительные и инфекционные (стерильный инфильтрат роговицы, микробные кератиты).

Приведены результаты исследования качественного и количественного состава биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот в образцах лекарственного растительного сырья *Bupleurum L.*, *Aloe Asphodeloideae*, выращенных в коллекционном питомнике Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Методами ВЭЖХ, спектрофотометрии и бумажной хроматографии были идентифицированы агликоны флавонолов и установлено высокое содержание биофлавоноидов и фенолкарбоновых кислот. Данные образцы применялись для создания изделий медицинского назначения для ухода за контактными линзами.

Ключевые слова: *Bupleurum L.*, *Aloe Asphodeloideae*, алоэ вера, володушка золотистая, володушка крупнолистная, биофлавоноиды, кверцетин, кемпферол, фенолкарбоновые кислоты, ВЭЖХ, офтальмология, контактные линзы, уход за контактными линзами.

Birukova N.M. CONTEMPORARY CONTACT LENS CARE AND POSSIBILITY OF USING MEDICINAL HERBS WITH THIS PURPOSE

The results are given of a study of the qualitative and quantitative composition of bioflavonoids and phenolcarboxylic acids in samples of medicinal plant raw material *Bupleurum L.*, *Aloe Asphodeloideae*, grown in the collection nursery of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. Using HPLC, spectrophotometry and paper chromatography, aglucones of flavonols were identified and a high content of bioflavonoids and phenol carboxylic acids was established. These samples were used to create medical products for contact lens care.

Key words: *Bupleurum L.*, *Aloe Asphodeloideae*, *Bupleurum aureum* Fisch., *Bupleurum rotundifolium L.*, bioflavonoids, quercetin, kaempferol, phenolcarboxylic acids, HPLC, ophthalmology, contact lenses, contact lens care.

К клиническим проявлениям осложнений при контактной коррекции относится конъюнктивальная инъекция («красный глаз»). Основные причины возникновения «красного глаза» – гипоксия роговицы, снижение слезопродукции, реакция на раствор для ухода за линзами или химическое вещество, попавшее на линзу, а также на микробные токсины. Гиперемия конъюнктивы («красный глаз») может быть симптомом начала конъюнктивита или кератоконъюнктивита различного происхождения.

Папиллярный конъюнктивит чаще всего возникает при использовании МКЛ пролонгированного ношения (без снятия на ночь) или традиционных кон-

Multiwave



БЕЗОПАСНОСТЬ

➤ И ДЛИТЕЛЬНОЕ УВЛАЖНЕНИЕ ГЛАЗ
С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

➤ ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ГИПОКСИИ
С ФУМАРОВОЙ КИСЛОТОЙ

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РАСТВОРЫ ДЛЯ ВСЕХ ТИПОВ КОНТАКТНЫХ ЛИНЗ

тактных линз с длительным сроком замены (6–8 месяцев). Причинами развития могут быть механическое рефлекторное раздражение конъюнктивы в краем линзы или отложения на линзе микронных размеров, а также аллергическая реакция на компоненты раствора для линз. Однако в большинстве случаев это аутоиммунная реакция на отложения денатурированного белка слезы на поверхности контактной линзы.

Распространенное осложнение контактной коррекции – отек роговицы. Он возникает вследствие нарушения метаболизма из-за недостаточного снабжения роговицы кислородом при ношении контактных линз. Клиническими признаками отека роговицы являются структурные изменения ее слоев, выявляемые при биомикроскопическом исследовании. Компенсаторным механизмом при хроническом отеке роговицы является ее васкуляризация (состояние, при котором в ткань роговицы прорастают новообразованные сосуды). Это осложнение долго протекает без субъективных симптомов. При длительном течении васкуляризация роговицы может приводить к нарушению прозрачности роговицы и снижению зрения. Как следствие васкуляризации роговицы возникает неоваскулярная вторичная глаукома (наблюдается при росте новообразованных сосудов в углу передней камеры, что блокирует отток внутриглазной жидкости). Нарушается баланс притока и оттока жидкости в полости глазного яблока, происходит ее накопление, а переизбыток приводит к повышению внутриглазного давления. Зрительный нерв в такой ситуации испытывает повышенную нагрузку от избыточно высокого внутриглазного давления и перестает адекватно передавать сигнал о принимаемом изображении мозгу. Механические воздействия на слезную пленку, гипоксический стресс, воздействия на нервные окончания и другие факторы приводят к синдрому сухого глаза.

Из выше изложенного материала однозначно следует, что особую роль в системе ухода за контактными линзами играет: нивелирование радикальных процессов, идущих под действием УФ-лучей; снижение гипоксии роговицы глаза; удаление отложений денатурированного белка слезы на поверхности контактной линзы; увеличение слезопродукции; нивелирование реакции на раствор по уходу за линзами или химическое вещество, находящееся в нем; удаление микробных токсинов; снижение отека роговицы; налаживание баланса притока и оттока жидкости в полости глазного яблока.

Известно, что многофункциональные растворы для ухода за контактными линзами являются самыми популярными. В их состав должны входить определенные группы веществ: консерванты (обеспечивают бактериостатическое действие)

и/или дезинфицирующий агент (обеспечивает бактерицидное действие), буферные вещества, хелатообразующие вещества, изотонические вещества, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и другие. Среди дезинфицирующих веществ и консервантов широкое применение нашли некоторые высокомолекулярные соли полигексаметиленгуанидина, зарегистрированные компанией Alcon (США) под торговой маркой Поликвад®, и бигуаниды (хлоргексидин, полигексаметилен бигуанид, полиаминопропил бигуанид и др.). Усилению антимикробной активности используемых высокомолекулярных солей полигексаметиленгуанидина и бигуанидов способствуют хелатообразующие агенты (этилендиаминтетрауксусная кислота и ее натриевая соль, соли лимонной, фосфоновой кислот и др.) – за счет связывания в прочный комплекс ионов кальция, входящих в состав стенок микробных клеток, а также разрушения кальциевых мостиков как между денатурированными белками и поверхностью линзы, так и между самими денатурированными белками. Использование в качестве консервантов бигуанидов, солей четвертичного аммония в большинстве случаев вызывают токсико-аллергические реакции [2].

