

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Степнова Ирина Владимировна

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ГОРЛЮХИ ЯСТРЕБИНКОВОЙ (PICRIS HIERACIODES L.)**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**Диссертация на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук**

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
профессор Валентина Николаевна Бубенчикова

Курск - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ГОРЛЮХА ЯСТРЕБИНКОВАЯ – КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ РАСТЕНИЕ.....	13
1.1 Описание ботанических особенностей.....	13
1.2 Изученность химического состава.....	15
1.3 Сведения об использовании горлюхи ястребинковой в народной медицине.....	23
Выводы по главе 1.....	26
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1 Объект исследования.....	27
2.2. Методики фитохимического исследования.....	28
2.2.1 Получение гексановых извлечений.....	28
2.2.2 Анализ каротиноидов.....	28
2.2.3 Сесквитерпеновые лактоны.....	29
2.2.4 Анализ жирных кислот.....	30
2.2.5 Приготовление водно-спиртового извлечения и его анализ.....	30
2.2.6 Кумарины.....	31
2.2.7 Фенолкарбоновые кислоты.....	31
2.2.8 Флавоноиды.....	32
2.2.9 Изучение фенольных соединений с использованием метода ВЭЖХ – масс – спектрометрии.....	33
2.2.10 Приготовление водных извлечений и их анализ.....	35
2.2.11 Анализ углеводов.....	35
2.2.12 Методы исследования азотсодержащих соединений.....	36
2.2.12.1 Методы исследования азотистых оснований.....	36
2.2.12.2 Анализ исследования аминокислотного состава.....	37
2.2.13 Анализ дубильных веществ.....	38
2.2.14 Анализ состава органических кислот.....	38
2.2.15 Анализ тритерпеновых соединений.....	39
2.2.16 Исследование минерального состава горлюхи ястребинковой.....	40
2.3 Методы исследования углеводов.....	40
2.3.1 Получение фракций углеводов.....	40
2.3.2 Исследование состава моносахаридов.....	43
2.3.3 Исследование количественного содержания моносахаридов.....	44
2.3.4 Анализ функциональных групп пектинов.....	45
2.4 Испытание сырья горлюхи ястребинковой по определению числовых показателей.....	46
2.4.1 Исследование содержания влаги.....	46
2.4.2 Исследование содержания золы.....	46
2.4.3 Исследование по определению экстрактивных веществ.....	47
2.5 Исследование морфолого-анатомических признаков для определения	

подлинности сырья	47
2.6 Проведение фармакологического скрининга.....	47
2.6.1 Острая токсичность настоя.....	48
2.6.2 Противовоспалительная активность настоя.....	48
2.6.3 Антиоксидантная активность.....	50
2.6.3.1 Определение антиокислительной активности.....	50
2.6.3.2 Определение антиоксидантной активности.....	51
2.6.4 Антимикробная активность.....	52
2.7 Технологические исследования и анализ лекарственных средств.....	52
2.8 Статистическая обработка результатов исследования.....	53
ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ГОРЛЮХИ ЯСТРЕБИНКОВОЙ ТРАВЫ И СОДЕРЖАНИЯ.....	54
3.1 Исследование каротиноидов.....	54
3.2 Качественное и количественное содержание сесквитерпеновых лактонов.....	55
3.3 Качественное и количественное определение жирных кислот.....	56
3.4 Качественное содержание кумаринов.....	59
3.5 Качественный состав фенолкарбоновых кислот.....	59
3.6 Качественный состав и количественное содержание флавоноидов.....	61
3.7 Исследование фенольных соединений методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ – УФ/МС).....	64
3.8 Анализ содержания сахаров.....	81
3.9 Азотсодержащие соединения.....	82
3.9.1 Содержание азотистых оснований.....	82
3.9.2 Содержание аминокислот.....	83
3.10 Результаты качественного и количественного анализа дубильных веществ.....	85
3.11 Качественное и количественное содержание органических кислот.....	86
3.12 Качественное и количественное содержание тритерпеновых соединений.....	87
3.13 Состав и содержание минеральных элементов.....	89
3.14 Качественный состав и содержание полисахаридов.....	91
3.14.1 Выделение полисахаридов по фракциям.....	91
3.14.2 Анализ полученных полисахаридных комплексов.....	92
3.14.3 Моносахаридный состав исследуемых полисахаридных комплексов..	94
Выводы по главе 3.....	96
ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА ГОРЛЮХИ ЯСТРЕБИНКОВОЙ ТРАВЫ.....	99
4.1 Характеристики подлинности сырья.....	99
4.1.1. Идентификация сырья по морфологическим признакам.....	99
4.1.2 Идентификация сырья по микродиагностическим признакам.....	101
4.2. Числовые показатели.....	112
4.2.1 Определение влаги.....	112

4.2.2 Определение золы.....	113
4.2.3 Анализ содержания экстрактивных веществ.....	113
4.3 Содержание основных групп биологически активных веществ.....	114
4.3.1 Содержание гидроксикоричных кислот.....	114
4.3.2 Валидационные характеристики спектрофотометрического определения гидроксикоричных кислот в горлюхе ястребинковой траве.....	119
4.3.3 Содержание суммы гидроксикоричных кислот в горлюхе ястребинковой траве.....	124
4.4 Содержание полисахаридов.....	125
4.4.1 Разработка условий гравиметрического определения суммы полисахаридов.....	126
4.4.2. Методика гравиметрического определения полисахаридов.....	129
4.4.3 Валидационные характеристики гравиметрического определения суммы полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве.....	130
4.4.4 Содержание суммы полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве.....	132
4.5 Определение сроков заготовки сырья горлюхи ястребинкой.....	133
4.6 Установление сроков годности сырья горлюхи ястребинковой.....	134
4.7 Разработка проекта ФС «Горлюхи ястребинковой трава».....	134
Выводы по 4 главе.....	136
ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА И ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ТРАВЫ ГОРЛЮХИ ЯСТРЕБИНКОВОЙ.....	139
5.1 Результаты исследования острой токсичности.....	139
5.2 Результаты изучения противовоспалительной активности.....	140
5.3 Результаты изучения антиоксидантной активности.....	143
5.3.1 Результаты изучения антиокислительной активности.....	144
5.3.2 Результаты изучения антирадикальной активности.....	146
5.4 Результаты изучения антимикробной активности.....	147
5.5 Получение и стандартизация жидкого экстракта.....	148
5.5.1 Получение жидкого экстракта.....	149
5.5.2 Оценка качества жидкого экстракта горлюхи ястребинковой.....	156
5.6 Получение и определение показателей качества настоя из горлюхи ястребинковой травы.....	158
Выводы по 5 главе.....	159
Общие выводы.....	161
Практические рекомендации.....	163
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	164
Список литературы.....	165
Приложения.....	192

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Стратегия развития фармацевтической промышленности в Российской Федерации до 2020 года предусматривает в качестве одной из приоритетных задач разработку и создание эффективных и безопасных отечественных лекарственных препаратов. Народная медицина по-прежнему остается одним из основных источников для получения лекарственных препаратов растительного происхождения.

В народной медицине широко используются растения семейства Астровых в качестве отхаркивающих, противовоспалительных, ранозаживляющих, диуретических и других средств. Растения семейства Астровые являются сырьевыми источниками для получения таких препаратов как Фламин, Алантон, Ротокан, Алором и других.

Однако, химический состав некоторых представителей семейства Астровые сравнительно мало изучен, они не находят применение в официальной медицине. К таким растениям относится горлюха ястребинковая – *Picris hieracioides* L. Горлюха ястребинковая в России применяется только в традиционной медицине в качестве слабительного, потогонного средства, а также для лечения нервных болезней и ушибов. Проведенные экспериментальные исследования установили наличие у водно-спиртового экстракта из надземной части растения антиоксидантной, противовоспалительной, антибактериальной и цитотоксической активностей. Ограниченность применения сырья горлюхи ястребинковой объясняется не только недостаточностью изучения ее химического состава, но и отсутствием документации на сырье.

В связи с этим фармакогностическое изучение горлюхи ястребинковой является актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Зарубежные исследователи в различных органах горлюхи ястребинковой изучили сесквитерпеновые лактоны и тритерпеновые соединения [Kisiel, 1992, Shiojima K., 1989, 1995, K. Nishimura, 1986, T. Ushiyama, 1990]. В листьях растения идентифицирован флавоноид изоетин [V. Sareedenchai, 2009] и стероидные соединения [Conforti, 2009]. Учёными Албании установлено содержание минеральных элементов в горлюхе ястребинковой [S. Shallari, 1998]. Экспериментальным путём выявлены антиоксидантная, противовоспалительная, цитотоксическая активности [Confronti, 2009; Confronti, 2008]. В России растение практически не изучалось.

Цель и основные задачи исследования

Целью работы является фармакогностическое изучение горлюхи ястребинковой травы, произрастающей в средней полосе Европейской части России, разработка критериев качества сырья.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Изучить и проанализировать научную литературу, касающуюся горлюхи ястребинковой травы;
2. Изучить комплекс биологически активных веществ горлюхи ястребинковой травы с использованием современных физико-химических методов анализа;
3. Провести изучение состава фенольных соединений с установлением качественной идентификации и количественного содержания;
4. Провести изучение углеводных комплексов горлюхи ястребинковой травы с их выделением и изучением моносахаридного состава;
5. Разработать методики количественного определения маркерных групп биологически активных веществ (гидроксикоричных кислот и полисахаридов) в горлюхе ястребинковой траве; провести испытания по установлению валидационных характеристик разработанных аналитических методик;

6. Изучить динамику накопления гидроксикоричных кислот и полисахаридов в зависимости от времени сбора сырья, установить сроки годности сырья;

7. Провести морфолого-анатомическое изучение горлюхи ястребинковой травы с целью установления диагностических признаков сырья;

8. Изучить противовоспалительную, антиокислительную, антирадикальную и антимикробную активности сырья горлюхи ястребинковой;

9. Изучить возможность использования методик количественного определения гидроксикоричных кислот и полисахаридов для стандартизации настоя и жидкого экстракта, полученных из горлюхи ястребинковой травы;

10. Разработать проект нормативного документа на горлюхи ястребинковой траву.

Научная новизна исследований

Впервые с использованием физико-химических, химических, морфолого-анатомических и технологических методов проведено фармакогностическое изучение сырья горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.), произрастающей в средней полосе европейской части России. Изучение комплекса биологически активных веществ горлюхи ястребинковой позволило получить научно-обоснованные данные по их составу и содержанию. Установлено, что комплекс биологически активных веществ горлюхи ястребинковой травы включает в себя: фенольные соединения, углеводы (свободные сахара: глюкоза, фруктоза; полисахариды), азотсодержащие соединения (аминокислоты, азотистые основания), органические кислоты (янтарная, винная, лимонная, аскорбиновая, щавелевая, малоновая, левулиновая, яблочная, фумаровая, бензойная, 2-окси,2-метилянтарная, 3-окси,2-метилглутаровая, азелаиновая, фенилуксусная), тритерпеновые соединения (олеаноловая кислота), каротиноиды (β -каротин), сесквитерпеновые лактоны, жирные кислоты (17 жирных кислот), минеральные элементы (25 элементов). Определено их количественное содержание.

Впервые проведено выделение полисахаридных комплексов горюхи ястребинковой травы: водорастворимого полисахаридного комплекса, пектинового комплекса, гемицеллюлоз А и Б; исследован их качественный и количественный моносахаридный состав.

Применение современных физико-химических методов анализа позволило впервые идентифицировать 17 фенольных соединений в горюхе ястребинковой траве, из них 2 кумарина (скополетин, кумарин); 6 фенолокислот (галловая, салициловая, п-оксибензойная, сиреневая, ванилиновая, гентизиновая), 4 гидроксикоричные кислоты (кофейная, хлорогеновая, феруловая, п-кумаровая), 5 флавоноидных соединений (лютеолин, цинарозид (лютеолин-7-О- β -D-глюкозид), апигенин-7-О- β -D-глюкозид, апигенин-4'-О- β -D-глюкозид, кверцимеритрин (кверцетин-7-О- β -D-глюкозид).

Полученные новые экспериментальные данные по установлению оптимальных условий экстракции гидроксикоричных кислот и полисахаридов составили основу для разработки и валидации методик спектрофотометрического определения гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту и гравиметрического определения полисахаридов.

Впервые проведено изучение зависимости содержания гидроксикоричных и полисахаридов от фазы развития растения, определена фаза заготовки сырья, позволяющая максимально накапливать действующие вещества.

Впервые установлены макро- и микроскопические признаки горюхи ястребинковой травы, предложенные для диагностики сырья и заключающиеся в особенностях опушения стебля, листа, язычковых цветков, листочков обертки; наличии сосочковидных выростов клеток эпидермиса, наличии млечников вдоль жилки листа.

Определены показатели экологической безопасности сырья.

Проведенный фармакологический скрининг выявил, что настой горюхи ястребинковой травы относится к практически не токсичным и обладает

противовоспалительной, антибактериальной, антиокислительной и антирадикальной активностью.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученный при выполнении диссертационной работы экспериментальный материал расширяет сведения о химическом составе горлюхи ястребинковой травы, ее морфологическом и анатомическом строении, методах анализа.

Научно обоснованы характеристики подлинности и показатели качества горлюхи ястребинковой травы, настоя и жидкого экстракта, полученных из нее. Предложены методики количественного определения полисахаридов и гидроксикоричных кислот в сырье, настое и жидком экстракте горлюхи.

Фармакологический скрининг может послужить основой для дальнейших фармакологических исследований с целью обоснования нового вида сырья – горлюхи ястребинковой травы.

Основные положения, выносимые на защиту:

- данные по анализу состава биологически активных веществ горлюхи ястребинковой травы;
- результаты разработки и валидации методик количественного определения гидроксикоричных кислот и полисахаридов;
- результаты установления сроков заготовки сырья;
- результаты определения содержания гидроксикоричных кислот и полисахаридов в сырье и водных и водно-спиртовых извлечениях – настое и жидком экстракте из горлюхи ястребинковой травы;
- результаты проведения морфолого-анатомических исследований;
- определение антиокислительной, антирадикальной, противовоспалительной и антимикробной активностей горлюхи ястребинковой травы.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования построена на анализе научных трудов отечественных и зарубежных ученых по изучению состава

биологически активных веществ и фармакологического исследования горлюхи ястребинковой травы, оценке степени разработанности и актуальности темы. При выполнении диссертационной работы были использованы различные методы, включающие: хроматографию в тонких слоях сорбента и на бумаге, высокоэффективную жидкостную хроматографию, газовую хромато-масс-спектрометрию, УФ-спектрофотометрию, атомно-эмиссионную спектроскопию, титриметрические, морфолого-анатомические, статистические методы исследований, фармакопейные методики ГФ XIV издания.

Степень достоверности результатов исследования

Экспериментальная часть работы выполнена на современном сертификационном оборудовании с многократным повторением экспериментов. Достоверность исследований подтверждена статистической обработкой полученных результатов, валидационной оценкой разработанных методик количественного определения, экспертной оценкой полученных данных. Научные положения и выводы по диссертационной работе базируются на содержании диссертационной работы, они обоснованы и логичны.

Апробация результатов диссертационного исследования

Основные результаты по диссертационной работе доложены: г. Москва, 2017 г., XXIV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»; г. Минск, 2017 г., II Международная конференция «Свободные радикалы в химии и жизни; г. Санкт-Петербург, 2017 г., ежегодная межвузовская межрегиональная научная конференция «Ильинские чтения»; г. Санкт – Петербург, 2017 г., «Актуальные вопросы развития Российской фармации», III Гаммермановские чтения; г. Москва, 2018 г., X Международный симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты»; г. Москва, 2018 г., Международная научная конференция «Перспективы лекарственного растениеводства».

Личный вклад автора

Автор проводил поиск и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы. Все экспериментальные исследования

проведены лично диссертантом, ею же написаны главы диссертационной работы и научные статьи, проведена статистическая обработка результатов исследования. Совместно с научным руководителем доктором фармацевтических наук, профессором Бубенчиковой В.Н. определена тема диссертационной работы, поставлены цели и задачи исследования, запланированы экспериментальные исследования и проведено обобщение полученных результатов.

Внедрения результатов исследования

Разработаны и апробированы методики количественного (спектрофотометрического) определения гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту и гравиметрического определения полисахаридов в испытательном центре «ФАРМОБОРОНА», в ОКК ООО фирмы «ЗДОРОВЬЕ». Результаты проведенного исследования используются в научно-исследовательской работе и учебном процессе на кафедрах общей, биологической, фармацевтической химии и фармакогнозии, а также фармакологии, клинической фармакологии и фармации Орловского государственного университета имени И. С. Тургенева. Разработан проект нормативного документа (НД) «Горлюхи ястребинковой трава», методики которого апробированы в ООО фирмы «ЗДОРОВЬЕ».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, п.2,3,6.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Курского государственного медицинского университета (номер государственной регистрации АААА-А17-117013060069-8).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы изложены в 23 научных публикациях, в том числе 7 статей в журналах ВАК Минобрнауки РФ и 2 в журналах, индексируемых в международной базе данных Scopus.

Экспериментальные исследования по диссертационной работе выполнены в испытательном центре «ФАРМОБОРОНА», на кафедрах фармакогнозии и ботаники, микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет».

Сотрудникам данных подразделений выражаем искреннюю признательность и благодарность.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 207 страницах компьютерного набора. Полученные экспериментальные данные проиллюстрированы 64 рисунками и 45 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы (1 глава), главы, посвященной объекту и методам исследования (глава 2) и 3 глав, посвященных результатам экспериментальных исследований и их обсуждению, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Список литературы включает 210 публикаций, из которых 47 принадлежат иностранным авторам.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ГОРЛЮХА ЯСТРЕБИНКОВАЯ – КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ РАСТЕНИЕ

1.1 Описание ботанических особенностей

Растения рода Горлюха (*Picris* L.) принадлежат к семейству Астровые (*Asteraceae*), подсемейству Латуковые (*Lactucoideae* или *Liguliflorae*).

Растения рода горлюха включают около 40-50 видов, распространенных в Евразии, Африке, Австралии и Новой Зеландии с предполагаемыми эволюционными центрами в бассейне Средиземного моря и Малой Азии [154, 202].

Растения рода Горлюха (*Picris* L.) представлены однолетними, двулетними, реже многолетними травянистыми растениями, для которых характерен простой одиночный стебель с одной корзинкой или ветвистый, с несколькими корзинками. Стебель опушен крючковидными (2,3 отдельными), а иногда и простыми волосками. Листья простые, имеющие продолговато-эллиптическую форму, край их зубчатый, перисто-надрезанный, или почти цельнокрайний. Цветки желтого цвета, собраны в многоцветковые корзинки, образующие щитковидно-метельчатое соцветие. Листочки обертки расположены черепитчато, состоят из 1-3 рядов, имеют линейно-ланцетную форму, зубчатые, перисто-надрезанные, или почти цельнокрайние, имеющие более короткие отогнутые в сторону наружные листочки. Поверхность цветоложа голая, ячеистая, волокнистая или мелкоямчатая, края ямок покрыты волосистыми пленками. Семянки имеют цилиндрическую форму, в большей или меньшей степени веретеновидные, могут иметь короткий носик или без него, поверхность их продольнобороздчатая, поперечноморщинистая. Хохолок не опадает, имеет 1-2 ряда щетинок, которые при основании не срастаются. Щетинки внутреннего ряда хохолка перистые, наружного ряда всегда более короткие, часто зубчатые [2, 154].

Род горлюха включает в себя несколько таксономически важных групп близкородственных видов, а также полиморфные виды со сложной внутривидовой изменчивостью. Горлюха ястребинковая является одним из таксономически наиболее важных и весьма полиморфных видов этого рода в Европе [202].

Горлюху ястребинковую впервые описал К. Линней в 1753 году; с того времени был описан целый ряд таксонов, как на видовом, так и на внутривидовом уровне. В настоящее время комплекс обычно рассматривается как один вид, но несколько весьма неоднозначных внутривидовых трактовок могут быть найдены в европейской флористике и в контрольных списках; в общей сложности, выделяется десять признанных подвидов. Длина плодоножки, размер и цвет листочков обертки являются одним из наиболее часто используемых символов для различения этих подвидов. Критическая оценка изменчивости видов в пределах большой географической территории и с использованием передовых таксономических инструментов, однако, до сих пор отсутствует. В недавнем морфометрическом исследовании популяции западных Карпат и прилегающей к ним Паннонии, были признаны два морфологических типа и неофициально названы как «низкая высота» (LA) и «большая высота» (HA) [201]. Два морфотипа, по-видимому, отличаются по своим экологическим предпочтениям и продолжительности жизни: первый тип (LA), как правило, это однолетние или двулетние травянистые растения; занимают сухие, солнечные, часто искусственные места обитания в низинах (или на малых высотах гор), тогда как второй (HA) часто недолговечные многолетние травянистые растения, встречающиеся преимущественно в полуестественных или естественных средах обитания (например, высокие травы лугов) на больших высотах [201].

Горлюха ястребинковая представляет собой двулетнее или многолетнее травянистое растение высотой 30-100 см, имеющее стержневой корень. Стебли прямостоячие, ветвистые, опушены вильчатыми и якоревидными волосками. Листья продолговато-эллиптические; прикорневые - в розетке, по краям

зубчатые, длинночерешковые, обычно рано отмирающие. Стеблевые листья сидячие, имеют очередное расположение и равномерно размещены на стебле, размер их меньше, чем размер прикорневых листьев, край зубчатый или цельнокрайний. Корзинки состоят из многих цветков, расположены на верхушках стеблей и ветвей в общем щитковидно-метельчатом соцветии. Все цветки в корзинке язычковые, обоеполые, желтого цвета. Обертки имеют колокольчатую форму, трехрядные, покрытые тонкими, не расширенными в основании, черными или реже белыми волосками. Плоды - веретеновидные морщинистые семянки с белым хохолком [48].

Горлюха ястребинковая относится к европейско-западноазиатским видам, занесена в Африку, Австралию и Северную Америку. В Российской Федерации распространена в европейской части, в Западной Сибири, на Кавказе. В средней полосе России произрастает большей частью во всех областях Черноземной полосы, севернее значительно реже [14, 48, 92].

Горлюха ястребинковая растет на лугах, в степях, на полянах, опушках, по кустарников, на сорных местах [48].

В соответствии с данными, приведенными в руководстве «Флора Центрального Черноземья и ее анализ» Н.С. Камышева, горлюха ястребинковая является широко распространенным растением, коэффициент ее встречаемости составляет 81-100% (обычное растение).

В Европейской части России наряду с горлюхой ястребинковой встречается горлюха твердая (*Picris rigida* L.) [99].

1.2. Изученность химического состава

Горлюха ястребинковая известна прежде всего как растение, содержащее сесквитерпеновые лактоны (таблица 1).

Таблица 1 - Состав биологически активных веществ горлюхи
ястребинковой

Части растения	Выделенные соединения	Литература
1	2	3
Подземная часть	Сесквитерпены: 11β,13 – дигидроглюкозализанин Тритерпеноиды: Гаммацер – 16 – ен – 3β – ил ацетат Гаммацер – 16 – ен - 3β – ол Гаммацер – 16 – ен - 3α – ол Гаммацер – 16 – ен – 3 – он Пикриеренил ацетат Пикриеренон Изопикриеренил ацетат Изопикриеренол Свертенил ацетат Лупенил ацетат Германицил ацетат β-амирин ацетат Тараксастерил ацетат Ψ – тараксастерил ацетат α-амирин ацетат Бауэренил ацетат Изобауэренил ацетат Бутироспермил ацетат Тирукалла – 7,21 – диен - 3β – ил ацетат Лупенон Германикон β-амиренон Фределин Тараксастерон Ψ – тараксастерон α-амиренон Бауэренон Изобауэренон Пикриеренол Свертенол Неомотиол Лупеол Германикол β-амирин Мультифлоренол	[187] [175, 176]

Продолжение таблицы 1

	Тараксастерол α -амирин Бауэренол Изобауэренол Бутироспермол Тирукалла – 7,21 – диен - 3 β – ол	
Надземная часть	Сесквитерпены: 8-дезоксигидролактацин Тритерпеноиды: Лупенил ацетат Германицил ацетат β -амирин ацетат Тараксастерил ацетат Ψ – тараксастерил ацетат α -амирин ацетат Бауэренил ацетат Изобауэренил ацетат Лупеол Германикол β -амирин Тараксастерол α -амирин Бауэренол Изобауэренол	[187] [176]
Все растение	Сесквитерпены: Лактуцин 11 β ,13 – дигидролактацин Крепидиазид А Икзерин F Пикризид А Пикризид В Пикризид С Пикриозид А Пикриозид Б Пикриозид А Пикриозид Б Икаризид В ₂ Розеозид	[197] [206]

	Сонхуионозид С Минеральные элементы: Кадмий 3мг/кг Кобальт 14 мг/кг Хром 49 мг/кг Медь 20мг/кг Никель 129мг/кг Свинец 32мг/кг Цинк 30мг/кг Кальций 0,62% Магний 0,64%	[198]
Соцветия	Сесквитерпены: Хиерацин I Хиерацин II 8-дезоксилактуцин Яквиленин	[186]
Листья	Стероиды: Ситостерол β -ситостерин Флавоноиды: Изоегин (5,7,2', 4', 5' – пентаоксифлаван)	[205, 125] [184, 196]

Сесквитерпеновые лактоны найдены в различных органах горлюхи ястребинковой. Польский ученый Kiesel W. из горлюхи ястребинковой, заготовленной в саду медицинских растений института фармакологии Польской академии наук в г. Кракове экстракцией этиловым спиртом с последующей колоночной хроматографией на силикагеле и использованием в качестве элюентов бензол-этилацетата (8:2) и хлороформ-метанола (95:5) выделил из надземной части сесквитерпен 8-дезоксидигидролактацин, а из корней сесквитерпен - 11 β -13 – дигидроглюкозалузанин [187]. При исследовании растений семейства Сложноцветные на содержание сесквитерпеновых лактонов была изучена горлюха ястребинковая из флоры Японии. Изучению подвергались высушенные целые растения, которые были

проэкстрагированы спиртом метиловым. Метанольное извлечение концентрировали и остаток суспендировали в воде. Далее полученный раствор последовательно экстрагировали диэтиловым эфиром и спиртом бутиловым. Бутальную фракцию разделяли на колонке с силикагелем, в качестве элюэнта использовали смесь хлороформа со спиртом метиловым (9:1). В результате было получено 7 соединений, предварительно отнесенных к сесквитерпеновым лактонам. Структура выделенных соединений была установлена на основании определения температур плавления, оптического вращения, результатов химических превращений, ИК-спектров, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров, газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографией. В результате выделенные лактоны были охарактеризованы как уже известные соединения: лактуцин, $11\beta,13$ -дигидролактучин, крепидиазид А, икзерин F и три новых соединения: гваянолидный гликозид пикризид А и два гликозида гермакранолидного типа: пикризид В и пикризид С [197].

Продолжая изучение сесквитерпеновых лактонов горлюхи ястребинковой, японскими учеными было выделено дополнительно 7 соединений данной группы. Для их выделения высушенные целые растения экстрагировали спиртом метиловым, извлечение концентрировали, сумму сесквитерпеновых лактонов извлекали бутанолом и далее бутанольную фракцию разделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле. В результате выделено 4 новых сесквитерпеновых гликозида: пикриозид А, пикриозид В, пикриозид А, пикриозид В и три известных гликозида: икаризид В₂, розеозид, сонхуиозид С. Структура данных сесквитерпенов была установлена на основании химических и спектральных исследований [206].

Сесквитерпеновые лактоны были выделены японскими учеными так же из соцветий горлюхи ястребинковой и проведено их изучение. Для их выделения использован спирт метиловый, далее полученное извлечение концентрировали в вакууме, разбавляли водой и из водной среды сесквитерпены экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фракцию

очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, в качестве элюэнтон были использованы смесь гексана с этилацетатом. Повторную очистку и разделение проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В результате было идентифицировано 4 сесквитерпеновых соединения: 8 – дезоксилактунин, яквиленин, хиерацин I и хиерацин II [186].

В последствие сесквитерпеновые лактоны были использованы в качестве хемосистематических маркеров семества Астровых, в том числе рода Горлюхи [210].

Горлюха ястребинковая изучалась и на содержание тритерпеновых соединений. Тритерпеновые соединения были выделены из свежих корней растения – 42 соединения и 15 соединений были выделены из свежей надземной части растения. Для выделения тритерпеновых соединений свежие корни растения экстрагировали трижды гексаном. Гексановые извлечения объединяли, упаривали и хроматографировали на силикагеле, в качестве элюэнтон использовали гексан, смесь гексана с бензолом (8:2; 1:1), бензол, смесь бензола с диэтиловым эфиром (9:1; 1:1), диэтиловый эфир. В результате было получено 14 фракций, из которых выделено 42 тритерпеновых соединения, представленных в таблице 1. Структура выделенных соединений была установлена с использованием спектрального анализа и химических превращений. Эти соединения представлены в основном пентациклическими тритерпеноидами, начиная от лупана, гаммацерона, олеанана, ирсана с некоторыми тетрациклическими соединениями. Впервые из корней данного растения выделены: гаммацер – 16 – ен – 3 β – ил ацетат, гаммацер – 16 – ен - 3 β – ол, гаммацер – 16 – ен - 3 α – ол, пикриеренола ацетат, пикриеренон, изопикриеренила ацетат, изопикриеренон [175, 176]. Аналогичным образом были выделены тритерпены из свежей надземной части [176].

В листьях горлюхи ястребинковой исследованы стероидные соединения. Стероидные соединения изучали в гексановых фракциях, полученных из листьев, которые анализировали методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии. Идентификация соединений была проведена в соответствии с

временами удерживания веществ и масс-спектрами в сопоставлении с таковыми из библиотеки данных системы ГХ – МС Уайм 138. В листьях горлюхи ястребинковой идентифицирован γ – ситостерол [205].

При изучении флавоноидов как хемосистематических маркеров растений семейства Астровые, подсемейства Цикориевые описано наличие флавоноидов изоетина (5,7,2',4',5' – пентоксифлавоноид), который был выделен из листьев растения. Изоетин в растении сопутствовал лютеолину [184, 196]. Данный флавоноид содержится в виде агликона.

Итальянскими учеными при изучении антиоксидантной активности в 2005 году проведено изучение фенольных соединений в листьях горлюхи ястребинковой. Общее содержание фенольных соединений определяли методом Фолина – Чокальтеу. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 726 нм, расчет содержания фенольных соединений вели в пересчете на хлорогеновую кислоту. Результаты исследования были выражены на эквивалент одного миллиграмма хлорогеновой кислоты на 1 г сухих листьев. В результате в листьях горлюхи ястребинковой найдено $85 \pm 0,81$ мг/г фенольных соединений. Наряду с фенольными соединениями этими же учеными было определено содержание флавоноидов спектрофотометрическим методом, в основе которого лежит реакция комплексообразования с алюминия хлоридом. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 430 нм. Калибровочную кривую строили по кверцетину, результаты были выражены в мг кверцетина на 1 г сухого веса. Содержание флавоноидов в листьях горлюхи ястребинковой составило $158 \pm 0,27$ мг/г [292].

В Албании была проведена работа по исследованию флоры серпантинной местности и бывших промышленных объектов, при этом было акцентировано внимание на поглощение и накопление металлов растениями. Исследование проводилось на восьми промышленных объектах, в прошлом расположенных на серпантинных почвах, т.е. на объектах по обработке железо-никелевых, хромовых соединений. Отбор проб проводился в июле 1995 года в

восьми местах, представляющих пять серпантинных участков и три промышленных объекта. Образцы почвы были взяты в случайном порядке на месте отбора растений. Также было отобрано более 10 видов на каждом участке, всего было собрано 58 видов растений, идентификация которых была проведена с помощью европейской флоры [198]. Горлюха ястребиновая была собрана в серпантинной зоне. В почвах и растениях было изучено содержание металлов: кадмия, кобальта, хрома, меди, никеля, свинца, цинка, кальция и магния, а также pH среды. Среди изученных элементов в наземной части горлюхи ястребиновой доминирующими были никель, его содержание составило 129 мг/кг^{-1} , кальций 62 % и магний 0,64 %. Минимальное содержание отмечено для кадмия (3 мг/кг^{-1}). Образцы почв, собранных в различных местах в Албании имели высокое содержание металлов. Высокие концентрации никеля, хрома и кобальта присутствовали в серпантинных почвах. В результате этого исследования не было установлено связи между концентрацией металлов в почве и исследуемых растениях [198].

Проведенные исследования по изучению влияния филогенеза на относительное содержание 6 тяжелых металлов: кадмия, хрома, меди, никеля, свинца и цинка в наземных побегах горлюхи ястребиновой с помощью комплекса «Апова» показали, что их содержание колебалось от $0,37 \text{ мг/кг}^{-1}$ (цинк) до $1,84 \text{ мг/кг}^{-1}$ (кадмий). При этом отмеченно и высокое содержание хрома ($1,25 \text{ мг/кг}^{-1}$) [192].

Было проведено исследование растений, произрастающих на цинковых и свинцовых рудниках в Юньнэне в Китае на накопление свинца, цинка, кадмия. Перед проведением анализа листья и корни растений были отделены и промыты водой из – под крана и дистиллированной водой для удаления поверхностной почвы и пыли, а затем высушены при температуре 100°C в течение 30 минут и далее при температуре 60°C сутки. Содержание свинца, цинка и кадмия определяли в главной лаборатории субтропических ресурсов и окружающей среды министерства сельского хозяйства Китая. Содержание свинца, цинка и кадмия установили с помощью оптической эмиссионной

спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. В результате среди исследованных растений установлены гипернакопители свинца, цинка и кадмия. Горлюха ястребинковая была отнесена к гипернакопителям кадмия. Концентрация кадмия в побегах горлюхи составила $145,2 \text{ мг/кг}^{-1}$, в корнях $354,5 \text{ мг/кг}^{-1}$. При сравнении указанных концентраций с растениями, произрастающими в незагрязненной среде было установлено, что уровень концентрации в загрязненной среде был в 145 раз выше. При изучении коэффициента насыщения в исследованных растениях было установлено, что во всех образцах он был ниже 1, а у горлюхи ястребинковой он был минимальным и составил 0,16 [185].

Среди других классов соединений в горлюхе ястребинковой обнаружен каучук [125].

1.3 Сведения об использовании горлюхи ястребинковой в народной медицине

Горлюха ястребинковая издревле использовалась в народной медицине. С лечебной целью люди использовали траву и листья, заготавливаемые во время цветения растения.

Горлюха ястребинковая оказывает диуретическое, желчегонное, слабительное, обезболивающее и смягчительное действие [95]. В народной медицине настой из травы находит применение для лечения желтухи различного происхождения, запоров в качестве слабительного средства и особенно часто его применяют при болях и ушибах внутренних органов [95]. С этой целью 1 столовую ложку сухой травы горлюхи настаивают 20 минут в 1,5 стаканах кипятка, процеживают и принимают по 1 столовой ложке 3-4 раза в день [95]. Для размягчения плотных воспалительных очагов (фурункулов, карбункулов) используют измельченные листья в виде припарок [95].

Экспериментальным путем установлено наличие антиоксидантной, противовоспалительной и цитотоксической активностей.

В поисках источников природных антиоксидантов была изучена антиоксидантная активность 10 растений флоры Италии, в том числе и горлюхи ястребинковой. В основе определения антиоксидантной активности лежали процессы свободно – радикального окисления и перекисного окисления липидов. Для определения свободно – радикального окисления к водно – спиртовым экстрактам из надземной части различной концентрации добавляли стабильный свободный радикал – дифенилпикрилгидразил (ДФПГ), встряхивали и выдерживали в темноте в течение 30 минут. Определяли оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 517 нм. В качестве контроля использовалась аскорбиновая кислота. Далее в процентах рассчитывали ингибирование свободных радикалов. Антиоксидантная активность (относительно ДФПГ) травы горлюхи ястребинковой составила 25 мг/мл. Далее были определены антиоксидантная активность по их способности обесцвечивания каротина *in vitro* тем самым предотвращения образования активных форм кислорода и перекисного окисления липидов бычьего мозга. В каротиновом тесте горлюха ястребинковая показала наибольшее ингибирование окисления липолево́й кислоты ($IC_{50} = 3$ мг/мл). При использовании липосом, полученных из мозга крупного рогатого скота также наблюдался самый высокий антиоксидантный эффект ($IC_{50} = 22$ мг/мл) [205].

Параллельно с изучением антиоксидантной активности итальянские ученые исследовали противовоспалительную активность. Для изучения противовоспалительной активности использовали модель острого воспаления, вызванного введением на внутреннюю поверхность правого уха мышей самцов кртонового масла, суспендированного в 42% водном спирте этиловом. Масло вводили под наркозом (гидрохлорид кетамина 145 мг/кг^{-1} внутривбрюшинно). Контрольные животные получали только масло, тогда как другие животные получали и исследуемые экстракты. Через 6 часов из обработанного (правого) и необработанного (левого) уха удаляли пробки (6 мм). Отек измеряли как разницу в весе между двумя пробками. Противовоспалительная активность

была выражена как процент уменьшения отека у обработанных мышей по сравнению с контрольными мышами. В качестве контрольного образца, был использован нестероидный противовоспалительный препарат индометацин. Результаты изучения противовоспалительной активности экстракта травы горлюхи ястребинковой, вводимой в дозе 300 мг/см^2 , показали что, данный экстракт снижал отек на 33%. При этом нестероидный противовоспалительный препарат индометацин уменьшал отечную реакцию на 57 % в дозе 100 мг/см^2 .

При продолжении исследований растений флоры Италии были изучены антипролиферативные свойства 16 пищевых растений, используемых в местной традиционной кухне. Для анализа готовили водно – спиртовые экстракты из листьев растений, которые использовали для оценки их антипролиферативной активности для лечения рака молочной железы (линейных клеток MCF – 7), рака простаты (линейных клеток LNCaP), безпигментных меланом (клеточные линии C₃₂), аденокарциномы почечных клеток (ACHN). Острая токсичность водно – спиртовых экстрактов оценивалась с помощью бактериального теста. В результате было установлено, что водно – спиртовый экстракт из листьев горлюхи ястребинковой проявлял антипролиферативную активность при раке молочной железы (MCF – 7) и раке простаты (LNCaP). Наибольшая активность была выявлена при раке молочной железы ($8,83 \pm 0,23\%$). Исследованный экстракт не обладает токсичностью [168].

Выводы по главе 1

1. Данные литературного обзора показывают, что горлюха ястребинковая широко произрастает на всей территории Российской Федерации, в том числе и в регионе Центрального Черноземья.
2. Из литературного обзора видно, что в химическом плане трава горлюхи ястребинковой изучена недостаточно. Имеются данные об изучении в ней сесквитерпеновых соединений и тритерпенов. В растениях из флоры

Албании изучен минеральный состав. Другие классы биологически активных веществ в траве горлюхи практически не изучались.

3. До настоящего времени в траве горлюхи не установлены группы действующих веществ. Имеются лишь единичные исследования о корреляции между антиоксидантной активностью и содержанием фенольных соединений.
4. Не проведены исследования по стандартизации сырья, по определению его подлинности.
5. Результаты всего сказанного являются свидетельством актуальности фармакогностического изучения горлюхи ястребинковой. Проведенные исследования будут способствовать расширению сырьевой базы растительного сырья.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом наших исследований выступила горлюха ястребинковой трава - *Picris hieracioides* L.



Рисунок 1 – Горлюха
ястребинковая
(Курская область, г. Курск,
берег реки Тускарь, июль
2017, фото автора).

Сырье заготавливали в течение 2015 – 2018 годов на территории областей средней полосы России – Курской, Белгородской, Орловской в различные фазы развития растения. Заготовку сырья осуществляли срезанием верхней части растения не более 30 см. Сушку сырья осуществляли воздушно-теневым способом, раскладывая сырьё в один слой. Образцы были определены профессором кафедры общей биологии и экологии Курского государственного университета А.В. Полуяновым. Заготовленные гербарные образцы находятся на хранении на кафедре фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета.

Сырье хранили в соответствии требованиям общей фармакопейной статьи [45]. Помещение для хранения было проветриваемое, сухое, без попадания солнечных лучей, температура помещения комнатная, зараженность амбарными вредителями отсутствовала. Для выделения средней

пробы сухое сырьё измельчали, просеивали и методом квартования выделяли пробу, из которой методом квартования получали аналитические пробы для проведения анализов.

Для фармакологических исследований готовили настой, в соответствии с требованиями ГФ XIII издания, соотношение сырьё-экстрагент составило 1:10, а также использовали пектиновые вещества, выделенные из травы горлюхи ястребинковой [45].

2.2 Методики фитохимического исследования

При проведении фитохимического анализа горлюхи ястребинковой травы определяли в ней содержание биологически активных веществ. Для проведения фитохимического анализа готовили извлечения, которые получали из измельченного воздушно-сухого сырья горлюхи ястребинковой с помощью экстрагентов: гексана, спирта различной концентрации и воды.

2.2.1 Получение гексановых извлечений

1,0 г измельченной воздушно-сухой горлюхи ястребинковой травы извлекали 150 мл гексана на протяжении 1 часа. Полученное гексановое извлечение упаривали под вакуумом до небольшого объема, в котором исследовали каротиноиды [60].

2.2.2 Анализ каротиноидов

Качественный состав каротиноидов изучали методом восходящей хроматографии при использовании пластинки "Sorbfil", в которой в качестве подвижной фазы выступала гексан-ацетон (8:2), стандартным образцом β -каротин (фирмы Dr. Ehrenstorfer) [60, 82]. Содержание каротиноидов в сырье горлюхи ястребинковой травы определяли методом спектрофотометрии в

видимой области спектра [60, 151]. Оптическая плотность полученного гексанового извлечения была определена при длине волны 453 нм. При этом гексан был использован как раствор сравнения.

2.2.3 Сесквитерпеновые лактоны

Сесквитерпеновые лактоны в горлюхи ястребинковой траве изучали следующим образом: к 1,0 г сырья, проходящего сквозь сито с размером отверстий 1 мм и помещённого в колбу объемом 250 прибавляли спирт этиловый 90 % (30 мл), выдерживали на водяной бане, с температурой 60°C 30 минут. Извлечение охлаждали, фильтровали и упаривали до 2 мл на кипящей водяной бане. Извлечение наносили на хроматографическую пластинку «Sorbfil», пластинку помещали в камеру с подвижной фазой: толуол-этилацетат (93:7) и хроматографировали. После хроматографирования пластинку сушили и проявляли детектирующим реактивом. В качестве проявителя хроматограммы использовали растор ванилина в концентрированной серной кислоте [69, 187].

Сесквитерпеновые лактоны определяли методом гравиметрии согласно методики Рыбалко К.С. [131]. Измельченную пробу горлюхи ястребинковой травы пропускали через сито с размером отверстий 1 мм. К аналитической навеске (≈ 10 г), помещенной в колбу на 100 мл, прибавляли воду очищенную (100 мл), нагретую до 80 °C, оставляли содержимое колбы на 30 минут. Экстрагировали сырье еще 4 раза, используя соотношение 1:5 по 1 часу. Полученные водные извлечения фильтровали, объединяли и экстрагировали в делительной воронке хлороформом, используя соотношение 20:1, затем извлекали хлороформом еще 3 раза, используя соотношение 30:1. Хлороформные извлечения объединяли и хлороформ отгоняли. К образованному остатку приливали диэтиловый эфир, используя соотношение 1:1, наблюдали выпадение осадка, который отделяли, сушили в сушильном

шкафу, имеющем температуру 60°C на протяжении 3 часов, а далее взвешивали с точностью 0,0001 г.

Количество сесквитерпеновых лактонов выражали в процентах и пересчитывали на сухое сырье [131].

2.2.4 Анализ жирных кислот

Качественный состав и содержание жирных кислот исследовали методом газо-жидкостной хроматографии [21, 80, 171, 174]. Точную навеску сырья, прошедшего сквозь сито с размером отверстий 1-2 мм (50,0 мг) вносили в вials «Agilent», приливали в неё тридекан в гексане (внутренний стандарт) и 1,0 мл BCl_3 14% в спирте метиловом (метилирующий агент). Происходило экстрагирование жирных кислот, содержащихся в горлюхе ястребинковой траве с одновременным их гидролизом и метилированием. По прошествии 8 часов сырье горлюхи отделяли от реакционной смеси, затем её разбавляли 1,0 мл воды очищенной и экстрагировали смесь метиловых эфиров жирных кислот с помощью хлористого метилена. Полученное хлористометиленовое извлечение анализировали на газо-жидкостном хроматографе Agilent Technologies 6890, имеющим в составе масс спектрометрический детектор 5973 N.

Идентификацию жирных кислот проводили сравнением с известными образцами, данными библиотеки масс-спектров WILEY 2007, NIST 05 и программами идентификации NIST и AMDIS.

2.2.5 Приготовление водно-спиртового извлечения и его анализ

Для обнаружения флавоноидов, кумаринов, фенолокислот, гидроксикоричных кислот, сапонинов, получали извлечение с использованием 70% спирта этилового в качестве экстрагента. Водно-спиртовое извлечение упаривали до водного остатка и обрабатывали различными экстрагентами:

хлороформом, этилацетатом, н.бутиловым спиртом, которые исследовали с помощью химических и физико-химических методов.

2.2.6 Кумарины

Обнаружение кумаринов в горлюхи ястребинковой траве проводили во фракции, полученной с помощью хлороформа. Идентификацию и разделение кумаринов проводили с помощью тонкослойной хроматографии. На линию старта пластинки "Sorbfil" наносили хлороформное извлечение и стандартные образцы: кумарина (Ph. Eur. Reference Standard), скополетина (USP Certificate). Пластинку помещали в хроматографическую камеру, где подвижной фазой выступала: бензол - этилацетат (2:1). После хроматографирования её вынимали, сушили на воздухе и просматривали в УФ-свете, при этом отмечая пятна кумаринов. Проявителем служил раствор натрия гидроксида спиртовый 10% [17, 70, 164].

2.2.7 Фенолкарбоновые кислоты

Для определения фенолкарбоновых кислот в горлюхи ястребинковой траве использовали этилацетатную фракцию, которую исследовали хроматографированием на бумаге (восходящей хроматографией) в сравнении со стандартными образцами фенолкарбоновых кислот фирм: Aldrich – Sigma, Ph. Eur. Reference Standard, Dr. Ehrenstorfer GmbH. В качестве подвижной фазы использовали раствор кислоты уксусной 2%. После хроматографирования хроматограмму высушивали и обрабатывали одним из детектирующих растворов: спиртовым раствором железа окисного хлорида 1%, парами аммиака [10, 31, 38, 98, 200].

Для более детального исследования фенолкарбоновых кислот горлюхи ястребинковой траву подвергали изучению с помощью метода газо-жидкостной хроматографии аналогично жирным кислотам [3, 172].

2.2.8 Флавоноиды

Качественное содержание

Флавоноиды устанавливали в водном остатке водно-спиртового извлечения и этилацетатной фракции из горлюхи ястребинковой травы, которые исследовали с помощью методов хроматографии и качественных реакций. Среди общего количества качественных реакций для идентификации флавоноидов мы использовали:

- цианидиновую реакцию: с кислотой хлористоводородной и магниевой стружкой [74, 181, 182], при проведении этой реакции действием водорода происходит восстановление флавоноидов и наблюдаются окрашивание от розового цвета до красно-фиолетового;

- цианидиновую реакцию в модификации Брианта: результаты цианидиновой реакции разбавляли равным объемом воды очищенной и приливали спирт октиловый (1 мл), далее пробирку с содержимым взбалтывали. Наличие окраски октанольного слоя говорит о том, что в траве горлюхи ястребинковой содержатся агликаны флавоноидов, а окраска водного слоя - наличие флаваноидных гликозидов [86, 170, 181].

- реакция с алюминия хлорида 2% - желто-зеленое окрашивание [86, 181, 182];

- реакция со свинца ацетатом, наличие извлечения флавоноидов с О-диоксигруппой показывает желтый осадок [37, 43, 86, 181];

- с борной кислотой и щавелевой кислотой фракции, содержащие флавонолы и флавоны с 5-оксигруппами образуют желтое окрашивание, имеющие желто-зеленую флуоресценцию [86, 157, 181];

- с реактивом Фелинга в исследуемых фракциях, содержащих флавоноиды после гидролиза и нагревания наблюдаются кирпично-красные осадки [37, 74, 181].

Анализ качественного состава флавоноидов проводили хроматографией на бумаге, а также в тонких слоях сорбента на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А-УФ. В качестве стандартных образцов использовали образцы фирм «Aldrich - Sigma», «Phytolab», «Фитопанацея». В качестве подвижных фаз использованы: кислота уксусная 15%, бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1) [89, 98, 145, 181, 209]. Детектирование пятен флавоноидов на хроматограммах проводили обработкой пластинок раствором хлорокиси циркония, раствором алюминия хлорида, парами аммиака [9, 42, 145, 181]. По окончании хроматографирования их просматривали в УФ-свете, отмечая пятна флавоноидов, далее обрабатывали детектирующими реактивами и снова просматривали в УФ-свете, отмечая изменение окраски.