Огромную роль в нивелировании отрицательных факторов, связанных с ношением контактных линз, вносят вещества, проявляющие антиоксидантные, антигипоксические, влагоудерживающие, бактериостатические, противовоспалительные, иммунотропные свойства. К таким компонентам комплексного действия относятся природные полисахариды (например, гидролизированный декстран, TS-полисахарид, гидроксипропилгуар, трегаллоза, гиалуроновая кислота), феруловая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота и ее натриевая соль, эфиры целлюлозы (например, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза), карбомеры (например, полиакриловая кислота, высокомолекулярный полиакрилат, поперечно-сшитый аллилпентаэритритом), флавоноиды, сапонины, витамины А, Е, В12, В6 и другие вещества. Источником этих активных веществ могут служить лекарственные растения. При этом лекарственные растения и выделенные из них компоненты характеризуются рядом преимуществ перед другими лекарственными средствами. К таким преимуществам относятся: мягкое терапевтическое действие; низкая токсичность; способность влиять на различные звенья патологического процесса; возможность использования пациентами различных возрастных групп.

Фундаментальные и прикладные исследования природных полифенолов послужили основой для создания целой области фармацевтической индустрии, выпускающей сотни наименований лекарственных препаратов, пищевых и биологически активных

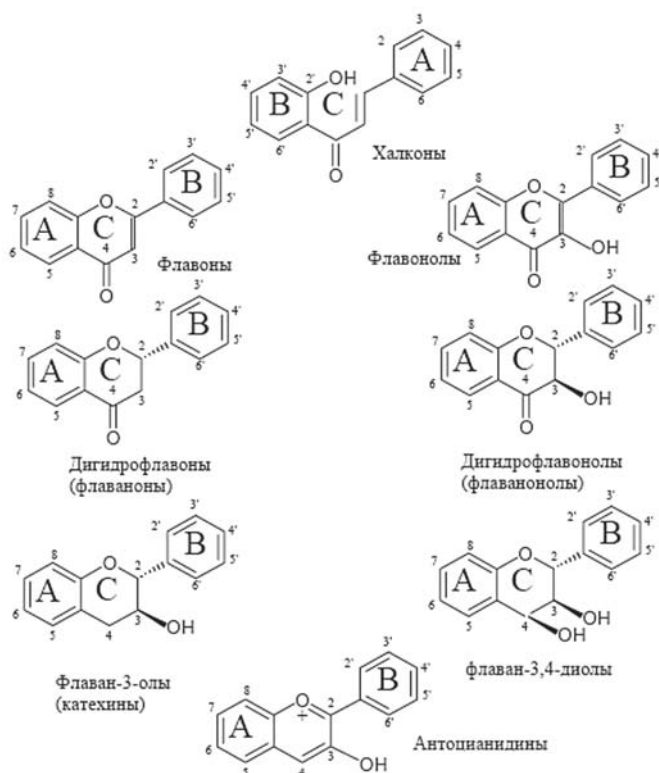


Рис. 1. Основные классы флавоноидов.

добавок (БАД), основным компонентом которых являются флавоноиды. Именно в сфере лечебного использования флавоноидов традиционная медицина особенно близко сомкнулась с имеющими тысячелетнюю историю восточными системами лечения, основанными на использовании лекарственных растений. Флавоноидсодержащие растения привлекают внимание исследователей вследствие их перспективности в получении лекарственных препаратов широкого спектра действия. В основе антиоксидантного действия флавоноидов лежит их способность подавлять образование свободных радикалов, являющихся причиной возникновения у человека многих тяжелых патологий, и выводить их из организма. Гидроксильные группы флавоноидов содержат подвижные атомы водорода, легко реагирующие с перекисными радикалами и обрывающие цепи окисления [3].

Флавоноиды являются наиболее распространенными фенольными соединениями растительного происхождения [4]. К флавоноидам (от латинского *flavus* – желтый) относятся природные полифенолы, синтезируемые через ацетатно-малонатный и шикиматный пути высшими растениями, включая мхи и папоротники, а также некоторыми микроорганизмами. В основе молекулы флавоноидов и их конденсированных производных – процианидинов – лежит так называемый C6C3C6-скелет. В отдельном растении могут образовываться и содержаться различные флавоноиды, и их качествен-

ный состав может быть использован как классификационный признак при описании родов и семейств. Кроме влияния на зрительный аппарат флавоноиды могут осуществлять химическую передачу информации, привлекая (аттрактанты) или отталкивая (репелленты) другие организмы, воздействуя на их органы вкуса и обоняния.

В зеленых растениях флавоноиды участвуют в некоторых реакциях световой фазы фотосинтеза, катализируя транспорт электронов и управляя ионными каналами, связанными с процессами фотофосфорилирования [5]. Кроме того, будучи эффективными светофильтрами, поглощающими как УФ, так и видимое излучение, флавоноиды защищают хлоропласты от прямой солнечной радиации и фотодинамического повреждения. При их дефиците в результате нарушения процессов вторичного метаболизма (что имеет место, например, у мутантов растения *Arabidopsis*) наблюдается сильное окислительное повреждение клеток. Наконец, многие флавоноиды, в частности флаван-3-олы и флаван-3,4-диолы, являются ключевыми субстратами для биосинтетических процессов, ведущих к образованию фенольных полимеров – дубильных веществ.

Благодаря высокому содержанию в съедобных растениях флавоноиды в достаточно большом количестве содержатся в пище и различных напитках (соки, вина, чай), являясь необходимым неэнергетическим диетическим компонентом. Среднестатистическое поступление флавоноидов в организм человека составляет около 600 мг/день. Фармакологические эффекты флавоноидов были обнаружены в 1936 году Сент-Дьердьи, который открыл витамины группы Р и установил их полифенольную структуру. В настоящее время установлено, что флавоноиды обладают выраженными антиаллергическими, антиканцерогенными, противовоспалительными и антивирусными свойствами. Не вызывает сомнений, что разнообразная биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием в их молекулах реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Кроме того, эти соединения способны превращаться в биологических системах в различные хиноны, которые могут взаимодействовать со специфическими функциональными группами белков-ферментов, изменяя их третичную структуру и каталитические свойства. Особенно активны в этом отношении агликоны флавоноидов. Однако большинство флавоноидов содержится в растениях и поступает в организм человека в виде гликозидов, то есть молекул флавоноидов (агликонов), гликозилированных по гидроксильным группам различными моно- и олигосахаридами. Молекулы флавоноидов могут также метилироваться и ацетилю-

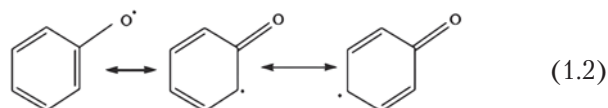
ваться. Именно благодаря различиям в расположении и типах заместителей и существует огромное разнообразие молекулярных структур среди природных флавоноидов [6].

Основные классы флавоноидов представлены на рис. 1.

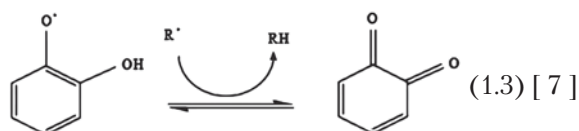
Флавоноиды благодаря своей полифенольной природе имеют выраженные электронно-донорные свойства. Термодинамическая способность полифенолов восстанавливать различные сильно окисленные продукты и в первую очередь свободные радикалы обусловлена их низким восстановительным потенциалом (Е7). У большинства флавоноидов Е7 лежит в диапазоне 0,25–0,75 в, тогда как значения восстановительного потенциала анион-радикала кислорода, алкоксильного, пероксильного и гидроксильного радикала значительно выше – 0,9–2,13 в. Благодаря такой высокой разнице в значениях восстановительного потенциала флавоноиды легко вовлекаются в одноэлектронные реакции с различными радикалами в соответствии с уравнением 1.1:



Характерной особенностью образующегося в результате реакции (1.1) ароксильного радикала Fl-O[•] является способность к делокализации, т. е. передвижению неспаренного электрона в ароматическое кольцо с образованием ряда резонансных структур:



Семихиноновый радикал Fl-O[•] может также реагировать с другим свободным радикалом с образованием стабильных хинонов.



Среди природных полифенольных соединений широко распространены фенолкарбоновые кислоты и их сложные эфиры [8].

Группа C₆-C₁-соединений представлена прежде

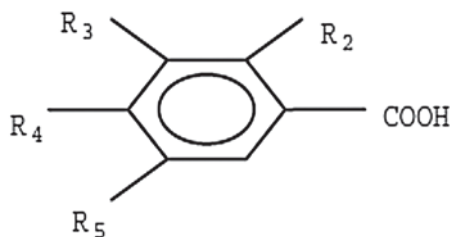


Рис. 2. Оксibenзойные кислоты: п-оксibenзойная (R₄ = OH), прокатехиновая (R₃ = R₄ = OH), ванилиновая (R₃ = OCH₃; R₄ = OH), галловая (R₃ = R₄ = R₅ = OH), сиреневая (R₃ = R₅ = OCH₃; R₄ = OH), салициловая (R₂ = OH); гентизиновая (R₂ = R₅ = OH).

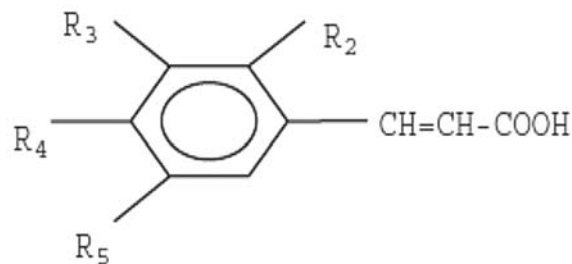


Рис. 3. Оксикоричные кислоты: п-оксикоричная (R₄ = H), кофейная (R₃ = R₄ = OH), феруловая (R₃ = OCH₃; R₄ = OH), синаповая (R₃ = KR₅ = OCH₃, R₄ = OH).

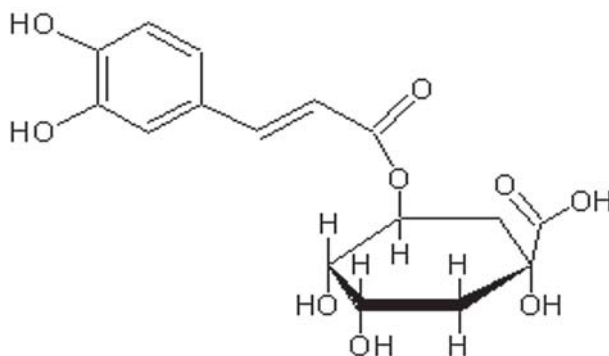


Рис. 4. Хлорогеновая кислота.

всего оксibenзойными кислотами: п-оксibenзойной, салициловой, β-резорциловой, протокатехиновой, гентизиновой, ванилиновой, галловой и сиреневой (рис. 2).