Количественное содержание

Содержание количественного состава флавоноидов в горлюхе ястребинковой траве проводили методом спектрофотометрии, основу которого составляет реакция комплексообразования с алюминия хлоридом. Стандартным образцом при определении флавоноидов был выбран лютеолин-7-гликозид (цинарозид), содержания флавоноидов рассчитывали с использованием удельного показателя поглощения лютеолина-7-глюказида с хлоридом алюминия [11, 12, 13, 98].

2.2.9 Изучение фенольных соединений с использованием метода ВЭЖХ – масс - спектрометрии

Исследование фенольных соединений травы горлюхи ястребинковой проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Хроматографический анализ осуществляли в испытательном центре «Фармоборона».

Для анализа фенольных соединений использовали горюхи ястребинковой траву, для чего сырьё помещали в экстракционную колбу объёмом 100 мл, в неё же вливали 20 мл экстрагента (спирта этилового 70%), выдерживали колбу 1 час на кипящей водяной бане, после того как смесь закипит в колбе. После завершения экстракции колбу охлаждали и фильтровали содержимое в мерную колбу на 25 мл через воронку с бумажным фильтром. Объём фильтрата доводили до 25 мл спиртом этиловым 70 % и использовали для дальнейших исследований.

Одновременно с приготовлением извлечения для анализа готовили растворы стандартных образцов фенольных соединений в концентрации от 0,02% до 0,05% в спирте этиловом 70%.

В качестве стандартных образцов использовали индивидуальные вещества фирм: «Phytolab», «Sigma-Aldrich», «Фитопанацея», «Ph. Eur. Reference Standard», «USP Certificate», «Dr. Ehrenstorfer».

Состав фенольных соединений анализировали с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent Technologies 1290 Infinity II с диодно-матричным УФ- и масс-селективным (Agilent Technologies 6490 Triple MS) детекторами. С помощью диодно-матричного детектора (модель Quand LC/MS) проводили детектирование и запись спектров поглощения в УФ области: 230-500 нм, а с помощью масс-селективного детектора определяли молекулярную массу, входящих в состав извлечения соединений (точность 0,1 а.е.).

Для разделения веществ использовали колонку EC 150/4.6 Nucleosil 100-5C18 (4,6x150 мм), с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использована смесь 2,3% кислоты уксусной-спирта метилового (70:30), которая подавалась со скоростью 1 мл/мин. Объем вводимой пробы составил 20 мкл. Температура колонки комнатная. Детектирование фенольных соединений проводили при двух длинах волн: 280 нм и 340 нм, ширина полос составила 40 нм. В качестве контрольной длины волны выбрана длина при 560 нм. Масс-селективный детектор использовали при атмосферном давлении (APCI),

сканирование проводили для отрицательных и положительных ионов, в диапазоне от 100 до 1000.

Сочетание УФ-детектора и масс-селективного при исследовании в двух режимах (для отрицательных и положительных ионов) позволяет получить наиболее полную информацию о составе исследуемого растения.

Обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения «Qualitative analysis B.07.00» компании Agilent. Фенольные соединения идентифицировали по характеристике УФ – и масс – спектров с используемыми индивидуальными веществами и литературными данными, а также по совпадению времен удерживания. Для количественного определения фенольных соединений использовали метод внешнего стандарта [57, 58, 153]. Метрологические характеристики рассчитывали в соответствии с ГФ XIII издания [45].

2.2.10 Приготовление водных извлечений и их анализ

Анализ водорастворимого биологически активного комплекса проводили в водных извлечениях, для этого 5,0 г горюхи травы просеивали сквозь сито с размером отверстий 1 мм, сырьё переносили в экстракционную колбу на 100 мл, в неё же приливали экстрагент (воду очищенную) 50 мл и экстракцию вели на кипящей водяной бане 1 час.

Полученное извлечение пропускали через фильтр, не допуская попадания сырья на фильтр. Сырьё с фильтра повторно вносили в колбу и экстрагировали водой еще три раза. Водные извлечения анализировали с помощью качественных реакций и хроматографии.

2.2.11 Анализ углеводов

Анализ свободных моносахаридов и гликозидов

Свободные сахара изучали качественной реакцией Бертрана, при этом водное извлечение горюхи ястребинковой травы помещали в пробирку, к нему прибавляли реактив Фелинга в объеме, равном количеству извлечения, содержимое пробирки нагревали. При наличии в извлечении свободных моносахаридов появляется осадок закиси меди кирпично-красного цвета [86, 141]. С этой же целью использовали нисходящую хроматографию на бумаге водного извлечения, в качестве системы растворителей выступали: пиридин - спирт бутиловый - вода очищенная (4:6:3) [28]. Образцом сравнения служили известные образцы сахаров. В качестве проявителя применяли раствор анилинфталата.

Определение гликозидов проводили реакцией Фелинга до и после кислотного гидролиза [86]. Образование большего по объему осадка после гидролиза может свидетельствовать о содержании в исследуемом извлечении гликозидов. Подтверждением наличия гликозидов может служить реакция с β -нафтолом 20%, при которой на границе с водным извлечением должно появиться вишневое кольцо [86].

Анализ моносахаридов в виде полисахаридов

Полисахариды устанавливали путём осаждения водного извлечения трехкратным объемом этилового спирта 96%, при этом выпадал рыхлый осадок, содержащий водорастворимые полисахариды [28, 62, 66, 142].

2.2.12 Анализ азотсодержащих соединений

2.2.12.1 Анализ азотистых оснований

Качественный анализ

Азотистые основания в горлюхе ястребинковой траве устанавливали качественными реакциями: 1) в пробирку помещали водное извлечение, к которому прибавляли 3% раствор кислоты фосфорновольфрамовой; 2) в пробирку помещали водное извлечение, в нее приливали аммония ванадат в растворе кислоты серной концентрированной (реакция Манделина); 3) в пробирку помещали водное извлечение и приливали кислоту хлористоводородную 0, 2 н и раствор бриллиантового зеленого 0,1 % [18, 20, 100].

Подтверждали присутствие азотистых оснований методом бумажной хроматографии; для чего водное извлечение подвергали хроматографированию, используя систему растворителей: н-бутиловый спирт-кислота уксусная-вода (4:1:2), проявителем служили пары йода [18, 20].

Анализ содержания азотистых оснований

Определение азотистых оснований проводили фотоэлектроколориметрическим методом, в основе которого лежит реакция азотистых оснований с солью Рейнеке, в результате чего образуются окрашенные комплексы, с дальнейшим определением их оптической плотности [20, 100].

2.2.12.2 Анализ исследования аминокислотного состава

Определение наличия аминокислот проводили нингидриновой реакцией, для чего к данному извлечению приливали раствор нингидрина 0,1% свежеприготовленный [16, 24].

Состав аминокислот и их содержание изучали с помощью аминокислотного анализатора (автоматизированного жидкостного хроматографа – ААА-400). Для изучения аминокислотного состава к водному извлечению прибавляли хлористоводородную кислоту и оставляли в

сушильном шкафу при температуре 100°C для проведения гидролиза. По окончании гидролиза и фильтрования реакцию смесь упаривали до сухого остатка с помощью роторного испарителя. Остаток растворяли в 5 мл воды очищенной и указанные процедуры проводили ещё два раза для удаления хлористоводородной кислоты. К сухому остатку, полученному после указанных процедур, приливали загрузочный буфер (pH – 2,2) (50 мл), раствор фильтровали и вносили в подготовительную ионообменную колонку. Состав аминокислот исследовали, применяя следующие условия: скорость подачи буферных растворов 0,3 мл/минута; нингидринового реактива 0,2 мл/минута; использовали длины волн 440 нм и 570 нм для детектирования, температура термостата реактора 121°C [6, 24].

2.2.13 Анализ дубильных веществ

Для обнаружения дубильных веществ водное извлечение, помещали в пробирку и к нему прибавляли: 1) равные количества желатина и хлористоводородной кислоты по каплям; 2) формальдегид и концентрированную хлористоводородную кислоту в равных количествах; 3) бромную воду; 4) железо-аммонийные квасцы [17, 47, 86].

Содержание дубильных веществ определяли методом перманганатометрии [45], с использованием навески сырья горюхи ястребинковой ≈ 2 г, в качестве экстрагента воду очищенную (250 мл), время извлечения – 30 минут; индикатор – индигосульфокислота; титрант - 0,02 моль/л калия перманганата раствор.

2.2.14 Анализ состава органических кислот

Разделение и идентификацию органических кислот проводили методом тонкослойной (восходящий) хроматографии, для чего водное извлечение наносили на хроматографическую пластинку «Sorbfil», параллельно с

образцами органических кислот, хроматографию проводили смесью спирта этилового 95% и раствора аммиака концентрированного (16:4,5), проявление осуществляли бромкрезоловым зеленым [17].

Более достоверное изучение органических кислот проводили методом газо-жидкостной хроматографии. Состав и содержание органических кислот идентифицировали сравнением их метиловых эфиров с известными образцами метиловых эфиров органических кислот в соответствии с исследованием жирных кислот [3, 116, 172].

Количественный анализ суммы органических кислот в сырье горлюхи ястребинковой проводили, используя методику ГФ-ХІ издания [46, 137, 162]. Титрантом служил раствор натрия гидроксида (0,1 моль/л); в качестве индикатора была использована смесь метиленового синего и фенолфталеина. Содержание органических кислот в горлюхи ястребинковой траве проводили в перерасчете на кислоту яблочную.

Содержание кислоты аскорбиновой

Содержание кислоты аскорбиновой было определено титриметрическим методом [46, 137, 162]. Навеска измельченного сырья горлюхи ястребинковой - 5,0 г; время настаивания – 10 минут; титрант 0,001 моль/л 2,6-дихлорфенолиндифенолят натрия. Титрование вели до изменения окраски в розовый цвет. Количественное содержание кислоты аскорбиновой выражали в % и проводили пересчет на абсолютно сухое сырьё.

2.2.15 Анализ тритерпеновых соединений

Качественное содержание

Для определения наличия тритерпеновых соединений горлюхи ястребинковой травы использовали бутанольную фракцию водно-спиртового

извлечения и водное извлечение, с которым проводили следующие качественные реакции:

- реакция осаждения со средним свинца ацетатом. К полученным фракциям (2 мл) приливали по каплям ацетат свинца;
- реакция Лафона. К полученным фракциям приливали концентрированную кислоту серную (1 мл), спирт этиловый 96% (1 мл) и 10% раствор сернокислого железа (1 капля);
- реакция Фонтан-Канделя. Водное извлечение (1-2 мл) вносили в 2 пробирки, из которых в одну вносили кислоту хлористоводородную 0,1 н (5мл), в другую натрия гидроксида 0,1 н (5мл). Растворы, содержащиеся в пробирках, тщательно встряхивали [86, 109, 117].

Для подтверждения наличия тритерпеновых соединений применяли метод тонкослойной хроматографии, системой растворителей выступала стстема: хлороформ-этилацетат (5:1), 20% раствор кислоты серной выполнял роль проявителя [86, 117].

Количественный анализ

Количественный анализ тритерпеноидов осуществляли спектрофотометрическим методом, в основе которого лежит реакция тритерпеноидов с серной кислотой, в результате которой образуются окрашенные растворы с дальнейшим определением их оптической плотности [99, 117].

Навеска измельченной горлюхи ястребинковой травы - 5 г, экстрагент – вода очищенная, время экстрагирования на водяной – два часа, объем полученного извлечения – 50 мл.

К 5 мл полученного извлечения прибавляли равные количества воды очищенной и кислоты хлористоводородной концентрированной (по 3 мл), полученный раствор выдерживали на кипящей водяной бане 30 минут. Колбу с содержимым охлаждали и переливали содержимое в делительную воронку, в

которую приливали смесь хлороформа со спиртом (5:1) для экстрагирования тритерпеноидов. Экстрагирование хлороформом со спиртом проводили еще дважды. Полученные извлечения упаривали досуха и растворяли в спирте этиловом 70% (25 мл).

Спиртовой раствор использовали для проведения реакции с концентрированной серной кислотой, для чего к 5 мл раствора приливали 5 мл серной кислоты концентрированной и через 30 минут полученный раствор спектрофотометрировали при длине волны 490 нм. При спектрофотометрировании вода очищенная выполняла роль раствора сравнения.

2.2.16 Исследование минерального состава горюхи ястребинковой

Минеральный состав горюхи ястребинковой травы исследовали на приборе ДРС-8-1.

Анализ минерального состава проводили методом спектрального анализа, аналитическую пробу сырья озоляли при $t=550\text{ }^{\circ}\text{C}$ в муфельной печи. Полученную золу использовали для определения содержания минеральных элементов на спектрограммах. Спектрограммы подвергали фотометрированию, при этом использовали атлас спектральных данных и спектров стандартов. Расчет вели с погрешностью не более 2% [113, 155, 160].

2.3 Методы исследования углеводов

2.3.1 Получение фракций углеводов

Согласно методу Н.К. Кочеткова из горюхи ястребинковой травы были получены полисахаридные комплексы: водорастворимые полисахариды, пектиновый комплекс, гемицеллюлозы А, Б [78].

Выделение водорастворимого полисахаридного комплекса

Для выделения комплекса водорастворимых полисахаридов горлюхи ястребинковой травы первоначально вели экстракцию сырья спиртом этиловым 70% для удаления фенольных соединений [26, 29, 62, 66].

К полученному и высушенному шроту (50,0 г), помещенному в колбу объемом 2 л, приливали горячую воду очищенную (1:20), колбу помещали на кипящую водяную баню и нагревали 2 часа при постоянном перемешивании. Повторную экстракцию водорастворимого полисахаридного комплекса проводили еще дважды, каждую по 1 часу, в соотношении сырья и экстрагента 1:10. После этого шрот сырья посредством центрифугирования был отделен от извлечения, а извлечения объединены и сгущены до получения 1/5 от изначального объема. Далее с целью очистки пропускали объединенное извлечение через воронку Бюхнера с диаметром 20 см и высотой полиамидного слоя сорбента 4 см. Через сорбент пропускали небольшие объемы воды очищенной, которые были добавлены к основному извлечению. Из извлечения выделяли полисахариды осаждением их спиртом этиловым 96% (3 объемами). Полученный осадок отфильтровывали, промывали спиртом этиловым 70%, далее 96% и ацетоном. После указанных процедур его высушивали.

Выделение комплекса пектиновых веществ

Для выделения пектиновых веществ использовали смесь кислоты щавелевой и аммония оксалата 0,5% растворов из шрота, после получения водорастворимого комплекса при нагревании на кипящей водяной бане 2 часа при соотношении 1:20. Экстрагирование пектиновых веществ проводили еще два раза, используя соотношение 1:10. Полученные кислые извлечения объединяли, далее концентрировали и подвергали диализу, а затем приливали спирт этиловый 96%, используя соотношение 1:5 для их осаждения [19, 30, 66].

В дальнейшем проводили фильтрование образовавшегося осадка, в качестве промывной жидкости был использован 96% спирт этиловый. Осадок, полученный на фильтре, высушивали, далее взвешивали.

Получение гемицеллюлозы А и Б

После получения пектинового комплекса из оставшегося шрота получали гемицеллюлозы А и Б. Шрот помещали в колбу, к нему прибавляли натрия гидроксид 10% (5 объемов) и оставляли на 12 часов в обычной комнате. Реакционную смесь фильтровали через марлю (4 слоя), и из фильтрата выпадал осадок гемицеллюлозы А при добавлении кислоты уксусной (2 объема). Осадок отфильтровывали на фильтре под вакуумом, далее высушивали и взвешивали (гемицеллюлоза А). Фильтрат использовали для выделения гемицеллюлозы Б путем добавления спирта этилового 96 % (2 объема), отделения осадка, высушивания и взвешивания его [30, 78].

2.3.2 Исследование состава моносахаридов

Для исследования моносахаридного состава, составляющего основу полисахаридных комплексов, использовали нисходящую и восходящую бумажную хроматографию. Комплексы гидролизovali серной кислотой, а далее хроматографировали [30, 141, 142]. Для проведения гидролиза точные навески полисахаридных комплексов выдерживали в сушильном шкафу в зависимости от группы полисахаридов: водорастворимые полисахариды оставляли на 6 часов, пектиновый комплекс на 20-24 часа, гемицеллюлозы на 48 часов. По окончании гидролиза гидролизаты нейтролизovali бария карбонатом, фильтровали и к ним приливали три или пять объёмов (для пектиновых веществ) спирта этилового 96% для осаждения полученных моносахаридов. Оставляли содержимое на 1-2 часа, а далее осадки

фильтровали, фильтраты упаривали до объема 0,5 мл (нейтральные сахара) и использовали для проведения хроматографии. Оставшиеся на фильтре осадки диспергировали 2,5 мл воды очищенной и прибавляли к ним катионит КУ-2 (H^+) до получения значений pH 3-4. Полученный раствор отфильтровывали и упаривали до объема 0,5 мл (кислые сахара).

Моносахаридный состав нейтральных сахаров исследовали методом нисходящей хроматографии на бумаге FN-1. В качестве подвижной фазы была использована : пиридин-вода-н бутиловый спирт (4:3:6), в качестве образцов сравнения - чистые для анализа нейтральные моносахариды [Бубенчикова, 2011, Степаненко, 1977, Степаненко, 1978, Чушенко, 1980]. Состав кислых моносахаров исследовали восходящей хроматографией на бумаге FN-5. В качестве подвижной фазы выступала смесь кислоты муравьиной-воды-кислоты уксусной-этилацетата (1:4:3:18), в качестве образцов сравнения – галактуронозная и глюкуронозная кислоты [30, 33, 141, 142, 159].

2.3.3 Анализ количественного содержания моносахаров

Количественный анализ сахаров, входящих в состав изучаемых полисахаридов исследовали методом денситометрии, в основе которого лежит проведения гидролиза и последующее разделение полученных моносахаров тонкослойной хроматографией [30, 33, 150].

Точные навески (0,05 г) исследуемых комплексов гидролизировали в сушильном шкафу при температуре 100-105°C по времени, указанному в разделе 2.3.2. Используя бария карбонат, создавали нейтральную среду, подтверждая это при помощи универсального индикатора. Полученную смесь фильтровали и в фильтрате определяли содержание нейтральных сахаров упариванием его до объема 1 мл и осаждением спиртом этиловым 96% (10 мл). Полученный осадок отфильтровывали на фильтре. Полученный водно-спиртовой фильтрат упаривали до сухого остатка, который растворяли

прибавлением воды очищенной (2,5 мл). Растворенный остаток в виде раствора помещали в пикнометр (5 мл) и доводили объем раствора до 5 мл водой очищенной. К осадку на фильтре приливали воду очищенную, проводя диспергирование осадка. После этого, содержимое доводили до значений pH 3-4 прибавлением катионита КУ-2 (H^+). Смесь фильтровали, затем фильтрат подвергали упариванию до получения сухого остатка. Раствор, полученный после добавления воды очищенной к сухому остатку, содержащему кислые моносахариды, вносили в пикнометр объемом 5 мл и объем в пикнометре доводили до 5 мл водой очищенной. Полученный раствор (0,025 мл) наносили на хроматографическую пластинку «Sorbfil» и параллельно наносили растворы известных нейтральных и кислых моносахаров. В качестве подвижной фазы выступала: уксусная кислота- н.бутиловый спирт- вода очищенная (1:1:3). По окончании хроматографирования хроматограмму вынимали, высушивали и подвергали обработке анилиндифениламинофосфатным реактивом. После обработки хроматограмму снова сушили, помещали в термостат, где выдерживали 10 минут. На хроматограмме проявлялись синие, коричневые, голубовато-зеленые пятна моносахаров, концентрацию которых определяли денситометрически (денситометр ERi фирмы «Карл Цейс Йена») [150].

2.3.4 Анализ функциональных групп пектинов

Обнаружение функциональных групп пектиновых веществ проводили методом титриметрии и их содержание выражалось в процентах [19, 118].

Определение свободных карбоксильных групп пектиновых веществ из горлюхи ястребинковой травы проводили титрованием раствором натрия гидроксида 0,1 моль/л до красного окрашивания, индикатором служил реактив Хинтона.

Метоксилированные карбоксильные группы определяли в том же растворе, который был получен после определения свободных карбоксильных групп, для чего к нему приливали 10 мл 0,5 моль/л раствора натрия гидроксида для их

омыления (2 часов). После их омыления к раствору прибавляли 0,5 моль/л хлористоводородной кислоты (10 мл), при этом наблюдали желтую окраску. В результате образовался избыток кислоты, который оттитровывали натрия гидроксидом (0,1 моль/л) до появления красной окраски вместо жёлтой.

Далее проводили суммирование свободных и метоксилированных карбоксильных групп для получения общего содержания карбоксильных групп.

Далее, используя результаты титриметрического исследования рассчитывали содержание метоксильных групп и степень метоксилированности (этерификации) [19, 118].

2.4 Испытание сырья горлюхи ястребинковой по определению числовых показателей

2.4.1 Исследование содержания влаги

Влажность горлюхи ястребинковой травы устанавливали в соответствии с ГФ XIII. В основе определения влажности лежит высушивание сырья до постоянной массы [45].

2.4.2 Исследование содержания золы

Общую золу и золу, не растворимую в растворе кислоты хлористоводородной (10%) травы горлюхи ястребинковой устанавливали в соответствии с ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте». В основе определения золы лежит сгорание сырья с последующим прокаливанием до постоянной массы.

При определении золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной, к остатку после определения золы общей прибавляли кислоту хлористоводородную (15 мл) с дальнейшим промыванием фильтра водой,

сжиганием фильтра, и прокаливанием полученного остатка до постоянной массы [45].

2.4.3 Исследования по определению экстрактивных веществ

Экстрактивные вещества определяли в соответствии с методикой ГФ XIII издания. Содержание их выражали количественно в виде сухого остатка (в процентах). При определении экстрактивных веществ использовали различные экстрагенты: воду очищенную, спирт этиловый 30%, 50%, 70%, 96% [45].

2.5 Исследование морфолого-анатомических признаков для определения подлинности сырья

Сырье горюхи ястребинковой было исследованно по морфологическим и микродиагностическим признакам для чего использовали гербарные образцы, а так же свежее и высушенное сырьё, которые заготавливали в Курской, Орловской, Белгородской областях в фазу цветения растений начиная с 2015 по 2018 годы согласно общепринятых методов ГФ XIII издания [45].

Микрофотографии были получены при использовании цифровой насадки, которую соединяли с лабораторным микроскопом «Биолам С-11». Полученные фотографии были отредактированы с применением программы Adobe Photoshop Lightroom 2.4 для получения более четкого и наглядного изображения.

2.6 Проведение фармакологического скрининга

В фармакологическом скрининге приняли участие следующие животные: белые беспородные крысы с массой 180,0-220,0 г, белые беспородные мыши с массой 18,0-20,0 г.

Экспериментальные фармакологические исследования проводили по принятым документам "Об утверждении правил лабораторной практики" (МЗ РФ, приказ № 267 от 19 июня 2003 г.), а также с учетом правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA Panel on Euthanasia JAVMA, 2001).

2.6.1 Острая токсичность настоя

Острую токсичность определяли при использовании белых беспородных мышей обоего пола, масса которых составила от 18,0-20,0 г. В качестве водного извлечения из горлюхи ястребинковой был приготовлен настой в соответствии с ГФ XIII, при соотношении сырье – экстрагент (1:10). Полученный настой вводили внутривентриально однократно, используя объемы 0,2 - 1 мл, что в переводе на дозы составляет 1 г/кг - 5 г/кг (рассчитывали на сухое сырье). Каждая группа животных (в группе по 6 животных) наблюдалась в течение суток (24 часа) при стандартной температуре и пищевом режиме [128, 129, 130, 136].

2.6.2 Противовоспалительная активность настоя

Противовоспалительная активность настоя из травы горлюхи ястребинковой была изучена в соответствии с методическими рекомендациями по изучению противовоспалительных свойств, при этом учитывали влияние настоя на различные стадии воспалительного процесса [40, 128, 129, 136, 156].

Влияние настоя на экссудативные процессы

При изучении антиэкссудативных свойств настоя, полученного из сырья горлюхи ястребинковой, использовали 2,5% водный раствор формальдегида (в

объеме 0,05 мл), который вводили в заднюю лапу мыши для моделирования острого воспалительного отека [128, 136].

В опыте использовали мышей примерно одинакового веса (18,0-20,0 г), которых разделили на две группы. Одна группа мышей получала настои из травы горлюхи, который вводили внутривентрально. Для приготовления настоя использовали соотношение сырье – вода 1:10. Доза вводимого настоя 1 г/кг сухого сырья горлюхи ястребинковой на массу тела мыши.

Животные тестируемой группы получали настой вначале за 2 часа до введения формальдегида, а затем по прошествии 5 часов и последнее введение было по прошествии 18 часов после его введения. Мыши контрольной группы в таком же порядке получали эквивалентное количество воды очищенной.

Экссудативное воспаление индуцировали при сублантарном введении 0,05 мл 2,5% раствора формалина в левую заднюю конечность мыши. Измерение веса воспаленной и невоспаленной конечностей проводили через 1 сутки, когда животных забивали и отрезали обе конечности (левую и правую). Измерение противовоспалительного отека проводили при расчете в разнице веса левой (воспаленной) и правой (невоспаленной) конечностей. Расчет противовоспалительного эффекта проводили на основании данных разницы веса отека конечностей у мышей тестируемой и контрольной групп. В качестве препарата сравнения выступала ацетилсалициловая кислота, ее доза составила 300 мг/кг.

Влияние настоя на процессы пролиферации

Исследование пролиферативной активности проводили на белых лабораторных беспородных крысах, которых делили на 3 группы (в каждой по 6 крыс); 2 группы тестируемые, из которых одной вводили настой, другой препарат сравнения индометацин; 3-я группа была контрольной [68, 129, 136].

Крысам выстригали шерсть в области спины и проводили операцию по разрезанию кожи и подкожной клетчатки, в которых делали полость для

внесения в нее простерилизованного и взвешенного ватного шарика, массой 25 мг. После помещения шарика в полость рану зашивали накладыванием 1-2 швов. Крысам первой тестируемой группы после операции в течение 7 дней вводили настой горлюхи ястребинковой травы (доза 1 г/кг). Вторая тестируемая группа получала препарат сравнения, который был представлен индометацином в дозе 6 мг/ кг. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество воды очищенной 7 дней. После введения исследуемых препаратов в течение указанного времени шарик, а так же образовавшуюся вокруг него грануляционно-фиброзную ткань извлекали и высушивали при 55-60°C до постоянной массы.

Вес грануляционно-фиброзной ткани устанавливали, рассчитывая разницу между весом высушенной грануляционно-фиброзной массы вместе с шариком и первоначальным весом имплантированного шарика.

2.6.3 Антиоксидантная активность

2.6.3.1 Определение антиокислительной активности

Антиокислительную активность горлюхи ястребинковой определяли с использованием методики, в основе которой лежит химическая реакция, возникающая при взаимодействии биологически активных веществ восстанавливающего характера, содержащихся в сырье горлюхи ястребинковой и калия перманганата [112, 146].

Исследуемые извлечения из горлюхи травы (спиртовое, водное и водно-спиртовые извлечения) получали в соответствии с требованиями для получения настоев в соответствии с ГФ 13 издания [45]. Для установления антиоксидантной активности использовали 8 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды очищенной, которую помещали в стаканчик вместимостью 50 мл, добавляли в него же 1 мл кислоты серной 20% и 1 мл калия перманганата 0,05 Н раствора. Содержимое колбы титровали извлечениями,

приготовленными из горлюхи ястребинковой травы различными экстрагентами до тех пор, пока не исчезнет розовая окраска. Расчет показателя антиоксидантной активности проводили в пересчете на флавоноидные соединения, известные своей антиоксидантной активностью: рутин, цинарозид, кверцетин (мг/мл) и рассчитывали по соответствующей формуле.

2.6.3.2 Определение антиоксидантной активности

Определение антиоксидантной (антирадикальной) активности проводили методом, в основе которого лежит реакция ДФПГ (2,2 – дифенил – 1 – пикрилгидразила) с антиоксидантом [5, 7]. При проведении реакции ДФПГ восстанавливается антиоксидантом, содержащимся в извлечении, и этом снижается его пурпурно – синяя окраска. Контроль реакции осуществляется спектрофотометрически по снижению оптической плотности в области максимума поглощения при 517 нм [7, 84, 102, 158].

Для приготовления раствора ДФПГ (Sigma - Aldrich) использовали спирт этиловый 96%, готовили раствор 5×10^{-4} М, рабочий раствор получали разведением первоначального раствора в соотношении 1:10, для получения оптической плотности рабочего раствора не выше 0,9 при длине волны 520 нм. К рабочему раствору (1 мл, 2 мл, 3 мл) прибавляли извлечение, полученное из горлюхи ястребинковой травы экстракцией спиртом этиловым 70%, в объемах: 3,0 мл, 2,0 мл и 1,0 мл, перемешивали, содержимое выдерживали 30 минут, а далее измеряли оптическую плотность полученного раствора при 520 нм. Контролем служил раствор ДФПГ без добавления извлечения (антиоксиданта). Далее рассчитывали антирадикальную активность.

2.6.4 Антимикробная активность

Антимикробную активность настоя и пектиновых веществ из горюхи ястребинковой травы исследовали на кафедре микробиологии КГМУ под руководством доцента О.Д. Печенина. Настой готовили традиционно (1:10), а из пектиновых веществ готовили 1% водный раствор. Исследование проводили на наборе стандартных индикаторных штаммов микроорганизмов. Экспериментальные исследования по изучению антибактериальной активности проводили путём внесения на питательный агар различных разведений исследуемого настоя и пектиновых веществ с последующим посевом на поверхность застывшего агара взвеси микроорганизмов.

Для этого исследуемый настой и раствор пектиновых веществ разводили, используя стерильный расплавленный и остуженный (до 50°C) питательный агар (готовили разведения в различных соотношениях 1:2, 1:4, 1:10). Приготовленные разведения разливали в стерильные чашки Петри и оставляли на 2 часа. Поверхность агара делили на сектора после его застывания и в каждый сектор вносили бактериологической петлей штриховым методом взвесь суточных культур, содержащих 100 млн микробных тел. Контролем служили те же тестовые культуры, но без изучаемых фитокомплексов. Чашки Петри после посева культур инкубировали в термостате на протяжении 24 часов или 48 часов. Результаты учитывали визуально: отсутствие роста, появление слабого роста и интенсивный рост [56, 67, 119, 123].

2.7 Технологические исследования и анализ лекарственных средств

Лекарственные растительные средства получали согласно общим правилам, используемым в фармацевтической технологии, при получении жидких экстрактов и водных извлечений.

При приготовлении жидкого экстракта изучены:

- технологические свойства сырья: измельченность, влажность, коэффициент спиртопоглощения [121, 140];
- проведен выбор оптимального экстрагента [52, 140];
- проведен выбор способа экстрагирования [72];

Анализ полученного жидкого экстракта проводили в соответствии с ГФ XIII издания, используя следующие характеристики: внешний вид, тяжелые металлы, сухой остаток, содержание спирта этилового, содержание действующих веществ [45].

В соответствии с общей фармакопейной статьей «ОФС 1.4.1.0018.15. Настои и отвары» получали настой и проводили его стандартизацию [45].

2.8 Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка экспериментальных исследований проведена по ГФ XIII издания. Обработка данных осуществлялась при использовании пакетов программы Microsoft, Excel 7,0. Уровень значимости $p < 0,05$ позволил считать установленные различия статистически значимыми [45].

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ГОРЛЮХИ ЯСТРЕБИНКОВОЙ ТРАВЫ И СОДЕРЖАНИЯ

Приведенный обзор литературы показывает, что химический состав горлюхи ястребинковой изучен ограниченно и в основном зарубежными учеными. Ими были исследованы сесквитерпеновые лактоны и тритерпеновые соединения. Итальянскими учеными был изучен состав минерального комплекса травы. В связи с вышесказанным является потенциально перспективным изучение состава горлюхи ястребинковой, широко произрастающей на территории Российской Федерации, в том числе и в областях Центрального Черноземья.

Превосходно нами был проведен фитохимический анализ на содержание биологически активных веществ, содержащихся в траве горлюхи ястребинковой (глава 2, раздел 2.2). Проведенный фитохимический анализ показал, что комплекс биологически активных веществ горлюхи ястребинковой травы включает: жирные кислоты, каротиноиды, сесквитерпеновые лактоны, фенольные соединения, углеводы, органические кислоты, азотсодержащие соединения, тритерпены, минеральные элементы. Проведено определение их содержания.

3.1 Исследование каротиноидов

Для качественного определения каротиноидов использовали гексановое извлечение. Каротиноиды исследовали с использованием метода хроматографии (восходящей) на пластинке «Sorbfil», в качестве системы растворителей применяли гексан – ацетон (8:2) (глава 2, раздел 2.2.2).

В результате на хроматограмме появилось 4 пятна желтой окраски, которые были отнесены к каротиноидам (R_f 0,03; R_f 0,31; R_f 0,72; R_f 0,92). В

сравнении со стандартным образцом (фирмы Dr. Ehrenstorfer) идентифицирован β -каротин.



R_f 0,92

R_f 0,72

R_f 0,31

R_f 0,03

Рисунок 2 – Фотография пластинки «Sorbfil» после хроматографического исследования;

А – гексановое извлечение из травы горлюхи ястребинковой
Б – стандартный образец β – каротина (Dr. Ehrenstorfer)
Система растворителей:
гексан – ацетон (8:2)

Количественный анализ каротиноидов, проведенный с использованием спектрофотометрического метода, показал содержание $13,03 \pm 0,57$ мг%.

3.2 Качественное и количественное содержание сесквитерпеновых лактонов

Сесквитерпеновые лактоны определяли с помощью хроматографии, использовали пластинки «Sorbfil» и систему растворителей: толуол – этилацетат (93:7) (глава 2, раздел 2.2.3). В качестве проявителя использовали ванилин-серноокислый реактив, в результате чего установлено наличие 7 соединений, окраска которых варьировала от розовой до фиолетовой, синей, которые были отнесены к сесквитерпеновым лактонам (рисунок 3).



Rf=0,78

Rf=0,77

Rf=0,62

Rf=0,36

Rf=0,28

Rf=0,21

Rf₁ =0,08

Рисунок 3 - Фотография тонкослойной хроматограммы водно-спиртового извлечения из травы горлюхи ястребинковой (различные концентрации)

Система растворителей:
толуол-этилацетат (93:7)

Анализ количественного содержания лактонов (глава 2, раздел 2.2.4) позволил установить их содержание, которое в траве горлюхи ястребинковой составило $0,04 \pm 0,002\%$.

3.3 Качественное и количественное определение жирных кислот

Жирным кислотам предается все большее значение. Им отводится значительная роль в обмене веществ, функционировании различных систем организма: иммунной, центральной нервной [55]. Для них характерно наличие антисклеротического, антиоксидантного действия [179, 49, 34]. Жирные кислоты предотвращают развитие возрастного окислительного стресса [143]. Исследование жирных кислот позволит также выявить неизученные биологически активные вещества исследуемого растения.

В результате качественного анализа жирных кислот (глава 2, раздел 2.2.4), установлено наличие 17 жирных кислот (таблица 2, рисунок 4).

Таблица 2 – Содержание жирных кислот (качественное и количественное) в траве горлюхи ястребинковой

№ п/п	Тривиальное название	Систематическое название (IUPAC)	IUPAC формула	Время удерживания	Содержание кислоты (мг/кг)	Доля от суммарного содержания жирных кислот
1.	Капроновая кислота	Гексановая	C6:0	5,775	19,81±0,45	0,21%
2.	Лауриновая кислота	Додекановая	C12:0	20,021	295,18±4,55	3,14%
3.	Миристиновая кислота	Тетрадекановая	C14:0	24,226	867,79±6,63	9,25%
4.	Пентадециловая кислота	Пентадекановая	C15:0	26,085	108,45±2,16	1,15%
5.	Пальмитиновая кислота	Гексадекановая	C16:0	28,234	2479,38±10,66	26,40%
6.	Пальмитолеиновая кислота	Цис-9-гексадеценая	C16:1ω7	28,938	114,38±1,33	1,22%
7.	Маргариновая кислота	Гептадекановая	C17:0	29,863	76,10±1,12	0,81%
8.	Стеариновая кислота	Октадекановая	C18:0	31,629	279,56±1,83	2,98%
9.	Олеиновая кислота	Цис-9-октадеценая	C18:1ω9	31,889	347,39±4,22	3,70%
10.	Линолевая кислота	Цис, цис – 9,12 – октадекатриеновая	C18:2ω6	32,796	1543,87±9,14	16,45%
11.	α-Линоленовая кислота	Цис, цис, цис-9, 12, 15-октадекатриеновая	C18:3ω3	33,919	2354,65±6,50	25,10%
12.	2-оксипальмитиновая кислота	2-оксигексадекановая	C16:0	34,927	31,64±0,43	0,34%
13.	Арахидиновая кислота	Эйкозановая	C20:0	34,997	252,01±2,28	2,69%
14.	Генейкоциловая кислота	Хенейкозановая	C21:0	36,534	46,52±0,26	0,50%
15.	Бегеновая кислота	Докозановая	C22:0	38,067	333,90±3,74	3,56%
16.	Трикоциловая кислота	Трикозановая	C23:0	39,507	58,99±0,38	0,63%
17.	Лигноцериновая кислота	Тетракозановая	C24:0	41,008	170,24±1,33	1,81%

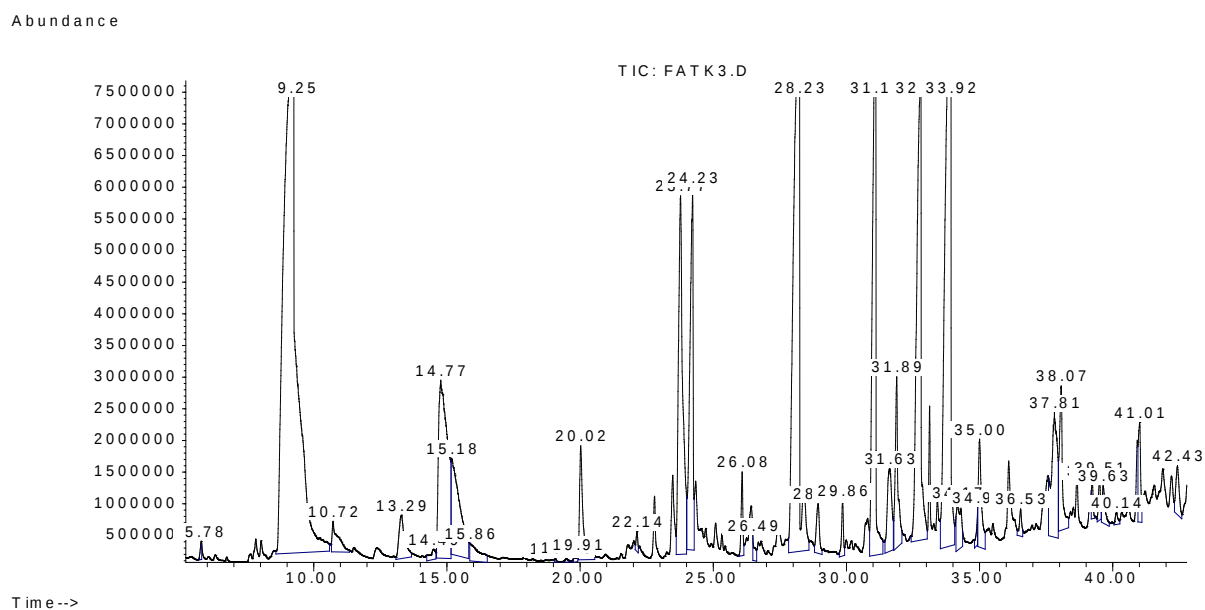


Рисунок 4 - Результаты газожидкостной хроматографии горлюхи ястребинковой травы

Результаты хроматографического анализа позволили установить в составе липидов горлюхи 17 жирных кислот с длинной углеродных цепей от 6 до 24 атомов. Жирные кислоты горлюхи разделились на насыщенные и ненасыщенные, среди которых преобладают насыщенные (53,51%). В комплексе насыщенных кислот доминируют пальмитиновая (26,40%) и миристиновая (9,25%) кислоты. Комплекс насыщенных кислот так же содержит кислоты, имеющие в своем составе 6, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24 углеродных атомов. Содержание указанных жирных кислот составляло небольшие количества и варьировало от 0,34% до 3,56%. Содержание ненасыщенных жирных кислот было значительным и составляло 46,48%. Ненасыщенные жирные кислоты представлены полиненасыщенными (41,65%) и мононенасыщенными, содержание которых незначительно. Полиненасыщенные жирные кислоты включают: линолевую (16,45%) и линоленовую (25,10%), которые являются эссенциальными кислотами и относятся к омега – 3 и омега – 6 кислотам. Горлюха ястребинковая может явиться источником омега – 3 жирных кислот, т.к. имеет низкий коэффициент полиненасыщенных жирных кислот (линолевая/линоленовая) [180]. В состав

мононенасыщенных жирных кислот входят олеиновая (3,70%) и пальмитолеиновая (1,22%) кислоты [23].

3. 4 Качественное содержание кумаринов

Определение кумаринов проведено в хлороформной фракции водно – спиртового извлечения из сырья горлюхи ястребинковой, которая явилась основой для определения кумаринов, которые были определены на пластинках «Sorbfil» при хроматографии в тонких слоях сорбента после проявления их 10% раствором натрия гидроксида (глава 2, раздел 2.2.6). На хроматограмме проявилось 2 вещества кумариновой природы, которые при сравнении со стандартными веществами идентифицированы как кумарин и скополетин (6 – метокси – 7 – оксикумарин) (рисунок 5).

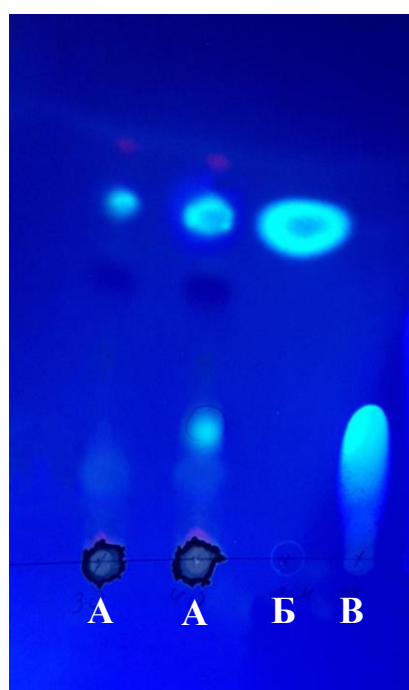


Рисунок 5 - Фотография тонкослойной хроматограммы хлороформной фракции водно-спиртового извлечения из травы горлюхи ястребинковой

А- хлороформная фракция травы горлюхи ястребинковой (различной концентрации)

Б – кумарин (Ph. Eur. Reference Standard)

В – скополетин (USP Certificate)

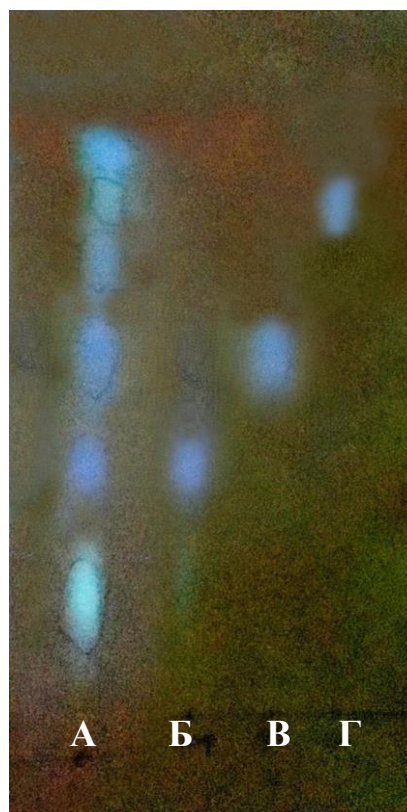
Система растворителей:

Бензол - этилацетат (2:1)

3.5 Качественный состав фенолкарбоновых кислот

Фенолкарбоновые кислоты травы горлюхи ястребинковой исследовали в этилацетатной фракции методом хроматографии на бумаге (глава 2, раздел 2.2.7). В траве горлюхи ястребинковой проявилось шесть пятен с голубой

флуоресценцией, имеющие: R_f 0,15, R_f 0,32, R_f 0,43, R_f 0,52, R_f 0,58, R_f 0,66, характерные для фенолкарбоновых кислот (рисунок 6). Идентификация со стандартными образцами кумаринов позволила установить в траве горлюхи ястребинковой наличие хлорогеновой, кофейной и феруловой кислот.



$R_f=0,66$
Хлорогеновая
кислота

$R_f=0,52$

Феруловая кислота
($R_f=0,43$)

Кофейная кислота
($R_f=0,32$)

$R_f=0,15$

А Б В Г

Рисунок 6 - Фотография бумажной хроматограммы этилацетной фракции водно – спиртового извлечения из травы горлюхи ястребинковой

А – этилацетатная фракция из травы горлюхи ястребинковой

Б – кофейная кислота (Dr. Ehrenstorfer GmbH)

В - феруловая кислота (Ph. Eur. Reference Standard)

Г - хлорогеновая кислота (Ph. Eur. Reference Standard)

Система растворителей: кислота уксусная 2%

Для более детального изучения фенолкарбоновых кислот исследовали их методом газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии (таблица 3).

Таблица 3 – Фенолкарбоновые кислоты травы горлюхи ястребинковой

№ п/п	Наименование кислоты	Время удерживания	Содержание фенолкарбоновых кислот (мг/кг)
1.	Салициловая кислота *	19,479	10,53±0,24
2.	Ванилиновая кислота *	34,165	154,68±3,12
3.	п-кумаровая кислота *	37,811	538,26±9,99
4.	п-оксибензойная кислота *	39,225	43,57±0,98
5.	Сиреневая кислота *	39,634	82,76±2,02
6.	Гентизиновая кислота *	40,136	24,31±0,38
7.	Феруловая кислота *	42,431	120,98±3,35

Примечание: * - данная кислота идентифицирована впервые

Таким образом, установлено, что фенолкарбоновые кислоты травы горлюхи ястребинковой представлены 7 соединениями, содержание которых варьирует от 10,53±0,24 мг/кг до 538,26±9,99 мг/кг. Максимальное накопление

отмечено для п-кумаровой ($538,26 \pm 9,99$ мг/кг), ванилиновой ($154,68 \pm 3,12$ мг/кг), феруловой ($120,98 \pm 3,35$ мг/кг) кислот.

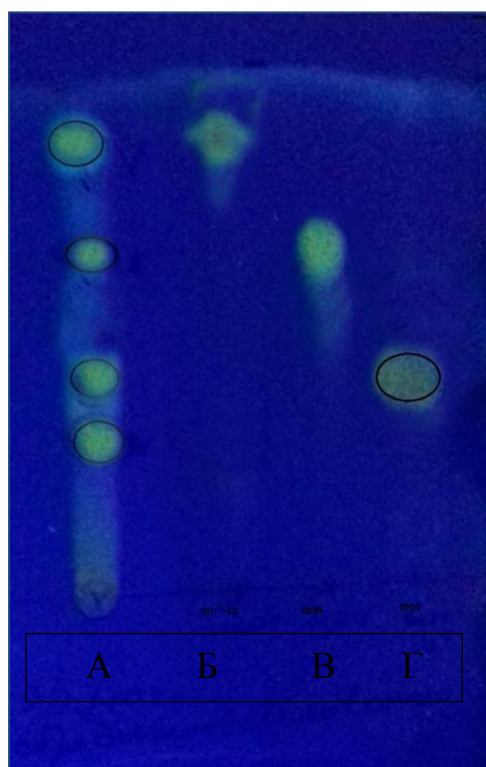
Все идентифицированные фенолкарбоновые кислоты в траве горлюхи ястребинковой были выявлены впервые.

3.6 Качественный состав и количественное содержание флавоноидов

Флавоноиды в траве горлюхи ястребинковой определяли с помощью известных качественных реакций, хроматографией на бумаге и методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ – МСД) (глава 2, разделы 2.2.8).