Оксibenзойные кислоты (за исключением салициловой и β-резорциловой) широко распространены в растениях. Они обычно содержатся в растительных тканях в связанной форме и высвобождаются лишь после гидролиза.

К фенолкарбоновым кислотам относятся соединения C₆-C₃ – ряда относится большая группа чрезвычайно широко распространенных кислот – оксикоричные кислоты (рис. 3).

В растительных тканях обычно преобладает транс-форма. Однако при облучении УФ – светом равновесия заметно сдвигается в сторону образования цис-формы.

Другая характерная особенность оксикоричных кислот – образование сложных эфиров с ациклическими кислотами – хинной и шикимовой. Наиболее широко известным и распространенным соединением является хлорогеновая кислота (кофеил-3-хинная) (рис. 4).

Хлорогеновая кислота в больших количествах содержится в семенах подсолнечника и необжаренных зернах кофе, используемых в качестве источника ее препаративного выделения.

Интерес к хлорогеновой кислоте не случаен. Так, методом радиоактивных индикаторов было показано, что замещенные коричные кислоты, которые



Рис. 5. Этапы получения и анализа флавоноидов.

встречаются в растениях преимущественно в виде сложных эфиров, являются промежуточными веществами синтеза лигнина из аминокислот (фенилаланина и тирозина) [9]. Известны работы, в которых хлорогеновая кислота рассматривается как регулятор ростовых процессов, как защитный фактор по отношению к некоторым микроорганизмам. Ее содержание коррелирует с антиоксидантной активностью кофе, плодов растений.

Введение в состав средств ухода за контактными линзами (многофункциональных растворов и капель) флавоноидов вносит неоспоримый вклад в борьбу с радикальными процессами, протекающими под действием УФ. Их гипоаллергенные, антиканцерогенные, противовоспалительные и антивирусные свойства приобретают новое звучание [10]. Для введения в состав средств по уходу за контактными линзами природных флавоноидов необходимо изучить и оценить качество растительного сырья.

В настоящее время значительное место в комплексной оценке подлинности и качества лекарственного растительного сырья занимает фитохимический анализ. Согласно современным требованиям нормативной документации на лекарственное растительное сырье, фитохимический анализ включает задачи качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья на содержание ведущих групп биологически активных соединений, обеспечивающих фармакологическую активность. Выбор объектов исследования, часто определяющий результативность работы, должен обосновываться потенциальными или доказанными возможностями их практического использования.

Получение и анализ флавоноидов, относящихся ко всем указанным выше группам, включает несколько основных этапов, показанных на рис. 5.

Приготовление растительного материала. Среди флавоноидов есть достаточно нестойкие соединения, кроме того, в сыром растительном материале флавоноиды могут быстро разрушаться под действием различных ферментов. Поэтому максимальную сохранность обеспечивает сушка предварительно размолотых замороженных образцов. Если растительный материал подготавливается для количественного анализа флавоноидов, то желательна его мгновенная заморозка в жидком азоте. Полученный таким образом сухой порошок следует хранить до использования в холодильнике в герметичной упаковке. Если растительный материал не предполагается использовать для анализа или получения

антоцианов или танинов, допускается его сушка при 100 °С. Сушка на воздухе – самый нежелательный вариант, поскольку в этом случае высока вероятность ферментативной деградации флавоноидов, например, превращения гликозидов в агликоны.

Выбор объектов исследования, часто определяющий результативность работы, должен обосновываться потенциальными или доказанными возможностями их практического использования. Виды володушек (*Bupleurum L.*) и алоэ вера (*Aloe Asphodeloideae*) используются в народной и официальной медицине в качестве антиоксидантных, капилляроукрепляющих и антигялуронидазных, регенерирующих, желчегонных, вяжущих и стимулирующих средств. Основными действующими веществами володушек и алоэ вера считаются фенольные соединения, что и послужило причиной их подробного изучения.

С целью определения ресурсного потенциала лекарственного растения володушек и алоэ вера в качестве источника биологически активных соединений нами был исследован качественный и количественный анализ флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в сухой надземной массе володушек и алоэ вера, выращенных в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов «ГНУ Центральный Ботанический Сад НАН Беларуси». Далее на основе полученных результатов получались образцы изделий медицинского назначения для ухода за контактными линзами и проводились их клинические испытания на базе 3-й городской клинической больницы г. Минска (отделение офтальмологии) и 10-й городской клинической больницы г. Минска (отделение микрохирургии глаза).

Методика эксперимента

Количественное определение содержания суммы антоциановых пигментов (антоцианов и лейкоантоцианов)

Суммарное содержание антоцианов и лейкоантоцианов определяли по методу [11] путем фотометрирования окрашенных вытяжек.

Навеску исследуемого материала в количестве 1 г заливали 20 мл 70 % неподкисленного этилового спирта и проводили экстрагирование на кипящей водяной бане до полного извлечения флавоноидов (4 слива через 30 мин). Экстракцию повторяли до тех пор, пока остаток не переставал давать окрашивание при обработке раствором 1% HCl. Раствор доводили до объема 100 мл и фильтровали через фильтр Шотта с диаметром пор 16 мкм.

К 10 мл экстракта добавляли 3 мл 20% водного раствора HCl. Затем проводили гидролиз на водяной бане в течение 15 минут, после чего раствор охлаждали и фильтровали. Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре КФК-2 при длине волны 540 нм в кювете L = 1 см. Контролем служила первоначальная спиртовая вытяжка, не подвергавшаяся гидролизу. Суммарное содержание антоциановых пигментов вычисляли по калибровочному графику, составленному по препарату чистого цианидина [12].

Установив концентрацию суммы антоциановых пигментов в вытяжке, определяли их содержание в исследуемом материале с учетом объема вытяжки и веса пробы:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 1000},$$

где: A – содержание суммы антоциановых пигментов в растительном материале в % на массу воздушно-сухого сырья; C – концентрация антоциановых пигментов, найденная по калибровочному графику; мг/мл; V – объем вытяжки, мл; m – навеска растительного материала, г.

Количественное определение содержания катехинов

Суммарное содержание катехинов определяли по методу [13] с использованием ванилинового реактива.

К 10 мл спиртовой вытяжки, полученной при экстракции суммы антоциановых пигментов, добавляли 3 мл 20% водного раствора соляной кислоты. Гидролиз проводили на кипящей водяной бане в течение 15 минут, после чего раствор охлаждали и фильтровали.

К 1 мл гидролизата добавляли 3 мл ванилинового реактива (1 % раствор ванилина в концентрированной HCl). Перемешивали и оставляли на 3 минут. Измерение оптической плотности растворов прово-

дили на спектрофотометре КФК-2 при длине волны 500 нм в кювете L = 1 см. Для контроля к 1 мл гидролизата добавляли 3 мл конц. HCl.

Суммарное содержание катехинов вычисляли по калибровочному графику, составленному по суммарному препарату катехинов чая (чайный танин).

Установив концентрацию катехинов в вытяжке, определяли их содержание в исследуемом материале с учетом объема вытяжки и веса пробы:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 1000},$$

где: A – содержание катехинов в растительном материале в % на массу воздушно-сухого сырья; C – концентрация катехинов, найденная по калибровочному графику, мг/мл; V – объем вытяжки, мл; m – навеска растительного материала, г.

Количественное определение содержания флавонолов

Количественное определение содержания флавонолов проводили по методу [14], модифицированному [15].

50 мл экстракта, полученного как при определении антоцианов, выпаривали под вакуумом на ротационном испарителе до сухого остатка. Остаток растворяли в 5 мл 70% этанола и фильтровали. Гидролиз проводили в течение 1 часа. 0,02–0,1 мл гидролизата наносили на хроматографическую бумагу «Filtrak» FN-15, подсушивали в токе теплого воздуха термовентилятора, после чего переносили в сосуд для хроматографии. Хроматография одномерная, нисходящая; растворитель – 15 % раствор уксусной кислоты; продолжительность разделения – 4–6 часов. Хроматограммы высушивали при комнатной температуре, проявляли спиртовым раствором 5% AlCl₃ и просматривали в УФ-свете. Пятна очерчивали карандашом и вырезали. Мелко измельченные участки хроматограмм заливали горячим 70% раствором этанола (температура 72–74 °C) и экстрагировали в течение 3 часов. Оптическую плотность элюатов измеряли на спектрофотометре VSU=2P при длине волны 258 нм в кювете L = 1 см.

Расчет количественного содержания суммы флавонолов производили по калибровочному графику, составленному по кверцетину.

Установив концентрацию флавонолов в вытяжке, определяли их содержание в исследуемом материале:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 1000},$$

где: A – содержание флавонолов в растительном материале в % на массу воздушно-сухого сырья; C – концентрация флавонолов, найденная по калибровочному графику; мг/мл; V1 – объем экстракта, взятый для анализа навески образца, мл; V2 – объем

элюата вещества, мл; V_1 – объем нанесенного на хроматограмму экстракта, мл; m – навеска растительного материала, г.

Определение содержания фенолкарбоновых кислот.

Для количественного определения суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту использовали метод [16] в модификации, разработанной в лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ЦБС НАН Беларуси.

25 мл экстракта, полученного как при определении антоцианов, переносили в фарфоровую чашку и выпаривали досуха на водяной бане. Остаток в чашке растворяли в 5 мл 70% спирта и отфильтровывали. 0,05 мл полученного фильтрата наносили на хроматографическую бумагу Filtrak FN-15, подсушивали в токе теплого воздуха термовентилятора, после чего переносили в сосуд для хроматографии. Хроматография одномерная, нисходящая; растворитель – 15% раствор уксусной кислоты; продолжительность разделения 4–6 часов. Хроматограммы высушивали, проявляли в парах аммиака и просматривают в УФ-свете. Пятна хлорогеновых кислот очерчивали и вырезали. Мелко измельченные участки хроматограмм заливали 70% этанолом и экстрагировали в течение 3 часов на аппарате для встряхивания. Оптическую плотность элюатов измеряли на спектрофотометре VSU = 2P при длине волны $\lambda = 325$ нм.

Расчет количественного содержания суммы фенолкарбоновых кислот производили по калибровочному графику, составленному по реактиву химически чистой хлорогеновой кислоты.

Установив концентрацию фенолкарбоновых кислот в вытяжке, определяли их содержание в исследуемом материале:

$$A = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot 1000},$$

где: A – содержание фенолкарбоновых кислот в растительном материале в % на массу воздушно-сухого сырья; C – концентрация фенолкарбоновых кислот, найденная по калибровочному графику; мг/мл; V_1 – объем экстракта, взятый для анализа навески образца, мл; V_2 – объем элюата вещества, мл; V_3 – объем нанесенного на хроматограмму экстракта, мл; m – навеска растительного материала, г.

ВЭЖХ-анализ агликонов флавонолов

ВЭЖХ-анализ проводили по следующей методике [17]:

Условия экстрагирования: 0,1 г измельченного материала заливали 10 мл 70% этилового спирта и проводили экстрагирование на кипящей водяной бане до полного извлечения флавоноидов (4 слива через 30 минут). Для получения агликонов водно-

спиртовой экстракт гидролизovali 2N раствором соляной кислоты 2 часа на водяной бане. После охлаждения гидролизат пропускали через фильтр Шотта с диаметром пор 16 мкм.