На основании качественных реакций в траве горлюхи ястребинковой установлено наличие флавоноидов: образовывалось красно – розовое окрашивание при проведении цианидиновой пробы; зеленовато-желтое окрашивание с раствором алюминия хлорида 2%; желтый осадок со свинца ацетатом; желтое окрашивание, имеющее желто-зеленую флюоресценцию с кислотой борной и кислотой щавелевой. Результаты цианидиновой реакции по Брианту позволили установить, что в траве горлюхи содержатся, как агликоны, так и гликозиды флавоноидов (окраска водного слоя, переходящая в октанол). Кирпично – красный осадок с жидкостью Фелинга подтверждает гликозидный характер флавоноидных соединений.

В результате хроматографии на бумаге (глава 2, раздел 2.2.8) в траве горлюхи ястребинковой установлено наличие четырех флавоноидных веществ с темной флюоресценцией в УФ – свете с R_f 0,28, R_f 0,40, R_f 0,64, R_f 0,82. В качестве хромогенного реактива использовали раствор циркония хлорокиси 2%, при этом окраска пятен флавоноидов изменялась с коричневого цвета желтый. Идентифицированные со стандартными образцами флавоноиды представлены: лютеолином, цинарозидом, апигенин – 7 - глюкозидом (рисунок 7).



Rf 0,82

Rf 0,64

Rf 0,40

Rf 0,28

А

Б

В

Г

Рисунок 7 – Фотография тонкослойной хроматограммы этилацетатной фракции водно – спиртового извлечения из травы горлюхи ястребинковой

А – этилацетатное извлечение
Б – апигенин – 7 – глюкозид (Phytolab)

В – цинарозид (Фитопанацея)

Г – лютеолин (Фитопанацея)

Система растворителей: кислота уксусная 3%

Анализ содержания флавоноидов проводили спектрофотометрической методикой, основу которой составляет реакция комплексообразования с алюминия хлоридом (глава 2, раздел 2.2.8), модифицированная нами. Содержание флавоноидов рассчитывали по стандартному образцу лютеолин-7-гликозида (цинарозида), используя при расчетах удельный показатель поглощения цинарозида с алюминия хлоридом [4, 11, 12, 13, 83].

Модификация методики включала два этапа: извлечение суммы флавоноидов, спектрофотометрирование извлечения с алюминия хлоридом.

На процесс извлечения флавоноидов влияют: измельченность сырья, используемый экстрагент и время экстракции. Результаты исследования влияния указанных факторов на количественное содержание флавоноидов показали, что они максимально извлекаются из сырья горлюхи ястребинковой, которое имеет степень измельчения 1,0 мм, экстрагентом выступает 70% спирт этиловый, время экстрагирования 75 минут (таблица 4).

Таблица 4 – Установленные условия экстракции для извлечения флавоноидов из сырья горлюхи

Установленные условия экстракции	Содержание флавоноидов, %
Измельченность сырья, мм	
1,0	0,78±0,03
2,0	0,74±0,03
3,0	0,58±0,02
Используемый экстрагент: спирт этиловый %	
30	0,44±0,02
50	0,46±0,02
70	0,95±0,04
96	0,41±0,01
Установленное время экстракции, мин (70% спирт этиловый, соотношение сырье-экстрагент 1:100)	
30	0,64±0,02
45	0,78±0,03
60	0,85±0,03
75	0,96±0,04
90	0,52±0,02

Извлечение флавоноидов осуществляли с помощью наступления равновесия [31, 34]. Для изучения условий извлечения флавоноидов из сырья горлюхи использовали кипящий спирт и соотношение сырье – растворитель 1:100 (таблица 4).

В процессе работы установлен максимум поглощения комплекса, образующегося при взаимодействии извлечения из горлюхи травы и алюминия хлорида, который находится в области 395 ± 2 нм. Для расчета содержания флавоноидов использовали удельный показатель поглощения флавоноида цинарозида с алюминия хлоридом, равный 345. Спектрофотометрирование вели в варианте дифференциальной спектрофотометрии.

Исследование устойчивости окрашивания комплексов, возникающих после взаимодействия с алюминия хлоридом, показало что устойчивое окрашивание устанавливается через 30 минут и сохраняется стабильным в течении 1 часа (таблица 5). Этого времени достаточно для проведения анализа.

Таблица 5 – Устойчивость окрашивания комплексов извлечений горюхи травы, после проведения реакции с алюминия хлоридом

Время после проведения реакции, мин	Оптическая плотность ($\lambda=395\pm 2\text{нм}$)
15	0,5680
30	0,5856
45	0,5923
60	0,5972
75	0,5304

После модификации методики количественного определения флавоноидов, нами изучено содержание флавоноидов в траве горюхи ястребинковой, произрастающей в различных областях (таблица 6) с использованием модифицированной методики.

Таблица 6 – Результаты определения флавоноидов

№ п/п	Район, область, год заготовки сырья	Метрологическая характеристика методики				
		X ср, %	S ²	S	Δx	Еотн, %
1	Курский р-н, Курская область, 2015 год	0,78	0,0001	0,01	0,03	3,85
2	Мценский р-н, Орловская область, 2016 год	0,61	0,00007	0,00837	0,02	3,28
3	Красногвардейский р-н, Белгородская область, 2016 год	0,97	0,00017	0,01304	0,04	4,12
4	Курский р-н, Курская область, 2016 год	0,70	0,00013	0,0114	0,03	4,29
5	Красногвардейский р-н, Белгородская область, 2017 год	0,85	0,00013	0,0114	0,03	3,53
6	Курский р-н, Курская область, 2017 год	1,27	0,00018	0,01342	0,04	3,15

Анализ результатов исследования показал, что содержание варьирует от $0,61\pm 0,02\%$ до $1,27\pm 0,04\%$ [22].

3.7 Исследование фенольных соединений методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ – УФ/МС)

Высокоэффективная жидкостная хроматография используется как один из эффективных методов экспресс-анализа. Для изучения состава фенольных соединений растительного сырья сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрией расширяет возможность данного метода и позволяет проводить разделение и идентификацию веществ, содержащихся в извлечениях из растительного сырья за короткое время.

При сочетании 2-х детекторов: УФ и масс-селективного и двух режимов сканирования: положительных ионов (APCI Pos. Scan) и отрицательных ионов (APCI Neg. Scan) возможно получить максимально информации о соединениях, содержащихся в исследуемом растении.

Анализу подвергались водно-спиртовые извлечения, а также этилацетатные, хлороформные фракции, полученные из травы горлюхи ястребинковой (глава 2, раздел 2.2.9).

При проведении расшифровки ВЭЖХ – УФ/МС хроматограмм с целью идентификации и установлении строения фенольных веществ были использованы: сравнение полученных времен удерживания веществ, УФ – и масс-спектров с таковыми данными стандартных веществ и литературными данными. При идентификации фенольных соединений за основу были взяты классические исследования [89, 188, 189, 204].

При исследовании водно-спиртовых извлечений нами идентифицированы фенолкарбоновые кислоты: галловая, хлорогеновая, кофейная, феруловая; флавоноиды: цинарозид, апигенин - 4' – глюкозид.

Для максимума на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) водно-спиртового извлечения со временем удерживания 3,70-3,77 имеется УФ-спектр, максимум поглощения которого находится при длине волны 225 нм (рисунок 8 б) и характеризующий фенолокислоты, а так же совпадающий с УФ-спектром стандартного образца галловой кислоты (фирмы Aldrich-Sigma) (рисунок 8 а).

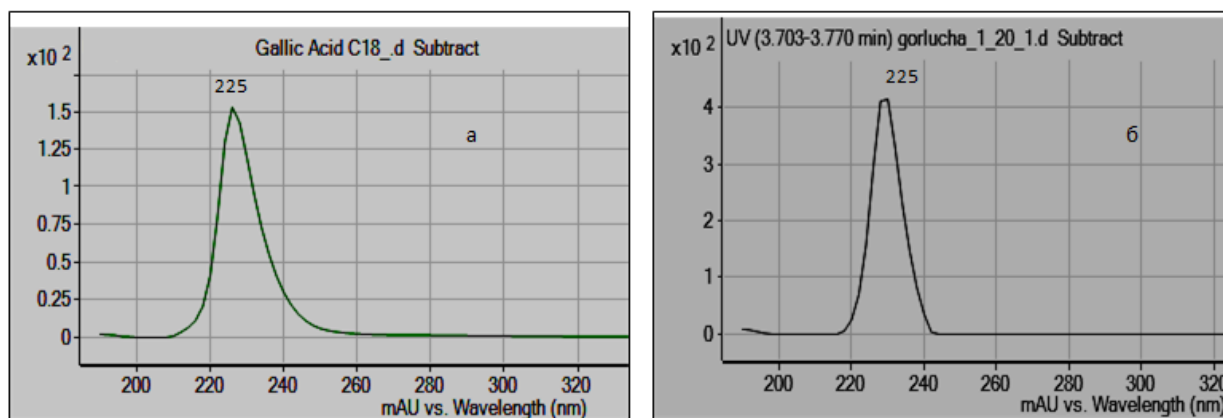


Рисунок-8 а – УФ – спектр стандартного образца галловой кислоты (Sigma-Aldrich); б - УФ – спектр соединения водно-спиртового извлечения горлюхи ястребинковой со временем удерживания 3,70÷3,77

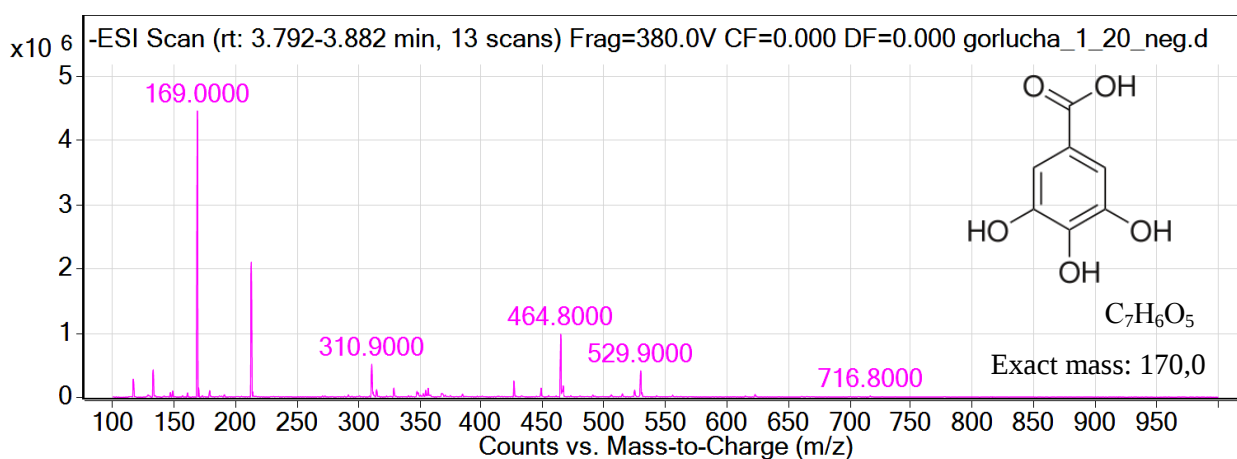


Рисунок-8 в – Масс-спектр соединения водно-спиртового извлечения горлюхи ястребинковой, имеющих в режиме ХИ АPCI, Neg. Scan. время удерживания 3,79-3,88

Регистрация в режиме ХИ АPCI Neg. Scan. показывает, что соединение имеет пик с m/z 169. В этом случае необходимо прибавить 1 к значению m/z (рисунок 8 в).

Таким образом, установлена молекулярная масса исследуемого вещества (м.м. 170) и с учетом данных максимумов поглощения в УФ-области спектра и сравнением со стандартным образцом данное соединение охарактеризовано как галловая (3,4,5-триоксибензойная) кислота.

Максимуму водно-спиртового извлечения на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) со временем удерживания 4,86÷5,04 соответствует УФ-спектр с максимумами поглощения 245 нм, 295 нм, 325 нм (рисунок 9 б), который

характеризует фенолкарбоновые кислоты и совпадает с УФ-спектром хлорогеновой кислоты (Ph. Eur. Reference Standard) (рисунок 9а).

Регистрация в режиме APCI Pos. Scan. показывает, что соединение имеет максимум молекулярного иона $[M]^+$ с $m/z = 352,9$ (рисунок 9 в). В масс-спектре присутствует максимум с $m/z 190,8$, который соответствует фрагменту молекулы, образуемому после отщепления остатка ($C_6H_{10}O_5^+$). В режиме ХИ APCI Neg. Scan. соединение так же дает основной ион с $m/z 352,8$.

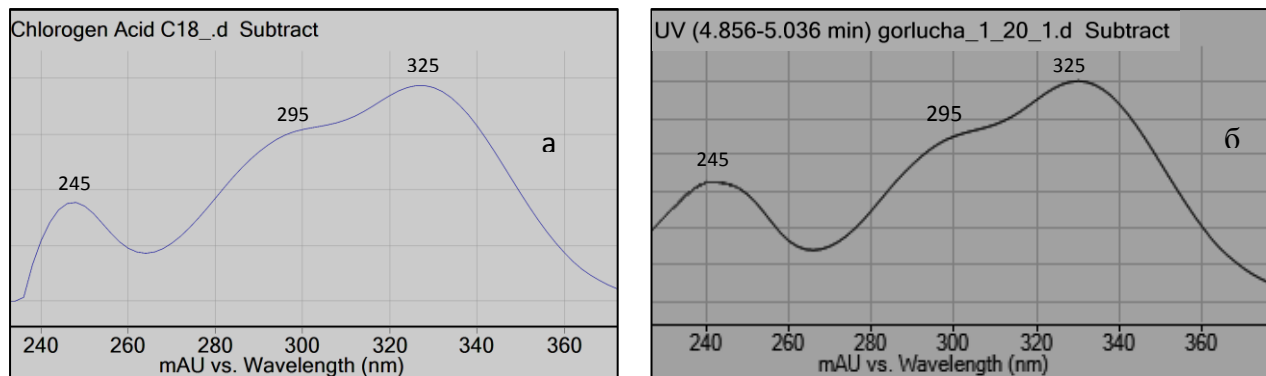


Рисунок-9 а – УФ – спектр стандартного образца хлорогеновой кислоты (Ph. Eur. Reference Standard); б - УФ – спектр вещества водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой со временем удерживания 4,86÷5,04

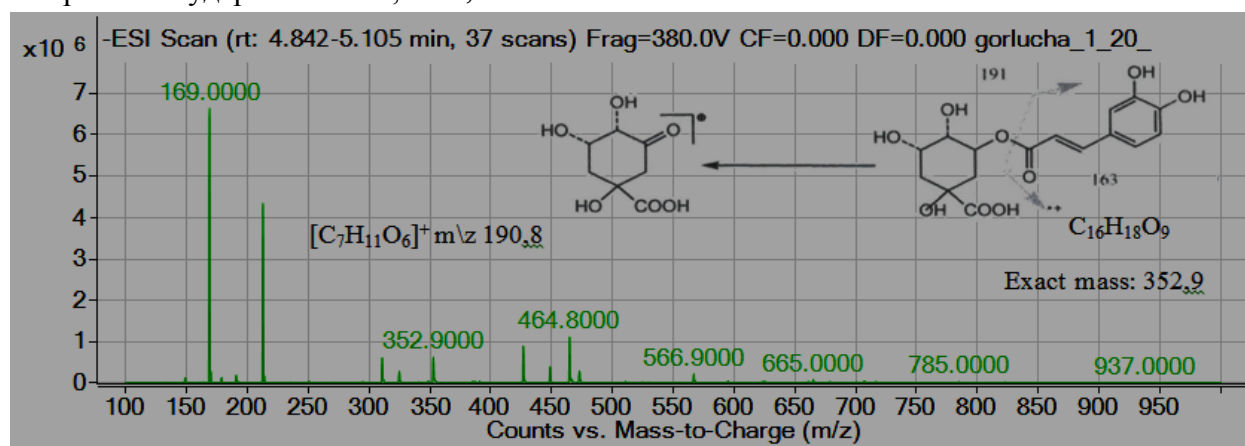


Рисунок-9 в – Масс-спектр соединения водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ APCI. Pos. Scan время удерживания 4,85-5,10

Проведенные исследования позволили получить точную информацию о величине молекулярной массы исследуемого вещества (м.м. 352,9) и совместно с данным максимумов поглощения в УФ-области спектра и сравнением со стандартным образцом позволили данное соединение идентифицировать как хлорогеновую (5-О-кофеил-D-хинную) кислоту.

Максимум водно-спиртового извлечения на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) со временем удерживания 7,87÷9,44, для которого характерны максимумы поглощения в области 240 нм, 295 нм, 325 нм (рисунок 10 б) характеризует фенолкарбоновые кислоты и соответствует максимуму поглощения кофейной кислоты (фирмы Dr. Ehrenstorfer GmbH) (рисунок 10 а).

Масс-спектр соединения, записанного в режиме APCI Neg. Scan. содержит пик псевдомолекулярного иона – $[M+H]^+$ с $m/z = 178,8$.

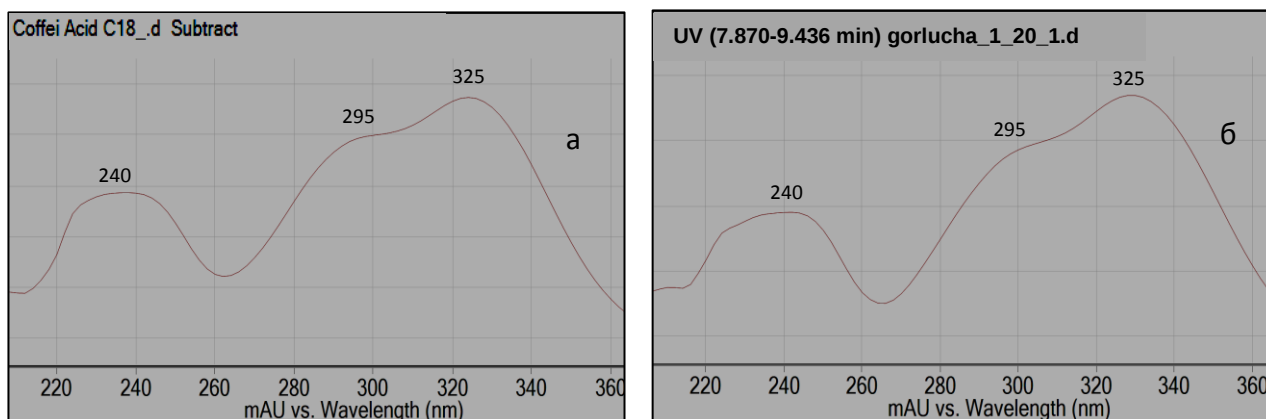


Рисунок-10 а – УФ – спектр стандартного образца кофейной кислоты (Dr. Ehrenstorfer GmbH); б - УФ – спектр вещества водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой со временем удерживания 7,87÷9,44

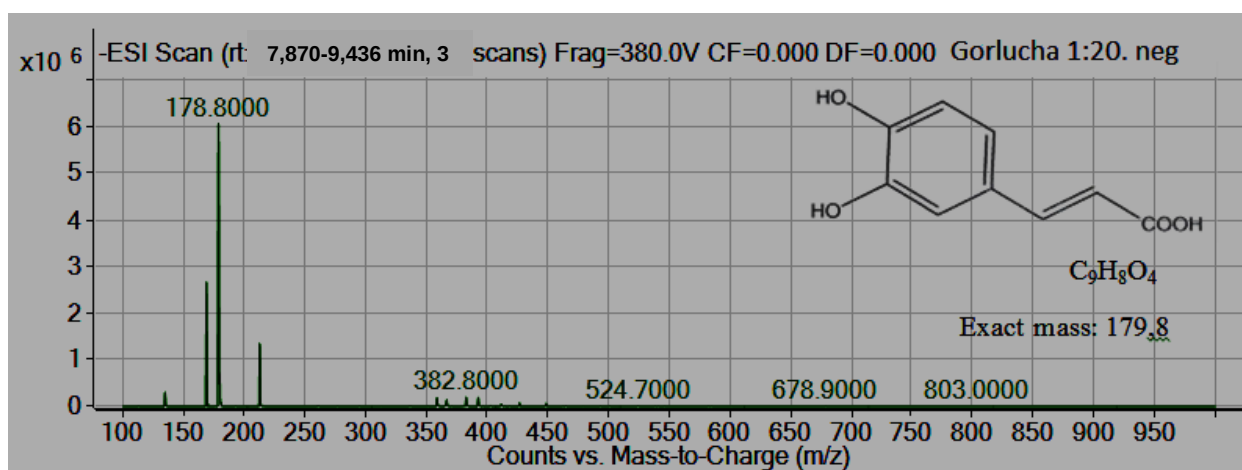


Рисунок-10 в – Масс-спектр соединения водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ APCI. Neg. Scan время удерживания 7,87÷9,44

Указанные спектры дали нам информацию о величине молекулярной массы исследуемого соединения (м.м. 179,8) (рисунок 10 в), а сочетание этих данных и максимумов поглощения в УФ-области спектра, а так же сравнение со

стандартным веществом с большой степенью достоверности исследуемое соединение идентифицировано как кофейная (3,4 –диоксикоричная) кислота.

Максимум водно-спиртового извлечения на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) со временем удерживания 11,14-12,47 и максимумами поглощения 230 нм, 296 нм, 325 нм (рисунок 11 б), соответствует максимуму поглощения феруловой кислоты (фирмы Ph. Eur. Reference Standard) (рисунок 11 а).

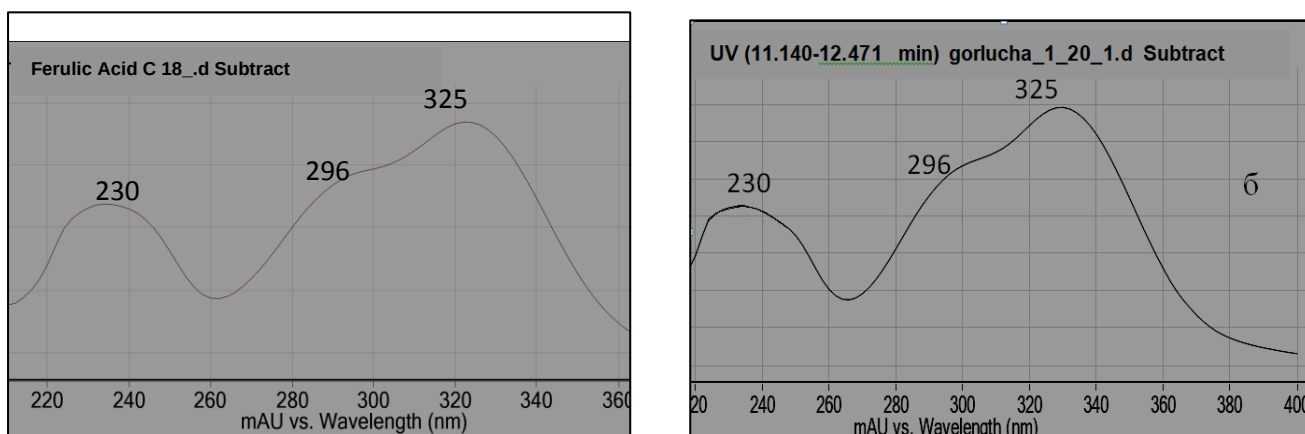


Рисунок-11 а – УФ – спектр стандартного образца феруловой кислоты (Ph.Eur.Reference Standard); б - УФ – спектр вещества водно-спиртового извлечения горлюхи ястребинковой со временем удерживания 11,14-12,47

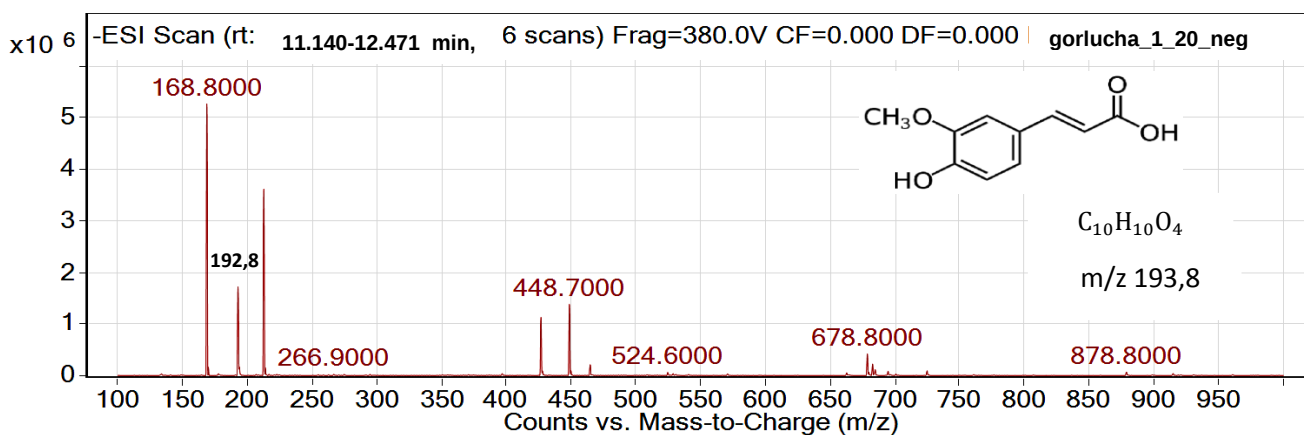


Рисунок-11 в – Масс-спектр соединения водно-спиртового извлечения горлюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ АPCI Neg. Scan. время удерживания 11,14-12,47

Регистрация ионов в режиме АPCI Neg. Scan. показывает, что вещество образует максимум с $m/z = 192,8$. Указанные спектры дали нам информацию о величине молекулярной массы исследуемого соединения (м.м. 193,8) (рисунок 11 в), а сочетание этих данных и максимумов поглощения в УФ-области спектра, а так же сравнение со стандартным веществом с большой степенью

достоверности исследуемое соединение идентифицировано как феруловая (4 – окси-3-метоксикоричная) кислота.

Максимуму водно-спиртового извлечения на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) со временем удерживания 36,38-38,60 соответствует УФ-спектр с максимумами поглощения 255 нм, 266 нм, 350 нм (рисунок 12 б) и он совпадает с УФ-спектром цинарозида (фирма «Фитопанацея») (рисунок 12 а).

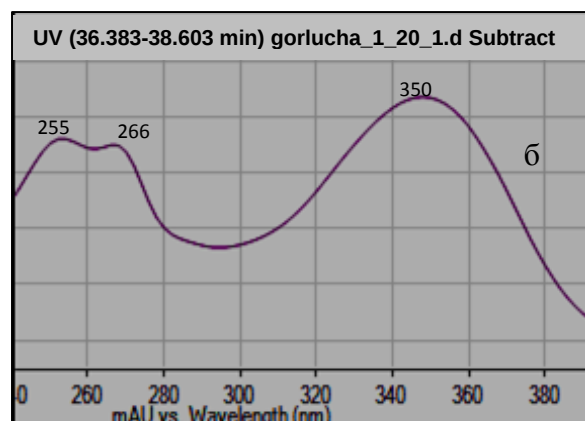
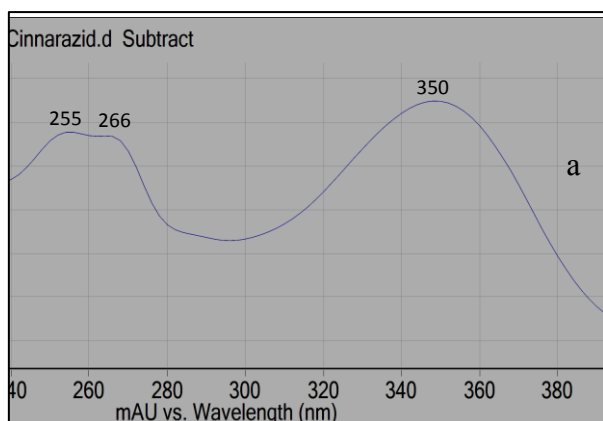


Рисунок 12 а – УФ – спектр стандартного образца цинарозида («Фитопанацея»); б - УФ – спектр вещества водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой со временем удерживания 36,38-38,60.

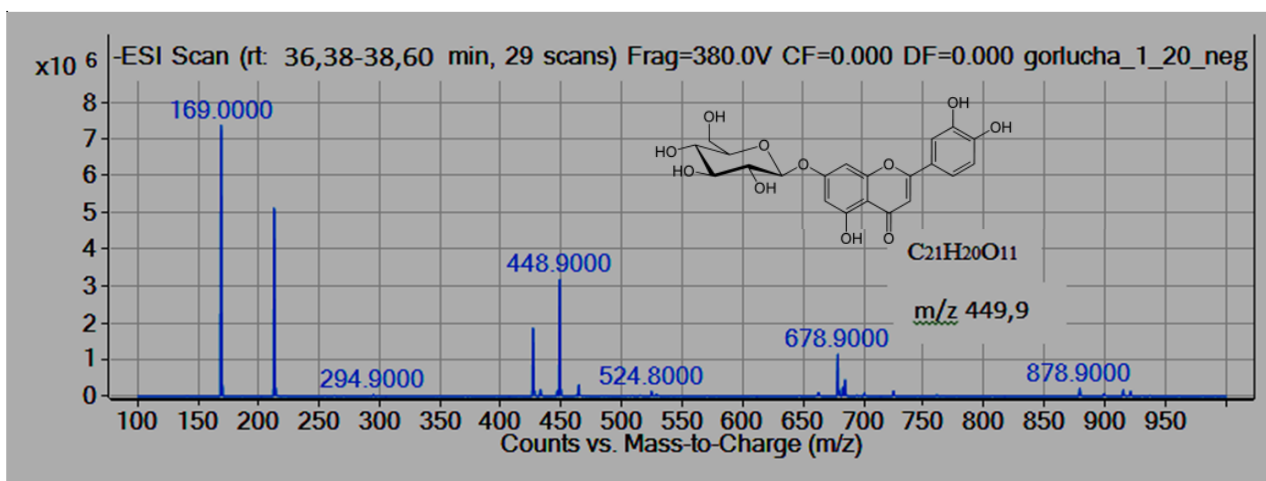


Рисунок-12 в - Масс-спектр соединения водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ АPCI Neg. Scan. время удерживания 36,38-38,60

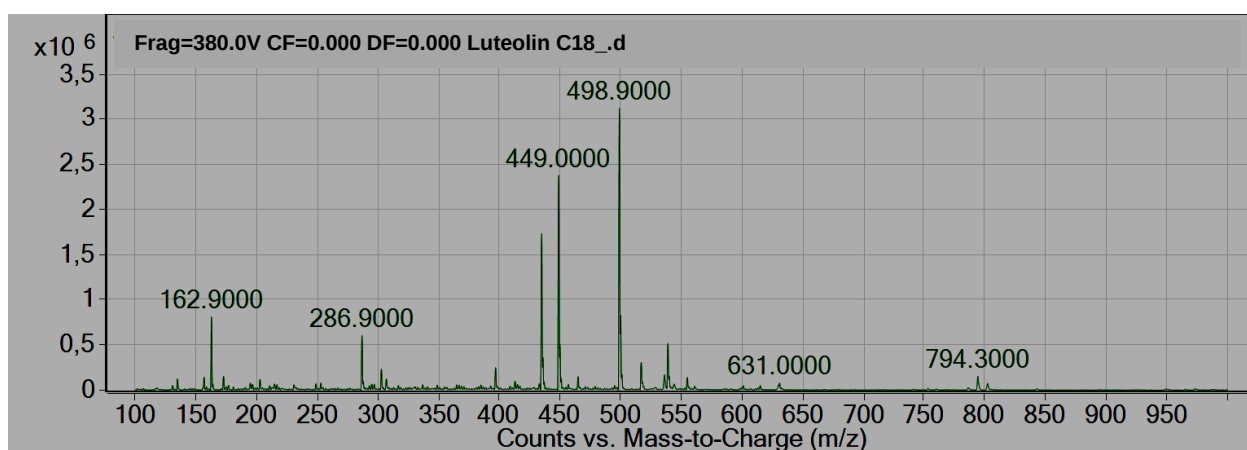


Рисунок-12 г - Масс-спектр фрагментации молекулярного иона стандартного образца лютеолина (фирма «Фитопанацея») в режиме ХИ АPCI Pos. Scan.

Регистрация в режиме АPCI Neg. Scan показывает присутствие максимума молекулярного иона с $m/z = 448,9$ (рисунок 12 в). В масс-спектре в режиме ХИ АPCI Pos. Scan присутствует максимум с $m/z = 286,9$ соответствующий фрагменту молекулярного иона лютеолина (рисунок 12 г). Таким образом, установлена молекулярная масса цинарозида (м.м. 449,9), а также природа его агликона (лютеолина, м.м. 286,9). В результате вещество охарактеризовано как лютеолин – 7 - О – β – D – глюкозид или цинарозид.

Максимуму водно-спиртового извлечения на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) со временем удерживания 74,39-77,47 соответствует УФ-спектр с максимумами поглощения 270 нм и 335 нм (рисунок 13б) и совпадает с УФ-спектром известного образца апигенин-4'-глюкозида (рисунок 13 а).

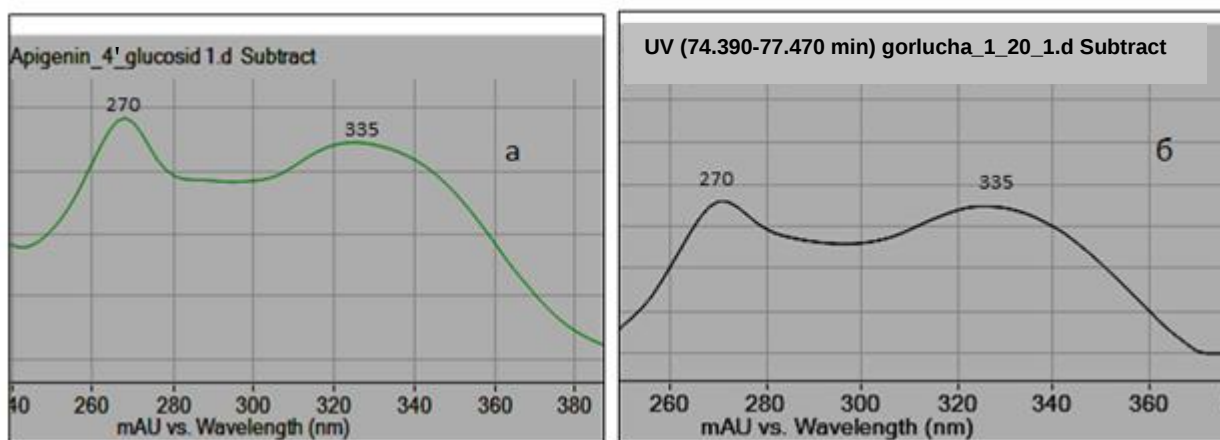


Рисунок-13 а – УФ – спектр известного образца апигенина-4'-глюкозида; б - УФ – спектр соединения водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой со временем удерживания 74,39-77,47

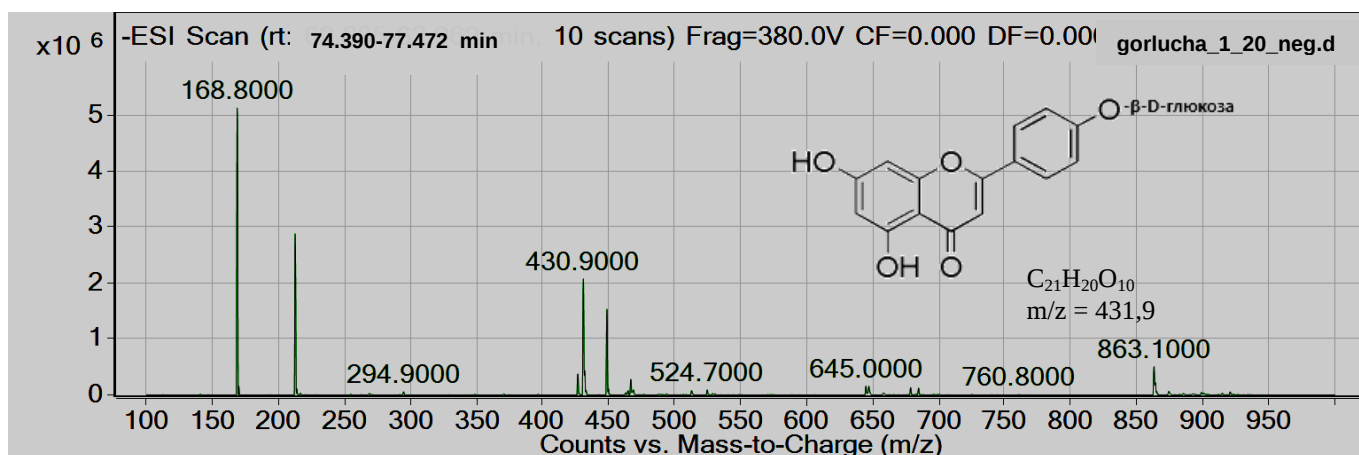


Рисунок-13 в-Масс-спектр соединения водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ APCI Neg. Scan. время удерживания 74,39-77,47

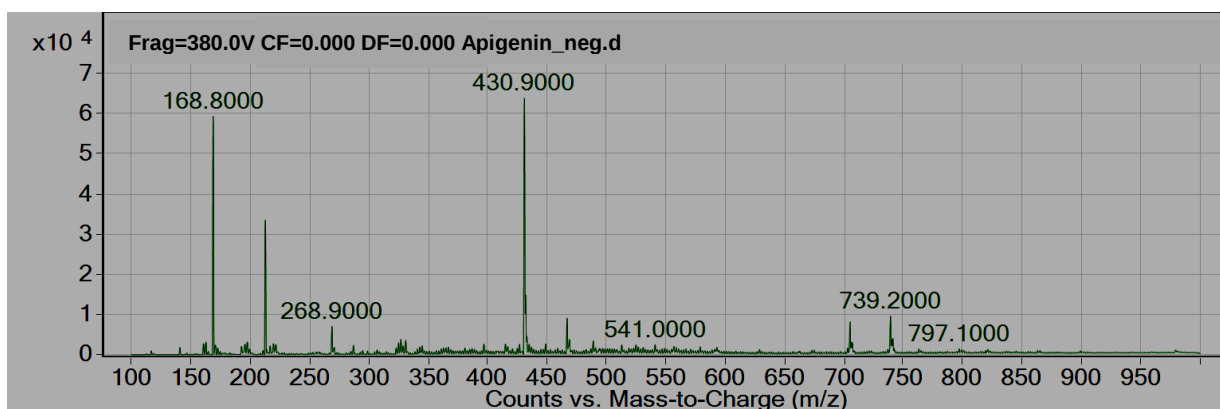


Рисунок-13 г - Масс-спектр стандартного образца апигенина (Phytolab) в режиме ХИ APCI Neg. Scan.

Регистрация в режиме APCI Neg. Scan. показывает присутствие максимума молекулярного иона с $m/z = 430,9$ (рисунок 13 в). Масс-спектр соединения в режиме ХИ APCI Neg. Scan. имеет максимум с $m/z = 268,9$, который соответствует фрагменту молекулярного иона апигенина (269,9) (рисунок 13 г). Таким образом, установлена молекулярная масса апигенин-4'-глюкозида (м.м. 431,9), а так же природе его агликона (апигенина, м.м. 269,9). Таким образом, данное соединение охарактеризовано как апигенин – 4' – O – β – D – глюкозид.

При исследовании этилацетатной фракции идентифицированы флавоноиды: кверцимеритрин, лютеолин, апигенин-7-глюкозид и п-кумаровая кислота.

Максимуму этилацетатной фракции на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) со временем удерживания 62,32-64,88 соответствует УФ-спектр с максимумом поглощения 258 нм, 370 нм (рисунок 14 б) и он совпадает с УФ-спектром известного образца кверцимеритрина (рисунок 14 а).

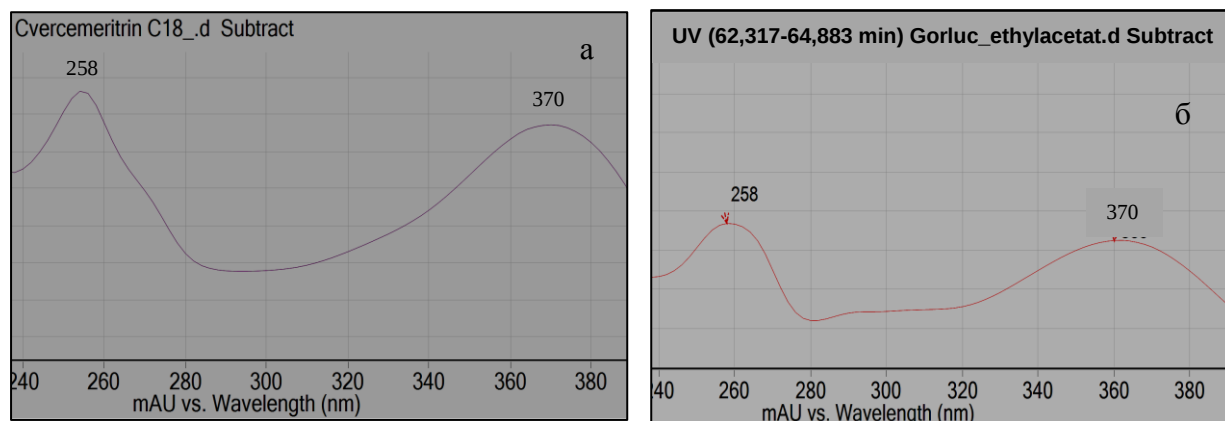


Рисунок-14 а – УФ – спектр известного образца кверцимеритрина; б - УФ – спектр вещества этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой со временем удерживания 62,32-64,88.

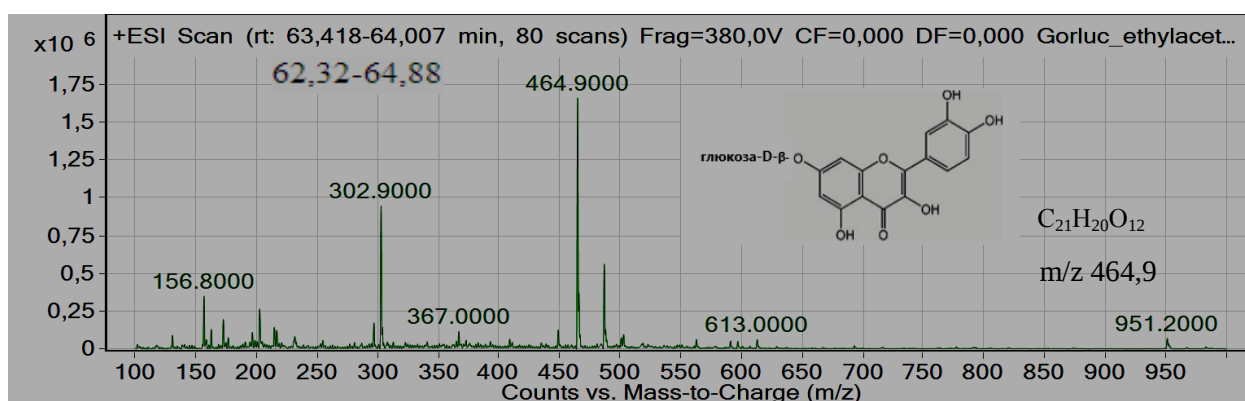


Рисунок-14 в - Масс-спектр соединения этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ АPCI Pos. Scan. время удерживания 62,32-64,88

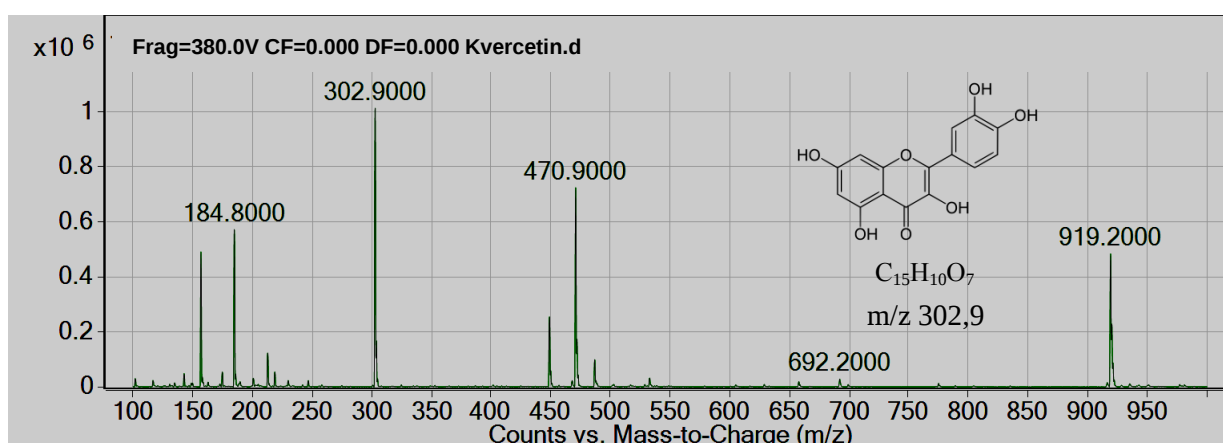


Рисунок-14 г – Масс-спектр фрагментации молекулярного иона стандартного образца кверцетина (USP Reference Standard) в режиме ХИ АPCI Pos. Scan.

Регистрация в режиме APCI Pos. Scan. показывает, что исследуемое соединение имеет максимум с $m/z = 464,9$ (рисунок 14 в). В масс-спектре в режиме ХИ APCI Pos. Scan. присутствует пик с $m/z=302,9$, соответствующий фрагменту молекулярного иона – кверцетина (фирмы «USP Reference Standard») (рисунок 14 г).

В результате установлено, что масс-спектры кверцемиритрина дают информацию о его молекулярной массе (м.м. 463,9), а также о природе агликона (кверцетина, м.м. 302,9). По полученным данным вещество охарактеризовано как кверцетин–7–О– β –D–глюкозид, или кверцемиритрин.

Максимум на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) этилацетатной фракции со временем удерживания 20,88-22,94 имеет УФ-спектр с максимум поглощения при длине волны 226 нм и 310 нм (рисунок 15 б), который характеризует оксикоричные кислоты и совпадает с УФ-спектром известного образца п-кумаровой кислоты (рисунок 15 а).

Регистрация в режиме APCI Neg. Scan. показывает, что соединение дает пик с $m/z 162,90$ (рисунок 15 в). В этом случае необходимо прибавить 1 к значению m/z .

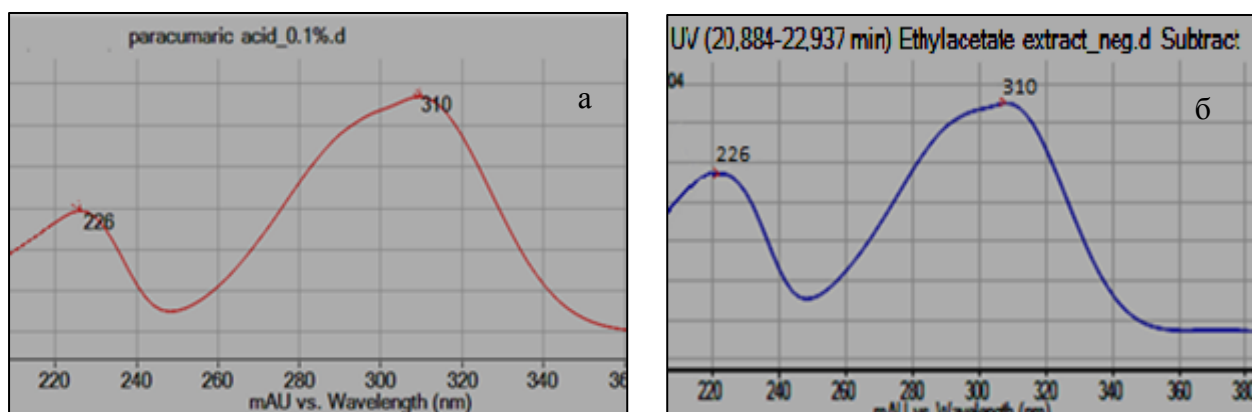


Рисунок-15 а – УФ – спектр известного образца п-кумаровой кислоты; б - УФ – спектр вещества этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой со временем удерживания 20,88-22,94

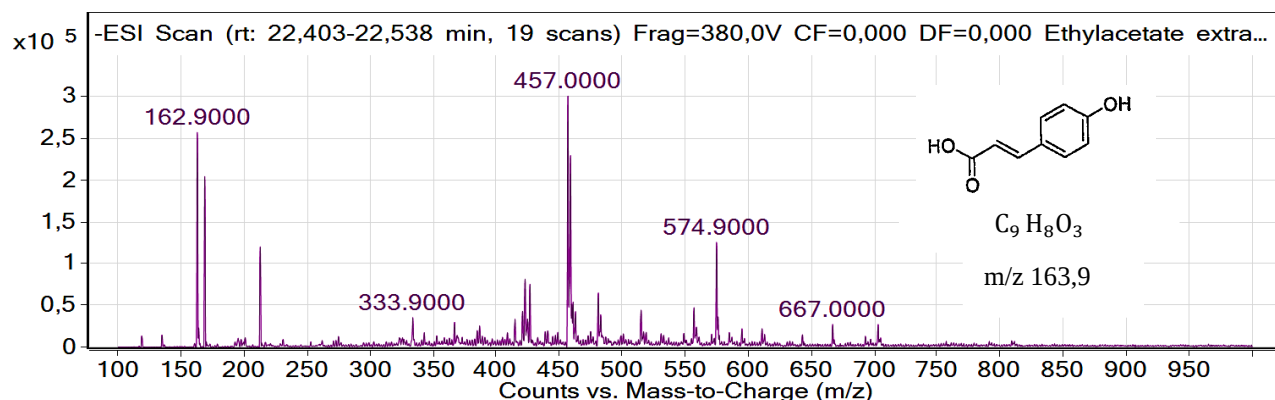


Рисунок-15 в - Масс-спектр соединения этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ АPCI Neg. Scan. время удерживания 22,403-22,538

Таким образом, установлена молекулярная масса исследуемого вещества (м.м. 163,9) и с учетом данных максимумов поглощения в УФ-области спектра и сравнением с известным образцом данное соединение охарактеризовано как п-кумаровая (п-оксикоричная) кислота.

Максимуму этилацетатной фракции на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) со временем удерживания 56,10-59,86 соответствует УФ-спектр с максимумами поглощения 258 нм, 265 нм, 352 нм (рисунок 16 б) и он совпадает с УФ-спектром лютеолина фирмы «Фитопанацея» (рисунок 16 а)

В масс-спектре в режиме ХИ АPCI Pos. Scan присутствует максимум с $m/z = 286,9$ соответствующий фрагменту молекулярного иона лютеолина.

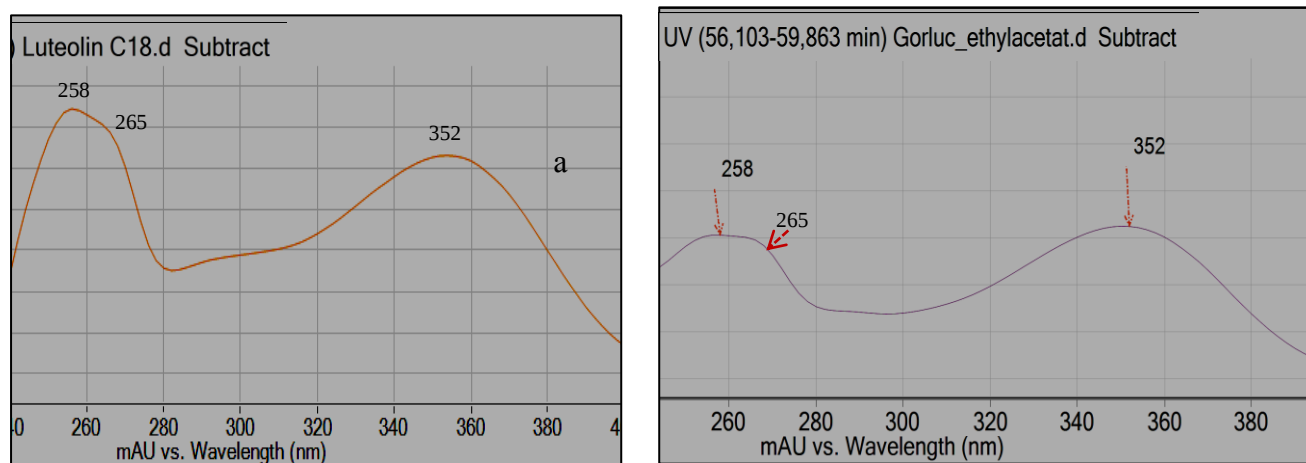


Рисунок-16 а – УФ – спектр стандартного образца лютеолина (фирма «Фитопанацея»); б - УФ – спектр вещества этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой со временем удерживания 56,10-59,86.

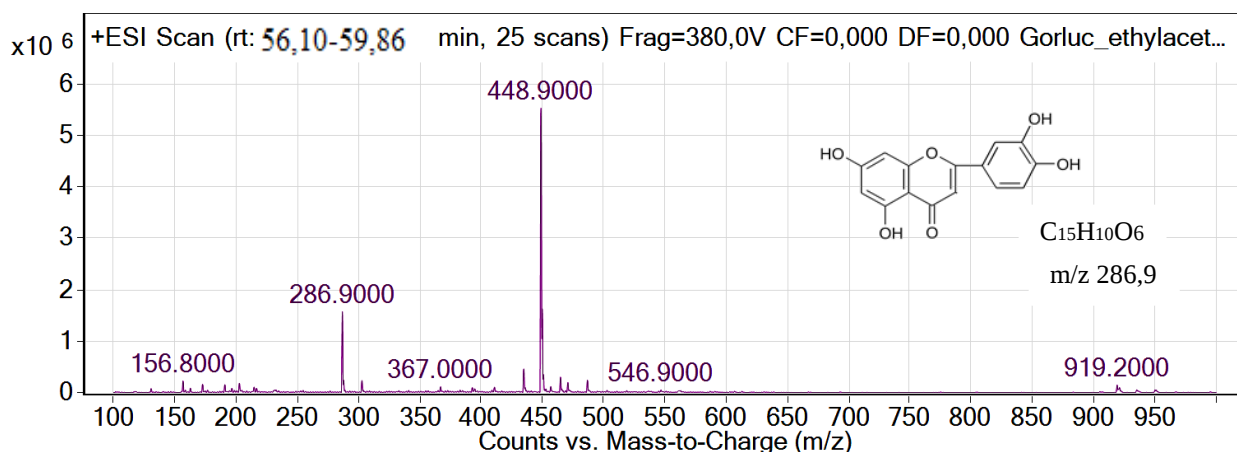


Рисунок-16 в– Масс-спектр соединения этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ APCI Pos. Scan. время удерживания 56,10-59,86

Таким образом, установлена молекулярная масса лютеолина (м.м. 286,9) и данное соединение охарактеризовано как лютеолин.

Этилацетатная фракция горлюхи ястребинковой (ВЭЖХ-УФ/МС) содержит максимум со временем удерживания 111,11-114,32, которому соответствует УФ-спектр с максимумом поглощения при длине волны 268 нм и 346 нм (рисунок 17 б), совпадающий с УФ-спектром стандартного образца апигенин- 7-глюкозида (фирма «Phytolab») (рисунок 17 а).

При регистрации ионов в режиме APCI Pos. Scan. соединение дает максимум с $m/z=433$, что позволило судить о молекулярной массе исследуемого соединения (м.м. 432,0) (рисунок 17 в).

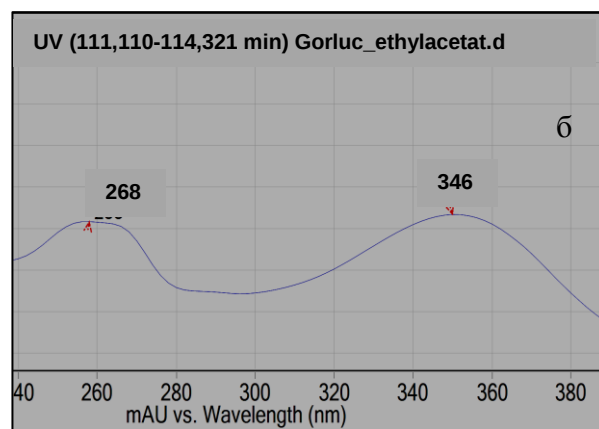
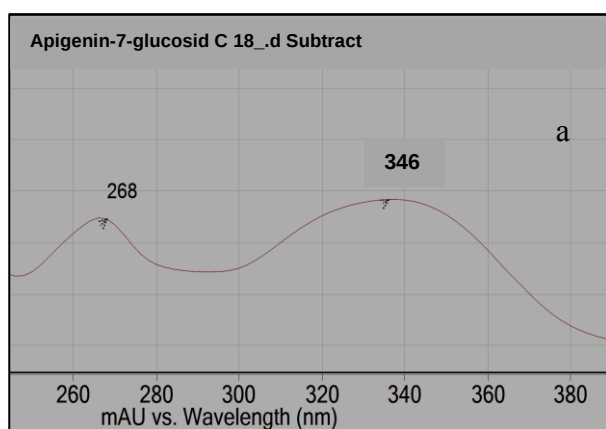


Рисунок-17 а – УФ – спектр стандартного образца апигенин-7-глюкозида (фирма «Phytolab»); б - УФ – спектр вещества этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой со временем удерживания 111,11-114,32

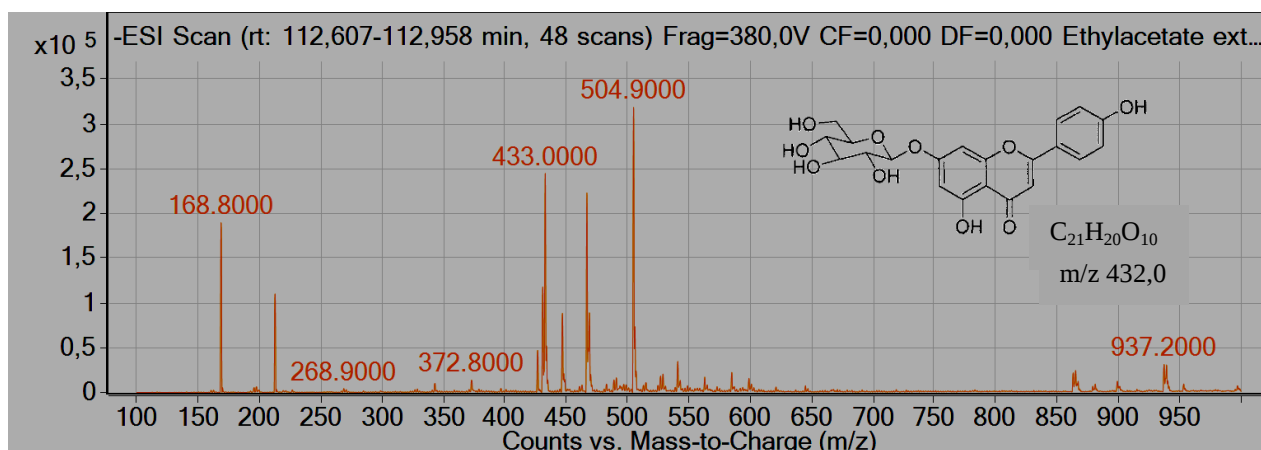


Рисунок-17 в– Масс-спектр соединения этилацетатной фракции горлюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ АPCI Pos. Scan. время удерживания 112,607-112,958

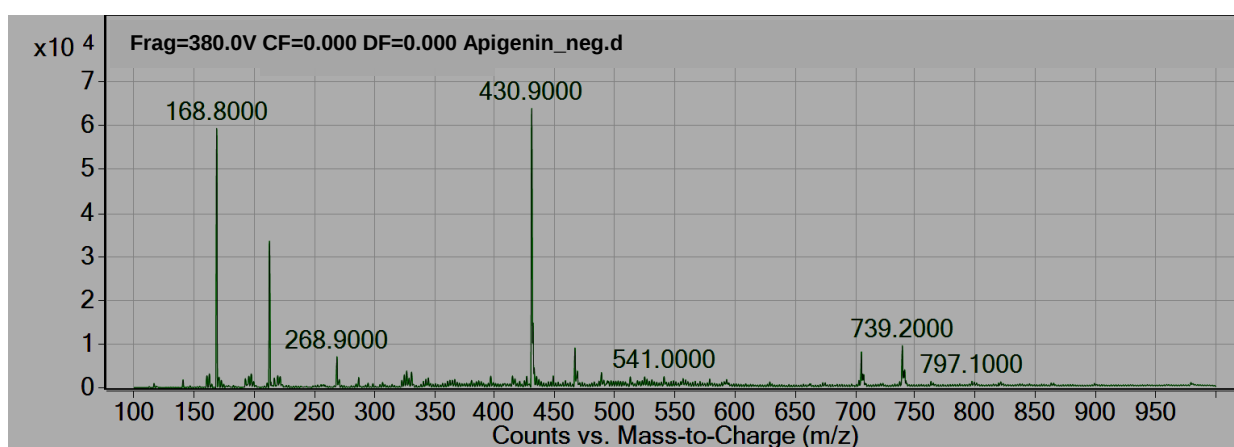


Рисунок-17 г - Масс-спектр стандартного образца апигенина (фирмы «Phytolab») в режиме ХИ АPCI Neg. Scan.

В масс-спектре в режиме АPCI Neg. Scan. присутствует максимум с $m/z=268,9$, который соответствует фрагменту молекулярного иона апигенина (269,9) (рисунок 17 г). Таким образом, установлена молекулярная масса апигенин-7-глюкозида (м.м. 432), а также природа его агликона (апигенина м.м. 269,9). Исследуемое соединение охарактеризовано как апигенин - 7-О-β-D-глюкозид или космоссин.

При исследовании хлороформной фракции идентифицированы кумарины: скополетин и кумарин.

Максимум на хроматограмме (ВЭЖХ) хлороформного извлечения со временем удерживания 18,72-19,95 имеет УФ-спектр с максимумом поглощения 228 нм, 256 нм, 298 нм, 348 нм (рисунок 18 б), который совпадает с

УФ-спектром стандартного образца скополетина (фирмы USP Certificate) (рисунок 18 а).

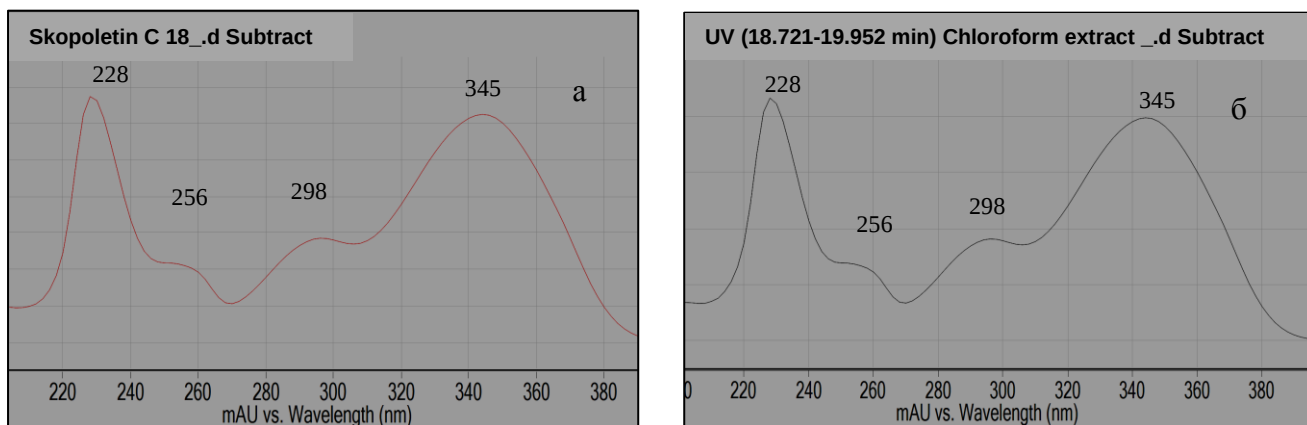


Рисунок-18 а – УФ – спектр стандартного образца скополетина (USP Certificate); б - УФ – спектр вещества хлороформного извлечения горлюхи ястребинковой со временем удерживания 18,72-19,95.

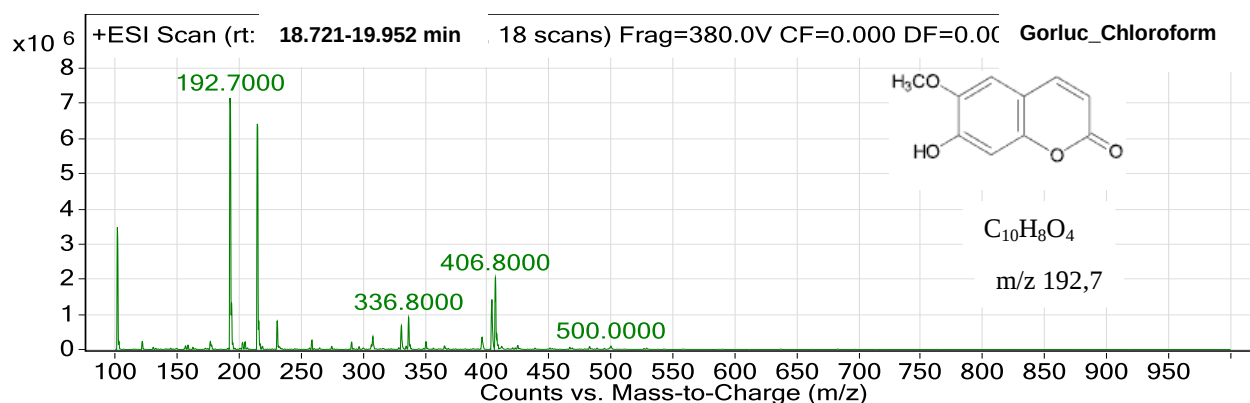


Рисунок-18 в – Масс-спектр соединения хлороформного извлечения горлюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ АPCI Pos. Scan. время удерживания 18,72-19,95

При регистрации положительных ионов в режиме АPCI Pos. Scan. соединение дает максимум с $m/z = 192,7$ (рисунок 18 в), что позволило судить о молекулярной массе соединения (м.м. 192,7). В результате исследуемое соединение с большой степенью достоверности идентифицировано как скополетин (6-метокси-7-оксикумарин).

Максимум на хроматограмме (ВЭЖХ-УФ/МС) хлороформного извлечения со временем удерживания 28,56-29,86 имеет УФ-спектр с максимумом поглощения 280 нм и 320 нм (рисунок 19 б), который совпадает с УФ-спектром стандартного образца кумарина (фирмы Ph. Eur. Reference Standard) (рисунок 19 а).

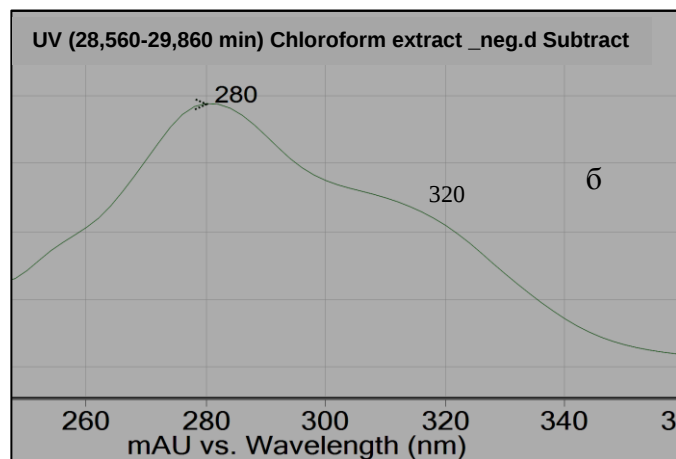
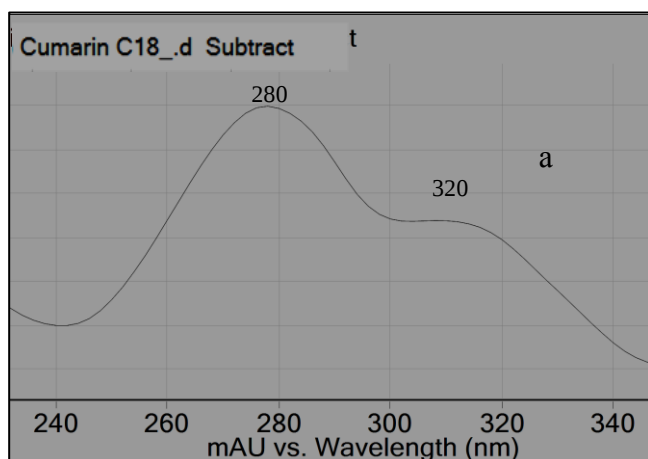


Рисунок-19 а-УФ-спектр стандартного образца кумарина (Ph.Eur.Reference Standard); б-УФ-спектр вещества хлороформной фракции горюхи ястребтнковой со временем удержания 28,56-29,86.

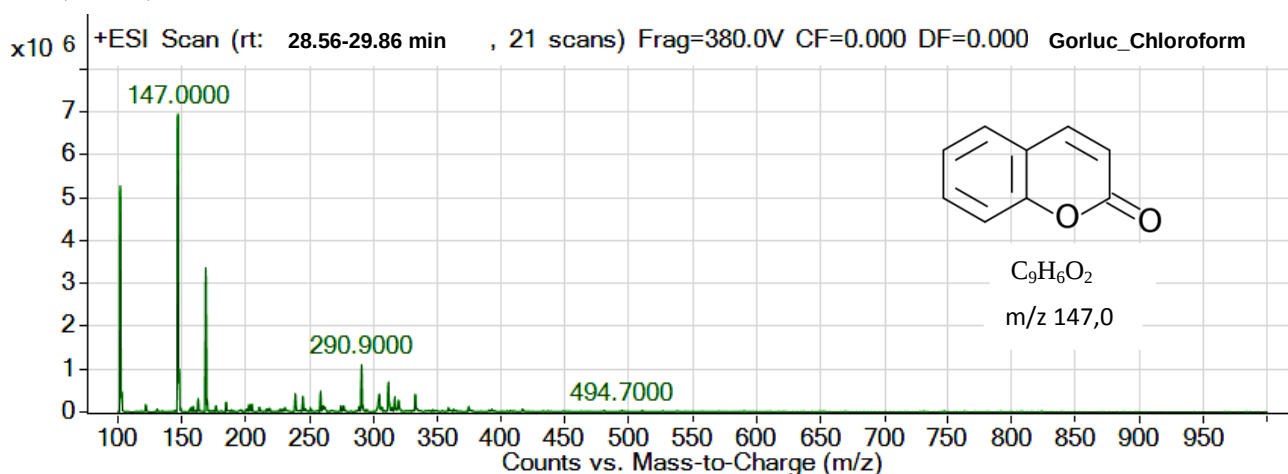


Рисунок-19 в – Масс-спектр соединения хлороформного извлечения горюхи ястребинковой имеющих в режиме ХИ АРСІ. Pos. Scan. время удерживания 28,56-29,86

При регистрации положительных ионов в режиме ХИ АРСІ. Pos. Scan. соединение показывает пик с $m/z = 147$ (рисунок 19 в). Данные спектры дали возможность судить о молекулярной массе соединения (м.м.147) и в сравнении с УФ-спектрами, сравнением со стандартным образцом исследуемое соединение с большой степенью достоверности идентифицировано как кумарин (бензо- α -пирон).

Результаты количественного определения фенольных соединений, определенные методом внешнего стандарта, представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты исследования фенольных веществ травы горюхи ястребинковой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс - спектрометрией

Время удерживания, мин	Название идентифицированных соединений	m / z	λ_{max} , нм	Содержание в мг/г
3,73	Галловая кислота*	170,0	225	0,076±0,00373
4,93	Хлорогеновая кислота*	353,0	245, 295, 325	0,35±0,00100
8,71	Кофейная кислота*	180,0	240, 295, 325	2,80±0,0900
11,70	Феруловая кислота*	194,0	230, 296, 325	2,53±0,10000
22,52	п-кумаровая кислота*	164,0	226, 310	0,102±0,00439
63,44	Кверциметрин*	465,0	258, 370	0,023±0,00079
37,16	Цинарозид*	450,0	255, 266, 350	0,28±0,01000
75,71	Апигенин - 4' - глюкозид*	432,0	270, 335	0,046±0,00140
58,46	Лютеолин*	287,0	258, 265, 360	2,37±0,09710
112,95	Апигенин – 7 - глюкозид*	432,0	268, 346	0,019±0,00072
29,39	Кумарин*	147,0	280, 320	0,0039±0,00014
19,18	Скополетин*	192,7	228, 256, 298, 345	0,00148±0,00015

Примечание: * - данные соединения идентифицированы впервые

Таким образом, в траве горюхи ястребинковой с использованием метода ВЭЖХ с диодно-матричным спектрофотометрическим и масс-спектрофотометрическим детектированием идентифицировано и определено содержание 12 фенольных соединений, которые представлены фенолкарбоновыми кислотами: 5 соединений, флавоноидами: 5 соединений, кумаринами – 2 вещества. Анализ полученных результатов показал, что фенолкарбоновые кислоты представлены в основном коричневыми кислотами: хлорогеновой, феруловой, кофейной, п-кумаровой и одна кислота является

фенолокислотой: галловая кислота. Среди них преобладают кофейная ($2,80 \pm 0,0114$ мг/г) и феруловая ($2,50 \pm 0,01028$ мг/г) кислоты (таблица 7).

Флавоноидные соединения травы горлюхи ястребинковой разделились на флавоны и флавонолы. К флавонам отнесены 4 соединения и они представлены агликоном лютеолином, а также гликозидами лютеолина и апигенина. Среди гликозидов лютеолина идентифицирован цинарозид (лютеолин-7-О-β-D-глюкозид), среди гликозидов апигенина – апигенин - 4'-О-β-D-глюкозид и апигенин-7-О-β-D-глюкозид (космоссиин). К флавонолам отнесено 1 соединение, представленное кверцимеритрином (кверцетин-7-О-β-D-глюкозидом). Среди флавоноидов преобладают лютеолин ($2,37 \pm 0,010$ мг/г) и цинарозид ($0,28 \pm 0,001249$ мг/г). Флавонол кверцимеритрин содержится в минорных количествах.

Все идентифицированные фенольные соединения в траве горлюхи ястребинковой установлены впервые.

3.8 Анализ содержания сахаров

Определение сахаров в свободном виде и в виде гликозидов

Появление в результате Бертрана кирпично-красного осадка (глава 2, раздел 2.2.11), свидетельствует о наличии сахаров в свободном виде в горлюхи ястребинковой траве. Подтвердили присутствие свободных сахаров бумажной (нисходящей) хроматографией (глава 2, раздел 2.2.12), в результате которой были идентифицированы глюкоза и фруктоза.

Положительные результаты проведения реакции Фелинга после кислотного гидролиза (глава 2, раздел 2.2.11) и реакции с α-нафтолом 20% подтвердили присутствие гликозидов в водном извлечении из горлюхи ястребинковой травы.

Определение связанных сахаров (полисахаридов)

Образование рыхлого осадка при добавлении к водному извлечению (концентрированному) спирта этилового 96% (глава 2, раздел 2.2.11), свидетельствует о содержании полисахаридов.

3.9 Азотсодержащие соединения

3.9.1 Содержание азотистых оснований

Для организма человека азотистые основания имеют большое значение, многие из них принимают участие в иммунных реакциях. Холин является составной частью фосфолипидов, в частности лецитина и сфингомиелина; входит в состав лекарственных средств, которые применяются для лечения различных заболеваний [96].

Для качественного определения азотистых оснований в траве горлюхи ястребинковой использовали водное извлечение, с которым проводили качественные реакции (глава 2, раздел 2.2.12.1) и наблюдали:

- образование темно-коричневого кольца при взаимодействии с реактивом Манделина, при взбалтывании раствор окрашивался в устойчивый зеленый цвет;
- помутнение извлечения при добавлении раствора кислоты фосфорновольфрамовой 3 %;
- образование зеленого цвета в бензольном слое при взаимодействии с бриллиантовым зеленым и кислотой хлористоводородной.

Результаты проведенных реакций говорят о том, что трава горлюхи ястребинковой содержит азотистые основания.

Подтверждение присутствия азотистых оснований устанавливали с помощью хроматографического исследования на бумаге, для которого использовали водное извлечение (глава 2, раздел 2.2.12.1). Высушенную хроматограмму помещали в эксикатор с кристаллами йода для проявления. В

траве горлюхи ястребинковой проявилось 4 пятна, которые по окраске пятен (темно – оранжевой) и значениям: R_f 0,19, R_f 0,29, R_f 0,35, R_f 0,42, отнесены к группе азотистых оснований (рисунок 20).



Рисунок 20 - Фотография бумажной хроматограммы водного извлечения из травы горлюхи ястребинковой

А- горлюха ястребинковая

R_f 0,42

R_f 0,35

R_f 0,29

Количественный анализ азотистых оснований (глава 2, раздел 2.2.13.1), показал, что их содержание составляет $0,048 \pm 0,0009\%$, из них содержание холина – $0,014 \pm 0,0003\%$.

3.9.2 Содержание аминокислот

Для жизненных процессов организма человека наряду с углеводами, липидами, нуклеиновыми кислотами аминокислоты являются необходимыми. Аминокислоты – участники обменных процессов, биосинтеза фосфатидов, фенольных и других соединений [50, 54, 163, 177].

Аминокислоты участвуют в процессах нервной регуляции различных функций организма, оказывают выраженное действие на сосудистый тонус [93, 96, 115, 163, 177]. Для аланина и глицина установлена гиполипедемическая активность [110, 135, 165], аспарагиновая кислота обладает иммуноактивными свойствами [91, 163, 177].

Кроме этого, аминокислоты обладают способностью потенцировать действие микроэлементов, а так же других биологически активных веществ [15, 44, 64].

В настоящее время в аптечной практике имеется целый ряд препаратов, в состав которых входят аминокислоты: глицин, церебролизин, гептрал, метионин, и другие [165]. Все это свидетельствует о важности изучения аминокислотного состава.

Однако, во многих лекарственных растениях, как официальных, так и не официальных, в том числе и в горлюхе ястребинковой, аминокислотный состав не изучен.

Поэтому нами был исследован качественный состав и количественное содержание аминокислот в горлюхе ястребинковой траве.

Для качественного обнаружения аминокислот в горлюхе ястребинковой траве использовали водное извлечение, к которому приливали свежеприготовленный раствор нингидрина 0,25% (в равных количествах), и нагревали реакционную смесь, отмечая при этом окраску – красно-фиолетовый цвет (глава 2, раздел 2.2.12.2), что свидетельствовало о содержании аминокислот.

Установление качественного состава и количественного содержания аминокислот было проведено методом ВЭЖХ (глава 2, раздел 2.2.12.2).

Таблица 8 – Результаты определения качественного состава и количественного содержания аминокислот в горлюхе ястребинковой траве, мг/%

№	Название аминокислоты	Содержание аминокислот мг/%	№	Название аминокислоты	Содержание аминокислот мг/%
1	Треонин*	0,50	9	Аспарагиновая кислота	1,44
2	Серин	0,48	10	Аланин	0,55
3	Глутаминовая кислота	1,36	11	Метионин*	0,05

Продолжение таблицы 8

4	Пролин	1,26	12	Тирозин	0,25
5	Глицин	0,52	13	Фенилаланин*	0,52
6	Валин*	0,64	14	Гистидин	0,40
7	Изолейцин*	0,51	15	Лизин*	0,63
8	Лейцин*	0,80	16	Аргинин	0,63
Итоговое содержание аминокислот		10,54			
Итоговое содержание незаменимых аминокислот		3,65			

Примечание: * - содержится незаменимая аминокислота.

Горлюхи ястребинковой трава содержит 16 аминокислот, включающих в себя 7 незаменимых. Итоговое содержание суммы аминокислот составляет 10,54мг/%, среди которых сумма незаменимых – 3,65мг/%. В траве горлюхи ястребинковой доминируют глутаминовая кислота (1,36мг/%) и аспарагиновая кислота (1,44мг/%).

3.10 Результаты качественного и количественного анализа дубильных веществ

Основой для качественного анализа дубильных веществ служило водное извлечение и качественные реакции (глава 2, раздел 2.2.13): с раствором желатина 1% наблюдали образование осадка, с бромной водой, а также формальдегидом и концентрированной кислотой хлористоводородной выпадал осадок, что свидетельствует о содержании в горлюхи ястребинковой траве дубильных веществ. С железоаммонийными квасцами наблюдали образование черно-зеленого окрашивания, что говорит о том, что трава горлюхи содержит дубильные вещества преимущественно конденсированной группы [86].

Количественный анализ (глава 2, раздел 2.2.13) показал, что в траве горлюхи ястребинковой содержание дубильных веществ относительно невелико, оно составляет $4,91 \pm 0,20\%$.

3.11 Качественное и количественное содержание органических кислот

В настоящее время органические кислоты привлекают к себе всё большее внимание. Они обладают бактерицидными, желчегонными, улучшающими пищеварение свойствами [60, 124, 135], используются для лечения атеросклероза и заболеваний сердечно-сосудистой системы, так как нормализуют обмен липидов [8].

В связи с чем, нами проведено исследование органических кислот горлюхи ястребинковой травы.

Основой для определения органических кислот служило водное извлечение. Водное извлечение исследовали методом тонкослойной хроматографии на пластинке «Sorbfil» (глава 2, раздел 2.2.14), что позволило идентифицировать в горлюхе ястребинковой траве 4 органические кислоты: винную, аскорбиновую, янтарную и лимонную кислоты (рисунок 21).

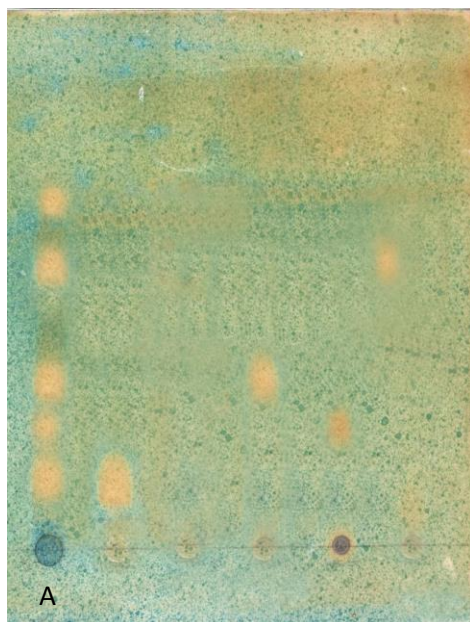


Рисунок 21 - Схема тонкослойной хроматограммы водного извлечения из травы горлюхи ястребинковой

$R_f=0.73$

Аскорбиновая кислота

Янтарная кислота

Винная кислота

Лимонная кислота

А – извлечение из травы горлюхи ястребинковой

Система растворителей: спирт этиловый 96% - конц. раствор аммиака (16:4,5)

Для более детального изучения органических кислот исследовали их с помощью газо-жидкостной хроматографии, имеющей масс-спектрометрический детектор (глава 2, раздел 2.2.14). При этом было установлено наличие 12 органических кислот (таблица 9, рисунок 4)

Таблица 9 – Состав и содержание органических кислот горлюхи ястребинковой травы

№ п/п	Название кислоты	Содержание органических кислот, (мг/кг)
1.	Щавелевая кислота	136,33±2,80
2.	Малоновая кислота	182,69±3,44
3.	Левулиновая кислота	1197,29±23,50
4.	Янтарная кислота	601,12±11,76
5.	Яблочная кислота	1141,37±20,04
6.	Лимонная кислота	1382,90±25,21
7.	Фумаровая кислота	39,80±1,10
8.	Бензойная кислота	120,70±2,41
9.	2-окси-2-метилянтарная	13,21±0,30
10.	3-окси-2-метилглутаровая	25,80±0,52
11.	Азелаиновая	32,75±0,52
12.	Фенилуксусная кислота	4,10±0,11

Три кислоты яблочная (1141,37 мг/кг), лимонная (1382,90 мг/кг), левулиновая (1197,29 мг/кг) преобладают по содержанию других кислот.

Результаты количественного анализа органических кислот

Количественный анализ органических кислот, проведенный в пересчете на кислоту яблочную (глава 2, раздел 2.2.14), показал их содержание 4,18±0,15%.

Содержание аскорбиновой кислоты

Содержание аскорбиновой кислоты, определенное методом титриметрии (глава 2, раздел 2.2.14) составило 0,52±0,02%.

3.12 Качественное и количественное содержание тритерпеновых соединений

Положительные результаты пробирочных реакций позволили установить наличие тритерпенов в горлюхе ястребинковой траве: при реакции пенообразования появлялась устойчивая пена, раствор ацетата свинца

образовывал осадок. Реакция Фонтан - Канделя показывала пену, равную по объему и стойкости с 0,1н раствором кислоты хлористоводородной и с 0,1н раствором натрия гидроксида, что свидетельствовало о наличии в горлюхе ястребинковой траве сапонинов, которые можно отнести к тритерпеновой природе (глава 2, раздел 2.2.15).

Результаты тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» позволили разделить и идентифицировать сапонины горлюхи ястребинковой травы (глава 2, раздел 2.2.15), которые проявлялись после обработки кислотой серной 20%. Сапонины представлены тремя соединениями (малиновый цвет) и имеющие значения: R_f 0,29, R_f 0,79, R_f 0,87 (рисунок 22). Со стандартными образцами веществ в траве горлюхи ястребинковой идентифицирована олеаноловая кислота.

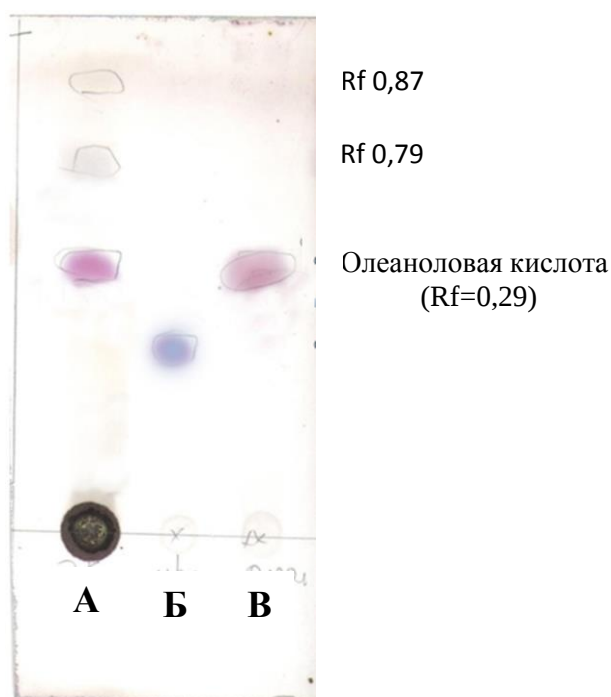


Рисунок 22 – Фотография тонкослойной хроматограммы бутанольной фракции водно – спиртового извлечения из травы горлюхи ястребинковой.

А - горлюха ястребинковая
Б - урсоловая кислота (Ph. Eur. Reference Standard)
В – олеаноловая кислота (Ph. Eur. Reference Standard)
Система растворителей: хлороформ – этилацетат (5:1)

Результаты количественного определения сапонинов (глава 2 раздел 2.2.15) в траве горлюхи ястребинковой показали, что их содержание составляет $0,44 \pm 0,01$ %.

3.13 Состав и содержание минеральных элементов

Микроэлементы с одной стороны оказывают многостороннее влияние на организм человека, с другой сами обладают высокой биологической активностью [81, 108, 114, 138, 147].

Минеральные элементы принимают активное участие в различных биохимических процессах организма, в том числе и в обмене веществ [91, 114]. Минеральные элементы повышают неспецифическую резистентность организма к различным воздействиям [114, 147].

Дисбаланс микроэлементов в организме приводит к микроэлементозам как у человека, так и у животных [90].

Лекарственные растения и препараты растительного происхождения могут стать ценным источником минеральных элементов [90].

Кроме того сведения о составе и содержании минеральных элементов могут расширить данные о химическом составе растения.

Состав и содержание минерального комплекса определяли с помощью метода эмиссионного спектрального анализа (глава 2, раздел 2.2.16) (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты качественного и количественного состава горюхи ястребинковой травы, мкг/г

Название элемента	Содержание, мкг/г	Название элемента	Содержание, мкг/г
Фосфор (P)*	30010±313,18	Марганец (Mn)*	303±4,00
Кальций (Ca)	60040±714,49	Серебро (Ag)	0,10±0,004
Натрий (Na)	10014±125,43	Стронций (Sr)	402±4,21
Калий (K)	300020±3178,90	Галлий (Ga)	3±0,05
Кремний (Si)**	60028±699,47	Барий (Ba)	303±4,39
Железо (Fe)*	3009±42,64	Кобальт (Co)	3,01±0,11
Никель (Ni)**	10,05±0,28	Титан (Ti)	299±5,12
Молибден (Mo)*	10±0,20	Ванадий (V)	5,03±0,09
Свинец (Pb)	5,88±0,09	Хром (Cr)	10,02±0,28
Медь (Cu)*	101±1,47	Бериллий (Be)	0,51±0,01

Продолжение таблицы 10

Алюминий (Al)	3002±32,32	Цирконий (Zr)	20,13±0,45
Цинк (Zn)*	203±4,21	Бор (B)	301±5,23
Магний (Mg)	50030±618,32		

Анализ минерального состава показал, что в горлюхе соержится 25 элементов, представленных как макро-, так и микроэлементами. Кальций, калий, магний, натрий, фосфор отнесены к макроэлементам, доминирующим среди которых является калий. Основная роль калия сводится к выведению из организма воды и натрия. Он так же принимает участие в обменных процессах, активации ряда ферментов, регулирует водно-солевой обмен [114].

Микроэлементы характеризуются высоким содержание меди, цинка, бария, марганца, стронция, титана, железа, бора, алюминия и кремния. Среди них имеются эссенциальные элементы – медь, цинк, марганец, железо, а также условно – эссенциальные – бор, кремний. Марганец в организме выполняет роль активатора ферментов, его недостаток снижает активность ферментов. Кроме того он влияет на обменные процессы в организме, в том числе биосинтез холестерина, оказывает влияние на содержание глюкозы в крови [114]. Железо, цинк, медь принимает участие в кроветворении, коррекции иммунитета [114].

Сырье горлюхи содержит достаточно высокую концентрацию алюминия. Потребность организма человека в алюминии находится в пределах 25 мг [126].

В указанных концентрациях алюминий положительно влияет на организм человека. Алюминий участвует в процессах восстановления костной ткани, эпителиальной соединительной ткани, а также в образовании фосфатных и белковых комплексов. В то же время высокое содержание алюминия вызывает нейротоксическое действие [161]. В связи с чем, возникает необходимость в разработке нормативных показателей содержания алюминия в лекарственном растительном сырье, которых до настоящего времени не существует.

В связи с чем, изучение накопления данных о содержании алюминия в лекарственном растительном сырье и тем самым установление допустимых норм его содержания являются перспективными.

Экологическая безопасность сырья предусматривает содержание токсичных элементов: свинца, ртути, кадмия и мышьяка в пределах установленных норм. В связи с чем, надо определено содержание свинца (5,88 мкг/г), что т требованиям ПДК для лекарственного растительного сырья [45, 132], приведенным в ГФ 14 издания. Другие токсичные элементы в траве горлюхи в рамках проведенного нами исследования не найдены, что говорит об экологической безопасности сырья горлюхи.

3.14 Качественный состав и содержание полисахаридов

3.14.1 Выделение полисахаридов по фракциям

Водорастворимый полисахаридный комплекс выделяли из водного извлечения осаждением спиртом этиловым 96% (глава 2, раздел 2.3.1), выход его составил $10,20 \pm 0,22\%$ (таблица 11). Водорастворимый комплекс получен в виде аморфного порошка, имеющего кремовый цвет. При изучении растворимости полисахаридного комплекса установлена его хорошая растворимость в воде, кислотах и щелочах. РН водного раствора полисахаридного комплекса варьирует от 5 до 6. Выделенных полисахаридный комплекс не растворим в органических растворителях, спиртах [26, 29, 86, 141, 142].

Таблица 11 – Результаты выделения фракций полисахаридов

Фракции полисахаридов, %			
Водорастворимые полисахариды	Пектиновый комплекс	Гемицеллюлоза А	Гемицеллюлоза Б
10,20±0,22	8,26±0,23	25,97±0,54	6,84±0,25

Содержание пектинового комплекса в горлюхе ястребинковой траве составило $8,26 \pm 0,23\%$ (таблица 11). Пектиновый комплекс так же имеет вид аморфного порошка светло-коричневого цвета. Он показывает хорошую растворимость в воде с образованием вязких растворов с pH 3 - 4. При прибавлении раствора алюминия сульфата 1% к водному раствору пектинового комплекса происходит образование осадка пектатов [19, 61, 88].

Содержание гемицеллюлозы А в траве горлюхи ястребинковой составило $25,97 \pm 0,54\%$, гемицеллюлозы Б – $6,84 \pm 0,25\%$ (таблица 11), которые были выделены в виде аморфных порошков светло-коричневого цвета [26].

3.14.2 Анализ выделенных фракций полисахаридов

Для изучения состава моносахаров, выделенных фракций использовали нисходящую бумажную хроматографию на бумаге FN-1 после проведения кислотного гидролиза в сушильном шкафу (глава 2, раздел 2.3.2) с последующим проявлением хроматограммы раствором анилин- гидрофталата и нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100-105°C (глава 2, раздел 2.3.3) [33, 59, 139, 142]. В составе водорастворимого полисахаридного комплекса, установлено 5 сахаров (рисунки 23, 24), которые с известными образцами были идентифицированы как: галактоза, фруктоза, ксилоза, рамноза и глюкуроновая кислота.

В составе пектинового комплекса установлено так же наличие 5 сахаров (рисунки 23, 24), которые с известными образцами были идентифицированы как: галактоза, арабиноза, ксилоза, рамноза и галактуроновая кислота.

Состав гемицеллюлоз А и Б (Гц А, Гц Б) включает 4 сахара (рисунок 23), которые с известными образцами идентифицированы как: галактоза, глюкоза, арабиноза и ксилоза.

Результаты хроматографического анализа горлюхи ястребинковой травы показали что, в водорастворимом комплексе доминировали галактоза,

фруктоза, в пектоновом комплексе галактурановая кислота, в составе целлюлоз
- ксилоза.

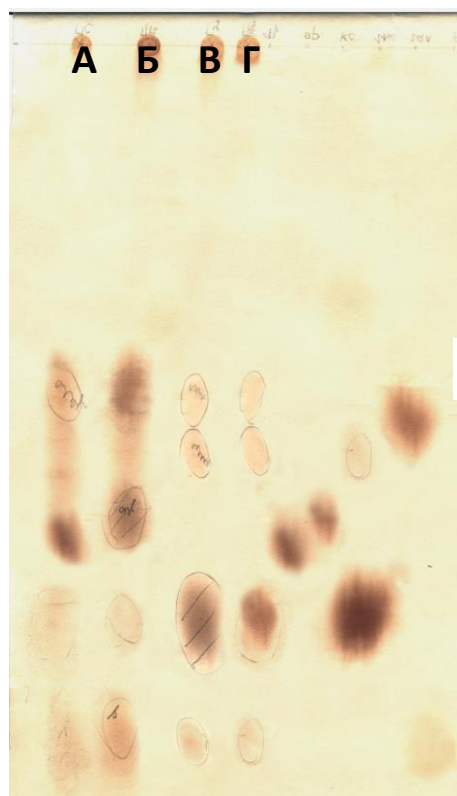


Рисунок 23 - Фотография хроматограммы продуктов кислотного гидролиза выделенных полисахаридных комплексов из травы горлюхи ястребинковой

А – водорастворимый полисахаридный комплекс
Б – пектиновый комплекс
В – гемицеллюлоза А
Г – гемицеллюлоза Б
Система растворителей: бутанол – пиридин – вода очищенная (6:4:3)

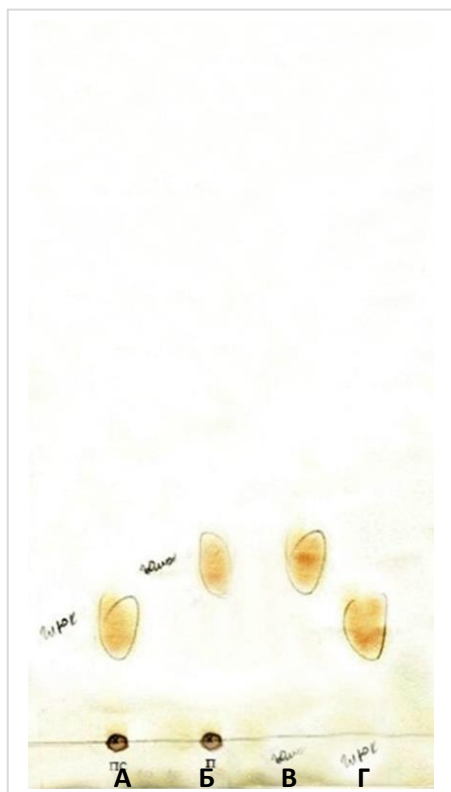


Рисунок 24 - Фотография хроматограммы продуктов кислотного гидролиза выделенных полисахаридных комплексов из травы горлюхи ястребинковой

А -водорастворимый полисахаридный комплекс
Б – пектиновый комплекс
В – галактурановая кислота
Г – глюкуроновая кислота
Система растворителей: этилацетат – кислота уксусная – кислота муравьиная – вода (18:3:1:4)

3.14.3 Моносахаридный состав исследуемых полисахаридных комплексов

Содержание моносахаридного состава исследовали методом денситометрии, после проведения гидролиза полисахаридных комплексов горлюхи ястребинковой травы (глава 2, раздел 2.3.3). Состав моносахаридов представлен в таблице 12.