Условия хроматографирования: для выполнения анализа использовали хроматограф Agilent 1200, оборудованный детектором на основе диодной матрицы. Разделение смеси проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 (150×4,6 мм, размер зерна 5 мкм), оснащенной предколонкой Zorbax SB-C18 (4,6×12,5 мм, размер зерна 5 мкм), применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1%) изменялось от 50 до 52% за 18 минут. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки 26 °С. Объем вводимой пробы 20 мкл. Детектирование осуществляли при $\lambda = 370$ нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос. ч.), ортофосфорную кислоту (ос. ч.), бидистиллированную деионизованную воду. Для приготовления стандартных образцов применяли препараты кверцетина и кемпферола производства фирмы Sigma.

Количественное определение индивидуальных компонентов проводили по методу внешнего стандарта.

Анализ хлорогеновой кислоты

При анализе хлорогеновой кислоты применялись условия экстрагирования, аналогичные как для анализа агликонов флавонолов.

Условия хроматографирования: для выполнения анализа использовали хроматограф Agilent 1200, оборудованный детектором на основе диодной матрицы. Разделение смеси проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 (150×4,6 мм, размер зерна 5 мкм), оснащенной предколонкой Zorbax SB-C18 (4,6×12,5 мм, размер зерна 5 мкм). Для приготовления подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила (ос. ч.) и раствора 0,4% фосфорной кислоты (ос. ч.) в соотношении 13:87 (о/о). Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки 26 °С. Объем вводимой пробы 20 мкл. Детектирование осуществляли при $\lambda = 327$ нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос. ч.), ортофосфорную кислоту (ос. ч.), бидистиллированную деионизованную воду. Для приготовления стандартного образца применяли препарат хлорогеновой кислоты производства фирмы Sigma. Количественное определение хлорогеновой кислоты проводили по методу внешнего стандарта.

Применяемые методики клинических испытаний изделий медицинского назначения для ухода за контактными линзами:

- анамнез, опрос на наличие жалоб;
- определение остроты зрения;

- в) определение чувствительности роговицы;
- г) биомикроскопия глаза;
- д) исследование прозрачности оптических сред;
- е) исследование глазного дна;
- ж) опрос о времени возможного ношения КЛ с использованием указанной системы и без нее.

В клинических испытаниях принимали участие пациенты в количестве 60 человек (на каждой клинической базе по 30 человек) в возрасте от 18 до 65 лет, корректирующие зрение с помощью контактных линз.

Обсуждение результатов

Исследование флавоноидов в биомассе володушки

В качестве объектов исследования были использованы образцы сухой надземной массы володушки: образец № 1 – володушка золотистая (*Bupleurum aureum* L.), полученная из Монголии; образец № 2 – володушка золотистая, полученная из Алтайского края; а также два образца – володушка золотистая (образец № 3) и володушка круглолистная (*Bupleurum rotundifolium* L., образец № 4), выращенные в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов «ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси». В результате сравнительной оценки биохимического состава образцов были получены количественные характеристики флавоноидного состава сухой надземной массы володушки, полученной из различных флористических областей (таблица 1).

Изучение особенностей накопления биофлавоноидов позволило установить, что сумма антоциановых пигментов в образце № 1 в 2–3 раза превосходила их содержание в образцах № 2 и № 3. В образце № 4 сумма антоциановых пигментов не была определена вовсе. В то же время катехины накапливались почти на равном уровне в образцах № 2 и № 3. Содержание катехинов в образцах № 4 и № 3 колебалось от 0,31 до 0,41% соответственно. Содержание флавонолов в образцах № 2 и № 3 было наибольшим, и это отразилось на суммарном содержании биофлавоноидов. Так, сумма биофлавоноидов в образце № 2 составляла 4,36 %, а в образце № 3 – 4,15 %, против 3,98 % в образце № 1 и 2,03 в образце № 4. Различие в содержании фенолкарбоновых кислот было незначительным: от 0,68 % в образце № 3 до 0,99% в образце № 1.

По данным научной литературы общее содержание биофлавоноидов в сухой зеленой массе володушки должно быть не менее 1,0% [18]. Следовательно, все образцы удовлетворяют нормам содержания биофлавоноидов. Причем володушка золотистая, выращенная в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов Центрального ботанического сада НАН Беларуси, по содержанию флавоноидов и фенолкарбоновых кислот не уступает сырью, собранному в местах ее естественного произрастания.

Методом ВЭЖХ был установлен состав агликонов флавоноидов после гидролиза водно-спиртовых экстрактов из сухой надземной массы володушки, по-

Таблица 1. Флавоноидный состав сухой надземной массы володушки, полученной из различных флористических областей

Показатели	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4
Сумма антоциановых пигментов, %	1,34 ± 0,10	0,58 ± 0,02	0,59 ± 0,01	0,0
Катехины, %	0,57 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,31 ± 0,02
Флавонолы, %	2,06 ± 0,01	3,27 ± 0,01	3,15 ± 0,03	1,73 ± 0,01
Сумма биофлавоноидов, %	3,98 ± 0,12	4,36 ± 0,05	4,15 ± 0,05	2,03 ± 0,02
Фенолкарбоновые кислоты, %	0,99 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,68 ± 0,04	0,77 ± 0,02

Таблица 2. Содержание агликонов флавонолов и хлорогеновой кислоты в гидролизате этанольного экстракта сухой надземной массы володушки из различных флористических областей

Образец №	Содержание агликонов флавонолов		Содержание хлорогеновой кислоты, %
	Кверцетин, %	Кемпферол, %	
1	0,73 ± 0,01	0,036 ± 0,002	0,38 ± 0,02
2	0,95 ± 0,02	0,015 ± 0,001	0,34 ± 0,01
3	1,16 ± 0,01	0,087 ± 0,002	0,28 ± 0,01
4	0,45 ± 0,02	0,033 ± 0,001	0,33 ± 0,01

лученной из различных флористических областей. Хроматограммы всех образцов характеризовались одним и тем же флавоноидным составом, что свидетельствует в пользу того, что образцы относятся к одному виду *Vipreum* L. Сопоставление времен удерживания сигналов веществ на хроматограммах анализируемых образцов со временем удерживания сигналов стандартных образцов флавоноидов и анализ УФ-спектров позволили достоверно идентифицировать кверцетин, кверцетрин, кемпферол и изорамнетин. Для увеличения селективности ВЭЖХ-разделения хлорогеновой кислоты использовалась модифицированная методика анализа. По площадям пиков было рассчитано количественное содержание кверцетина, кемпферола и хлорогеновой кислоты для всех исследованных образцов (табл. 2.).