Таблица 12 - Содержание моносахаридного состава полисахаридных комплексов горлюхи ястребинковой травы

Фракции полисахаридов, %			
Водорастворимые полисахариды, их моносахаридны состав	Пектиновый комплекс, их моносахаридны состав	Гемицеллюлоза А, их моносахаридны состав	Гемицеллюлоза Б, их моносахаридны состав
рамноза - 0,90±0,04	арабиноза - 1,90±0,08	галактоза - 1,90±0,08	галактоза – 1,60±0,07
галактоза - 9,40±0,40	галактоза - 1,30±0,06	глюкоза - 2,30±0,1	глюкоза - 2,10±0,09
глюкуроновая кислота - 3,60±0,14	ксилоза - 0,30±0,001	ксилоза - 8,30±0,31	ксилоза - 7,60±0,29
фруктоза - 11,80±0,53	рамноза - 0,20±0,004	рамноза - 0,70±0,03	рамноза - 0,90±0,04
ксилоза - 2,30±0,10	галактуроновая кислота - 89,70±3,98		

Данные таблицы 12 показывают, что в водорастворимом полисахаридном комплексе среди моносахаров доминируют фруктоза – 11,80%, галактоза – 9,40%; в пектиновом комплексе галактуроновая кислота - 89,70%; в гемицеллюлозах А и Б ксилоза 8,30% и 7,60% соответственно.

Проведенные исследования говорят о том, что сырьё горлюхи ястребинковой может быть источником водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ. Для водорастворимых полисахаридов установлены гепатопротекторное, иммуномоделирующее, противовоспалительное и другие виды действия [125]. Пектины используются в первую очередь в качестве сорбентов и детоксикантов при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а также при отравлении радионуклеидами и солями тяжелых металлов. Основу указанных свойств пектинов составляет их способность образовывать с ними нерастворимые комплексы, быстро выводимые из организма человека.

Пектиновые вещества также улучшают перистальтику кишечника, что ведет за собой более быстрое выведение токсинов из организма человека [39, 56]. Полученные нами результаты согласуются с таковыми по применению горлюхи в народной медицине и установленной фармакологической активностью и свидетельствуют о том, что полисахариды в комплексе с другими биологически активными веществами могут участвовать в фармакологической активности травы горлюхи.

Содержание функциональных групп пектиновых веществ

Пектиновые вещества в качестве основной структурной единицы содержат галактуроновую кислоту. Кроме нее в их состав входит незначительное количество нейтральных моносахаридов. Пектины характеризуются наличием различных групп: метоксильных, карбоксильных и других, обуславливающие свойства пектинов, таких как способность к пектинов к желированию и комплексообразованию [79]. Способность пектинов к желированию является основой для их использования в фармации для создания растительных средств с желирующей способностью. Способность пектинов к комплексообразованию [65] лежит в основе их применения в качестве детоксикантов при отравлении радионуклидами и тяжелыми металлами. В связи с вышесказанным знания о функциональных группах пектинов являются значимыми.

Функциональные группы, характерные для пектиновых веществ было определяли методом титриметрии (глава 2, раздел 2.3.4.).

Таблица 13 – Результаты анализа функциональных групп

Карбоксильные свободные	Карбоксильные метоксилированные	Карбоксильные общие количество	Метоксильные	Степень метоксилированности (λ), %
6,51±0,23	1,78±0,07	8,29±0,26	1,23±0,05	21,49±0,77

Анализ содержания свободных карбоксильных групп показал, что их содержание составляет 6,51%, метоксилированных карбоксильных групп – 1,78%, метоксильных групп – 1,23%. Свободные карбоксильные группы пектиновых веществ горлюхи ястребинковой травы составляют 6,51%, что может говорить об их комплексообразующей способности и перспективности применения в качестве детоксикантов. Степень этерификации исследуемых пектиновых веществ была невысокой ($\lambda < 50\%$).

Выводы по главе 3:

1. Изучен качественный состав биологически активных соединений горлюхи ястребинковой травы. В результате проведенного анализа определены: каротиноиды, в том числе β -каротин; дубильные вещества, преимущественно конденсированной группы; сесквитерпеновые лактоны; жирные кислоты; кумарины, в том числе скополетин, кумарин; флавоноиды, в том числе лютеолин, цинарозид, апигенин $-7-O-\beta-D-$ глюкозид; гидроксикоричные кислоты, в числе которых хлорогеновая и феруловая; органические кислоты, тритерпеновые сапонины, в числе которых олеаноловая кислота; азотсодержащие соединения; минеральные элементы, углеводы.
2. В результате количественного анализа определено содержание: каротиноидов – $13,03 \pm 0,57$ мг%; сесквитерпенов $0,04 \pm 0,002\%$, флавоноидов $0,61 \pm 0,02\%$ – $1,27 \pm 0,04\%$; азотсодержащих соединений – $0,048 \pm 0,0009\%$, в их числе холина – $0,014 \pm 0,0003\%$; дубильных веществ – $4,91 \pm 0,20\%$; органических кислот – $4,18 \pm 0,15\%$; аскорбиновой кислоты – $0,52 \pm 0,02\%$; тритерпеновых сапонинов – $0,44 \pm 0,01\%$.
3. Органические кислоты горлюхи ястребинковой травы включают в себя: щавелевую, фумаровую, винную, янтарную, аскорбиновую, малоновую, яблочную, лимонную, леулиновую, бензойную, 2-окси-2-метилянтарную, 3-окси-2-метилглутаровую, азелаиновую, фенилуксусную кислоты. Органические кислоты горлюхи ястребинковой травы исследованы впервые.

4. Впервые с использованием метода ВЭЖХ изучен аминокислотный состав горлюхи ястребинковой травы. В составе аминокислот идентифицировано 16 соединений, среди которых 7 незаменимых. Итоговое содержание незаменимых аминокислот - 3,65 мг%.
5. Газожидкостная хромато-масс-спектрометрия позволила установить жирнокислотный состав горлюхи. В составе жирных кислот идентифицировано 17 соединений, которые представлены как насыщенными, так и ненасыщенными жирными кислотами.
6. Методом эмиссионного спектрального анализа исследован минеральный состав горлюхи ястребинковой травы. Минеральные элементы представлены 25 соединениями, среди которых 5 отнесены к макроэлементам: кальций, калий, магний, натрий, фосфор, среди них доминирует калий. У микроэлементов наблюдается достаточно высокое содержание меди, цинка, бария, марганца, стронция, титана, железа, бора, алюминия, кремния. Содержание токсического элемента свинца не превышает ПДК для лекарственного растительного сырья, установленного ГФ 14 издания.
7. Фенольные соединения содержащиеся в горлюхе ястребинковой траве изучены с использованием различных методов хроматографии. Фенольные соединения представлены 17 соединениями, в составе которых идентифицированы кумарины: кумарин, скополетин; флавоноиды: производные кверцетина - кверцимеритрин (кверцетин-7-O- β -D-глюкозид), производные лютеолина – лютеолин, цинарозид (лютеолин-7-O- β -D-глюкозид), производные апигенина - апигенин - 4'-O- β -D-глюкозид, апигенин-7-O- β -D-глюкозид; производные фенолоксилот и оксикоричных кислот - галловая, кофейная, хлорогеновая, феруловая, п-оксибензойная, салициловая, ванилиновая, п-кумаровая, сиреневая, гентизиновая кислоты. Все фенольные соединения в траве горлюхи идентифицированы впервые.
8. Впервые изучены полисахариды по фракциям: водорастворимые полисахариды, пектиновый комплекс, гемицеллюлозы А и Б. Выход фракции составил: водорастворимого полисахарида – 10,20 $\pm$ 0,22%, пектинового

комплекса – $8,26 \pm 0,23\%$, гемицеллюлозы А – $25,97 \pm 0,54\%$ и гемицеллюлозы Б – $6,84 \pm 0,25\%$.

9. Изучен состав и количественное содержание моносахаров полисахаридных комплексов, полученных из горлюхи ястребинковой травы. Доминирующими моносахаридами водорастворимого комплекса являются : фруктоза – $11,80\%$, галактоза – $9,40\%$, пектинового комплекса - галактуроновая кислота – $89,70\%$, гемицеллюлозы А и Б – ксилоза, содержание которой составляет $8,30\%$ и $7,60\%$ соответственно.
10. Установлены функциональные группы пектиновых веществ. Наряду с этим установлена степень этерификации, которая составила $21,49 \pm 0,77$ ($\lambda < 50\%$).

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА ГОРЛЮХИ ЯСТРЕБИНКОВОЙ ТРАВЫ

4.1 Характеристики подлинности сырья

Проведенный анализ литературных источников, а также данные, полученные в результате фитохимического изучения травы горлюхи ястребинковой, показывают с большой долей вероятности возможность медицинского применения на практике, что приводит к неизбежности разработки достоверных характеристик, подтверждающих подлинность, и показателей, определяющих качество сырья.

В связи с вышесказанным, для определения подлинности сырья изучены морфолого-анатомические признаки надземной части горлюхи ястребинковой, среди них выявлены диагностические признаки, а также определены числовые показатели качества сырья.

4.1.1. Идентификация сырья по морфологическим признакам

Морфологические признаки надземной части горлюхи ястребинковой исследованы по гербариям, свежим растениям и экземплярам сырья, прошедшим процесс сушки. Исследование осуществляли в полном соответствии с ОФС ГФ тринадцатого издания «Травы» (глава вторая, раздел 2.5).

Итоговые результаты, полученные в процессе макроскопического исследования позволили определить совокупность признаков для определения подлинности сырья по внешним (морфологическим) признакам (рисунок 25): смесь цельных и (или) частично измельченных округло-ребристых стеблей, не длиннее 30 см, имеющих листья, цветки и некоторое количество незрелых плодов; стебли опушены волосками, которые охарактеризованы как вильчатые

и якоревидные. Содержащиеся в сырье исследуемого растения листья продолговато-эллиптические, по краям зубчатые или цельнокрайние, длинночерешковые или сидячие, верхние листья являются полустеблеобъемлющими. Листья на стебле имеют очередное расположение и равномерно размещены на стебле. Корзинки многоцветковые, на верхушках стеблей и ветвей в общем щитковидно-метельчатом соцветии. Все цветки в корзинке язычковые, обоеполые, желтые. Отгиб венчика в 2-3 раза длиннее его трубки. Обертки корзинок имеют колокольчатую форму; листочки обертки линейно – ланцетные, расположены в три ряда; снаружи листочки отогнуты в разные стороны. Листочки обертки при внимательном изучении имеют заметное опушение, волоски при рассмотрении тонкие, в основании нет заметного расширения черного цвета, хотя иногда встречаются белые волоски. Цвет как стеблей, так и присутствующих листьев можно охарактеризовать как светло-зеленый, иногда зеленый, цветки, содержащиеся в сырье, имеют цвет желтый. Запах имеет характер, называемый травянистым. Вкус водного извлечения определяется как горький.



Рисунок 25 – Исследуемая трава горлюхи ястребиновой (фото произведено автором)

4.1.2 Идентификация сырья по микродиагностическим признакам

Для определения признаков, относящихся к микродиагностическим, были получены и затем использованы временные микропрепараты, которые были приготовлены в полном соответствии с методикой ГФ тринадцатого издания в непосредственном соответствии с ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», впоследствии автором производилась микрофотосъемка (глава вторая, раздел 2.5). Исследовали стебель, лист, листочки обертки и язычковые цветки. В итоге были установлены микродиагностические признаки для определения подлинности сырья горлюхи:

Стебель при рассмотрении поперечного сечения имеет округло-ребристую форму, покровная ткань - эпидермис (рисунок 26). Форма клеток эпидермиса прямостенная, прозенхимная, имеющая прямые или скошенные концы (рисунки 29, 30, 31). Эпидермис характеризуется устьицами аномоцитного типа, которые локализуются в междуреберье (рисунок 29). Эпидермис стебля опушен двумя типами простых волосков: тонкостенными, многоклеточными и двурядными или многорядными многоклеточными, которые на вершукке заканчиваются двумя якоревидными крючками (якоревидный волосок) (рисунки 31, 32). Под клетками эпидермиса в ребрах в 6-8 слоев наблюдаются клетки пластинчатой колленхимы (рисунок 28). В междуреберьях располагаются клетки основной паренхимы, они чаще всего заполнены бурым содержимым (рисунки 27, 28). Крупные клетки эндодермы образуют внутренний слой первичной коры, отделяя ее от центрального цилиндра, в котором формируется пучковый тип строения (рисунки 27, 28). Коллатеральные пучки расположены в форме круга, более мелкие в ребрах, а уже в междуреберье пучки крупнее по размеру (рисунки 26, 27). Клетки флоэмы проводящих пучков мелкоклеточные, а сосуды ксилемы формируют более или менее вертикальные ряды (рисунок 28). Склеренхима располагается большими

участками над проводящими пучками и между ними (рисунок 28). Клетки основной паренхимы формируют сердцевину стебля (рисунок 28) [27].

Лист. Подробное изучение приготовленных микропрепаратов листа с поверхности позволяет утверждать, что нижний эпидермис имеет сильно извилистые клетки (рисунок 35), верхний эпидермис - прямые или слегка извилистые клетки (рисунок 36), клетки эпидермиса вдоль жилок прямостенные, прозенхимной формы (рисунок 34). Устьица располагаются на нижней и верхней стороне листа. Устьица сопровождаются 4-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) (рисунки 33, 35). На всей поверхности листа и по краю листа располагаются простые дву- или многорядные многоклеточные волоски, заканчивающиеся на вершукке двумя якоревидными крючками или двумя остроконечными клетками (рисунки 37, 38, 40). Так же одним из диагностических признаков горлюхи ястребинковой является определенное наличие млечников, располагающихся вдоль жилок листьев (рисунки 36, 39) [27].

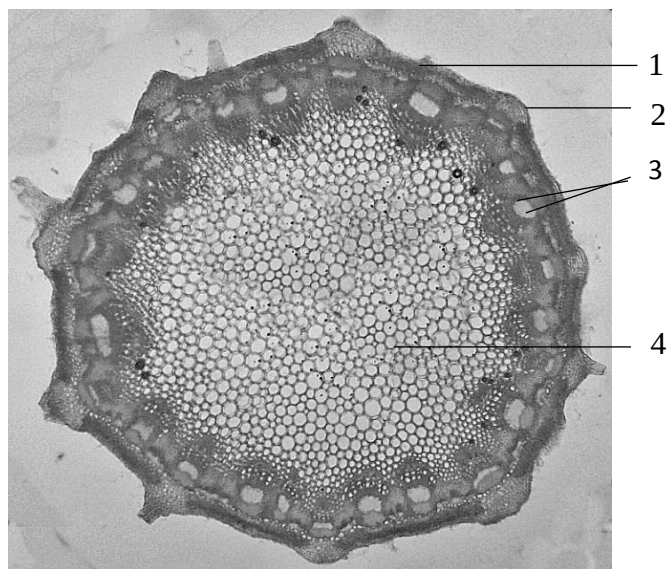


Рисунок 26 - Поперечный срез стебля
(Увел.40х)

- 1-эпидермис
- 2-первичная кора
- 3-проводящий пучок
- 4-паренхима сердцевидная

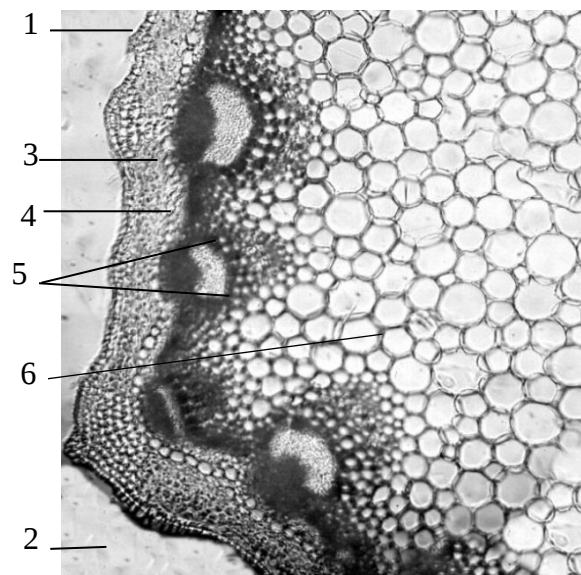


Рисунок 27- Фрагмент поперечного
среза стебля (Увел.80х)

- 1-эпидермис
- 2-пластинчатая колленхима
- 3-основная паренхима
- 4-эндодерма
- 5-коллатеральный пучок
- 6-основная паренхима сердцевины

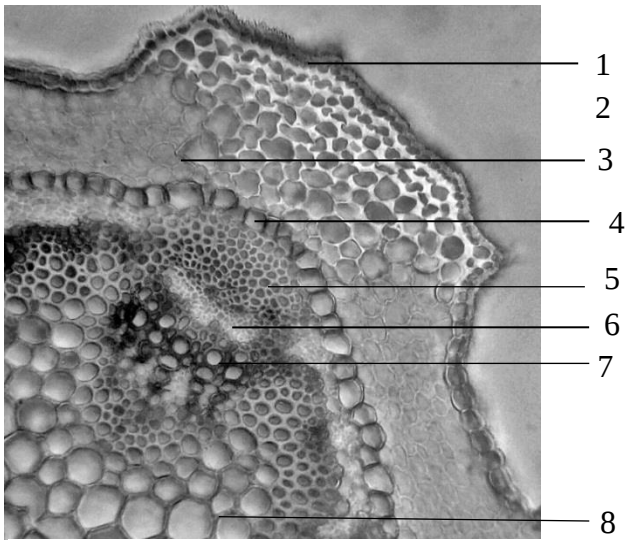


Рисунок 28- Фрагмент поперечного среза стебля (Увел.200х)

- 1-эпидермис
- 2-пластинчатая колленхима
- 3-основная паренхима
- 4-эндодерма
- 5-склеренхима
- 6-флоэма
- 7-сосуды ксилемы
- 8-основная паренхима сердцевины

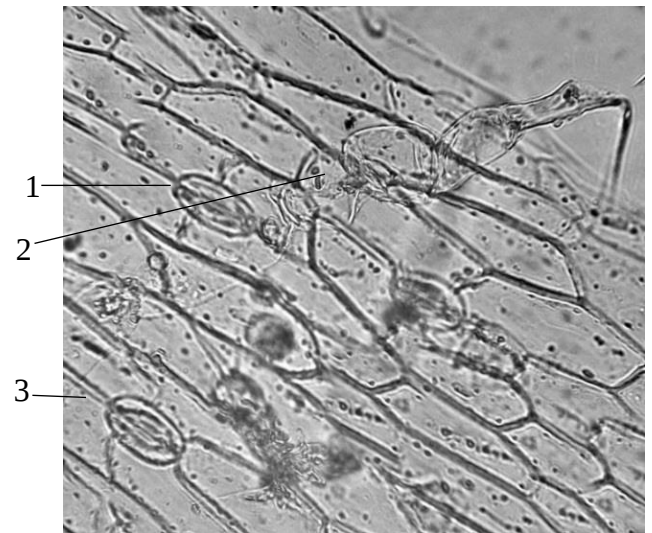


Рисунок 29- Фрагмент эпидермиса стебля в междубье (Увел.400х)

- 1-устьице
- 2-простой тонкостенный многоклеточный волосок
- 3-клетки эпидермиса

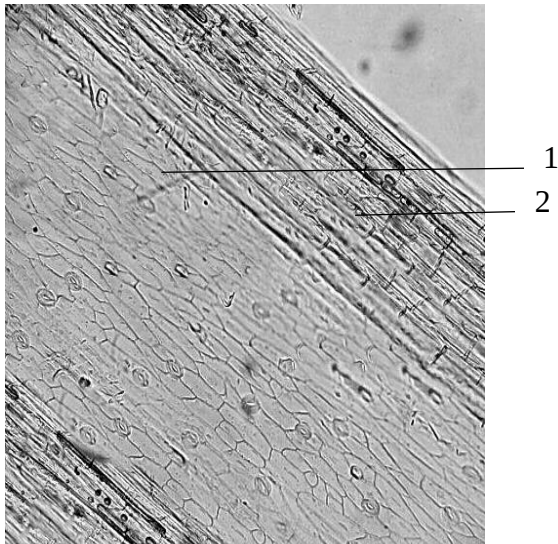


Рисунок 30- Фрагмент эпидермиса стебля (Увел.70х)

- 1-клетки эпидермиса в междубье
- 2-клетки эпидермиса вдоль ребра

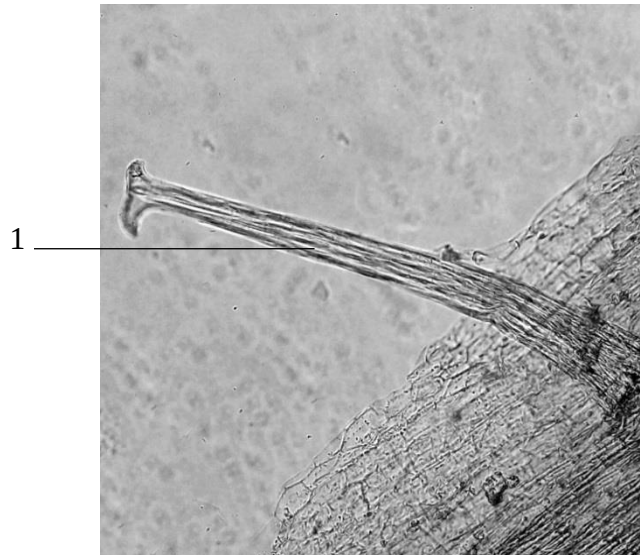


Рисунок 31- Фрагмент эпидермиса стебля, вдоль ребра (Увел.400х)

- 1-многоклеточный волосок на верхушке с двумя якоревидными крючками (якоревидный волосок).

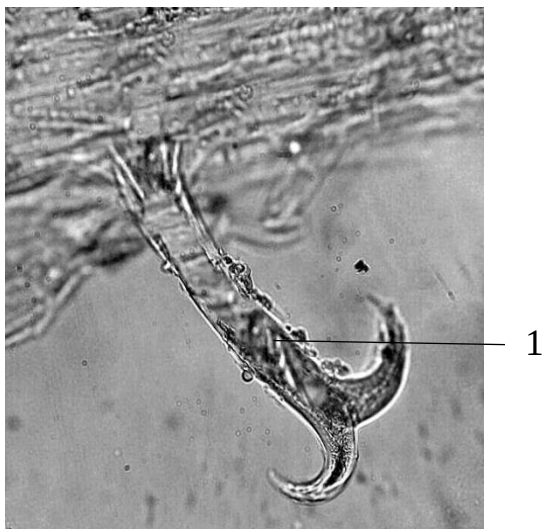


Рисунок 32- Фрагмент эпидермиса стебля (Увел.400х)
1-двурядный многоклеточный простой волосок на вершшке с двумя якоревидными крючками (якоревидный волосок).

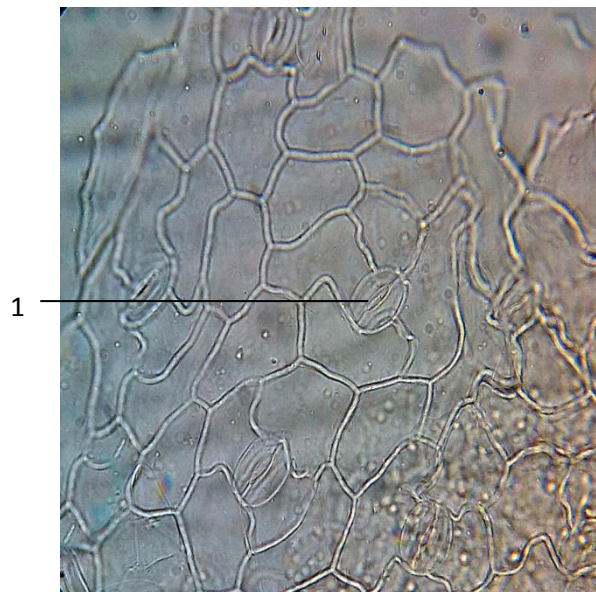


Рисунок 33 - Фрагмент верхнего эпидермиса листа (Увел.400х)
1-устьица

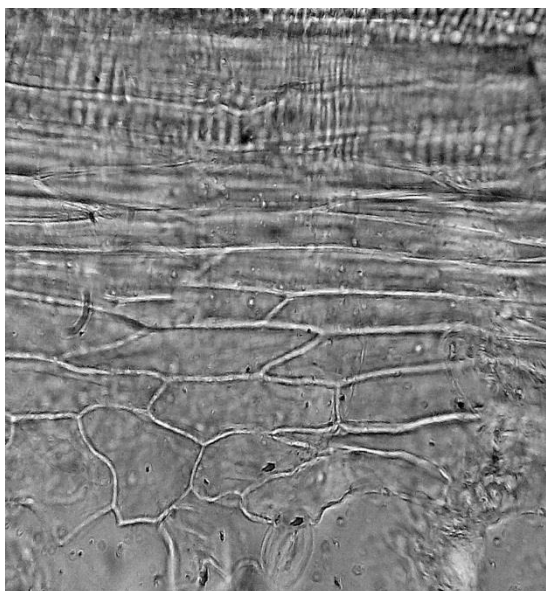


Рисунок 34 - Фрагмент эпидермиса листа вдоль жилок (Увел.400х)

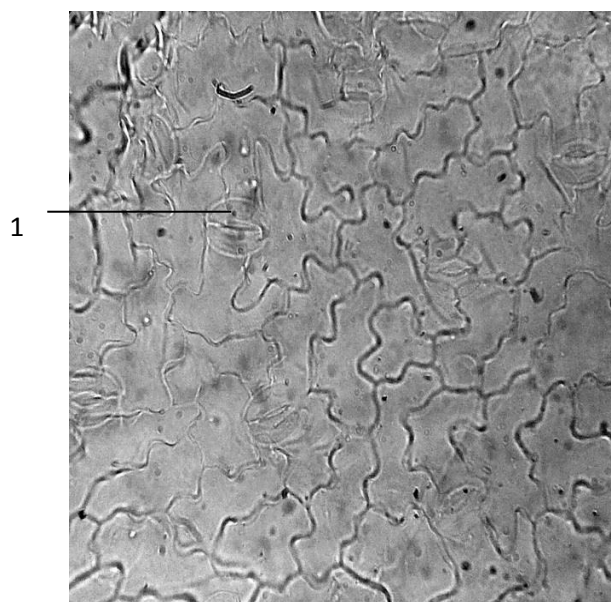


Рисунок 35 - Фрагмент нижнего эпидермиса листа (Увел.400х)
1-устьица

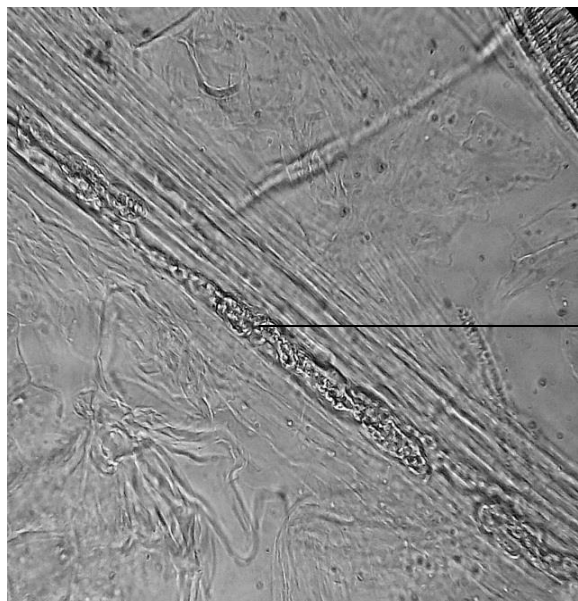


Рисунок 36 - Фрагмент эпидермиса
листа (Увел.400х)

1-млечники



Рисунок 37 – Фрагмент поверхности
листа (Увел.100х)

1-многорядный многоклеточный
простой волосок с двумя
якоревидными крючками

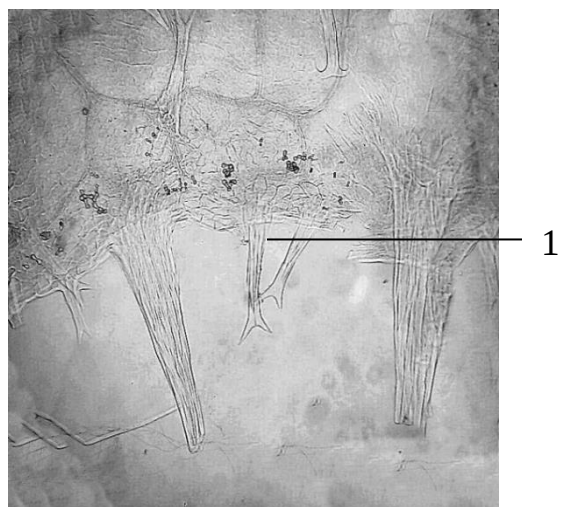


Рисунок 38- Фрагмент края листа
(Увел.100х)

1-двурядный многоклеточный
простой волосок на верхушке с
двумя остроконечными клетками

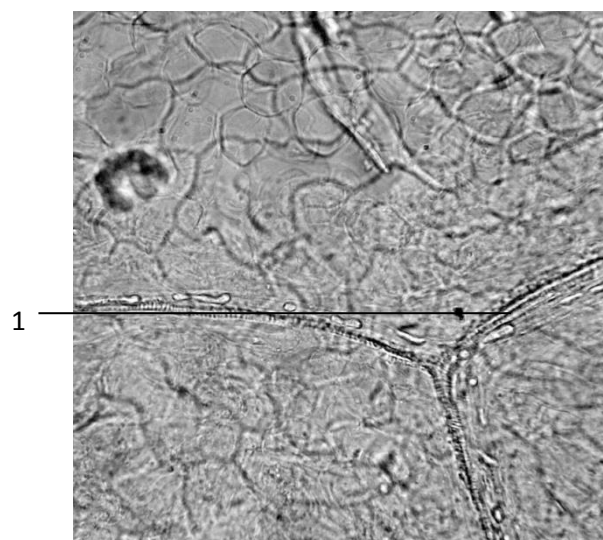
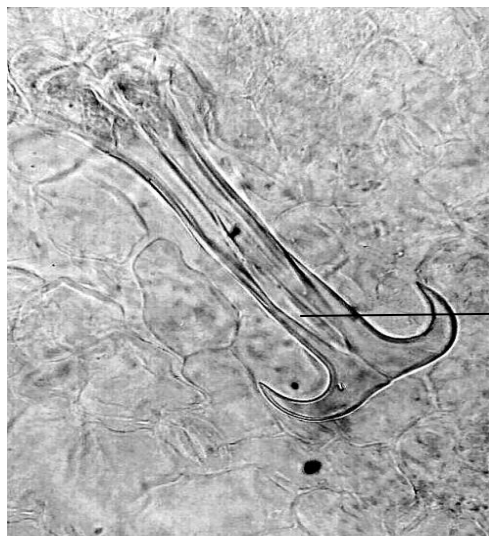


Рисунок 39 - Фрагмент
эпидермиса листа вдоль жилки
(Увел.400х)

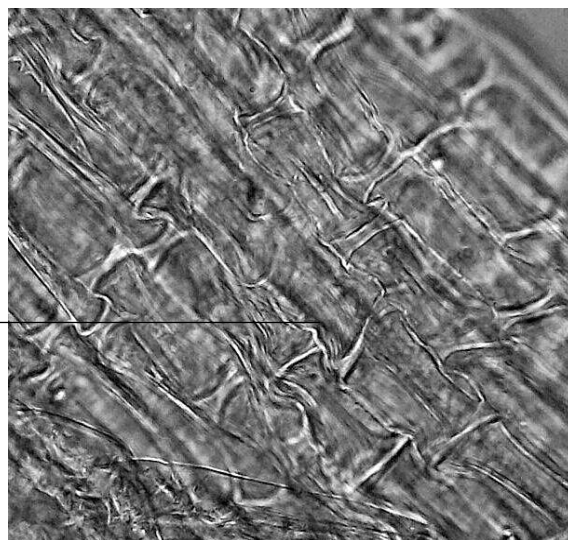
1-млечники



1

Рисунок 40-Фрагмент нижнего эпидермиса листа (Увел.400)

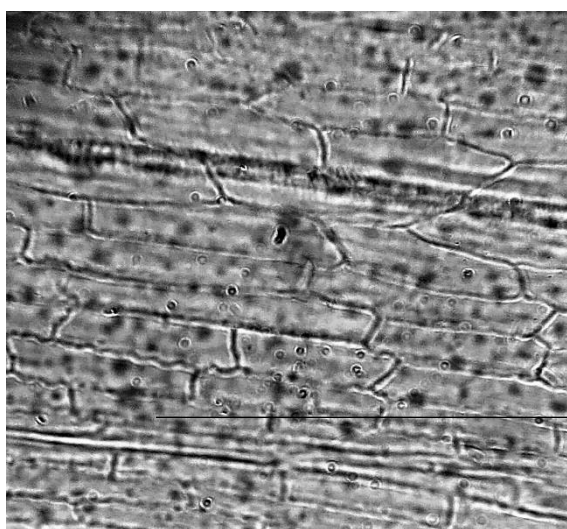
1-двурядный многоклеточный простой волосок на верхушке с двумя якоревидными клетками (якоревидный волосок)



1

Рисунок 41 – Фрагмент эпидермиса в нижней части трубки венчика язычкового цветка (Увел.400 х)

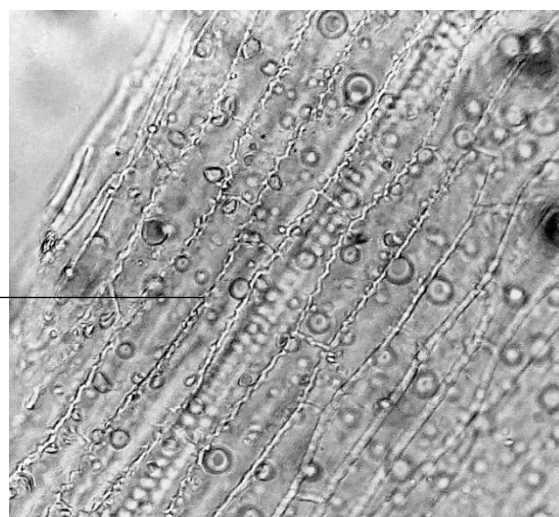
1 – клетки эпидермиса с продольной морщинистостью кутикулы



1

Рисунок 42 – Фрагмент эпидермиса в верхней части трубки венчика язычкового цветка (Увел.400 х)

1 – клетки эпидермиса



1

Рисунок 43 – Фрагмент эпидермиса зубцов венчика язычкового цветка (Увел.400 х)

1 – извилистостенные клетки эпидермиса

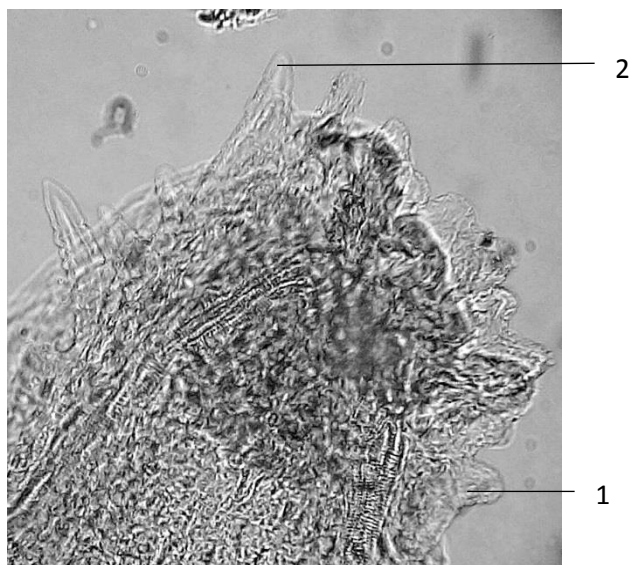


Рисунок 44 – Фрагмент эпидермиса верхушки зубцов венчика язычкового цветка (Увел.280 х)

1 – сосочковидные выросты
2 – простой одноклеточный толстостенный волосок с бородавчатой кутикулой

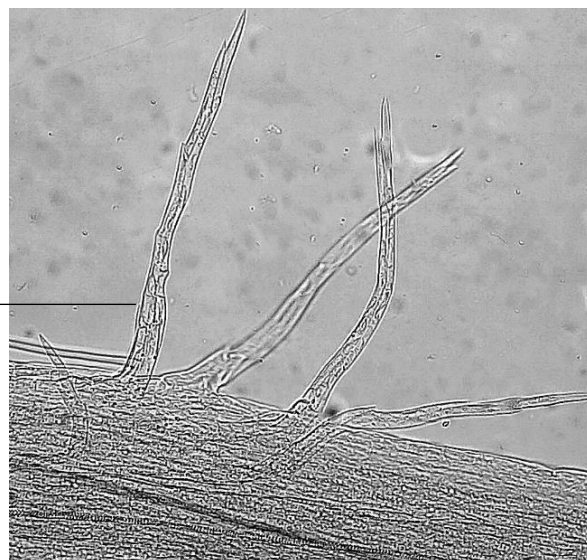


Рисунок 45 – Фрагмент эпидермиса зубцов венчика язычкового цветка (Увел.100 х)

1 – простой многорядный многоклеточный волосок с двурядной заостренной верхушкой

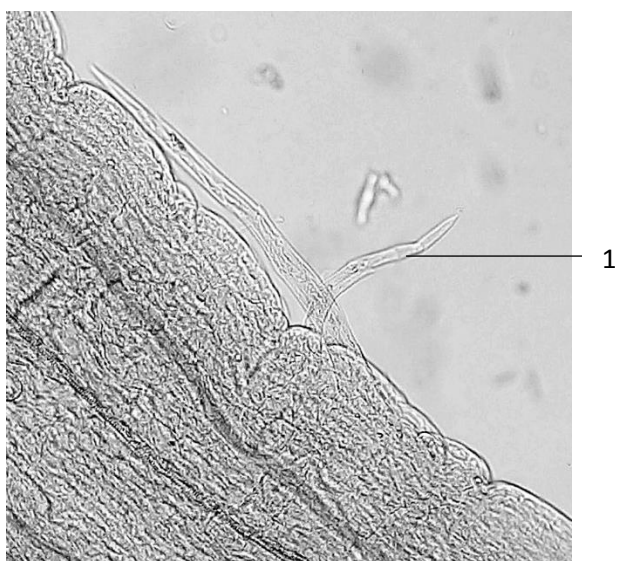


Рисунок 46 – Фрагмент эпидермиса зубцов венчика язычкового цветка (Увел.100 х)

1 – простой многорядный многоклеточный волосок с однорядной заостренной верхушкой

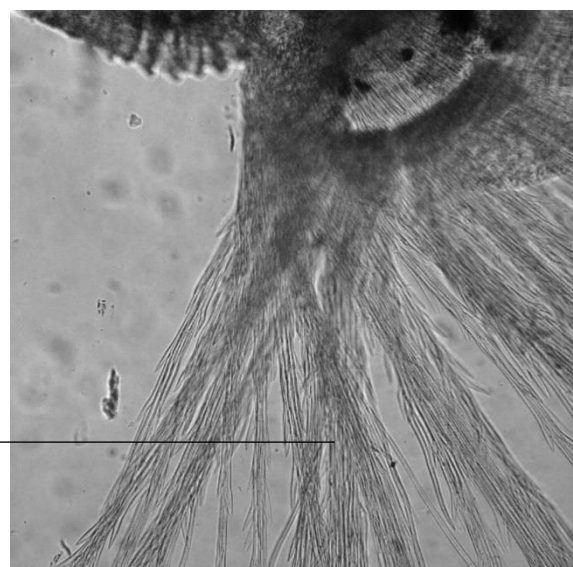


Рисунок 47 – Фрагмент завязи язычкового цветка (Увел.100 х)

1 – простые длинные тонкостенные волоски, состоящие из одноклеточных волосков сросшихся между собой

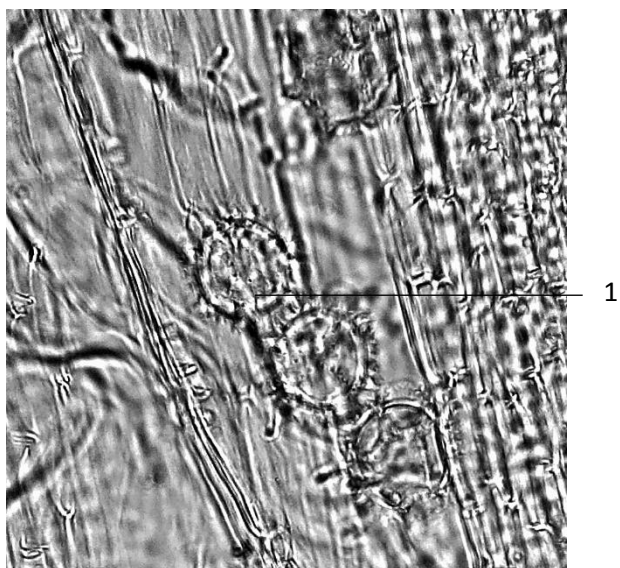


Рисунок 48 – Фрагмент эпидермиса
венчика язычкового цветка (Увел.400 х)

1 – пыльца

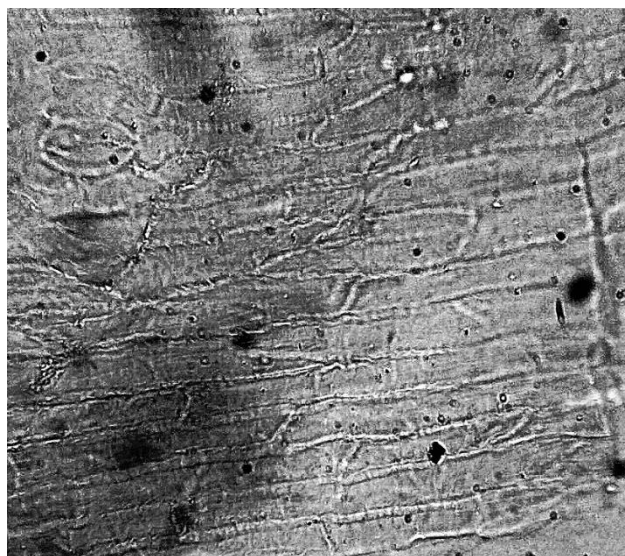


Рисунок 49 – Фрагмент эпидермиса в
основании листочка обертка
(Увел.400х)

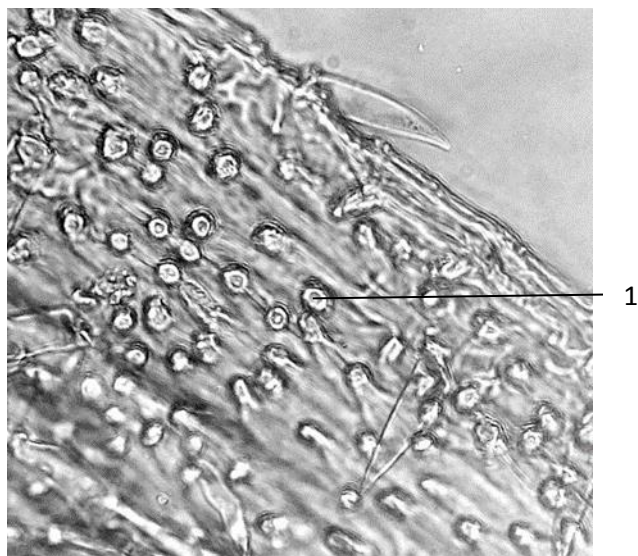


Рисунок 50 – Фрагмент эпидермиса
листочка обертки (Увел.400 х)

1 - сосочковидные выросты
эпидермиса

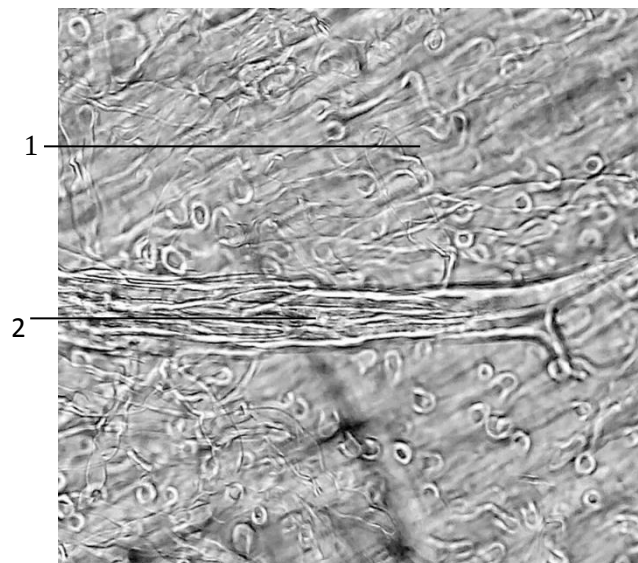


Рисунок 51 – Фрагмент эпидермиса
листочка обертки (Увел.400 х)

1 - сосочковидные выросты эпидермиса
2- простой многоклеточный волосок с
двумя остроконечными клетками

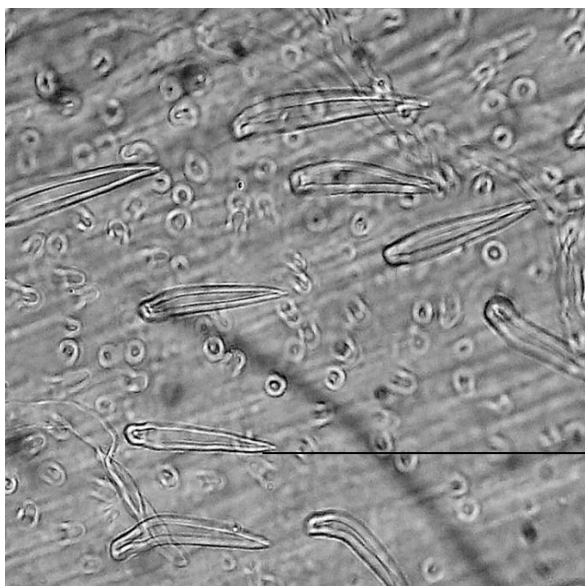


Рисунок 52 – Фрагмент эпидермиса
листочка обертки (Увел.400 х)

1 - одноклеточные остроконечные
толстостенные простые волоски

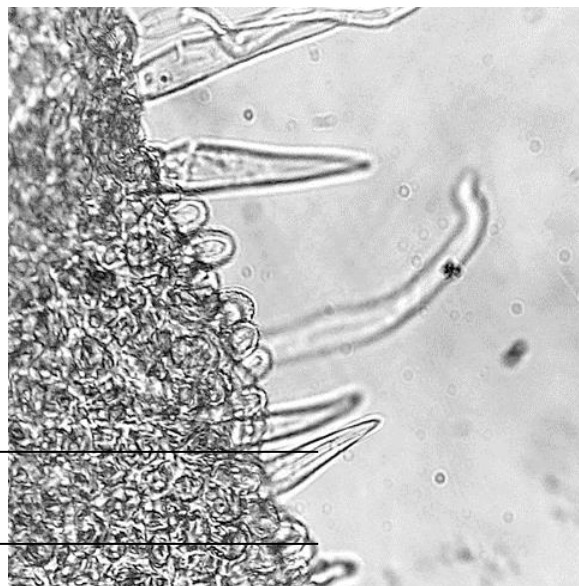


Рисунок 53 – Фрагмент эпидермиса
листочка обертки (Увел.400 х)

1 - сосочковидные выросты
эпидермиса
2 - одноклеточный остроконечный
толстостенный простой волосок

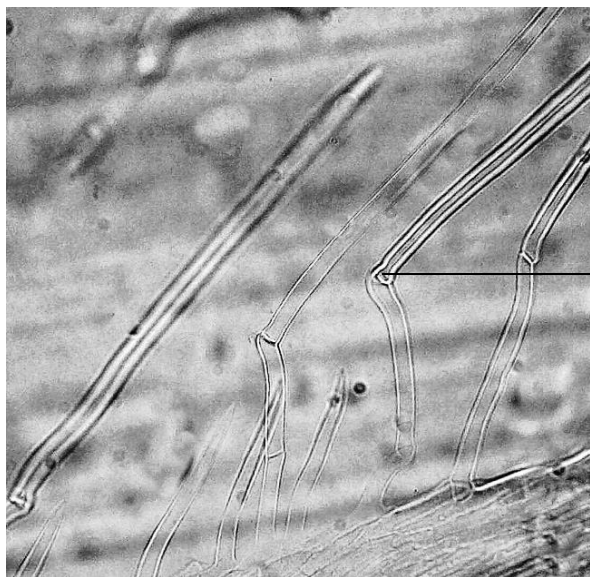


Рисунок 54– Фрагмент эпидермиса по
краю листочка обертки (Увел.400 х)

1 - простые тонкостенные длинные
многоклеточные волоски

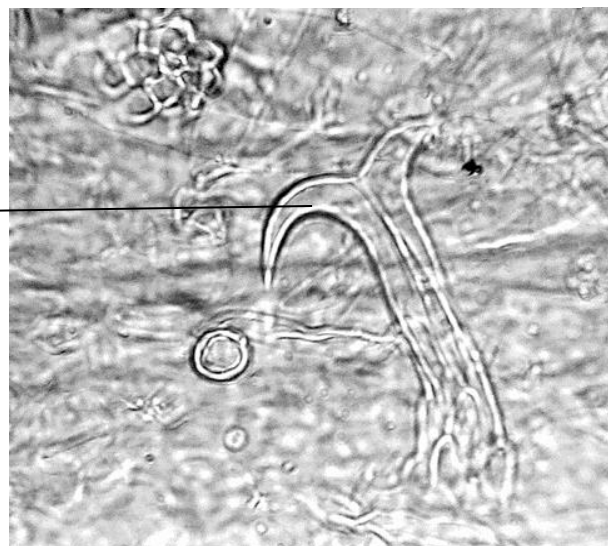


Рисунок 55 – Фрагмент эпидермиса
листочка обертки (Увел.400 х)

1 - двурядный волосок на верхушке с
двумя якоревидными крючками

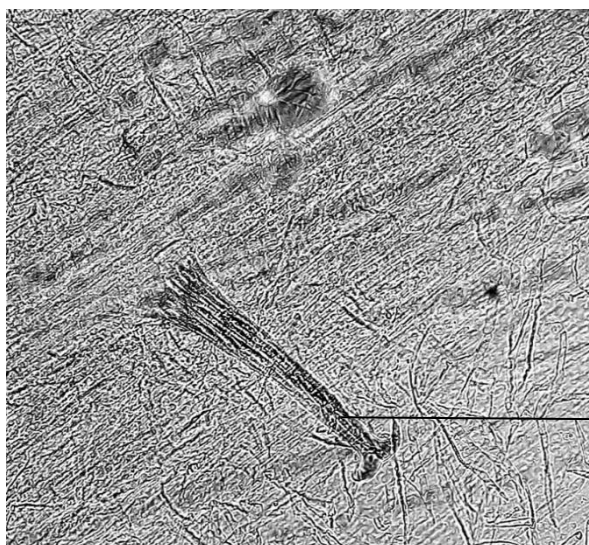


Рисунок 56– Фрагмент эпидермиса
листочка обертки (Увел.400 х)

1 - многорядный волосок на вершучке
с двумя якоревидными крючками

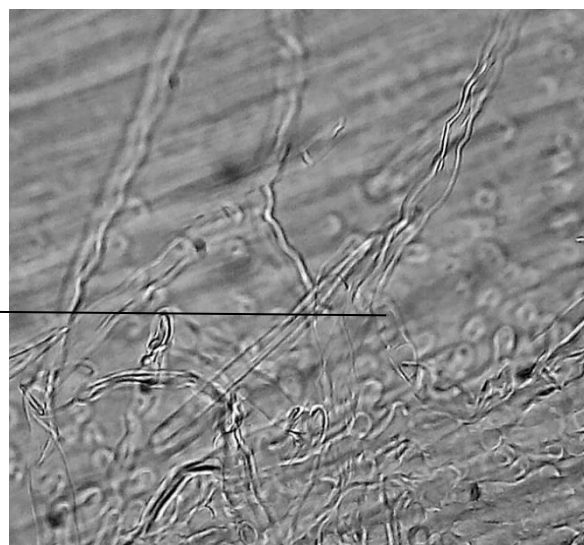


Рисунок 57 – Фрагмент эпидермиса
листочка обертки (Увел.400 х)

1 - тонкостенные длинные
многоклеточные волоски

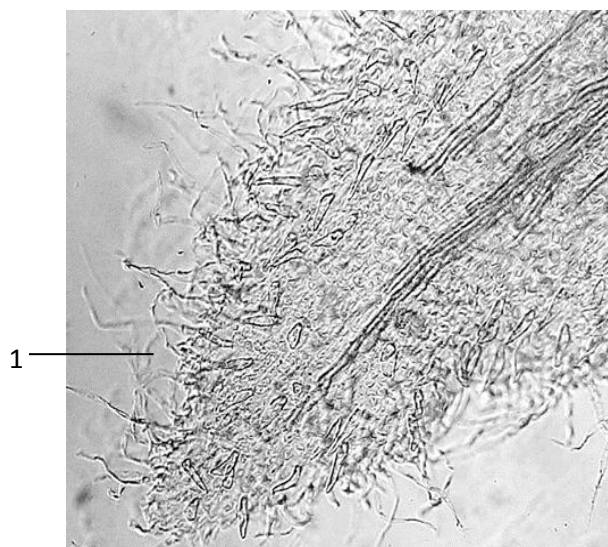


Рисунок 58 – Фрагмент эпидермиса
верхушки листочка обертки
(Увел.400 х)

1 - тонкостенные длинные
многоклеточные волоски, часто со
спадающимися клеточными
стенками

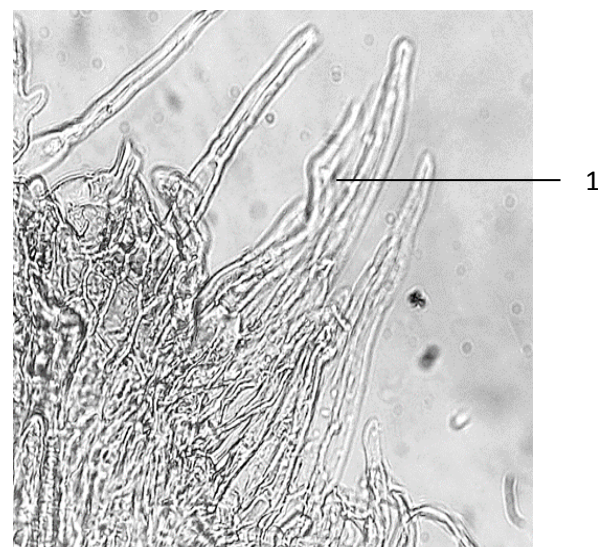


Рисунок 59 – Фрагмент эпидермиса
верхушки листочка обертки
(Увел.400 х)

1 - тонкостенные длинные
многоклеточные волоски часто со
спадающимися клеточными
стенками

Язычковые цветки. Исследование анатомического строения язычкового цветка показало, что для эпидермальных клеток нижней части трубки венчика характерно наличие прозенхимной формы с прямыми утолщенными клеточными стенками с хорошо заметной продольной морщинистостью кутикулы (рисунок 41). Эти клетки часто сдавлены в продольном направлении. Немного выше эпидермис трубки упомянутого язычкового цветка представлен следующим типом клеток: стенки слегка извилистостенные или со скошенными или с прямыми концами (рисунок 42). Клетки эпидермиса зубцов венчика прозенхимной формы, извилистостенные (рисунок 43), а на верхушке с сосочковидными выростами. Среди этих выростов встречаются одноклеточные толстостенные волоски с бородавчатой кутикулой (рисунок 44). Эпидермис язычкового цветка опушен длинными многоклеточными многорядными простыми волосками с одно-, двурядной верхушкой, которые в большом количестве встречаются в нижней части зубцов язычкового цветка (рисунки 45, 46). Завязь язычкового цветка имеет опушение, волоски тонкостенные, длинные, простые, представляющие собой несколько одноклеточных волосков, между собой сросшихся (рисунок 47). По эпидермису цветка встречаются пыльцевые зерна округлой формы с шиповатыми выростами (рисунок 48) [27].

Листочки обертки. При изучении микропрепаратов листочка обёртки выявлено, что в её основании клетки прозенхимной формы, прямостенные (рисунок 49). Далее по всей длине листочков обертки и по их краю клетки эпидермиса слегка извилистостенные с сосочковидными выростами (рисунок 50). Эпидермис листочков обертки исследуемого сырья при ближайшем рассмотрении имеет опушение с характерными разнообразными простыми волосками: иногда дву- или многорядными на верхушке с двумя якоревидными крючками или же с двумя остроконечными клетками (рисунок 51), которые встречаются вдоль главной жилки (рисунки 55, 56); одноклеточными толстостенными простыми волосками с острым концом (рисунки 52, 53) (такие волоски можно встретить практически по всей длине

листочков обёртки); тонкостенными, имеющими большую длину многоклеточными волосками, часто со спадающимися клеточными стенками, встречаются на верхушке, по краю и по всей длине листочков обёртки (рисунки 54, 57, 58, 59) [27].

4.2. Числовые показатели

4.2.1 Определение влаги

Влагу у травы горлюхи ястребинковой определяли в соответствии с ГФ XIII издания (глава 2, раздел 2.4.1) [45].

Таблица 14 – Результаты определения влажности и зольности горлюхи ястребинковой травы

Район, область, год заготовки	Статистические данные методики				
	X ср., %	S ²	S	Δx	Eотн, %
Содержание влаги					
Курский р-н, Курская область, 2015 год	11,50	0,02285	0,15116	0,42	3,65
Мценский р-н, Орловская область, 2016 год	9,43	0,01767	0,13293	0,37	3,92
Красногвардейский р-н, Белгородская область, 2016 год	10,40	0,01997	0,14132	0,39	3,75
Содержание золы общей					
Курский р-н, Курская область, 2015 год	9,70	0,01668	0,12915	0,36	3,71
Мценский р-н, Орловская область, 2016 год	8,60	0,01147	0,1071	0,3	3,49
Красногвардейский р-н, Белгородская область, 2016 год	9,30	0,01443	0,12012	0,33	3,55
Содержание золы, не растворимой в кислоте хлористоводородной					
Курский р-н, Курская область, 2015 год	0,26	0,00001	0,00316	0,01	3,85
Мценский р-н, Орловская область, 2016 год	0,81	0,00015	0,01225	0,03	3,70
Красногвардейский р-н, Белгородская область, 2016 год	0,64	0,00007	0,00837	0,02	3,13

Итоги проведенных исследований показали, что содержание влаги в горлюхе ястребинковой траве, собранной в областях средней полосы России,

имеет диапазон от 9,43% до 11,50% (таблица 14). Исходя из этого, возможно установить норматив содержания влаги в горлюхе ястребинковой траве не более 13%.

4.2.2 Определение содержания золы

Золу общую и золу, нерастворимую в кислоте хлористоводородной 10%, исследовали в соответствии с методикой ГФ XIII издания (глава 2, раздел 2.4.2). Итоги проведенного эксперимента показали, что содержание золы общей колеблется от 8,60% до 9,70%, а золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной 10% – от 0,26 % до 0,81% (таблица 14). В связи с чем, установлены нормативы по содержанию указанных показателей:

- содержание золы общей – не более 10%;
- содержание золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной 10% – не более 1%.

4.2.3 Анализ содержания экстрактивных веществ

Выбор оптимального экстрагента при определении экстрактивных веществ горлюхи ястребинковой травы проводили согласно методике ГФ XIII, сумму экстрактивных веществ определяли количественно в виде сухого остатка (глава вторая, раздел 2.4.3). В качестве экстрагирующего компонента обоснованно применили воду очищенную и различные концентрации спирта этилового (96%, 70%, 50%, 30%).

Таблица 15 – Зависимость содержания экстрактивных веществ в горлюхе ястребинковой траве от применяемого экстрагента

Наименование экстрагента	Статистические данные методики				
	X, %	S ²	S	Δx	Eотн, %
Вода очищенная	35,79	0,20627	0,45417	1,26	3,52

Продолжение таблицы 15

Спирт этиловый 96%	15,99	0,06758	0,25996	0,72	4,5
Спирт этиловый 70%	26,91	0,15532	0,39411	1,1	4,09
Спирт этиловый 50%	29,01	0,16448	0,40556	1,13	3,9
Спирт этиловый 30%	28,29	0,09407	0,306708331	0,852649	3,01

Итоги, приведенные в таблице 15 отражают, что максимальное извлечение экстрактивных веществ происходит при использовании в качестве экстрагирующего вещества воды очищенной (35,79%), основываясь на этом, рекомендовано установить норматив по содержанию экстрактивных веществ, а именно извлекаемых водой очищенной, не менее 30%.

4.3 Содержание основных групп биологически активных веществ

4.3.1 Содержание гидроксикоричных кислот

Разработка методов стандартизации сырья неизученных видов растений является актуальной задачей. Основными группами действующих веществ горлюхи ястребинковой травы являются сесквитерпеновые соединения, фенольные соединения и полисахариды, о чем свидетельствуют результаты нашего фитохимического изучения.

Фенольные соединения в горлюхи ястребинковой траве представлены флавоноидами, дубильными веществами, кумаринами, гидроксикоричными кислотами. Среди них преобладающими являются гидроксикоричные кислоты. В связи с чем нами была разработана методика количественного определения гидроксикоричных кислот. Гидроксикоричные кислоты в растительном сырье определяют с помощью различных методов: прямой спектрофотометрии, хроматоспектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, газожидкостной хроматографии [51, 63, 75, 76, 107].

В основе методики определения гидроксикоричных кислот в горлюхе ястребинковой траве был использован спектрофотометрический метод по собственному поглощению гидроксикоричных кислот в УФ-области спектра [107].

Количественное определение гидроксикоричных кислот

Для анализа горлюхи ястребинковой травы нами модифицирована методика определения гидроксикоричных кислот с помощью методов спектрофотометрии.

Для установления стандартного образца, используемого при расчете суммы гидроксикоричных кислот, нами, прежде всего, были проведены изучения спектров поглощения водно-спиртовых извлечений (концентрация 50%, 70% спирт этиловый) из травы горлюхи ястребинковой (рисунок 60). При изучении полученных ультрафиолетовых спектров установлен максимум поглощения водно-спиртовых извлечений, который находится при длине волны 325 нм. Гидроксикоричные кислоты имеют максимум поглощения в этой же области спектра, что свидетельствует об их основном вкладе в УФ-спектр водно-спиртового извлечения из горлюхи ястребинковой травы и о том, что они являются диагностически значимыми соединениями для неё. Большинство гидроксикоричных кислот имеют максимумы поглощения в области 325-330 нм, и их максимум полностью совпадает с максимумом водно-спиртового извлечения из горлюхи ястребинковой травы, что является основанием для использования этой длины волны для их спектрофотометрического определения. Проведенные экспериментальные исследования, представленные в 3 главе показывают, что состав гидроксикоричных кислот включает в себя в основном хлорогенную, кофейную и фероловую кислоты с заметным преобладанием кофейной и фероловой кислот. В связи с чем в качестве стандартного вещества для

расчета содержания гидроксикоричных кислот нами использована кофейная кислота. Расчет содержания гидроксикоричных кислот горюхи ястребинковой травы целесообразно проводить с использованием удельного показателя поглощения кофейной кислоты, определяемого при длине волны 325 нм. Его величина составила 782.

Для извлечения гидроксикоричных кислот из растительного сырья существенно значимыми параметрами являются: степень измельченности сырья, используемый экстрагент, кратность экстракции, время, пошедшее на экстрагирование [63, 71, 85].

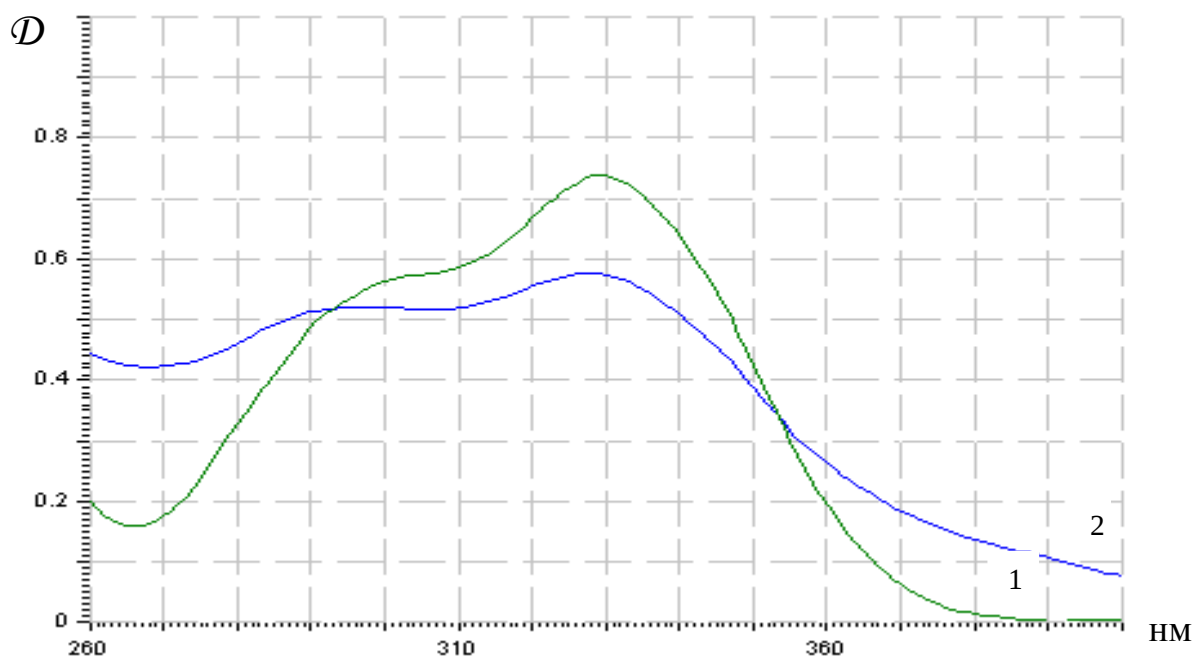


Рисунок 60 – Электронный спектр водно-спиртового извлечения из горюхи ястребинковой травы (2) и раствора кофейной кислоты (1) (экстрагент 50% спирт этиловый).

Итоги проведения исследований по изучению зависимости измельченности сырья на экстракционную способность гидроксикоричных кислот из горюхи ястребинковой травы представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Влияние степени измельченности сырья на количественную экстракцию гидроксикоричных кислот из горлюхи ястребинковой травы

Степень измельченности сырья, мм	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчёте на кофейную кислоту, %
1	$2,31 \pm 0,11$
2	$2,40 \pm 0,01$
3	$2,12 \pm 0,09$

Результаты представленной таблицы убедительно показывают, что максимально возможное извлечение гидроксикоричных кислот из исследуемой горлюхи ястребинковой травы наблюдается при тщательном измельчении сырья до 1 мм и 2 мм, что и положено в основу разрабатываемой методики.

Немаловажное значение для проведения процесса экстракции гидроксикоричных кислот имеет природа экстрагента, применяемого для их извлечения. Извлечение гидроксикоричных кислот чаще всего осуществляется водой очищенной или спиртом этиловым раздичной концентрации [71, 85], что мы и применили на практике при разработки методики (таблица 17).

Таблица 17 – Влияние концентрации спирта этилового на полноту извлечения гидроксикоричных кислот из горлюхи ястребинковой травы

Концентрация спирта этилового	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчёте на кофейную кислоту, %
30%	$2,23 \pm 0,08$
50%	$2,51 \pm 0,11$
70%	$2,39 \pm 0,09$
96%	$0,91 \pm 0,04$

Из данных таблицы делаем логичный вывод, что оптимальным экстрагентом являются 50% спирт этиловый и 70% спирт этиловый. Нами в дальнейшем использован 50% спирт этиловый, показавший серьезную экономию.

При изучении времени, пошедшего на экстракцию, была взята экстракция до наступления равновесия. Исследования наблюдаемой динамики экстрагирования гидроксикоричных кислот из горлюхи ястребинковой травы

спиртом этиловым в концентрации 50% при соотношении взятого сырья к экстракту 1:100 в зависимости от времени экстрагирования позволили достоверно установить, что наибольшее их содержание наблюдается через 45 минут (таблица 18).

Таблица 18 - Влияние времени экстрагирования на полноту извлечения гидроксикоричных кислот из горлюхи ястребинковой травы

Время экстрагирования, мин.	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчёте на кофейную кислоту, %
30	$2,21 \pm 0,08$
45	$2,51 \pm 0,10$
60	$2,26 \pm 0,09$

Проведенные нами исследования легли в основу предлагаемой методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в горлюхе ястребинковой траве.

Методика количественного определения гидроксикоричных кислот

Аналитическую пробу сырья горлюхи ястребинковой измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с размером отверстий 1 мм или 2 мм.

Около 1,0 г (точная навеска) подготовленного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, в неё же приливают 100 мл спирта этилового 50%. Колбу закрывают пробкой, помещают на технические весы и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и помещают на кипящую водяную баню (умеренное кипение) на 45 минут. По прошествии 45 минут колбу охлаждают, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют первоначальный вес спиртом этиловым 50%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, первые 10 мл фильтрата отбрасывают.

Для анализа гидроксикоричных кислот готовят испытуемый раствор: 1,0 мл, полученного извлечения помещают в мерную колбу объемом 25,0 мл и доводят до метки спиртом этиловым 50%.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 325 нм.

В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 50%.

Содержание суммы гидроксикоричных кислот (X) в процентах в пересчёте на кофейную кислоту и абсолютно сухое сырьё вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * A * B * 100}{782 * a * b * (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого извлечения;

A – объем приготовленного извлечения, мл;

B – объем мерной колбы, используемой для разведения и анализа, мл;

b – объем извлечения, взятый для разведения и анализа, мл;

782 – удельный показатель поглощения ($E_{1\%}^{1\text{см}}$) кофейной кислоты при $\lambda=325$ нм;

a – навеска сырья, г;

W-потеря в массе при высушивании сырья, %.

4.3.2 Валидационные характеристики спектрофотометрического определения гидроксикоричных кислот в горлюхе ястребинковой траве

Для изучения возможности использования разработанной методики в фармацевтическом анализе, для целей стандартизации горлюхи ястребинковой травы, необходима разработка валидационных характеристик. Валидационные исследования проводили согласно ОФС «Валидация аналитических методик» и «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIII издания [45]. Оценку разработанной аналитической методики осуществляли по

следующим характеристикам: линейности, прецизионности (повторяемости и промежуточной прецизионности), правильности [41, 45, 97].

Линейность методики показывает наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемых веществ в пределах аналитической области методики. Линейность проверяют экспериментально с измерением аналитических сигналов для не менее чем 5 проб с различными концентрациями, что и было выполнено в процессе работы. Первоначально нами были приготовлен раствор стандартного образца кислоты кофейной (Dr. Ehrenstorfer GmbH) 0,29%, из которого при разбавлении готовили растворы с различной концентрацией для определения содержания гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту. Согласно методике были приготовлены растворы, у которых впоследствии измеряли оптическую плотность при длине волны 325 нм, а зависимость оптической плотности от концентрации выражали в представленном графике (таблица 19, рисунок 61).

Рассчитанный коэффициент корреляции составил 0,99917 (таблица 20, рисунок 61), т.е. разработанная методика является линейной.

Таблица 19 – Линейность методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой

№ п/п	Концентрация кофейной кислоты мг/ мл	Оптическая плотность
1	0,087	0,291
2	0,116	0,380
3	0,145	0,462
4	0,174	0,569
5	0,203	0,664
6	0,232	0,767

Таблица 20 - Результаты расчета коэффициента корреляции

f	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	A	R
5	0,160	0,522	3,287	-0,002	0,99917

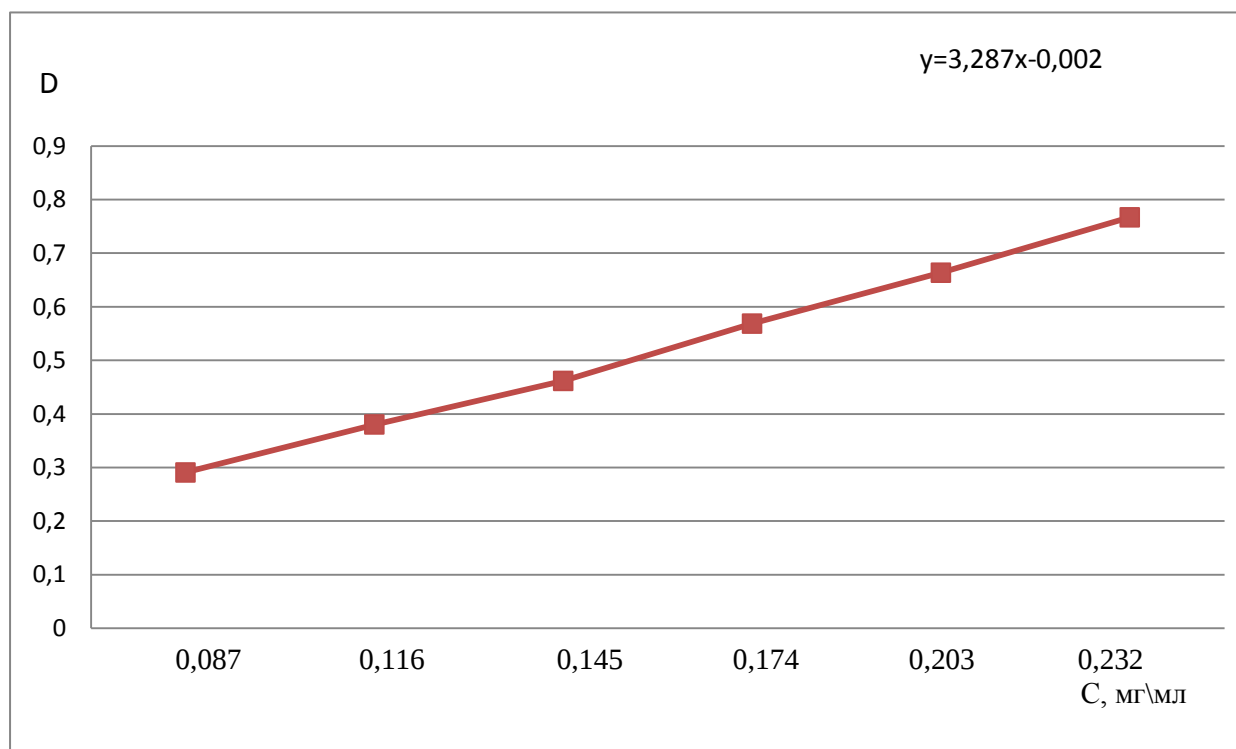


Рисунок 61 - Зависимость оптической плотности растворов кофейной кислоты от её концентрации

Диапазон использования разработанной нами методики изучали путем получения извлечений спиртом этиловым 50% из навесок различной массы: 1,00 г, 1,25 г, 1,50 г, 1,75 г, 2,0 г. Полученные извлечения использовали для определения суммы гидроксикоричных кислот и построения графика зависимости оптической плотности полученных извлечений от массы сырья (рисунок 62).

Таблица 21 - Результаты расчета коэффициента корреляции

f	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	A	R
4	1,4999	0,5797	0,38	-0,01012	0,999186

Коэффициент корреляции удовлетворял предъявляемым требованиям ($R=0,999186$), что позволяет сделать вывод о линейности разработанной методики (таблица 21, рисунок 62).

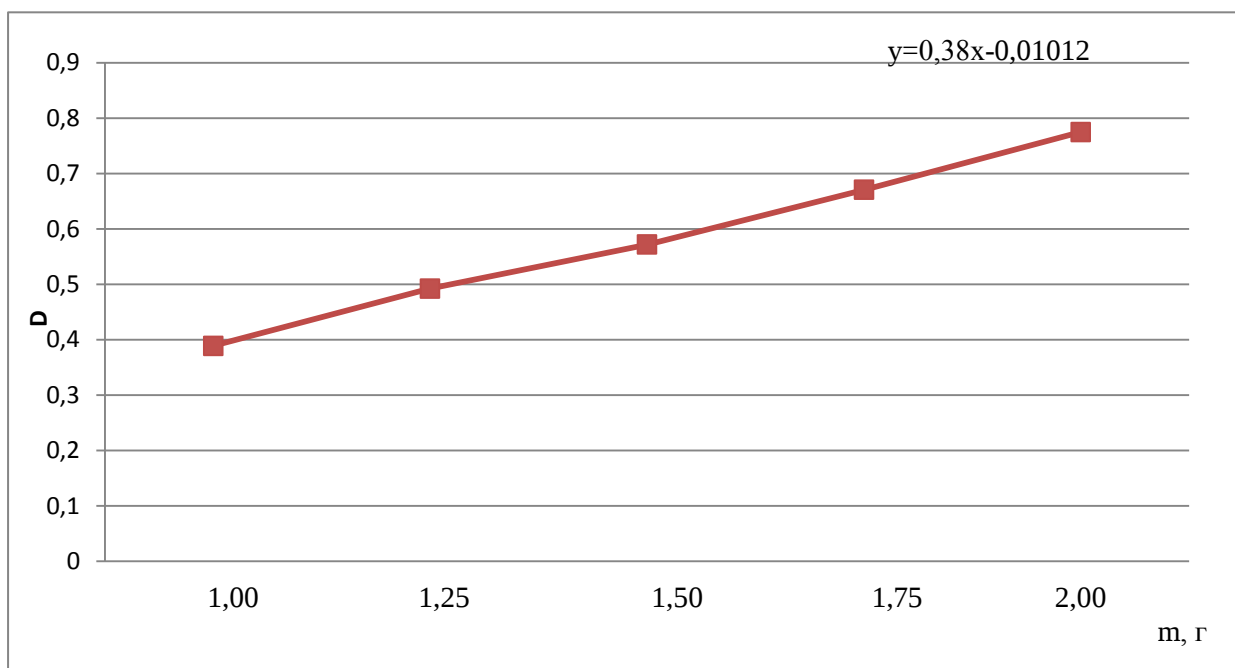


Рисунок 62 – Градуировочный график зависимости оптической плотности извлечения из горюхи ястребинковой травы от навески сырья

Прецизионность методики характеризует рассеянность результатов, которые получаются при её использовании, относительно среднего результата. Прецизионность нами оценивалась как повторяемость и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность.

Повторяемость методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых условиях (один и тот же исполнитель, один образец сырья, одни и те же реактивы), в проведенных 6 повторностях (таблица 22).

Таблица 22 - Итоги определения повторяемости методики

№ п/п	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчёте на кофейную кислоту, %	Статистические характеристики метода
1	2,55	$\bar{X} = 2,50$ $S_x^2 = 0,0023766$ $S_{xcp} = 0,048751$ $\Delta X = 0,125$ $E_{отн.} = 5,01$ $X_{cp} + \Delta X_{cp} = 2,55 \pm 0,125$
2	2,44	
3	2,48	
4	2,52	
5	2,45	
6	2,55	

Результатом проведенной на этом этапе работы было определение точной величины относительного стандартного отклонения, его величина в любом случае не должна превышать известные 10%. В нашем случае, после подсчетов, она составила 5,01% (таблица 22).

Промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность разработанной методики оценивали в условиях работы одной лаборатории, но в разные дни и разными исследователями кафедры. Оценку промежуточной прецизионности проводили 2 аспиранта кафедры, исследуя по 3 образца сырья горлюхи ястребинковой и проводя исследование в 3 повторностях (таблица 23).

Таблица 23 – Итоги определени промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности методики

Повторность исследований	Аналитик	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту в горлюхе ястребинковой траве, %		
		Образец сырья №1	Образец сырья №2	Образец сырья №3
1	2	3	4	5
1	1	2,61	2,71	2,21
2	1	2,66	2,76	2,29
3	1	2,46	2,69	2,24
4	2	2,44	2,75	2,35
5	2	2,48	2,77	2,31
6	2	2,45	2,68	2,21
Среднее значение		2,52	2,73	2,27
Стандартное отклонение (относительное), (RSD%)		9,58	3,61	6,50

В представленной таблице видно, что полученная величина относительного стандартного отклонения не выходит за пределы 9,58%, что в полной мере однозначно свидетельствует о том, что полученные в этом случае данные сравнимы и методика является достоверной.

Валидируемая методика является правильной, если полученные результаты лежат внутри доверительных интервалов средних результатов анализов, полученных экспериментально [45]. Для определения правильности

методики использовали метод добавок, при котором осуществляли прибавление стандартного образца кофейной кислоты с известной концентрацией (0,29%, 1,00 мл и 2,00 мл) к испытуемому извлечению (таблица 24).

Таблица 24 – Итоги определения правильность методики

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту кофейную, мг	Добавлено СО кислоты кофейной, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Найдено относительно введенного, %	Статистические характеристики
27,6	0,116	27,716	27,706	99,96	$X_{\text{среднее}} = 100,78$ $S_x^2 = 2,2680305$ $S = 1,505998$ $\Delta X = 3,479$ $E_{\text{отн}} = 3,45$ $X_{\text{ср}} \pm \Delta X = 100,78 \pm 3,48$
27,6	0,116	27,716	27,731	100,05	
27,6	0,116	27,716	27,201	98,14	
27,6	0,116	27,716	28,115	101,43	
27,6	0,116	27,716	28,262	101,97	
27,6	0,232	27,832	27,808	100,08	
27,6	0,232	27,832	28,268	101,56	
27,6	0,232	27,832	28,767	103,35	
27,6	0,232	27,832	27,904	100,25	
27,6	0,232	27,832	28,115	101,01	
Среднее значение выхода				100,78	

Данные представленной таблицы показывают, что открываемость методики колеблется от 98,14% до 103,56%. Следовательно предложенная методика спектрофотометрического определения гидроксикоричных кислот в горлюхе ястребинковой траве соответствует валидационным параметрам и может быть использована для определения качества сырья горлюхи ястребинковой.

4.3.3 Содержание суммы гидроксикоричных кислот в горлюхи ястребинковой траве

Согласно разработанной методике было определено содержание суммы гидроксикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой, произрастающей в различных местах и различных лет заготовки.

Таблица 25 - Содержание суммы суммы гидроксикоричных кислот в горлюхи ястребинковой траве (n=5, P= 95%)

№ п/п	Район, область, год заготовки сырья	Статистические данные методики				
		X ср, %	S ²	S	Δx	Еотн, %
1	Курский р-н, Курская область, 2015 год	2,52	0,00088	0,02966	0,08	3,27
2	Мценский р-н, Орловская область, 2016 год	2,29	0,00165	0,04062	0,11	4,93
3	Красногвардейский р-н, Белгородская, область, 2016 год	2,76	0,00128	0,03577	0,10	3,61
4	Курский р-н, Курская область, 2016 год	2,45	0,00075	0,02738	0,08	3,11
5	Красногвардейский р-н, Белгородская, область, 2017 год	2,65	0,00157	0,039623	0,11	4,15
6	Курский р-н, Курская область, 2017 год	3,81	0,00293	0,05412	0,15	3,95

Данные таблицы 25 свидетельствуют о том, что содержание суммы гидроксикоричных кислот в горлюхи ястребинковой траве варьирует от 2,29% до 3,81%. Результаты экспериментальных исследований позволили установить норматив по содержанию гидроксикоричных кислот, который установлен на уровне не менее 2,0%. Метрологическая характеристика разработанной методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот отражена в таблице 25.

4.4 Содержание полисахаридов

При проведении фитохимических исследований нами было установлено, что горлюхи ястребинковой трава может быть источником полисахаридов, широко применяемым в медицинской практике.

Полисахариды находят применение в медицине в качестве противовоспалительных, обволакивающих, смягчительных и отхаркивающих средств [87, 114].

Отдельные полисахариды обладают антибактериальной, противовирусной, иммуностропной активностями [113, 120, 148, 199].

В эксперименте установлено, что полисахариды снижают уровень холестерина в сыворотке крови [148], повышают работоспособность, производные хитозана и фуконаида обладают антикоагулянтной активностью [148].

Выявлена противоопухолевая активность полисахаридов [113].

В связи с вышесказанным нами разработана методика количественного определения полисахаридов. Полисахариды в лекарственном растительном сырье и растительных препаратах определяют гравиметрическими [45], спектрофотометрическими [106] и хроматоспектрофотометрическими методами [167].

В последнее время качественный и количественный состав полисахаридов определяют методами высокоэффективной и газожидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [169, 173, 178].

Нами за основу разрабатываемой методики положен гравиметрический метод, как наиболее распространенный для сырья, содержащего полисахариды.

4.4.1 Разработка условий гравиметрического определения суммы полисахаридов

Разработку методики определения полисахаридов с использованием гравиметрического метода проводили на одном образце сырья горлюхи ястребинковой.

При разработке методики гравиметрического определения полисахаридов были изучены:

- количественная экстракция полисахаридов из травы горлюхи ястребинковой;
- выбор условий осаждения полисахаридов из водных извлечений.

Извлечение полисахаридов из растительного сырья зависит от многих факторов: размера измельченных частиц сырья, используемого экстрагента, соотношения объема применяемого экстрагента по отношению к массе сырья, времени экстракции, температурного режима экстракции.

Согласно литературным данным для сырья, содержащего полисахариды, степень измельченности чаще всего составляет 1-2 мм. Полученные нами результаты показывают, что максимально возможное извлечение полисахаридов происходит при измельченности сырья, до размера частиц 2 мм (таблица 26).

Таблица 26 – Влияние степени измельченности горлюхи ястребинковой травы на полноту экстрагирования полисахаридов

Степень измельчения сырья, мм	Содержание суммы полисахаридов, %
1	6,04±0,17
2	8,97±0,37
3	5,76±0,25

Извлечение полисахаридов осуществляли водой очищенной в качестве экстрагента [86]. Для извлечения полисахаридов было использовано сырье с размером частиц 2 мм, при этом соотношение массы сырья к объему экстрагента составило 1:10. Полученные нами результаты показывают, что максимальное извлечение полисахаридов происходит при четырехкратной экстракции по 30 минут (таблица 27).

Таблица 27 – Влияние времени экстракции на содержание суммы полисахаридов горлюхи ястребинковой травы (степень измельчения 2 мм)

Время экстрагирования, мин.	Содержание суммы полисахаридов, %
30	2,62±0,10
60 (30*2)	6,05±0,13
90 (30*3)	8,06±0,17
120 (30*4)	8,94±0,20
150 (30*5)	8,58±0,23

Для осаждения полисахаридов из водных извлечений применяются органические растворители и 96% спирт этиловый [21, 86]. Нами проведено определение объема спирта этилового 96% для наиболее полного осаждения полисахаридов, содержащихся в горлюхи ястребинковой траве (таблица 28).

Таблица 28 – Результаты определения оптимального объема спирта этилового 96% для осаждения полисахаридов

Соотношение водного извлечения и спирта этилового 96%	Содержание суммы полисахаридов, %
1:1	5,01±0,14
1:2	7,12±0,21
1:3	8,61±0,32
1:4	8,77±0,35

Данные таблицы 28 показывают, что максимальный объем спирта этилового 96%, необходимый для полного осаждения полисахаридов, составляет 1:3.

Проведенные исследования и полученные результаты позволили нам предложить методику гравиметрического определения полисахаридов в горлюхи ястребинковой траве.

4.4.2. Методика гравиметрического определения полисахаридов

Около 5,0 г (точная навеска) сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито, с размером отверстий 2 мм, помещали в колбу вместимостью 250 мл, вливали в неё 100 мл воды очищенной. Колбу помещали на электрическую плитку, присоединяли к обратному холодильнику, и кипятили содержимое колбы в течение 30 минут, периодически всряхивая колбу. По истечении 30 минут водное извлечение осторожно сливали с сырья и проводили экстрагирование полисахаридов из этого же сырья еще три раза по 100 мл воды очищенной, проводя кипячение в течение 30 минут и сливая водные извлечения вместе.

Объединённое водное извлечение центрифугировали с частотой вращения 5000 об/мин на протяжении 10 минут. Далее водное извлечение пропускали через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 500 мл, марлю промывали водой очищенной и объем в колбе доводили до метки (раствор А).

Аликвоту (25 мл) раствора А помещали в центрифужную пробирку, в нее же вносили 75 мл спирта этилового 96%. Содержимое пробирки перемешивали, помещали на водяную баню, имеющую температуру 60°C на 5 минут, далее пробирку выдерживали на воздухе 60 минут. По прошествии 60 минут пробирку помещали в центрифугу и центрифугировали 30 минут с частотой вращения 5000 об/мин. Пробирку вынимали и на первом этапе фильтровали надосадочную жидкость под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром, который был высушен в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 100-105°C. После всего перечисленного на тот же самый фильтр переносили количественно полученный осадок, оставшийся после центрифугирования, и промывали осадок смесью воды очищенной и спирта этилового 96% (1:4). Осадок на фильтре высушивали первоначально на

воздухе, затем в сушильном шкафу при температуре 100-105⁰С до тех пор, пока не будет установлена постоянная масса.

Содержание полисахаридов (X) в процентах вели в пересчете на абсолютно сухое сырье:

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

где m_1 – масса высушенного фильтра без осадка, г;

m_2 – масса высушенного фильтра с осадком, г;

m – навеска сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

4.4.3 Валидационные параметры методики гравиметрического определения полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве

Разработанную методику гравиметрического определения полисахаридов валидировали по общепринятым характеристикам [41, 45, 97, 127].

Для установления линейности тестируемой методики готовили извлечения, имеющие разведения различных уровней, для чего использовали следующие навески сырья: 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 г (точные навески), и определяли в них содержание полисахаридов. Полученные данные служили основой для построения градуировочного графика (рисунок 63). Полученные результаты свидетельствуют о том, что во всех рамках измеряемых и упомянутых выше концентраций содержание суммы полисахаридов от применяемой навески сырья имеет линейную зависимость (рисунок 63 и таблица 29).

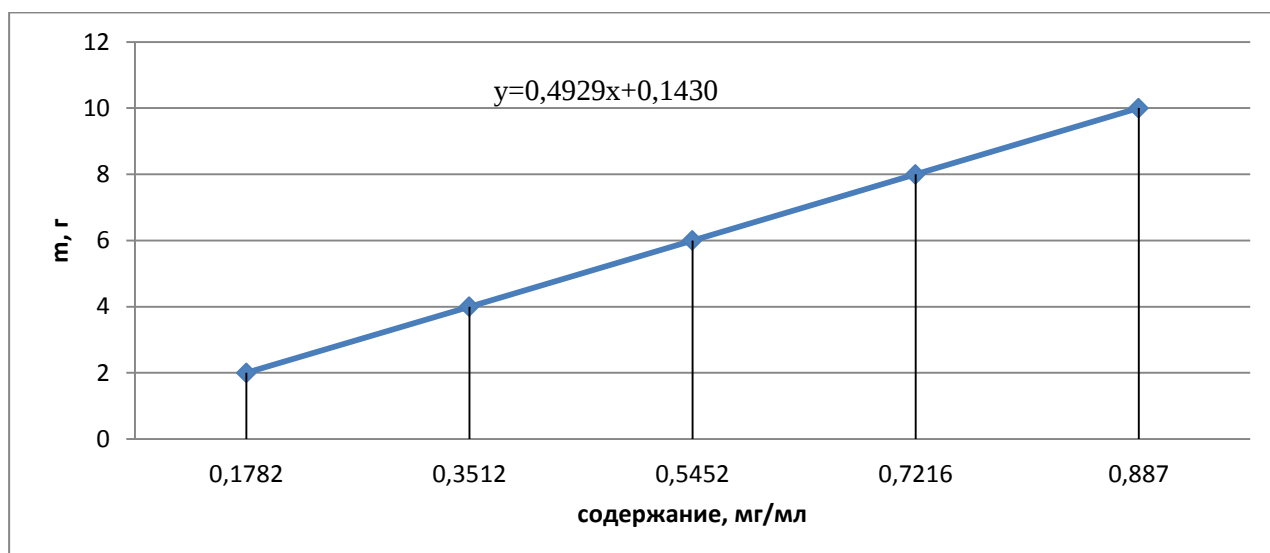


Рисунок 63 – Зависимость содержания полисахаридов от навески сырья горлюхи ястребинковой

Таблица 29 – Расчет коэффициента корреляции

F	$\bar{x}$	$\bar{y}$	B	a	R
4	0,53664	0,4075	0,49291942	0,14298	0,99788

Повторяемость (сходимость) методики выражали критерием приемлемости, который в нашем случае составил 2,69 % (таблица 30). Определение проводили в одинаковых условиях в одной и той же лаборатории и в короткий промежуток времени.

Таблица 30 – Определение повторяемости (сходимости) методики

№ п/п	Содержание полисахаридов, %	Статистические данные
1	9,01	$X_{\text{ср}} = 8,92$ $S_X^2 = 0,00894$ $S_{X_{\text{ср}}} = 0,094552$ $\Delta x = 0,24$ $E_{\text{отн}} = 2,69$ $X_{\text{ср}} + \Delta x_{\text{ср}} = 8,92 + 0,24$
2	8,93	
3	8,96	
4	8,92	
5	8,74	
6	8,97	

Воспроизводимость устанавливали 2 аспиранта кафедры с использованием 3 образцов сырья, и каждый образец исследовали в 3 повторностях. Рассчитывали величину относительного стандартного отклонения, которое не превышало 6,51 (таблица 31).

Таблица 31 – Определение воспроизводимости методики гравиметрического определения суммы полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве

Повторяемость методики	Аналитик	Содержание суммы полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве		
		Образец сырья №1	Образец сырья №2	Образец сырья №3
1	1	8,85	10,65	9,28
2	1	9,03	10,40	9,30
3	1	8,73	10,86	9,54
4	2	8,95	11,23	9,35
5	2	9,20	10,71	9,71
6	2	8,98	10,75	9,02
Среднее значение		8,96	10,77	9,37
Погрешность измерения (Δx)		$\pm 0,41$	$\pm 0,70$	$\pm 0,61$
Относительное стандартное отклонение, (RSD)		4,58	6,50	6,51

4.4.4 Содержание суммы полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве

Согласно разработанной методике гравиметрического определения полисахаридов было определено их содержание в горлюхе ястребинковой траве, заготовленной в различных местах произрастания в течение 2015-2017 годов. Результаты проведенного при исследованиях количественного определения суммы полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве приведены в таблице 32.

Таблица 32 – Содержание полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве (n=5, P=95%)

Район, область, год заготовки сырья	Статистические данные методики				
	X, %	S ²	S	ΔX	E _{отн} , %
Горлюха ястребинковая					
Курский р-н, Курская область, 2015 год	8,96	0,01387	0,11777	0,33	3,68
Мценский р-н, Орловская область, 2016 год	10,77	0,02265	0,1505	0,42	3,90
Красногвардейский р-н, Белгородская область, 2016 год	9,37	0,01118	0,10574	0,29	3,09

Продолжение таблицы 32

Курский р-н, Курская область, 2016 год	7,81	0,01075	0,10368	0,29	2,29
Красногвардейский р-н, Белгородская область, 2017 год	8,72	0,0079	0,08888	0,25	2,87
Курский р-н, Курская область, 2017 год	12,41	0,01892	0,13755	0,38	3,06

Данные таблицы 32 однозначно и недвусмысленно показывают, что содержание полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве колеблется от 7,81 % до 12,41%. Представленные данные позволили установить норматив содержания суммы полисахаридов в сырье горлюхи ястребинковой, который установлен на уровне не менее 7,0% (таблица 32) [32].

4.5 Определение сроков заготовки сырья горлюхи ястребинковой

Установление сроков заготовки сырья горлюхи ястребинковой проводили на основании исследований по изучению динамики накопления гидроксикоричных кислот и полисахаридов в траве в различные фазы развития растения. С этой целью заготавливали траву горлюхи ястребинковой в Курской области, окрестностях г. Курска в 2017 году на протяжении всего вегетационного периода (таблица 33).

Таблица 33 – Содержание суммы гидроксикоричных кислот и полисахаридов в горлюхе ястребинковой траве в различные фазы вегетации растения

Область, район, год заготовки сырья	Фаза развития	Статистические данные				
		X ср, %	S ²	S	Δx	Eотн,%
Содержание гидроксикоричных кислот						
Курская область, Курский р-н, 2016	Фаза бутонизации	1,81	0,000730	0,0270	0,07	4,16
	Фаза цветения	2,45	0,00077	0,0277	0,08	3,27

Продолжение таблицы 33

	Фаза плодоношения	2,08	0,00133	0,03647	0,10	4,81
	Содержание полисахаридов					
Курская область, Курский р-н, 2016	Фаза бутонизации	7,18	0,00743	0,0862	0,24	3,34
	Фаза цветения	7,81	0,01443	0,12012	0,33	4,23
	Фаза плодоношения	6,90	0,01142	0,10686	0,30	4,35

Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют, что максимальное количество действующих веществ (полисахаридов и гидроксикоричных кислот) накапливается в фазу цветения растения, что дало основание рекомендовать данную фазу для установления времени заготовки сырья.

4.6 Установление сроков годности сырья горлюхи ястребинковой

При определении сроков годности сырья горлюхи ястребинковой проводили анализы через каждый 0,5 года (таблица 34).

Проведенные исследования по изучению сроков хранения сырья в течение 2-х лет показали, что данное сырьё соответствует показателям первичного анализа по числовым показателям и нормативам проекта ФС, что позволяет нам установить срок годности сырья горлюхи ястребинковой 2 года. Исследования по изучению сроков годности сырья горлюхи будут продолжены.