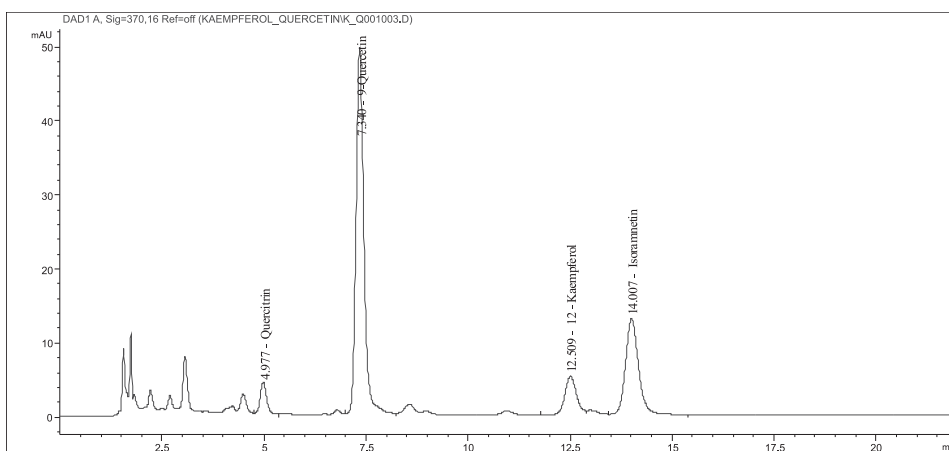


Рис. 6. Хроматограмма гидролизата этанольного экстракта сухой надземной массы володушки. На хроматограмме обозначены: агликоны флавонолов: кверцетрин ($R_t = 4,977$ мин), кверцетин ($R_t = 7,34$ мин), кемпферол ($R_t = 12,509$ мин), изорамнетин ($R_t = 14,007$ мин).

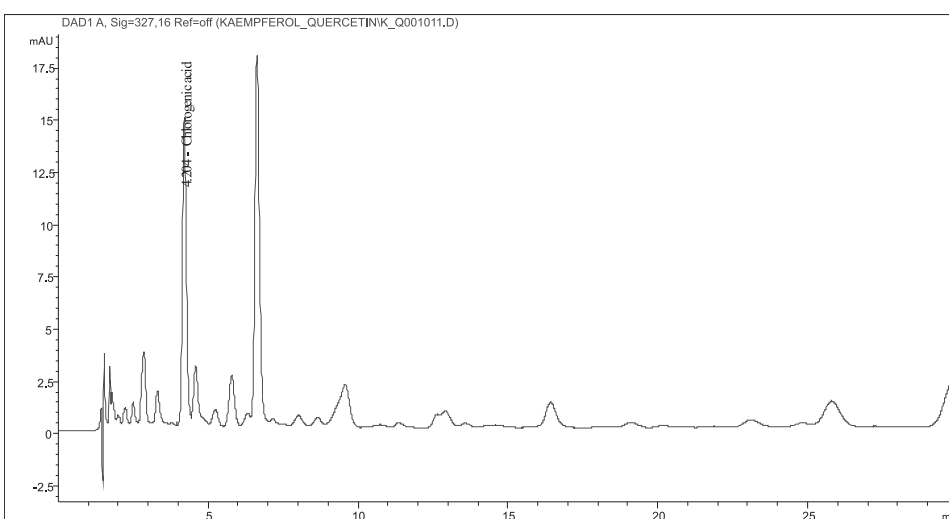


Рис. 7. Хроматограмма гидролизата этанольного экстракта сухой надземной массы володушки, полученной из различных флористических областей. На хроматограмме обозначена хлорогеновая кислота ($R_t = 4,204$ мин).

На рисунке 6 представлена типичная хроматограмма гидролизата этанольного экстракта сухой надземной массы володушки из различных флористических областей, полученная методом ВЭЖХ. Было достоверно идентифицировано четыре агликона флавонолов: кверцетрин ($R_t = 4,977$ мин), кверцетин ($R_t = 7,34$ мин), кемпферол ($R_t = 12,509$ мин), изорамнетин ($R_t = 14,007$ мин). По величине пиков можно судить о том, что кверцетин во всех образцах значительно превалировал.

На рисунке 7 представлена хроматограмма гидролизата этанольного экстракта сухой надземной массы володушки для определения хлорогеновой кислоты, полученная методом ВЭЖХ. Сопоставление времени удерживания сигналов веществ на хроматограмме со временем удерживания стандартного об-

разца позволило идентифицировать хлорогеновую кислоту ($R_t = 4,204$ мин).

Исследование флавоноидов в биомассе алоэ вера, выращенных в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов «ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси», позволило получить количественные характеристики флавоноидного состава надземной массы алоэ вера (табл. 3).

Материалы исследований химического состава лекарственных растений володушек и алоэ вера в качестве источника биологически активных соединений послужили основанием для разработки образцов универсальных офтальмологических растворов и капель по уходу за контактными линзами на предприятии ООО «Чистая река» (г. Минск, Республика Беларусь) и были подвергнуты клиническим испытаниям, согласно разработанной и утвержденной в установленном порядке программе клинических испытаний.