4.7 Разработка проекта ФС «Горлюхи ястребинковой трава»

Результаты проведенных экспериментов по исследованию морфологических и микродиагностических признаков, разработке числовых показателей для сырья горлюхи ястребинковой; установлению сроков годности сырья были положены в основу проекта нормативного документа на исследуемое сырьё, разработанного нами (Приложение 1).

Таблица 34 - Результаты исследования показателей качества сырья горюхи ястребинковой в процессе хранения

Год, область и район заготовки сырья	Хранение сырья (через 0,5 года)	Числовые показатели									Микробиологическая чистота
		Влага, (не более 13%)	Зола общая (не более 10%)	Зола, нерастворимая в растворе кислоты хлористоводородной 10% (не более 1%)	Экстрактивные вещества, извлекаемые водой (не менее 30 %)	Сумма гидроксикоричных кислот (не менее 2,0 %)	Сумма полисахаридов (не менее 8 %)	Частиц проходящих сквозь сито 7 мм (не более 10%)	Органической примеси (не более 1 %)	Минеральной примеси (не более 1 %)	
2015 год, Курская область, Курский р-н	-	11,50	9,70	0,26	35,80	2,53	8,96	7,46	0,56	0,80	Категория 4А
	0,5	11,46	9,73	0,28	35,82	2,52	9,10	7,46	0,54	0,82	Категория 4А
	1,0	11,50	9,82	0,26	35,86	2,51	8,98	7,58	0,56	0,79	Категория 4А
	1,5	11,52	9,74	0,27	35,84	2,54	8,90	7,40	0,55	0,80	Категория 4А
	2,0	11,48	9,76	0,28	35,85	2,50	9,06	7,52	0,50	0,78	Категория 4А
	2,5	11,55	9,80	0,26	35,80	2,55	8,90	7,50	0,58	0,82	Категория 4А

Выводы по главе 4:

1. Проведенный макроскопический анализ позволил установить, что горлюхи ястребинковой трава цельная представлена: смесью цельных и (или) частично измельченных округло-ребристых стеблей, не длиннее 30 см, имеющих листья, цветки и некоторое количество незрелых плодов; стебли опушены волосками, которые охарактеризованы как вильчатые и якоревидные. Содержащиеся в сырье исследуемого растения листья продолговато-эллиптические, по краям зубчатые или цельнокрайние, длинночерешковые или сидячие, верхние листья являются полустеблеобъемлющими. Листья на стебле имеют очередное расположение и равномерно размещены на стебле. Корзинки многоцветковые, на верхушках стеблей и ветвей в общем щитковидно-метельчатом соцветии. Все цветки в корзинке язычковые, обоеполые, желтые. Отгиб венчика в 2-3 раза длиннее его трубки. Обертки корзинок имеют колокольчатую форму; листочки обертки линейно – ланцетные, расположены в три ряда; снаружи листочки отогнуты в разные стороны. Листочки обертки при внимательном изучении имеют заметное опушение, волоски при рассмотрении тонкие, в основании нет заметного расширения, черного цвета, хотя иногда встречаются белые волоски. Цвет как стеблей, так и присутствующих листьев можно охарактеризовать как светло-зеленый, иногда зеленый, цветки, содержащиеся в сырье, имеют цвет желтый. Запах имеет характер, называемый травянистым. Вкус водного извлечения определяется как горький.

2. Результаты изучения анатомического строения позволили установить диагностические признаки горлюхи ястребинковой травы: 1) стебель имеет округло-ребристую форму, пучковый тип строения; 2) эпидермис стебля опущен простыми, многоклеточными тонкостенными

волосками и двурядными или многорядными многоклеточными волосками; 3) устьица аномоцитного типа 4) наличие млечников вдоль жилки листа 5) лист опушен простыми дву – и многорядными многоклеточными волосками на верхушке с двумя якоревидными крючками или с двумя остроконечными клетками; 6) наличие на эпидермисе листочков обертки и язычковых цветков сосочковидных выростов; 7) наличие на эпидермисе листочков обертки простых волосков: дву- или многорядных на верхушке с двумя якоревидными крючками или же с двумя остроконечными клетками; одноклеточных остроконечных толстостенных; тонкостенных длинных многоклеточных волосков, часто со спадающимися клеточными стенками; 8) эпидермис язычкового цветка опушен простыми многорядными с одно-, двурядной верхушкой волосками, имеющими оттянутую острую верхушку и расширенное основание; 9) эпидермис завязи опушен простыми одноклеточными волосками, которые срастаются между собой; 10) эпидермис зубцов венчика опушен одноклеточными толстостенными волосками, имеющими бородавчатую кутикулу; 11) на эпидермисе цветка имеются пыльцевые зерна округлой формы с шиповатыми выростами.

3. Впервые проведены испытания горлюхи ястребинковой травы на: содержание влаги, экстрактивных веществ, золы общей, золы нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной. Проведенные экспериментальные исследования дали возможность установить показатели качества для горлюхи ястребинковой травы: содержание общей золы не более 10%, золы нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной – не более 1%; влаги не более 13%, содержания экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 30 %.

4. Впервые проведена разработка методики спектрофотометрического определения суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту применительно к горлюхе ястребинковой. Суммарное содержание гидроксикоричных кислот варьирует от 2,29% до 3,81%. Установлен

показатель качества сырья по содержанию гидроксикоричных кислот, который составляет не менее 2,00%.

5. Впервые проведена модификация методики гравиметрического определения суммы полисахаридов применительно к горлюхе ястребинковой траве. Суммарное содержание полисахаридов колеблется от 7,81% до 10,77%. Установлен норматив по содержанию полисахаридов не менее 7,00 %.

6. Проведена валидационная оценка тестируемых методик количественного определения гидроксикоричных кислот и полисахаридов.

7. Проведено изучение накопления биологически активных веществ в горлюхи ястребинковой траве по фазам вегетации: бутонизации, цветения, плодоношения. Установлено, что максимальное количество гидроксикоричных кислот и полисахаридов накапливается в период цветения, что дало нам возможность рекомендовать данную фазу для заготовки горлюхи ястребинковой травы. Установлен срок годности сырья горлюхи ястребинковой – 2 года.

8. На основании экспериментальных исследований разработан проект нормативного документа «Горлюхи ястребинковой трава».

ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО СКРИНИНГА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА И ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ТРАВЫ ГОРЛЮХИ ЯСТРЕБИНКОВОЙ

Фармакологическая активность фитопрепаратов и водных извлечений из растительного сырья обусловлена комплексом биологически активных веществ, содержащихся в них [73, 101]. В результате изучения химического состава травы горлюхи ястребинковой и анализа литературных данных установлено, что преобладающими группами биологически активных веществ в ней являются сесквитерпеновые лактоны, полисахариды, фенольные соединения, что и побудило нас провести фармакологический скрининг по следующим направлениям:

- острая токсичность;
- противовоспалительная активность;
- антиоксидантная активность;
- антибактериальная активность.

Проведенные исследования химического состава показали возможность использования фитопрепаратов из травы горлюхи ястребинковой, обладающих противовоспалительной и антиоксидантной активностями. Основной целью проведения фармакологического скрининга являлось изучение биологической активности отечественного сырья.

5.1 Результаты исследования острой токсичности

Результаты исследования острой токсичности водного извлечения в различных концентрациях (глава 2, раздел 2.6.1) показали, что при проведении исследований в течение суток животные были вялые, заторможенные, у них наблюдалось угнетение двигательной активности. При увеличении дозировки вводимого извлечения данные явления

увеличились. Однако по истечении суток животные приходили в норму, их поведение не отличалось от животных, не получавших настоя (таблица 35).

Таблица 35 – Результаты исследования острой токсичности настоя из горлюхи ястребинковой травы

Водное извлечение (настой) Вводимая доза, мг/кг	Количество мышей в группе	
	Погибших мышей	Живых мышей
1000	0	6
2000	0	6
3000	0	6
4000	0	6
5000	0	6

Внутрибрюшинное введение настоя горлюхи ястребинковой травы мышам в дозах: 1000-5000 мг/кг не приводило к гибели животных, что позволяет считать данное извлечение не токсичными в диапазоне исследуемых доз. Максимально возможное введение по объему испытуемого извлечения не приводило к гибели животных, в связи с чем LD₅₀ не была установлена. На основании полученных данных, водное извлечение (настой) горлюхи ястребинковой травы было отнесено к практически нетоксичным по классификации К.К. Сидорова.

5.2 Результаты изучения противовоспалительной активности

В последнее время лекарственные растения и фитопрепараты, полученные из них, не находят широкого применения в качестве противовоспалительных средств в медицинской практике. Это объясняется менее выраженным их эффектом, по сравнению с синтетическими препаратами, но одновременно они имеют ряд преимуществ: более низкая токсичность, полифункциональность, лучшая переносимость.

Противовоспалительное действие изучаемого настоя оценивали по влиянию водного извлечения на процессы экссудации и пролиферации по общепринятой схеме.

Антиэкссудативная активность

Для изучения антиэкссудативной активности горлюхи ястребинковой травы (настоя), использовали модель, которая приводила к возникновению воспаления при введении (субплантарном) в одну задних лап мыши раствора формалина (глава 2, раздел 2.6.2), (таблица 36).

Таблица 36 – Результаты изучения влияния настоя горлюхи ястребинковой травы на отек лапы мышей, вызванный формальдегидом

Наименование вводимого препарата, используемая доза	Вес лапок, мг		Вес отека, мг		Результат противовоспалительной активности, %
	Левой	Правой	($M \pm m$), мг	%	
Контрольная группа мышей	130,60	191,25	$60,65 \pm 1,55$	100,00	-
Ацетилсалициловая кислота, 300 мг/кг	115,30	158,25	$42,95 \pm 3,04^*$	70,80	29,20
Горлюхи ястребинковой трава (настой), 1г/кг	133,16	167,63	$34,47 \pm 3,78^*$	56,83	43,17

Примечание: * - статистически достоверные различия при $P < 0,05$ в сравнении с контрольными данными; количество животных в группе – 6.

Величина отека лапок в контрольной группе мышей принята за 100% и ее величина составила $60,65 \pm 1,55$ мг (таблица 36). Под влиянием настоя горлюхи ястребинковой наблюдали уменьшение массы отека до величины $34,47 \pm 3,78$ мг; противовоспалительная эффективность исследуемого настоя составила 43,17%, что может свидетельствовать о выраженном антиэкссудативном действии.

Антиэкссудативная активность испытуемого настоя горлюхи ястребинковой по эффективности противовоспалительной активности превышает эффективность ацетилсалициловой кислоты (препарата сравнения).

Пролиферативная активность

Влияние водного извлечения (настоя) горлюхи ястребинковой на пролиферацию изучали с использованием модели "ватной гранулемы" и белых крыс (глава 2, раздел 2.6.2), (таблица 37)

Таблица 37 - Влияние настоя горлюхи ястребинковой травы на образование у крыс грануляционно-фиброзной ткани

Наименование вводимого препарата, исследуемая доза	Число крыс в группе	Вес высушенных гранул ($M \pm m$), мг	Угнетение образования гранулемы, процент
Контроль	6	139,95 $\pm$ 8,16	-
Индометацин, 6 мг/кг	6	44,44 $\pm$ 3,28*	68,25
Горлюхи ястребинковой трава (настой), 1г/кг	6	57,12 $\pm$ 6,44*	59,19

Примечание: * - статистически достоверные различия при $P < 0,05$, в сопоставлении с данными контроля

Вес грануляционно-фиброзной ткани в контрольной группе крыс был принят за 100% и составил 139,95 $\pm$ 8,16 мг (таблица 37). Под влиянием настоя горлюхи ястребинковой наблюдали уменьшение величины грануляционно-фиброзной ткани до 57,12 $\pm$ 6,44 мг (настой), в сравнении с данными контрольной группы, что составляет 59,19% и свидетельствует об антипролиферативном эффекте настоя травы горлюхи ястребинковой. При введении крысам индометацина масса гранулемы составила 44,44 $\pm$ 3,28мг, при этом антипролиферативная активность – 68,25%.

Итоги проведенного исследования показывают, что испытуемый настой обладает достаточной антипролиферативной активностью, несколько менее выраженной, чем у индометацина (препарата сравнения).

5.3 Результаты изучения антиоксидантной активности

Неблагоприятные факторы окружающей среды вызывают снижение защитных сил организма человека, при этом падает и активность его антиоксидантных систем. Это приводит к увеличению концентрации свободных радикалов в организме, в результате чего возникают различные патологические процессы, например сердечно-сосудистые, сахарный диабет, гипертония, онкологические, атеросклероз, и другие. В основе патогенеза данных заболеваний лежит антиокислительный (антиоксидантный) стресс, который выражается избыточным содержанием свободных радикалов. В связи с вышесказанным, поиск препаратов для предотвращения указанных заболеваний является весьма актуальным. С этой целью могут быть использованы антиоксиданты, которые необходимы для функционирования организма человека. Антиоксиданты подавляют свободно радикальные реакции, которые вызывают повреждение клеток. Для антиоксидантов характерно наличие антиокислительных свойств, что способствует участию в окислительных процессах организма человека [1, 103, 104].

В последнее время с этой целью применяется растительное сырье, содержащее различные группы биологически активных веществ.

Для биологически активных веществ растительного происхождения одной из важнейших характеристик является наличие антиоксидантной активности [53, 56, 94, 105, 149]. Антиоксидантная активность присуща различным классам биологически активных веществ: фенольным соединениям; фенолкарбоновым кислотам [5], флавоноидам [77, 144, 152, 166, 195]; кумаринам [111, 207, 208], дубильным веществам [122, 183, 203],

витаминам: каротиноидам [191], аскорбиновой кислоте [191, 193], тритерпеновым сапонинам [194], эфирному маслу [7] и другим.

Литературный обзор показал данные об исследовании антиоксидантной активности у травы горлюхи ястребинковой, которая проводилась на основе процессов свободно – радикального окисления и перекисного окисления липидов [168], что побудило нас к изучению антиоксидантной, в частности антиокислительной и антирадикальной активностей.

5. 3. 1 Результаты изучения антиокислительной активности

Исследование антиокислительной активности (глава 2, раздел 2.6.3.1) проводили с использованием водных и водно-спиртовых извлечений, соблюдая соотношение сырья горлюхи ястребинковой: извлечение – 1:10) [45]. Растворами сравнения служили растворы стандартных образцов: цинарозида, являющегося доминирующим флавоноидным соединением горлюхи ястребинковой, а также известные антиоксиданты рутин и кверцетин [166]. С целью установления зависимости между содержанием фенольных соединений и антиоксидантной активностью определяли содержание гидроксикоричных кислот и флавоноидов. Флавоноиды определяли с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии, в основе которого положена реакция комплексообразования с хлоридом алюминия в пересчете на цинарозид [35]. Сумму гидроксикоричных кислот определяли с помощью метода прямой спектрофотометрии, используя длину волны 325 нм; пересчет вели на кофейную кислоту [36].

Проведенные исследования показали, что все извлечения, полученные нами, экстрагируют антиоксидантные вещества и обладают антиокислительной активностью (таблица 38).

Таблица 38 – Антиокислительная активность и содержание фенольных соединений (флавоноидов, гидроксикоричных кислот) в траве горлюхи ястребинковой

Экстрагент, применяемый для получения извлечений	Антиокислительная активность, мг/кг			Содержа ние суммы флавонои дов, %	Содержание суммы гид- роксикоричн ых кислот, %
	в перерасче те на рутин	в перерасчет е на цинарозид	в перерасчет е на кверцетин		
Вода очищенная	23,20 ± 0,86	23,03 ± 0,85	13,77 ± 0,51	0,16 ± 0,001	1,93 ± 0,08
Спирт этиловый, 30%	26,26 ± 1,13	26,07 ± 1,33	15,58 ± 0,67	0,25 ± 0,01	1,95 ± 0,09
Спирт этиловый, 50%	27,97 ± 1,35	27,76 ± 1,34	16,59 ± 0,79	0,26 ± 0,01	2,20 ± 0,10
Спирт этиловый, 70%	36,12 ± 1,67	35,86 ± 1,66	21,43 ± 0,99	0,43 ± 0,02	2,48 ± 0,11
Спирт этиловый, 96%	13,02 ± 0,63	12,93 ± 0,63	7,72 ± 0,37	0,23 ± 0,01	0,56 ± 0,02

Однако, полученные результаты показывают различную антиокислительную активность при использовании различных экстрагентов. При этом четко наблюдается наличие связи между антиокислительной активностью и содержанием фенольных соединений: флавоноидов, гидроксикоричных кислот. Максимальная антиокислительная активность установлена для извлечений, полученных с использованием спирта этилового 70% в качестве экстрагента, показатели антиокислительной активности варьируют от 21,43±0,99 мг/кг (расчет на кверцетин), до 36,12±1,67 мг/кг (расчет на рутин). При этом экстрагируется и максимальное количество фенольных соединений: содержание суммы флавоноидов составляет 0,43±0,02%, а суммы гидроксикоричных кислот 2,48±0,11%.

Наименьшую антиокислительную активность проявили извлечения, полученные с помощью спирта этилового 96% в качестве экстрагента.

Установленная антиокислительная активность колебалась от $7,72 \pm 0,37$ мг/кг (в пересчете на кверцетин) до $13,02 \pm 0,63$ мг/кг (в пересчете на рутин). Содержание гидрохикоричных кислот при этом было также минимальным ($0,56 \pm 0,02\%$), что можно объяснить тем, что гидрохикоричные кислоты плохо экстрагируются 96% спиртом этиловым. Содержание же флавоноидов составляет $0,23 \pm 0,01\%$, что несколько выше, чем при использовании экстрагента воды очищенной, что объясняется тем, что флавоноидные соединения лучше экстрагируются спиртом этиловым 96% в сравнении с водой. Антиокислительная активность при экстрагировании водой очищенной значительно выше, чем при экстрагировании спиртом этиловым 96%, что можно объяснить тем, что вода экстрагирует и другие природные антиоксиданты, которые установлены в траве горлюхи ястребинковой, например, аскорбиновая кислота, полисахариды [25].

5.3.2 Результаты изучения антирадикальной активности

Для исследования антирадикальной активности использовали водно – спиртовое извлечение, в качестве экстрагента у которого выступал спирт этиловый 70%, показавшие максимальную антиокислительную активность в предыдущем опыте (глава 2, раздел 2.6.3.2).

Показателями антирадикальной активности явились антиоксидантная активность (АОА, %) и степень ингибирования ДФПГ (%) [глава 2, раздел 2.6.3.2], представленные в таблице 39.

Таблица 39 – Результаты исследования антирадикальной активности водно – спиртового извлечения из травы горлюхи ястребинковой

Исследуемый образец (объем водно – спиртового извлечения + объем ДФПГ)	Антиоксидантная активность (АОА, %)	Степень ингибирования (СИ, %)
1 мл извлечения + 3 мл ДФПГ	25,72	92,82
2 мл извлечения + 2 мл ДФПГ	51,82	94,56
3 мл извлечения + 1 мл ДФПГ	75,33	96,41

В представленных результатах эксперимента видно, что все исследуемые извлечения проявляют антирадикальную активность и с увеличением объема водно – спиртового извлечения антиоксидантная активность увеличивается.

Таким образом, водно – спиртовое извлечение из травы горлюхи ястребинковой проявляет антиоксидантную активность, что объясняется содержанием в её составе природных антиоксидантов (фенольных соединений), что может свидетельствовать о перспективности использования травы горлюхи ястребинковой в качестве антиоксидантов.

5.4 Результаты изучения антимикробной активности

Изучение антибактериального действия исследуемых настоев и пектиновых веществ проводили методом культивирования микробов в питательной среде с добавлением исследуемых фитокомплексов и сравнением с данными контроля [глава 2, раздел 2.6.4].

Антибактериальную активность исследуемого настоя и пектиновых веществ исследовали *in vitro*, используя следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Candida*.

Итоги исследования антимикробной активности представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Итоги изучения антимикробной активности настоев и пектиновых веществ травы горлюхи ястребинковой

Используемая тест – культура	Вводимый настой			Вводимый пектиновый комплекс		
	1:2	1:4	1:10	1:2	1:4	1:10
<i>Candida</i>	-	±	±	-	±	±
<i>Staphylococcus aureus</i>	±	±	+	±	+	+

Продолжение таблицы 40

<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	±	+	±	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+

Примечание: "-" – означает отсутствие роста, "±" – присутствует слабый рост, "+" – наблюдается сильный рост.

Данные таблицы 40 показывают, что фитопрепараты горлюхи ястребинковой были наиболее активными в отношении тест – культуры *Candida*. При ее использовании наблюдалось отсутствие роста у настоя и пектиновых веществ при использовании концентрации 1:2 и слабый рост в концентрациях 1:4 и 1:10. Кроме этого настой оказывал антимикробное действие в концентрации 1:2; в концентрации 1:4 проявлял бактерицидное действие в отношении культуры *Pseudomonas aeruginosa*; при использовании пектиновых веществ бактерицидное действие наблюдалось в концентрации 1:2. Изучение антибактериальной активности в отношении культуры *Staphylococcus aureus* показало слабый рост у настоя в концентрации 1:2 и 1:4 и в концентрации 1:2 у пектиновых веществ.

Таким образом, из проведенных исследований видно, что антимикробную активность проявил настой, полученный из горлюхи ястребинковой травы в отношении грибов рода *Candida* и тест культуры *Pseudomonas aeruginosa*; пектиновые вещества - в отношении грибов рода *Candida*.

5.5 Получение и стандартизация жидкого экстракта

Создание фитопрепаратов (жидкого экстракта и настоя) из горлюхи ястребинковой травы обусловлено несколькими факторами: прежде всего тем, что лекарственное растительное сырье в медицинской практике

используется, в первую очередь, в виде водных извлечений (настоев и отваров) и жидких лекарственных средств, во-вторых, расширение ассортимента лекарственных средств растительного происхождения с антиоксидантной и противовоспалительной активностями является потенциально перспективным.

Не менее остро в настоящее время стоит вопрос разработки современных методик анализа для оценки качества фитопрепаратов из лекарственного растительного сырья.

В технологических, аналитических и фармакологических аспектах важным моментом является наличие в готовом фитопрепарате (экстракте, настое) действующих веществ, обуславливающих фармакологическую активность сырья.

Проведенными нами ранее исследованиями обоснована целесообразность проведения стандартизации сырья горлюхи ястребинковой по содержанию гидроксикоричных кислот [36]. Другой группой действующих веществ горлюхи ястребинковой являются полисахариды.

Не менее важным вопросом является разработка объективных и унифицированных методик количественного определения действующих веществ в ряду сырье-фитопрепарат.

На основании вышесказанного нами предложена оценка количественного содержания суммы гидроксикоричных кислот в жидком экстракте и настое, в настое дополнительно устанавливается и содержание полисахаридов.

5.5.1 Получение жидкого экстракта

Разработка жидких экстрактов предусматривает использование такого способа экстрагирования, при котором происходит максимальное извлечение

действующих веществ. Для изучения условий экстрагирования необходимо определение технологических свойств сырья (глава 2, раздел 2.7).

Изучение технологических свойств горлюхи ястребинковой травы

В связи с этим нами были определены следующие технологические свойства сырья: содержание действующих веществ в сырье, влажность сырья, коэффициент спиртопоглощения. Для разработки экстракта было использовано сырье, которое заготавливалось в 2016 году в Курской области. Таблица 41 – Содержание суммы гидроксикоричных кислот и влаги в горлюхи ястребинковой траве

Суммарное содержание гидроксикоричных кислот, %	Содержание влаги, %
2,45±0,12	10,43±0,37

По результатам экспериментальных исследований установлено суммарное содержание гидроксикоричных кислот в горлюхи ястребинковой траве, которое составило 2,45±0,12%, влажность сырья – 10,43±0,37%.

Коэффициент спиртопоглощения определяется для расчета объема экстрагента, обеспечивающего наибольший выход действующих веществ. Этот показатель, определяет также объем экстрагента, поглощаемого единицей массы сырья в процессе его набухания и остающего в сырье и частичном его возвращении с помощью процесса рекуперации в технологический процесс [121].

Для определения коэффициента спиртопоглощения 5,0 г измельченного растительного сырья горлюхи, проходящего сквозь сито с размером отверстий 2 мм, заливали спиртом этиловым различной концентрации и настаивали до прекращения прироста в массе. При определении коэффициента спиртопоглощения проводили учет потерь в

набухшем сырье и определяли объем спирта, необходимый для проведения процесса экстрагирования (таблица 42).

Таблица 42 – Коэффициенты спиртопоглощения горлюхи ястребинковой травы

Используемый экстрагент	Рассчитанный коэффициент спиртопоглощения
Спирт этиловый 30%	4,3
Спирт этиловый 50%	4,0
Спирт этиловый 70%	3,8
Спирт этиловый 96%	3,4

Результаты эксперимента показывают, что коэффициент спиртопоглощения зависит от концентрации спирта этилового и увеличивается с уменьшением его концентрации.

Степень измельченности сырья значительно влияет на процесс экстрагирования, ее увеличение приводит к увеличению поверхности соприкосновения частиц сырья и экстрагирующего агента, следовательно, увеличивается полнота и скорость экстракции действующих веществ [140].

Результаты проведенных нами ранее исследований показали, что наибольший выход гидроксикоричных кислот происходит из сырья, имеющего степень измельчения 1 и 2 мм (глава 4), что и было использовано при дальнейших исследованиях.

Выбор оптимального экстрагента и способа экстрагирования

На процесс экстрагирования биологически активных веществ влияет природа экстрагента. Экстрагент влияет на скорость, полноту и качество экстракции действующих веществ. Для наиболее полного извлечения действующих веществ и максимальной скорости процесса экстрагирования к экстрагенту обычно предъявляют требования: узкий спектр действия – извлечение определенной группы действующих веществ, избирательная

способность – максимальное извлечение действующих и минимальное сопутствующих веществ, химическая и фармакологическая индифферентность, малая токсичность, невысокая стоимость [52, 140]. Ранее нами определено, что для извлечения гидроксикоричных кислот оптимальными экстрагентами являются 50% и 70% спирты.

С целью выбора наиболее эффективного способа получения жидкого экстракта горлюхи ястребинковой нами проведено сравнительное исследование влияние способа экстрагирования на выход гидроксикоричных кислот. Для этого образцы исследуемого сырья были подвергнуты экстрагированию различными методами, наиболее часто применяемыми для получения экстрактов: мацерацией, мацерацией с перемешиванием, перколяцией (таблица 43) [72].

1. Использование мацерации

Для изучения влияния способа экстрагирования (мацерации) на выход действующих веществ использовали 50,0 г горлюхи ястребинковой травы, которую взвешивали на весах, подвергали измельчению и просеиванию через сито, имеющее размер отверстий 2 мм. Подготовленное сырье загружали в перколятор. Под сливной кран подставляли сухой стакан. Сырье в перколяре уплотняли, заливали до «зеркала» 200 мл спирта этилового 50%. Перколятор плотно закрывали крышкой и оставляли на 24 часа при комнатной температуре. По истечении данного промежутка времени открывали спускной кран и сливали 25 мл полученного извлечения. Закрывали кран и заливали в перколятор 25 мл экстрагента, плотно закрывали крышку и настаивали еще 6-7 часов. По истечении указанного времени сливали еще 25 мл извлечения и добавляли к первому извлечению. Полученное извлечение отстаивали в плотно закрытом крышкой отстойнике в помещении, имеющим температуру не выше +10°C в течение 2-х суток. Осветлённую жидкость сливали с осадка и отфильтровывали через фильтровальную бумагу,

накрывая при этом воронку с фильтром стеклянной пластинкой. Готовый продукт анализировали.

2. Использование мацерация с перемешиванием

С этой целью 50,0 г неизмельченной горюхи ястребинковой травы помещали в перколятор, заливали 250 мл экстрагента. С помощью миксера с мощностью 1000 оборотов в минуту производили перемешивание сырья с экстрагентом в течение 5 мин. Полученное извлечение сливали, сырье отжимали, извлечения объединяли. Полученное извлечение отстаивали в плотно закрытом крышкой отстойнике в помещении, имеющем температуру не выше +10°C, в течение 2-х суток. Осветлённую жидкость сливали с осадка и отфильтровывали через фильтровальную бумагу, накрывая при этом воронку с фильтром стеклянной пластинкой. Готовый продукт анализировали.

3. Использование перколяции

Для этой цели 50,0 высушенной горюхи ястребинковой травы взвешивали на весах, измельчали и просеивали через сито с размером отверстий 2 мм. Подготовленное сырье помещали в выпарительную чашку (фарфоровую), заливали 50 мл спирта этилового 50%, перемешивали, плотно закрывали бумагой и оставляли для набухания на 30 мин. По истечении 30 минут набухшее сырье небольшими порциями переносили в подготовленный перколятор. Сырье тщательно уплотняли. На уплотнённый растительный материал помещали слой марли и небольшой груз. И с целью вытеснения воздуха открывали спускной кран и заливали спирт этиловый 50%. После появления первых капель, сливной кран закрывали, вытекшую жидкость возвращали в перколятор. Экстрагент заливали в объеме, в 3 раза превышающем массу сырья, чтобы образовалось зеркало высотой 1-1,5 см. Перколятор закрывали крышкой и оставляли на 24 часа при комнатной температуре для настаивания. Перколирование проводили со скоростью 1/24 рабочего объёма перколятора в час, которую рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{\pi d^2 h}{4 * 24 * 60},$$

где d – диаметр перколятора, см;

h – высота столба сырья, см [26].

В приемник собирали концентрированное извлечение (85 ч. от количества растительного сырья, то есть 42,5 мл). Затем подготовив второй приемник, проводили перколяцию до полного истощения сырья (разбавленное извлечение). Полученное разбавленное извлечение упаривали (до 15 частей от массы растительного материала, то есть до 7,5 мл) в вакуум-выпарительной установке. Сгущенный остаток прибавляли к первому извлечению. Полученные извлечения отстаивали в плотно закрытом крышкой отстойнике в помещении, имеющем температуру не выше +10°C, в течение одних суток. Осветлённую жидкость сливали с осадка и отфильтровывали через фильтровальную бумагу, накрывая при этом воронку с фильтром стеклянной пластинкой. Готовый продукт анализировали.

Таблица 43 – Влияние природы экстрагента и способа экстрагирования на выход суммы гидроксикоричных кислот из сырья горюхи ястребинковой

Методы экстрагирования	Экстрагент (спирт этиловый), %	Содержание гидроксикоричных кислот, %	Истощение сырья по гидроксикоричным кислотам, %
Мацерация	50	0,69±0,03	28,16
	70	0,65±0,03	26,17
Мацерация с перемешиванием	50	0,64±0,07	26,12
	70	0,56±0,03	22,86
Перколяция	50	0,77±0,02	31,43
	70	0,72±0,03	29,39

Наибольшее содержание гидроксикоричных кислот в сырье горюхи ястребинковой наблюдается в жидком экстракте, полученном методом перколяции при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 50%, что свидетельствует о том, что метод перколяции является наиболее эффективным методом получения жидкого экстракта горюхи ястребинковой, и он был использован нами в дальнейших исследованиях.

Получение жидкого экстракта горлюхи ястребинковой

Проведенные исследования по определению технологических свойств сырья, выбору оптимального экстрагента и способа экстрагирования позволили разработать технологию получения жидкого экстракта из травы горлюхи ястребинковой.

Состав жидкого экстракта горлюхи ястребинковой (1:1) 100 мл

Травы горлюхи ястребинковой..... 100,0 г

Спирта этилового 50% 500 мл

Количество экстрагента для получения 100 мл жидкого экстракта рассчитывали по формуле:

$$X = V + m \cdot K,$$

где: X – необходимое количество спирта этилового, мл;

V – объем получаемого экстракта, мл;

m – масса горлюхи ястребинковой травы, г;

K – коэффициент поглощения спирта этилового.

$$X = 100,0 + 100,0 \times 4 = 500,0 \text{ мл}$$

Таким образом, для проведения одного опыта, т.е. получения 100 мл жидкого экстракта горлюхи ястребинковой требуется 500 мл спирта этилового 50%.

Технологическая пропись на получение 100 мл жидкого экстракта горлюхи ястребинковой с экстрагентом спиртом этиловым 50% имеет вид:

Травы горлюхи ястребинковой..... 100,0 г

Спирта этилового 50% 500 мл

Разработанная технологическая схема получения жидкого экстракта представлена на рисунке 64.

5.5.2 Оценка качества жидкого экстракта горюхи ястребинковой

Полученный жидкий экстракт стандартизовали согласно ГФ XIII издания по следующим характеристикам: внешний вид, содержание тяжелых металлов, содержание сухого остатка, содержание спирта этилового, содержание действующих веществ.

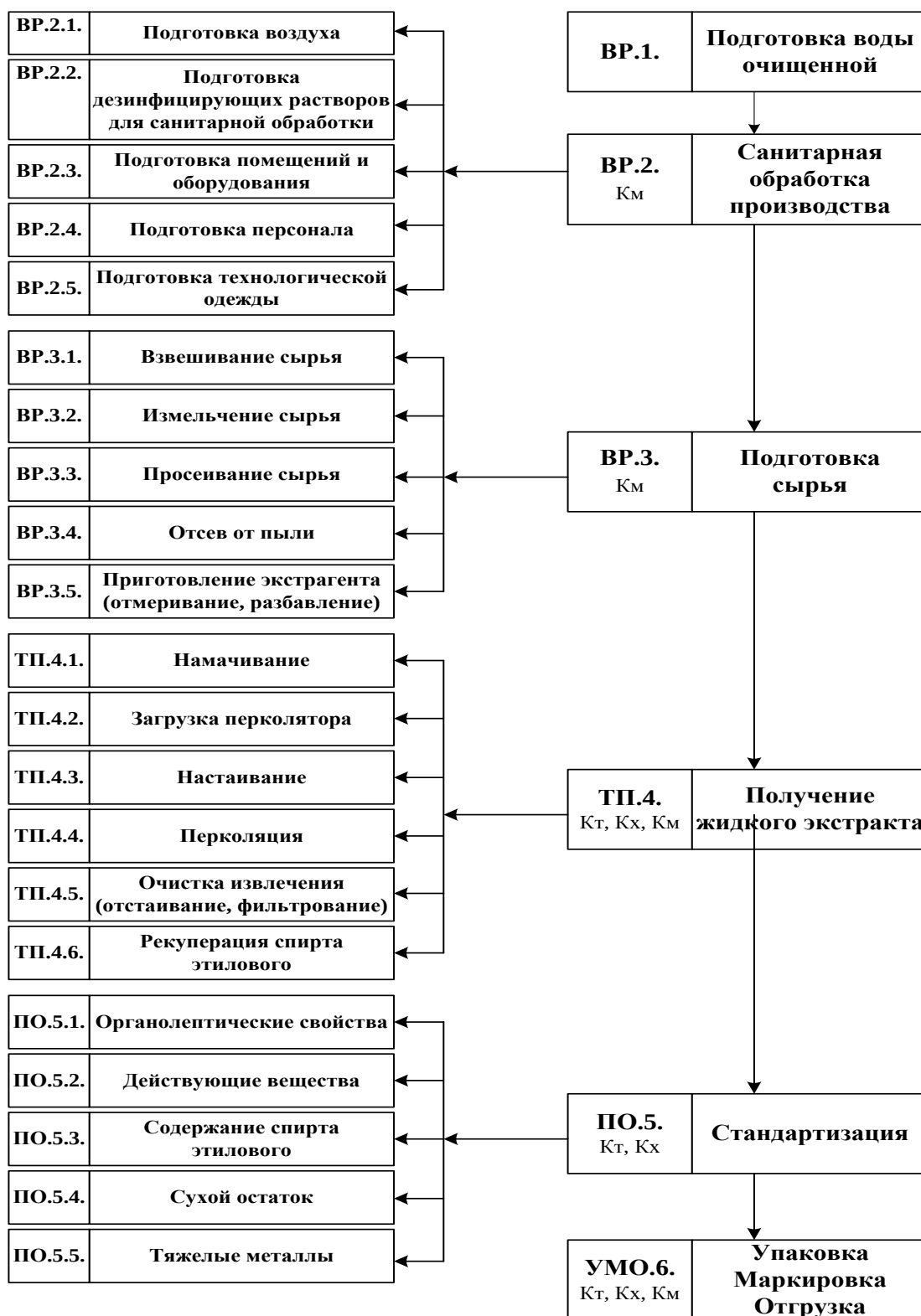
Таблица 44 – Результаты стандартизации жидкого экстракта горюхи ястребинковой

Показатели стандартизации (ГФ XIII)	Результаты анализа жидкого экстракта
Внешний вид	Прозрачная жидкость темного зеленовато-коричневого цвета, запах травянистый
Содержание спирта этилового, %	$50 \pm 1,30$
Содержание тяжелых металлов, %	Не превышает 0,01
Содержание сухого остатка, %	$9,25 \pm 0,28$
Содержание суммы гидроксикоричных кислот, %	$0,77 \pm 0,03$

Таким образом, полученные результаты исследований позволили установить показатели качества жидкого экстракта горюхи ястребинковой следующие:

- органолептические показатели: прозрачная жидкость темного зеленовато-коричневого цвета, с травянистым запахом;
- содержание спирта этилового не менее 45%;
- содержание тяжелых металлов не должно превышать 0,01%;
- содержание сухого остатка не менее 8%;
- содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту не менее 0,7%.

(Кт, Кх, Км – технологический, химический, микробиологический контроль соответственно).



**Рисунок 64 – Технологическая схема производства жидкого экстракта
горюхи ястребинковой методом перколяции**

5.6 Получение и определение показателей качества настоя из горлюхи ястребинковой травы

Лекарственное растительное сырье используется, прежде всего, в виде настоев и отваров. Разработка методик стандартизации водных извлечений остается одной из важных задач фармацевтической практики. Проведенные экспериментальные исследования и литературные данные показали, что действующими веществами горлюхи ястребинковой травы являются сесквитерпены, гидроксикоричные кислоты и полисахариды. Из них водорастворимыми являются гидроксикоричные кислоты и полисахариды. Ранее нами были разработаны методики определения суммы гидроксикоричных кислот и полисахаридов в горлюхи ястребинковой траве, которые использовали для их определения в настой горлюхи ястребинковой травы.

Получение настоя горлюхи ястребинковой проводили в соответствии со статьей «ОФС.1.4.1.0018.15 Настои и отвары» ГФ XIII издания [45], используя соотношение 1:10. Настой получали в инфундирном аппарате и анализировали.

Оценку качества настоя горлюхи ястребинковой травы проводили согласно ГФ XIII издания по следующим характеристикам: внешний вид, pH, содержание сухого остатка, содержание действующих веществ (гидроксикоричных кислот, полисахаридов).

Результаты исследований показаны в таблице 45.

Таблица 45 – Результаты стандартизации настоя горлюхи ястребинковой травы

Показатели стандартизации	Результаты анализа настоя
Описание внешнего вида	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета, запах слабый травянистый, вкус слегка горьковатый

Продолжение таблицы 45

рН	6,1±0,12
Содержание сухого остатка, %	0,45±0,02
Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту, %	0,34±0,01
Содержание суммы полисахаридов, %	0,90±0,04

Таким образом, нами проведена стандартизация настоя из горлюхи ястребинковой травы, в результате чего выделены следующие показатели качества:

- органолептические показатели: прозрачная жидкость светло-коричневого цвета, со слабым травянистым запахом, слегка горьковатым вкусом;
- содержание сухого остатка не менее 0,40%;
- сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту не менее 0,30%;
- сумма полисахаридов не менее 0,70%.

Выводы по главе 5:

1. Настой, полученный из горлюхи ястребинковой травы, отнесен к практически нетоксичным.

2. Настой горлюхи ястребинковой травы оказывает противовоспалительное действие, влияя на разные фазы процесса воспаления: экссудацию и пролиферацию. Противовоспалительный эффект при изучении антиэкссудативной активности составил 43,17%, при изучении пролиферации наблюдали уменьшение образования гранулемы на 59,19%.

3. Определена суммарная антиокислительная активность водного и водно-спиртовых извлечений из горлюхи ястребинковой травы. Выявлено, что максимальной антиокислительной активностью обладает водно-

спиртовое извлечение, получено при использовании спирта этилового 70% в качестве экстрагента: $36,12 \pm 1,67$ мг/кг (расчет на рутин), $35,86 \pm 1,66$ мг/кг (расчет на цинарозид) и $21,43 \pm 0,99$ мг/кг (расчет на кверцетин). В этом же извлечении установлено максимальное количество фенольных соединений. Величина антиокислительной активности достоверно связана с содержанием фенольных соединений положительной корреляционной связью.

4. Проведено изучение антирадикальной активности водно – спиртового извлечения (экстрагент спирт этиловый 70%) с использованием 2,2 – дифенил – 1 – пикризила. Установлено, что водно – спиртовой экстракт из надземной части горлюхи ястребинковой проявляет антиоксидантную активность.

5. Впервые исследована антибактериальная активность настоя и пектиновых веществ горлюхи ястребинковой травы. Антибактериальную активность показал настой в отношении грибов рода *Candida* и тест культур *Pseudomonas aeruginosa*, а пектиновые вещества в отношении грибов рода *Candida*.

6. Установлена оптимальная степень измельченности сырья (2 мм), оптимальный экстрагент (спирт этиловый 50%) и способ экстрагирования (перколяция) для получения жидкого экстракта. Предложена технологическая схема получения жидкого экстракта.

7. Разработаны показатели качества жидкого экстракта и настоя горлюхи ястребинковой травы, установлены нормы содержания суммы гидроксикоричных кислот и полисахаридов.

Общие выводы

1. На основании литературных данных систематизированы и обоснованы сведения о составе биологически активных веществ и фармакологической активности травы горлюхи ястребинковой и показана недостаточность ее изученности.
2. В результате проведения фитохимического анализа установлено наличие, определён качественный состав и количественное содержание: сесквитерпеновых лактонов ($0,04 \pm 0,002\%$); каротиноидов ($13,03 \pm 0,57$ мг %) - β -каротина; жирных кислот (идентифицировано 17 кислот); кумаринов - кумарина, скополетина; гидроксикоричных кислот - хлорогеновой, феруловой; флавоноидов ($0,61 \pm 0,02\%$ – $1,27 \pm 0,04\%$) - лютеолина, цинарозида, апигенин-7-O- β -D-глюкозида; дубильных веществ ($4,91 \pm 0,20\%$); свободных сахаров - глюкозы, фруктозы; полисахаридов; азотсодержащих соединений - азотистых оснований ($0,014 \pm 0,0003\%$), аминокислот (10,54 мг %); органических кислот ($4,18 \pm 0,15\%$) - янтарной, винной, лимонной, аскорбиновой; тритерпеновых сапонинов ($0,44 \pm 0,01\%$) - олеаноловой кислоты.
3. В горлюхе ястребинковой траве с использованием хроматографических методов (бумажной, тонкослойной, газожидкостной хромато-масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии) впервые идентифицировано 17 фенольных соединений. Комплекс фенольных соединений включает фенолокислоты: галловую, салициловую, п-оксибензойную, ванилиновую, сиреневую, гентизиновую; гидроксикоричные кислоты: кофейную, хлорогеновую, феруловую, п-кумаровую; кумарины - кумарин, скополетин; флавоноиды - лютеолин, цинарозид (лютеолин-7-O- β -D-глюкозид), апигенин-4'-O- β -

D-глюкозид, апигенин-7-O- β -D-глюкозид, кверцимеритрин (кверцетин-7-O- β -D-глюкозид).

4. Из горлюхи ястребинковой травы впервые выделены и изучены полисахаридные фракции: водорастворимый полисахаридный комплекс ($10,20 \pm 0,22\%$), пектиновые вещества ($8,26 \pm 0,23\%$), гемицеллюлоза А ($25,97 \pm 0,54\%$), гемицеллюлоза Б ($6,84 \pm 0,25\%$), установлен их качественный и количественный состав.
5. Впервые разработаны спектрофотометрическая методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на доминирующую кофейную кислоту и гравиметрическая методика определения суммы полисахаридов в горлюхи ястребинковой траве; в результате чего установлены нормы содержания суммы гидроксикоричных кислот не менее 2,0%, суммы полисахаридов не менее 7,0%. Обосновано использование разработанных методик для контроля качества сырья горлюхи ястребинковой.
6. По результатам исследования динамики накопления действующих веществ установлена закономерность накопления гидроксикоричных кислот и полисахаридов в зависимости от фазы развития растения. Заготовка горлюхи ястребинковой травы рекомендована в фазу цветения растения.
7. Проведенное морфолого-анатомическое изучение надземной части горлюхи ястребинковой позволило установить диагностические признаки сырья. К диагностически значимым морфологическим признакам отнесены: поперечное сечение стебля и его опушение, тип листовой пластинки и листорасположение, наличие или отсутствие черешка, расположение корзинок на стебле, характеристика цветков и листочков обертки; анатомическими признаками являются: наличие различных типов простых волосков: многоклеточные тонкостенные длинные волоски (эпидермис стебля, листочков обёртки); двурядные или

многорядные волоски с двумя якоревидными крючками (якоревидными волосками) или двумя остроконечными клетками на верхушке (эпидермис стебля, листа, листочков обёртки, язычковых цветков); одноклеточные толстостенные остроконечные волоски (эпидермис листочков обёртки); одноклеточные толстостенные волоски с бородавчатой кутикулой (эпидермис зубцов венчика); одноклеточные волоски, сросшиеся между собой (завязь); наличие сосочковидных клеток эпидермиса по краю листочков обертки и язычковых цветков; наличие млечников вдоль жилки листа; пыльцевые зерна округлой формы с шиповатыми выростами.

8. При проведении фармакологического скрининга горлюхи ястребинковой трава отнесена к практически нетоксичным, а также установлено наличие противовоспалительного, антимикробного, антиокислительного и антирадикального действия, что может быть основанием для дальнейшего её изучения с целью введения в научную медицину в качестве нового источника растительного сырья.
9. Показана возможность использования разработанных методик количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту и суммы полисахаридов для стандартизации жидких лекарственных форм (настоя и жидкого экстракта).
10. Разработанные характеристики подлинности, изученные нормативы показателей качества сырья, в том числе и содержание гидроксикоричных кислот и полисахаридов включены в проект нормативного документа «Горлюхи ястребинковой трава», который согласован с ООО фирмы «Здоровье».

Практические рекомендации

В результате проведенных экспериментальных исследований расширены знания о химическом составе горлюхи ястребинковой травы и

ее фармакологической активности, разработаны методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот и полисахаридов, экспериментально обоснованы морфологические и микродиагностические признаки сырья и нормы его качества. Разработанные в процессе исследования подходы к определению подлинности и стандартизации сырья могут быть использованы в учебном процессе по дисциплине «Фармакогнозия» в высших учебных заведениях и центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В результате проведенных исследований показана целесообразность дальнейшего изучения горлюхи ястребинковой, с целью внедрения в отечественную номенклатуру нового вида лекарственного растительного сырья с антиокислительной, антирадикальной и противовоспалительной активностями.

Список литературы

1. Активация свободнорадикального окисления – эффективное звено типовых патологических процессов / под ред. Н.П. Чесноковой, М.Ю. Ледванова.- Саратов, 2006.- С.177.
2. Алексеев, Ю.Е. Травянистые растения СССР / Ю. Е. Алексеев, В.Н. Вехов, Г.П. Гапочка, Ю.К. Дундин. – М.: Мысль, 1971. – Т. 2. – 309 с.
3. Аминокислотный, жирнокислотный и углеводный состав сока некоторых видов рода *Betula* / Т. А. Шуляковская, Л.В. Ветчинникова, М.К. Ильинова, Г.К. Канючкова, А.В. Репин, Л.Л. Веселкова // Растит. ресурсы. – 2006. – Т. 42, вып. 2. – С. 69-77.
4. Андреева, В. Ю. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L. S. L. / В. Ю. Андреева, Г. И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. – № 1. – С. 85-88.
5. Антиоксидантная активность стевии и продуктов ее переработки / Г.К. Подпоринова, Н.Д. Верзилина, Л.В. Рудакова, Н.К. Полянская, Я.И. Янин // Известия вузов. Пищевая технология.- 2005.- № 5/6.- С.121-122.
6. Анчеева, Е.Ю. Сравнительный анализ состава свободных аминокислот некоторых видов рода *Stellaria* L. / Е.Ю. Анчеева // Современные проблемы науки и образования. Фамацевт. науки. [Электронный ресурс] : науч. электрон. журн. – 2013. – № 2. – режим доступа: <http://www.science-education.ru/108-8974>, свободный.
7. Арзамасцев, А. П. Оценка показателей антиоксидантной активности препаратов на основе лекарственного растительного сырья / А. П. Арзамасцев, Е. И. Шкарина, Т. В. Максимова // Хим.-фармацевт. журн. – 1999. – № 11. – С. 17-20.