Таблица 3. Флавоноидный состав сухой надземной массы алоэ вера

Показатели	Образец № 1
Сумма антоциановых пигментов, %	0,34 ± 0,10
Катехины, %	0,39 ± 0,02
Флавонолы, %	2,06 ± 0,01
Сумма биофлавоноидов, %	4,68 ± 0,12
Фенолкарбоновые кислоты, %	0,69 ± 0,01

Выводы

1. Сумма биофлавоноидов володушки золотистой, выращенной в Беларуси, составляет $4,15 \cdot 0,05\%$ и не уступает сырью, собранному в местах ее естественного произрастания. Для образца володушки круглолистной суммарное содержание биофлавоноидов составило $2,03 \cdot 0,02$, что, тем не менее, превышает минимально допустимое содержание флавоноидов для вида *Bupleurum L.*
2. Сумма биофлавоноидов алоэ вера, выращенного в питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов Центрального ботанического сада НАН Беларуси, составила $4,68 \cdot 0,12$, что достаточно для использования этого растения как источника биофлавонолов.
3. Методом ВЭЖХ был установлен состав агликонов флавонолов для исследованных образцов. Хроматограммы всех образцов характеризовались одним и тем же флавоноидным составом, что свидетельствует в пользу того, что данные образцы относятся к одному виду *Bupleurum L.*
4. Были достоверно идентифицированы кверцетрин, кверцетин, кемпферол, изорамнетин и хлорогеновая кислота.
5. Оба образца володушки, выращенные в коллекционном питомнике лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов Центрального ботанического сада НАН Беларуси, по содержанию флавоноидов и фенолкарбоновых кислот сопоставимы с сырьем, собранным в местах ее естественного произрастания, что дает основание рекомендовать данные образцы для дальнейших исследований в качестве перспективного источника биофлавоноидов и сырья для разработки лекарственных средств направленного действия.
6. Проведенные клинические испытания изделий медицинского назначения, содержащих биоактивные компоненты, которые выделены из растительного сырья, показали значительное увеличение (до 16 часов) продолжительности ношения контактных линз, хорошую переносимость и эффективность средств ухода за контактными линзами,

отсутствие отека роговицы, отличную остроту зрения, отсутствие сухости глаза, прекрасные адаптационные характеристики, сохранение прозрачности оптических сред в течение всего срока клинических испытаний, отсутствие изменений при биомикроскопическом исследовании слоев роговицы.

Список литературы

1. Бирюкова Н.М., В.Г.Соколов. Средства серии «Мультирол» для ухода за лечебными мягкими контактными линзами // Глаз. – М. – 2009. – № 3. – С. 7–10.
2. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И., Блинова М.И., Чураков Т.К. Оценка влияния бензалкония хлорида на цитотоксичность глазных капель Неттацин и Тобрек в условиях in vitro // Современные технологии в офтальмологии. – 2016. – № 3. – С. 163–166.
3. Семенов А.А. Очерк химии природных соединений. – Новосибирск, 2000.
4. ВФС 42-580-76. Сырье володушки многожильчатой. Трава растительного происхождения. Временная фармакопейная статья. № госрегистрации 79/1041/1 // Государственный реестр лекарственных средств. – Том I. – С. 21.
5. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. – М., 2004.
6. Карабанов И.А. Флавоноиды в мире растений. – Минск, 1981.
7. Шадыро О.И. Гомологические ряды изменчивости в биологии и химии. – Минск, 1987.
8. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М., 1974.
9. Дейнека В.И., Хлебников В.А., Сорокопудов В.Н., Анисимович И.П. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства Berberidaceae // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С. 57–61.
10. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В 2 тт. – Харьков, 1998.
11. Swain T. The phenolic constituents of *Prunus Domenstica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents // J. Sci. Food Agric. – 1959. – Vol. 10. – № 1. – С. 63–68.
12. Скорикова Ю.Г., Шафтан Э.А. Методика определения антоцианов в плодах и ягодах // Труды 3-го Всесоюзного семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод. – Свердловск, 1968. – С. 451–461.
13. Запрометов, М.Н. Биохимия катехинов. – М, 1964.
14. Сарапул Л., Мийдла Х. Фенольные соединения яблони // Уч. зап. Тарт. гос.ун-та. – 1971. – Вып. 256. – С. 111–113.
15. Шапино Д.К., Дашкевич Л.Э., Довнар Т.В. Определение флавонолов в черноплодной рябине и других окрашенных плодах // Интродукция растений и зеленое строительство. – Минск, 1974. – С. 209–213.
16. Мжаванадзе В.В., Таргамадзе И.Л., Драник Л.И. Количественное определение хлорогеновой кислоты в листьях черники кавказской (*V. arctostaphylos L.*) // Сообщ. АН Груз. ССР. – 1971. – Т. 63. – Вып. 1. – С. 205–210.
17. Васильева М.С., Высочина Г.И. Хроматографическое исследование содержания и состава флавоноидов змеиного лекарственного *Bistorta Officinalis Delabre*, произрастающего в Сибири // Растительный мир Азиатской России. – 2010. – Т. 5. – № 1. – С. 87–94.
18. Мингажева А.М. и соавт. Ксилитол из растения *Bupleurum aureum Fisch* // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы Всероссийской конференции. – Барнаул, 2005. – С. 354–357.

Для связи с автором:

Бирюкова Наталья Маратовна;
адрес: Республика Беларусь, г. Минск, ул. Центральная, д. 49, к. 9, ООО «Чистая река»;
тел. +375-29-708-04-13; e-mail: sektormed@tut.by.