8. Архипова, О. В. Изучение содержания аскорбиновой кислоты в цветках и листьях боярышника, произрастающих на территории Российской Федерации / О. В. Архипова, Е. А. Клейненберг // Молодежная наука и современность : материалы 74-й межвуз. итог. науч. конф. студентов и молодых ученых, посвящ. году молодежи в России (21-22 апр. 2009 г.). – Курск, 2009. – Ч. 2. – С. 161.
9. Бандюкова, В. А. Методы исследования природных флавоноидов / В. А. Бандюкова, А. Л. Шинкаренко, А. Л. Казаков. – Пятигорск : Изд-во Бальнеол. ин-та, 1977. – 72 с.
10. Бандюкова, В. А. Фенолкислоты растений, их эфиры и гликозиды / В. А. Бандюкова // Химия природных соединений. – 1983. - № 3. – С. 263-273.
11. Беликов, В. В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидов / В. В. Беликов, Т. В. Точкова // Фенольные соединения и их физиологические свойства. – Алма-Ата, 1973. – С. 168-172.
12. Беликов, В. В. Спектрофотометрия комплексных соединений флавоноловых смесей / В. В. Беликов, Т. В. Точкова // Современные проблемы фармацевт. науки и практики: тез. докл. II съезда фармацевтов УССР. – Киев, 1972. – С. 572-575.
13. Беликов, В.В. Избирательный метод анализа флавоноидов в фитохимических препаратах / В.В. Беликов, Т.В. Точкова, Н.Г. Колесник // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств: Материалы докл. всесоюзн. конф. – М., 1991. – Т. 2, ч. 2. – С. 13, 142.
14. Большая Курская энциклопедия. Растительный мир. Грибы./ Под ред. Ю.А. Бугрова. Т.3.– Курск, 2006.– 258 с.
15. Борисова, Д. А. Аминокислоты сырья первоцвета лекарственного / Д. А. Борисова // Фармация. – 2011. – № 8. – С. 11-12.

16. Бубенчиков, Р. А. Изучение азотсодержащих соединений травы герани сибирской (*Geranium sibiricum* L.) / Р. А. Бубенчиков, Т. А. Позднякова // Вопр. обеспечения качества лек. средств. – 2013. – № 1. – С. 27-28.
17. Бубенчиков, Р. А. Фитохимическое изучение травы кульбабы осенней (*Leontodon autumnalis* L.) / Р. А. Бубенчиков, Н. Н. Гончаров, Ю. А. Мастихина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2015. – №1. – С. 41-43.
18. Бубенчиков, Р.А. Изучение веществ первичного биосинтеза травы кульбабы шерстистоволосистой (*Leontodon hispidus* L.) / Р.А. Бубенчиков, Н.Н. Гончаров, О. Д. Герасимова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – N 2. – 2013. – С. 37-41.
19. Бубенчикова, В. Н, Изучение пектиновых веществ травы хондриллы ситниковидной / В. Н. Бубенчикова, В. Н. Левченко, Д. С. Наседкин // Вопросы обеспечения качества лек. средств. – 2014. - №5. – С. 43 – 45.
20. Бубенчикова, В. Н. Азотистые основания хондриллы ситниковидной *Chondrilla juncea* L. / В. Н. Бубенчикова, В. Н. Левченко // Свободные радикалы в химии и жизни: тез. докл. Междунар. конф. (Минск, 25 – 26 июня 2015 г.) – Минск. – 2015. – С. 59 – 60.
21. Бубенчикова, В. Н. Аминокислотный, жирнокислотный и полисахаридный состав травы тимьяна Палласа (*Thymus Pallasianus*) / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Старчак // Химия растительного сырья. – 2014. – №3 . – С. 191-194.
22. Бубенчикова, В. Н. Горлюха ястребинковая – перспективный источник биологически активных веществ / В. Н. Бубенчикова, И. В. Степнова // Фармация и Фармакология. – 2018. – № 1. – С. 33-46.

23. Бубенчикова, В. Н. Жирнокислотный и минеральный состав травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, И. В. Степнова // Химия растительного сырья. – 2018. – № 1. – С. 113-119.
24. Бубенчикова, В. Н. Изучение аминокислотного состава травы колокольчика круглолистного (*Campanula rotundifolia* L.) / В. Н. Бубенчикова, Л. Е. Сипливая, Е. А. Никитин // Традиционная медицина. – 2016. – № 3 (46). – С. 44-47.
25. Бубенчикова, В. Н. Изучение антиоксидантной активности травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, И. В. Степнова // Традиционная медицина. – 2017. – №3(50). – С. 33-35.
26. Бубенчикова, В. Н. Изучение веществ первичного биосинтеза травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В.Н. Бубенчикова, Е. А. Воробьева, И. В. Степнова // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т. 11, № 5 (65). – С. 67-70.
27. Бубенчикова, В. Н. Изучение морфолого-анатомического строения горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Кондратова, И. В. Степнова // Фармация. – 2018. – Т. 67. – № 2. – С. 31-35.
28. Бубенчикова, В. Н. Изучение полисахаридного и минерального состава герани луговой (*Geranium pratense* L.) / В. Н. Бубенчикова, Ж. А. Булатникова // Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации : сб. науч. тр. междунар. конгр. – М., 2011. – С. 166-168.
29. Бубенчикова, В. Н. Изучение полисахаридов травы хондриллы ситниковидной / В. Н. Бубенчикова, В. Н. Левченко, Д. С. Наседкин // Традиционная медицина. – 2015. - №2 (41). – С. 34 – 36.
30. Бубенчикова, В. Н. Исследование полисахаридного комплекса травы тимьяна мелового (*Thymus cretaceus* Klok. et Shost.) / В. Н.

- Бубенчикова, Ю. А. Старчак // Башкир. хим. журн. – 2013. – Т. 20, № 1. – С. 99-101.
31. Бубенчикова, В. Н. Разработка и валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в растениях рода тимьян / В. Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчак // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии – 2015. – № 5. - С.14-17.
 32. Бубенчикова, В. Н. Разработка методики количественного определения полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, И. В. Степнова, М. С. Шкабунова // Фармация. – 2018. - № 5. – С.19 – 23.
 33. Бубенчикова, В. Н. Состав и фармакологическая активность полисахаридного комплекса выделенного из травы шалфея блестящего / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Кондратова // Науч. ведомости БелГУ. Сер. «Медицина.Фармация». – 2011. – № 22 (117), вып. 16/2. – С. 206-209.
 34. Бубенчикова, В. Н. Фенольные соединения шалфея лугового (*Salvia pratensis* L.) / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Кондратова // Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации : сб. науч. тр. междунар. конгр. – М, 2011. – С. 168-170.
 35. Бубенчикова, В.Н. Исследование фенольных соединений травы горлюхи ястребинковой / В.Н. Бубенчикова, И.В. Степнова // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сборник научных статей X Международного симпозиума (14-19 мая 2018г, Москва) / отв. ред. Н.В.Загоскина.- М.: ИНФ РАН,- 2018.-С.246-250.
 36. Бубенчикова, В.Н. Разработка методики количественного определения суммы фенолкарбоновых кислот в траве горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В.Н. Бубенчикова, И.В. Степнова, Н.В. Попова // Вестник южно-казахстанской

государственной фармацевтической академии.-2017г.- т.2.- №1 (78) - С.145-148.

37. Быстрова, М.Н. Сравнительное исследование содержания флавоноидов в препаратах седативного сбора № 3 / М. Н. Быстрова, Г.А. Панина, М.А. Демидова, Е.В. Харитоновна// Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации : сб. науч. тр. междунар. конгр. – М., 2011. – С. 174-177.
38. Валов, Р. И. Фармакогностический анализ травы хамерии узколистной (*Chamerion angustifolium* (L.) Holub) / Р. И. Валов, М. А. Ханина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. / Пятигор. фармацевт. акад. – Пятигорск, 2007. – С. 23-24.
39. Валышев, А.В. Пребиотическая активность пектинов и их производных / А.В Валышев, В.В Головченко // Бюл. Оренбург. науч. центра Ур О РАН. -2012.- №3.- С.1-8.
40. Веремчук, О. А. Противовоспалительная активность настойки побегов вереска обыкновенного и её основного компонента / О. А. Веремчук, Д. В. Моисеев // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. - №2. – С. 109 – 113.
41. Гаврилин, М. В. Валидация аналитических методов : метод. указания / М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко. – Пятигорск, 2009. – 40 с.
42. Галишевская, Е. Е. Фенольные соединения двух видов растений рода Марьянник / Е. Е. Галишевская, В. М. Петриченко // Хим.-фарм. журн. – 2010. – Т. 44, № 9. – С. 30-33.
43. Гейссман, Т. А. Цветные реакции на флавоноидные соединения / Т. А. Гейссман // Химические методы анализа растений : сб. статей. – М. : Изд-во ИП, 1960. – 469 с.
44. Гончаров, Н. Ф. Аминокислотный состав плодов нефармакопейных видов рода *Crataegus* L. / Н. Ф. Гончаров // I Рос. Фитотерапевт.

- съезд: сб. науч. тр. (Москва, 14-16 марта 2008 г.). – М., 2008. – С. 241-242.
45. Государственная фармакопея Российской Федерации: 13 –ое издание, III том. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/felm/> (дата обращения 11.06.16).
 46. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11 – е изд. доп. – М.: Медицина, 1989. – 400с.
 47. Гринько, Е. Н. Требование Российской и Европейской фармакопей к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е. Н. Гринько// Фармация. – 2010. – №5. – С. 49 – 53.
 48. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 3. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И. А. Губанов, К.В. Киселева, В.С Новиков, В.Н. Тихомиров – М., 2004. – 520 с.
 49. Гусакова, С.В. Липофильные экстракты в фитотерапии и фитокосметике, получение и биохимические свойства / С.В. Гусакова, Ш.Ш. Сагдулаев, З.А. Хуштакова // Химия природ. соединений. - 1998. - №4. - С. 437-447.
 50. Джисман, Т. Биогенез фенолов растительного происхождения / Т. Джисман // Биогенез природных соединений. – М., 1965. – С. 482-527.
 51. Дойко, И.В. Динамика накопления гидроксикоричных кислот в различных частях растения эхинацеи пурпурной и рудбекии волосистой, выращенных в условиях светокультуры / И.В. Дойко, А.А. Тихомиров, Г.Г. Чепелева, В.М. Леонтьева // Химия растительного сырья.- 2002. – №3. – С. 35-37.

52. Дубашинская, Н. В. Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация (ч II) / Н. В. Дубашинская, О. М. Хишова, О. М. Шимко // Вестник фармации. – 2007. - №2 (36). – С.70-79.
53. Ершик, О. А. Антиоксидантная активность сабельника болотного *Comarum palustre* L. / О. А. Ершик, Г. Н. Бузук // Вестн. фармации. – 2013. – № 3. – С. 81-85.
54. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения и методы их исследования / М. Н. Запрометов // Биохим. методы в физиологии растений. – М., 1971. – С. 185-207.
55. Захарова, И.Н. Роль полиненасыщенных жирных кислот в формировании здоровья у детей / И.Н. Захарова, Е.Н. Суркова // Педиатрия. - 2009. - №88(6). - С. 84-91.
56. Злобин, А. А. Антиоксидантная и антимикробная активность пектинов ряда растений Европейского севера России / А. А. Злобин, Е. А. Мартинсон, Ю. С. Оводов // Известия Коми НЦ УрО РАН. – 2011. – № 7. – С. 33-37.
57. Идентификация и количественное определение основных биологически активных веществ травы пустырника с помощью ВЭЖХ – масс – спектрометрии / А. А. Жогова, И.Б. Перова, И.А. Самылина, К.И. Эллер, Г.В. Раменская // Химико – фармацевтический журнал. – 2014. – т. 48. - №7. – С. 54 – 59.
58. Изучение биологически активных веществ водных извлечений караганы гривастой (*Caragane jubata* (Pall.) Poir.) / П. А. Какорин, И.Б. Перова, Е.Д. Рыбакова, К.И. Эллер, Г.В. Ременская, Л.А. Павлова, Ю.О. Теселкин // Химико - фармацевтический журнал. – 2017. - т. 51. - №11. – С. 29 – 34.
59. Изучение химического состава и фармакологической активности полисахаридов листьев липы сердцевидной / Н. А. Криштанова, Е.Д. Павлова, В.Ц. Болотова, Е.И. Саканян, Е.Е. Лесиовская //

- Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения: материалы VII Междунар. съезда «Фитофарм 2003» (С.-Петербург – Пушкин, 3-5 июля 2003 г.). – СПб., 2003. – С. 59-61.
60. Исследование химического состава серпухи венценосной, культивируемой в Сибири/ А. С. Ангаскиева, В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина, Е.Н. Сальникова, Е.А. Бородышена, Т.Г. Харина // Химии растительного сырья. – 2003. – №4. – С. 47-50.
 61. Кайшева, Н.Ш. Исследование природных полиуронидов и получение лекарственных средств на их основе: автореф. дис.... д-ра фармацевт. наук : (15.00.02) / Н. Ш. Кайшева. – Пятигорск, 2004. – 46 с.
 62. Каржаубекова, Ж. Ж. К фитохимическим исследованиям *Cistanche Salsa* (Orobanchaceae) / Ж. Ж. Каржаубекова, Н. Г. Гемеджиева, Ж. С. Набиева // Химия растительного сырья. – 2016. - № 4. – С. 123 – 130.
 63. Киселева, Т.Л. Фенолкарбоновые кислоты отдельных представителей рода Полынь / Т. Л. Киселева, Ж.А. Союнова, Ю.В. Медведев, А.В. Чаузова // Фармация. – 2012. – № 2. – С. 16-18.
 64. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – 3-е изд., испр. – М. : Высш. шк., 2000. – 479 с.
 65. Комиссаренко, С. Н. Пектины – их свойства и применение / С. Н. Комиссаренко, В. Н. Спиридонов // Растит. ресурсы. – 1998. – Т. 34, вып. 1. – С. 111-119.
 66. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) из флоры республики Башкортостан / С. Р. Хасанова, С.В. Кривошеков, Н.В. Кудашкина, А.М. Гурьев, К.И. Ровкина, М.В. Белоусов // Растительные ресурсы. – 2015. – т. 51. – вып. 3. – С. 397 – 406.
 67. Кондратова, Ю.А. Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности вероники ключевой / Ю. А.

- Кондратова // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: сб. науч. тр. II междунар. науч.-практ. конф. – Владикавказ, 2011. – ч. 1. – С. 217 – 218.
68. Коновалова, Д.С. Изучение противовоспалительной активности травы пиретриума девичьего / Д. С. Коновалова, С. А. Кулешова, Д. А. Коновалов / Науч. ведомости БелГУ. Сер. «Медицина Фармация». – 2011. – № 4 (99), вып. 13/2. – С. 157-160.
 69. Коновалова, Д.С. Хроматографическое изучение биологически активных соединений пиретрума девичьего / Д. С. Коновалова, Д. А. Коновалов // Курск. науч. – практ. вестн. «Человек и здоровье». – 2008. – №1. – С. 123 – 125.
 70. Королев, В. А. Фармакогностическое изучение представителей рода Донник: автореф. дис. ...канд. фармацевт. наук. : 15.00.02 / В. А. Королев ; Перм. ГФА. – Пермь, 1996. – 26 с.
 71. Коротаев, М.С. Содержание флавоноидов и гидроксикоричных кислот в надземной части *Ledum palustre* (Ericaceae) / М. С. Коротаева, М. В. Белоусов, Н. С. Фурса // Растительные ресурсы. – 2008. – Т. 44, вып. 1. – С. 66-75.
 72. Корочинский, А.В. Определение оптимальных условий экстрагирования растительного сырья / А. В. Корочинский // Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики. – Владикавказ, 2014. – С. 251 – 255.
 73. Корсун, В.Ф. Клиническая фитотерапия в урологии / В.Ф. Корсун, Е.В. Корсун, А.П. Суворов.- М.: Мк, 2011.- 336 с.
 74. Корулькин, Д. Ю. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин, Ж. А. Абилов, Г. А. Толстиков. – Новосибирск : Наука, 2007. – 296 с.
 75. Косман, В. М. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Флавоны,

- флавонолы и их гликозиды / В. М. Косман, И. Г. Зинкевич // Растит. ресурсы. – 1997. – Т. 33, вып. 2. – С. 14-26.
76. Косман, В. М. Количественное экстракционно-спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых растений / В. М. Косман, И. Г. Зинкевич // Раст. ресурсы. – 2001. – Т. 37, вып. 4. – С. 123-129.
 77. Костюк, В. А. Антиокислительная активность флавоноидов в различных системах перекисного окисления липидов / В. А. Костюк, А. И. Потапович, С. М. Терещенко // Биохимия. – 1988. – Т. 53, № 8. – С. 1365-1370.
 78. Кочетков, Н. К. Химия биологически активных природных соединений / Н. К. Кочетков. – М.: Химия, 1970. – 378 с.
 79. Кочеткова, А. А. Классификация и применение пектинов / А. А. Кочеткова, А. Ю. Колесов // Пищевая промышленность. – 1995. – № 9. – С. 28-29.
 80. Кроткова, О.А. Сравнительное изучение липофильных веществ растений рода *Euphrasia* L. / О. А. Кроткова, Т. В. Бомбела, В. М. Петриченко // Химия растительного сырья. – Пермь. – 2014. - №1. – С. 147 – 151.
 81. Кудрин, А. В. Микроэлементы в онкологии. Ч. 2. Микроэлементы и противоопухолевый иммунитет / А. В. Кудрин, А. В. Скальный // Микроэлементы в медицине. – 2001. – Т. 2, № 2 – 35 с.
 82. Курегян, А. Г. Хроматографические методы, используемые в анализе каротиноидов (Обзор) / А. Г. Курегян, С. В. Печинский, И. Н. Зилфикаров // Вопросы биологический, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – №11. – С. 3 – 15.
 83. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных

- растений, содержащих флавоноиды: автореф. дис... д-ра фармац. наук: 14.04.02 / Ф.В. Куркина. – Самара, 2013. – 48 с.
84. Лагута, И.В. Анализ антиоксидантных свойств экстрактов растений / И.В. Лагута, О.Н. Ставинская, О.И. Дзюба, Р.В. Иванников // Доп. НАН України.- 2015.- №5.- С. 130-137.
 85. Ларькина, М. С. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого / М. С. Ларькина, Т. В. Кадырова, Е. В. Ермилова // Химия растительного сырья. – 2008. – № 3. – С. 71-74.
 86. Лекарственные растения Государственной фармакопеи. Фармакогнозия / под ред. И. А. Самылиной, В. А. Северцева. – М., 2003. – 534 с.
 87. Лесиовская, Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии: учеб. пособие/ Е.Е. Лесиовская, Л.В. Пастушенков. - 2е изд. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 592 с.
 88. Лигай, Л. В. Изучение углеводов *Malva neglecta* / Л. В. Лигай, Д. А. Рахимов, В. А. Бандюкова // Химия природных соединений. – 1989. – № 2. – С. 280-281.
 89. Литвиненко, В. И. Химия природных флавоноидов и создание препаратов при комплексной переработке растительного сырья: автореф. дис. ... д-ра хим. наук : 02.00.10; 15.00.02 / В. И. Литвиненко. – Харьков, 1990. – 80 с.
 90. Ловкова, М.Я. Почему растения лечат / М. Я. Ловкова, А.М Рабинович, С.М. Пономарева – М.:Наука, 1989. – 256 с.
 91. Лукманова, К. А. Аминокислотный и минеральный состав фитопрепарата люцерн / К. А. Лукманова, В. А. Рябчук, Н. Х. Салихова // Фармация. – 2000. – № 1. – С. 25-27.
 92. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы Европейской части России / П.Ф. Маевский. – 10-е изд., испр. и доп. – М., 2006. – 600 с.

93. Макарова, Л. М. Поиск и изучение церебропротекторов в ряду производных тормозных нейромедиаторных аминокислот: дис... канд. фармацевт. наук : 14.00.25 / Л. М. Макарова. – Пятигорск, 2002. – 170 с.
94. Мальцева, Е.М. Антиоксидантная и антирадикальная активность *in vitro* экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития / Е. М. Мальцева, Н. О. Егорова, И. Н. Егорова, Р. А. Мухамадияров, Е.Т. Мальцева // Медицина в Кузбассе. – 2017. – т.16. – №2. – С. 32 – 38.
95. Махлаюк, В. П. Лекарственные растения в народной медицине / В.П. Махлаюк. – Саратов: Приволж. кн. изд-во, 1993. – 542 с.
96. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2006. – 1206 с.
97. Мешковский, А. П. Валидация аналитических методов / А. П. Мешковский // Современные требования к организации и деятельности контрольно-аналитических лабораторий отделов контроля качества фармацевтических предприятий. – М., 2002. – С. 26-30.
98. Мирзоева, Х. А. Содержание основных действующих веществ в траве и экстракционных препаратах травы *Thymus Marshallianus* Wild. / Х. А. Мирзоева, Ф. М. Юнусов // Химия растительного сырья. – 2017. - №2. – С. 75 – 79.
99. Мироненко, Н. В. УФ – спектрофотометрическое определение тритерпеновых сапонинов – производных олеаноловой кислоты / Н. В. Мироненко, Т. А. Брежнева, В. Ф. Селеменев // Химия растительного сырья. – 2011. - №3. – С. 153 – 157.
100. Муравьева, Д. А. Азотистые основания омелы белой и формианы простой / Д. А. Муравьева, О. И. Попова, К. О. Гаспарян // Фармация. – 1991. – № 1. – С. 16-17.

101. Никонов, Г.К. Основы современной фитотерапии / Г.К. Никонов, Б.М. Мануйлов. – М.: Медицина, 2005.- 520 с.
102. Новиченко, О. В. Получение биологически активных веществ высших водных растений Волго – Каспийского бассейна на примере *Potamogeton perfoliatus* L. и *Zostera Noltii*: состав, свойства и перспективы применения: Автореф. дис... канд. фармац. наук / О. В. Новиченко. – Астрахань, 2016. – 24 с.
103. О роли активации свободнорадикального окисления в структурной и функциональной дезорганизации биосистем в условиях патологии / Н.П. Чеснокова, В.В. Моррисон, Е.В. Понукалина, Г.А. Афанасьева, М.Н. Бизенкова, В.Ю. Барсуков, О.Л. Морозова, Н.В. Полутова, Т.Н. Жевак // Успехи современного естествознания.-2008.- №3.- С. 25-33.
104. О роли активации свободнорадикального окисления в структурной и функциональной дезорганизации биосистем в условиях патологии / Н.П. Чеснокова, В.В. Моррисон, Е.В. Понукалина, Г.А. Афанасьева, М.Н. Бизенкова, В.Ю. Барсуков, О.Л. Морозова, Н.В. Полутова, Т.Н. Жевак // Функциональные исследования.- 2009.- №5.- С. 122-130.
105. Овчинникова, О. Ю. Фармакологические свойства нового антиоксидантного комплекса на основе природных флавоноидов: автореф. дис. ... канд. биолог. наук : 14.03.06 / О. Ю. Овчинникова. – Волгоград, 2010. – 28 с.
106. Оленников, Д.Н. Методика количественного определения суммарного содержания полисахаридов в семенах льна (*Linum usitatissimum* L.) / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 85-90.
107. Определение гидроксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье и объектах растительного происхождения / Ю.В. Медведев, О.И. Передеряев, А.П. Арзамасцев, К.И. Эллер, В.И.

- Прокофьева // Вопр. биолог., мед. и фармацевт. химии. – 2010. – № 3. – С. 25-31.
108. Орджоникидзе, З. Г. Значение микроэлементов для достижения высоких спортивных результатов и сохранения здоровья спортсменов / З. Г. Орджоникидзе, О. А. Громова, А. В. Скальный // Микроэлементы в медицине. – 2001. – Т. 2, № 2. – С. 12-14.
 109. Павловская, Н. Е. Исследование тритерпеновых сапонинов, полученных из корней овса посевного (*Avena sativa* L.) / Н. Е. Павловская, И. Ю. Солохина, И. А. Гнеушева // Вест. Орлов. Гос. аграрного ун-та. - 2012. – Вып. 2, т. 35. – С. 48-50.
 110. Парфенов, А. А. Аминокислоты травы пустырника пятилопастного / А. А. Парфенов, Н. С. Фурса // Фармация. – 2007. – № 7. – С. 6-7.
 111. Парфенов, Э. А. Фармакологический потенциал антиоксидантов на основе кумарина : обзор / Э. А. Парфенов, Л. Д. Смирнов // Хим.-фарм. журн. – 1998. – Т. 22, № 12. – С. 1438-1448.
 112. Пат. 2170930, Российская Федерация, МПК: G01N33/50, G01N33/52. Способ определения антиокислительной активности / Т. В. Максимова, И.Н. Никулина, В.П. Пахомов, Е.И Шкарина,. З.В. Чумакова, А.П. Арзамасцев; заявитель и патентообладатель Моск. мед. акад. им. И. М. Сеченова. - №2000111126/14; заявл. 05.05.2000; опубл. 20.07.2001.
 113. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лекарственных и лечебно-профилактических средств/ Н.А. Криштанова, М.Ю. Сафонова, В.Ц. Болотова, Е.Д. Павлова, Е.И. Саканян // Вестн. ВГУ. Сер. «Химия. Биология. Фармация». – 2005. – №1. – С. 212-221.
 114. Пилат, Т. Л. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение) / Т. Л. Пилат, А. А. Иванов. – М.: Авваллон, 2002. – 710 с.

115. Погорелый, В. Е. Препараты аминокислот как нейропротекторы / В. Е. Погорелый, Н. Е. Слюнькова, Л. М. Макарова // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения : материалы VII Междунар. съезда «Фитофарм 2003» (С.-Петербург – Пушкин, 3-5 июля 2003 г.). – СПб., 2003. – С. 244-250.
116. Позднякова, Т. А. Герань сибирская : содержание жирных и органических кислот / Т. А. Позднякова, Р. А. Бубенчиков // Фармация. – 2014. – № 8. – С.13-15.
117. Позднякова, Т. А. Изучение тритерпеновых сапонинов астрагала белостебельного (*Astragalus albicaulis* Д. С.)/ Т. А. Позднякова, Р. А. Бубенчиков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – т. 19. – №12. – С. 24-27.
118. Позднякова, Т. А. Количественное определение функциональных групп пектиновых веществ травы герани сибирской (*Geranium sibiricum* L.) / Т. А. Позднякова, Р. А. Бубенчиков // Фундаментальные исследования . – 2014. -№11, ч. 1. – С. 110 – 113.
119. Покровский, М. В. Фармакотерапевтическая эффективность растений рода Фиалка при лечении стафилококковой пневмонии / М. В. Покровский, Р. А. Бубенчиков // Науч. ведомости БелГУ. Сер. «Медицина. Фармация». – 2010. – № 22 (93), вып. 12/2. – С. 19-22.
120. Получение высокочистого арабиногалактана лиственницы и исследование его иммуномодулирующих свойств/ Е.Н. Медведева, В.А. Бабкин, О.А. Макаренко, С.М. Николаев, В.Б. Хобракова, А.М. Шулунова, Т.Е. Федорова, Л.А. Еськова // Химия растительного сырья. –2004. –№4. – С. 17-23.
121. Пономарев, В. Д. Экстрагирование лекарственного растительного сырья / В. Д. Пономарев, - М.: Медицина, 1978.- 204 с.

122. Прида, А. И. Танин из виноградных семян – источник натуральных антиоксидантов (проантоцианидинов) / А. И. Прида, С. В. Вылку // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения : материалы VII Междунар. съезда «Фитофарм 2003» (С. Петербург-Пушкино, 3-5 июля 2003 г.). – СПб, 2003. – С. 369-372.
123. Противовоспалительные и антибактериальные свойства извлечений из надземной части живокости высокой *Delphinium elatum* L. (Ranunculaceae) / Т. Н. Поветьева, Ю.В. Нестерова, А.В. Крапивин, Н.И. Суслов, Л.В. Лаврентьева, С.С. Кравцова, Ю.Г. Нагорняк // Бюл. Сиб. медицины. – 2012. - №3. – С. 58-62.
124. Разработка методики потенциометрического определения суммы органических кислот в плодах шиповника / А. И. Марахова, О.А. Супикова, Н.Н. Федоровский, Е.В. Сергунова, А.А. Сорокина // Фармация. – 2013. – № 1. – С. 24-27.
125. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.5. Семейство Asteraceae (Compositae). Часть 2. Роды *Echinops* –*Youngia* / отв. ред. А. Л. Буданцев. Спб., 2013. – 312 с.
126. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. Методические рекомендации. МР 2.3.1.1915-04. - М.: Ремедиум, 2004. – 28 с.
127. Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2(R1) // Фармация. – 2008. – № 4. – С. 3-10.
128. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / редкол. А. Н. Миронов (председатель). – М.: Гриф и К., 2012. – с. 944.

129. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. В. П. Фисенко. – М.: Ремедиум, 2000. – 398 с.
130. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических видов / под ред. Р. У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.
131. Рыбалко, К.С. Природные сесквитерпеновые лактоны / К. С. Рыбалко. – М.: Медицина, 1978. – 319 с.
132. Санитарные правила и нормы СанПин 2.3.2./1078-01. «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов от 06.11.2001 г.» с изменениями от 31.05.2002 г.
133. Сафонова, И.А. Изучение элементного состава плодов и листьев сливы колючей (*Prunus spinosa* L.) / И. А. Сафонова, В.Я. Яцюк, А.А. Фатьянов, А.А. Сафонов // Науч. ведомости БелГУ. Сер. «Медицина. Фармация». – 2012. – № 10-3 (129). – С. 46-48.
134. Семенова, Е.Ф. Фармакологическая и пищевая ценность семян льна посевного *Linum usitatissimum* L. / Е.Ф. Семенова, Т.М. Фадеева, Е.В. Преснякова // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». - 2013. - № 2. - С. 117-124.
135. Сергунова, Е. В. Изучение аминокислотного состава плодов и экстракта шиповника / Е. В. Сергунова, И.А. Самылина, А. А. Сорокина // Фармация. – 2003. – № 2. – С. 13-15.
136. Сернов, Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М., 2000. – 352 с.
137. Сидельникова, Л. Л. Содержание некоторых групп соединений у *Neurocallis minor* в условиях интродукции / Л. Л. Сидельникова, Т. А. Кукушкина // Химия растительного сырья. – 2014. – №1. – С. 177 – 183.

138. Скальный, А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А. В. Скальный. – М.: ОНИКС 21 век, Мир, 2004. – 216 с.
139. Смирнова, Н. И. Галактоманнаны некоторых видов сем. Fabaceae / Н. И. Смирнова, И. Е. Лобанова, О. В. Анулов // Растит. ресурсы. – 1998. – Т. 34, вып. 4. – С. 68-71.
140. Сосипатрова, А. А. Влияние факторов экстрагирования на эффективность извлечения биологически активных веществ из листьев березы повислой / А. А. Сосипатрова, Н. Б. Демина, В. А. Быков // Фармация. – 2011. - №1.- С. 25 – 27.
141. Степаненко, Б. Н. Химия и биохимия углеводов. Моносахариды / Б. Н. Степаненко. – М.: Высш. шк., 1977. – 222 с.
142. Степаненко, Б. Н. Химия и биохимия углеводов. Полисахариды / Б. Н. Степаненко. – М.: Высш. шк., 1978. – 256 с.
143. Терешина, Е.В. Роль жирных кислот в развитии возрастного окислительного стресса. Гипотеза // Успехи герантологии. - 2007. - №20(1). - С. 59-65.
144. Теселкин, Ю. О. Антиоксидантные свойства дигидрокверцетина / Ю. О. Теселкин, Б. А. Жамбалова, И. В. Бабенкова // Биофизика. – 1996. – Т. 41, вып 3. – С. 620-624.
145. Тонкослойная хроматография в анализе флавоноидов растительных объектов / А. А. Мальцева, О.В. Тринеева, А.С. Чистякова, Т.А. Брежнев, А.И. Сливкин, А.А. Сорокина // Фармация. – 2013. – № 1. – С. 13-16.
146. Тринеева, О.В. Антиоксидантная активность водно-спиртовых извлечений листьев крапивы двудомной / О. В. Тринеева, Е.Ф. Сафронова, С.С. Воропаева, А.И. Сливкин // Фармация. – 2013. – №1. – С. 11 – 12.

147. Удельнова, Т. Н. Микроэлементы, экология и здоровье человека / Т. Н. Удельнова, С. Г. Торгин, В. А. Ягодин // Успехи современной биологии. – 1990. – Вып. 2. – С. 279.
148. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк, Э.И. Хасина, А.В. Кропотов, Е.А. Коленченко, И.С. Сергущенко, М.Ю. Хотимченко, В.В. Ковалев // Вестник ДВО РАН. –2005. –№1. – С.72-82.
149. Федосеева, А.А. Антиоксидантная активность настоя чая / А. А. Федосеева, О. С. Лебедкова, Л. В. Каниболоцкая, А. Н. Шендрик // Химия растительного сырья. – 2008. - №3. – С. 123 – 127.
150. Филиппов, М. П. Колориметрическое определение уронидной части в пектиновых веществах / М. П. Филиппов // Изв. АН МССР: Сер. «Биолог. и хим. науки». – 1973. – № 3. – С. 76-79.
151. Финкельштейн, Е. И. Современные методы анализа каротиноидов (обзор) / Е. И. Финкельштейн // Химико – фармацевтический журнал. – 2016. – т. 50. - №2. – С. 29 – 40.
152. Фитотерапия антиоксидантами – биофлаваноидами / В. К. Колхир, Т.Е. Трумпе, Н.Г. Глазова, А.И. Бачинская, Л.Д. Шипулина, М.Ф. Минеева, Т.В. Фатеева, Л.Б. Стрелкова, В.А. Стихин, С.А. Вичканова, // Человек и лекарство.: тез. докл. 5 Рос. нац. конгр. (7-11 апр. 1998 г.). – М., 1998. – С. 374.
153. Флавоноиды травы горца почечуйного / И. Б. Перова, К.И. Эллер, А.А. Мальцева, А.С. Чистякова, А.И. Сливкин, А.А. Сорокина // Фармация. – 2017. – т. 66. - №2. – С. 15 – 19.
154. Флора СССР: в 30 т. / под ред. В.Л. Комарова. – М. – Л., 1934 – 1964.
155. Фурса, Н. С. Элементный состав листьев растений рода вакциниум / Н. С. Фурса, Д. С. Круглов, М. М. Белокуров // Фармация. – 2017. - №1. – С. 33 – 36.

156. Хань, К. Х. Моделирование воспалительных отеков: взаимозаменяемы ли модели? / К. Х. Хань, В. Н. Хазиахметова, Л. Е. Зиганшина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – №7 (78). – С. 24 – 31.
157. Харборн, Д. Биохимия фенольных соединений / Д. Харборн. – М. : Мир, 1969. – 572 с.
158. Хасанов, В. В. Методы исследования антиоксидантов / В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова, Е. В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. - №3. – С. 63 – 75.
159. Чушенко, В. Н. Исследование в области полисахаридных препаратов: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук : (15.00.02) / В. Н. Чушенко ; Харьков. ХНИХФИ. – Харьков, 1980. – 24 с.
160. Шестакова, Т. С. Элементный состав травы и экстракционных препаратов очанки / Т. С. Шестакова, В. М. Петриченко, Т. В. Сухинина // Хим.-фарм. журн. – 2008. – Т. 42, № 8. – С. 20-22.
161. Шугалей, И.В. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы / И.В. Шугалей, А.В. Гарабаджиу, М.А. Илюшин, А.М. Судариков // Экологическая химия. - 2012. - №21(3). - С. 172-186.
162. Щемелинина, Т. В. Содержание аскорбиновой кислоты и органических кислот в траве донника лекарственного / Т. В. Щемелинина, А. А. Сорокина // Фармация. – 2015. - №2. – С. 22-24.
163. Якубке, Х. Д. Аминокислоты, пептиды, белки / Х. Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М. : Мир, 1985. – 456 с.
164. Дахим, І. С. Хімічний склад трави стокроток багаторічних / І. С. Дахим, С. М. Марчишин // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2014. - №1. – С. 36 – 38.
165. Ісюк, М. В. Дослідження амінокислотного складу герані сибірської / М. В. Ісюк, І. Л. Бензель, Л. В. Бензель // Актуальні питання

- фармацевтичної і медичної науки та проктики. – 2012. – № 3. – С. 4-6.
166. Чекман, І.С. Флавоноїди – клініко - фармакологічний аспект / І.С. Чекман // Фітотерапія в Україні.- 2000.- №2.- С. 3-5.
 167. Acidic polysaccharides from *Psidium cattleianum* / L.C. Vriesmann, C. L. de Oliveira Petkowicz, P. I. B. Carneiro, M. E. Costa, E. Beleski-Carneiro // *Int. J. Biol. Technol.* – 2009. – Vol. 52, N. 2. – P. 259-264.
 168. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants / F. Conforti, G. Loele, G.A. Statti, M. Marrelli, G. Ragno, F. Menichini // *Food and Chemical Toxicology.* – 2008. – Vol. 46. – P. 3325 – 3332.
 169. Bauer, S. Mass spectrometry for characterizing plant cell wall polysaccharides / S. Bauer // *Front. Plant. Sci.* – 2012. – Vol. 3, N 45. – P. 1-6.
 170. Briant, E. T. A note of the differentiation between flavonoid glycosides and their aglicones / E. T. Briant // *J. Am. Pharm. Assoc.* – 1950. – vol. 39, №8. – P. 480-488.
 171. Calder, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes : New twists in an old tale / P. C. Calder // *Biochimie.* – 2009. – Vol. 91, N 6. – P. 791-795.
 172. Carrapiso, A. I. Development in lipid analysis: some new extraction technigues and in situtransesterification / A. I. Carrapiso, C. Carcia // *Lipids.* – 2000. – Vol. 35. – P. 1167-1177.
 173. Chemical composition and antioxidant activities of tree polysaccharide fractions from Pine cones / R.-B. Xu, [X. Yang](#), [J. Wang](#), [H.-T. Zhao](#), [W.-H. Lu](#), [J. Cui](#), [C-L Cheng](#), [P. Zou](#), [W-W Huang](#), [P. Wang](#), [W.-J. Li](#), [X.-L. Hu](#)// *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13. – P. 14262-14277.
 174. Christie W. W. Preparation of lipid extract from tissues// *Advances in lipid methodology.* Dundee, Stotland. – 1993. – Vol. 2. – P. 195-213.

175. Composite constituents : three gammacer - 16-en derivatives, novel triterpenoids isolated from roots of *Picris hieracoides* subsp. *japonica* / K. Shiojima, K. Masuda, T. Lin, H. Suzuki, H. Ageta // *Tetrahedron letters*. - 1989. - Vol. 30. - № 37. - P. 4977 – 4980.
176. Composite Constituents: Forty – Two Triterpenoides Including Eight Novel Compounds Isolated from *Picris hieracioides* subsp. *Japonica* / K. Shiojima, K. Masuda, H. Suzuki, T. Lin, Y. Oishi, H. Ageta // *Chem. Pharm. Bull.* - 1995. – Vol. 43, № 10. - P. 1634 – 1639.
177. Davies, J. S. Aminoacids, peptides and proteins / J. S. Davies. – Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 2006. – 472 p.
178. Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols / L. Wang, Y.-C. Tu, T.-W. Lian, J.-T. Hung, J.-H. Yen, M.-J. Wu// *J. Agric. Food. Chem.* – 2006. – Vol. 54. – P. 9798-9804.
179. Effect of supplementation of probiotics and phytosterols alone or in combination on serum and hepatic lipid profiles and thyroid hormones of hypercholesterolemic rats / S.S. Awaisheh, M.S. Khalifeh, M.A. Al-Ruwaili, O.M. Khalil, O.H. Al-Ameri, R. Al-Groom // *Journal of dairy science*. - 2013. - Vol. 96. - № 1. – P. 9-15.
180. Fatty acids profiles of some Spanish wild vegetables / P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, A.M. Carvalho, M.C. Sánchez-Mata, M. Cámara, J. Tardío // *Food Sci. Technol. Int.* – 2012. – Vol. 18. - P.281-290.
181. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and application / ed. M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton ; London ; New York, 2006. – 1198 p.
182. Geissman, T. A. Chemistry of flavonoid compounds / T. A. Geissman. – Oxford: Pergamon Press, 1962. – 666 p.
183. Hagerman, A. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants / A. Hagerman, K. Riedl, G. Jones // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. – Vol. 46. – P. 1887-1892.

184. Harborne, J. B. The rare flavone isoetin as a yellow flower pigment in *Heywoodiella oligocephala* and in other cichorieae / J. B. Harborne // *Phytochemistry*. – 1978. – Vol. 17. – P. 915 – 917.
185. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on leadzine mining area in Yunnan, China/ Z.Yanqun, L. Yuan, C. Jianjun, C. Haiyan, Q.Li, C. Schvartz // *Environment international*. – 2005. - № 31. – P. 755 – 762.
186. Kanayama, T. Sesquiterpene Lactones from of *Picris hieracioides* / T. Kanayama, M. Tada // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1988. – Vol. 61. – P. 2971 – 2972.
187. Kisiel, W. Sesquiterpene lactones from *Picris heiracioides* subsp. *heiracioides* / W. Kisiel // *Planta medica*. – 1992. - № 52. – P. 115.
188. Mabry, T.J. The systematic identification of flavonoids / T.J. Mabry, K.R.Markham, M.B. Thomas. – New York-Heidelberg-Berlin. – 1970. – 354 p.
189. Markham, K.R. Carbon – 13 NMR Spectroscopy of flavonoids / K.R. Markham, V.M. Chari, T.J. Mabry / In: Harbone, J.B., Mabry, T.J. (Eds.), *The Flavonoids: Advances Research*. Chapman & Hall, London. – 1982. – P. 19 – 134.
190. Michalska, K. Sesgviterpene lactones from *Taraxacum obovatum* / K. Michalska, W. Kisiel // *Planta Med.* – 2003. – Vol. 69, N 2. – P. 181-183.
191. Michalska, M. Antioxidant capacities of natural supplements with high does of vitamin C / M. Michalska, M. Wasek // *Actual problems of creation of new medicinal preparations of natural origin PHYTOPHARM 2003: proceedings of the 7 Intern. Cong. (3-5 july; 2003; St. – Peterburg – Pushkin, Russia)*. – Spb, 2003. – P. 491-494.
192. Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms / M.R. Broadley, N. Willey, J.C. Wilkins, A.J.M. Baker, A. Mead, P. White // *New Phytologist*. - 2001. - N. 152. - P. 9 - 27.

193. Podmore, I. D. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties / I. D. Promore, H. R.Griffiths, K. E. Herbert // Nature. – 1998. – Vol. 392. – P. 559.
194. Recio, M. C. Structural requirements for the antiinflammatory activity of natural triterpenoids / M. C. Recio // Planta Med. – 1995. – Vol. 61, N 2. – P. 182-185.
195. Rossetto, M. Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles / M. Rossetto, P. Vanzani, F. Mattivi // Arch. Biochem. Biophys. – 2002. – Vol. 408. – P. 239-245.
196. Sareedenchai, V. Flavonoids as chemosystematic markers in the tribe Cinchoriae of the Asteraceae / V. Sareedenchai, C. Zidorn // Biochemical Systematics and Ecology. – 2009. – Vol. XXX. – P. 1 – 23.
197. Sesquiterpene Lactones from *Picris hieracioides* L. var. *japonica* REGEL. I. / K. Nishimura, T. Miyase, A. Ueno, T. Noro, M. Kuroyanagi, S. Fukushima // Chem. Pharm. Bull. – 1986. – Vol. 34, N. 6. – P. 2518 – 2521.
198. Shallari , S. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania / S. Shallari, C. Schwartz, A. Hasko, J.L. Morel // The Science of the Total Environment. – 1998. – Vol. 209. – P. 133 – 142.
199. Shi, L. Isolation, purification, and immunomodulatory activity in vitro of three polysaccharides from roots of *Cudrania tricuspidata* / L. Shi, Y. Fu // Acta Biochim. Biophys. Sin.- 2001. – Vol. 43, N. 5. - P. 418-424.
200. Shimiati, N. New method for location of organic acids on paper chromatograms / N. Shimiati, C. Fischer, J. N. Mecoven // J. Pharm. Sci. – 1963. – Vol. 52. – P. 468-472.
201. Slovak, M. Morphological evaluation of *Picris hieracioides* α (Compositae) in Slovakia / M. Slovak, K.Marhold // Phytion (Horn, Austria). – 2007.- N 47.- P. 73-102.

202. Slovak, M. The Morphological and Genetic Variation in the Polymorphic Species *Picris hieracioides* (Compositae, Lactuceae) in Europe Strongly Contrasts with Traditional Taxonomical Concepts / M. Slovak, J. Kucera, K. Marhold, J. Zozomova – Lihova // Systemic Botany. – 2012. – Vol.37, № 1. - P. 259 – 278.
203. Sugihara, N. Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid hydroperoxidation in cultured hepatocytes / N. Sugihara, M. Ohnishi, M. Imamura. // J. Health Sci. – 2001. – Vol. 47, N 2. – P. 99-106.
204. The Flavonoids: Advances in Research / Eds J.B.Harbone and T.J.Marby. – London: New York: Chapman and Hall. – 1982. – xii. – 744 p.,
205. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents / F. Conforti, S. Sosa, M. Marrelli, F. Menichini, G.A. Statti, D. Uzunov, A. Tubaro, F. Menichini // Food Chemistry. – 2009. – Vol. 112. – P. 587 – 594.
206. Uchiyama, T. Terpenoid glycosides from *Picris hieracioides* / T. Uchiyama, K. Nishimura, T. Miyase, A. Ueno // Phytochemistry. - 1990. Vol. 29. - P. 2947 – 2951.
207. Vladimirov, Y. A. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation / Y. A. Vladimirov // Free Radical Bioi. Med. – 1995. – Vol. 18. – P. 739-745.
208. Vladimirov, Y. A. Quinolizin-coumarins as physical enhancers of chemiluminescence during lipid peroxidation in live HL-60 cells / Y. A. Vladimirov // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – Vol. 384, N 1. – P. 154-162.
209. Wagner, H. Plant drug analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas / H. Wagner, S. Blads. – Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer Verlag, 1996. – P. 348.

210. Zidorn, C. Sesquiterpenoids as chemosystematic markers in the subtribe Hypochaeridinae (Lactuceae, Asteraceae) / C. Zidorn // Biochemical systematics and ecology. – 2006. - № 34. – P. 144 – 159.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение №

Дата регистрации « » г.

ООО Фирма «Здоровье», Россия, 121170, г. Москва, ул. 1812 года, д. 2
(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

(номер)

Горлюхи ястребинковой трава
(торговое наименование лекарственного препарата)

Горлюхи ястребинковой трава
(международное непатентованное или группировочное наименование)

Трава цельная
(лекарственная форма, дозировка)

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ООО Фирма «Здоровье», Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ООО Фирма «Здоровье», Россия

**УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ
(ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)**

ООО Фирма «Здоровье», Россия

**ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ
КАЧЕСТВА**

ООО Фирма «Здоровье», Россия

Наименование показателей	Методы	Характеристики показателей и их нормы
Время сбора сырья		Цветение
Описание	Органолептический ГФ XIII	Смесь цельных и (или) частично измельченных округло-ребристых стеблей, не длиннее 30 см, имеющих листья, цветки и некоторое количество незрелых плодов; стебли опушены волосками, которые охарактеризованы как вильчатые и якоревидные. Содержащиеся в сырье исследуемого растения листья продолговато-эллиптические, по краям зубчатые или цельнокрайние, длинночерешковые или сидячие, верхние листья являются полустеблеобъемлющими. Листья на стебле имеют очередное расположение и равномерно размещены на стебле. Корзинки многоцветковые, на верхушках стеблей и ветвей в общем щитковидно-метельчатом соцветии. Все цветки в корзинке язычковые, обоеполые, желтые. Отгиб венчика в 2-3 раза длиннее его трубки. Обертки корзинок имеют колокольчатую форму; листочки обертки линейно – ланцетные, расположены в три ряда; снаружи листочки отогнуты в разные стороны. Листочки обертки при внимательном изучении имеют заметное опушение, волоски при рассмотрении тонкие, в основании нет заметного расширения черного цвета, хотя иногда встречаются белые волоски. Цвет как стеблей, так и присутствующих листьев можно охарактеризовать как светло-зеленый, иногда зеленый, цветки, содержащиеся в сырье, имеют цвет желтый. Запах имеет характер, называемый травянистым. Вкус водного извлечения определяется как горький.
Микроскопия	Микроскопический ГФ XIII	Стебель при рассмотрении поперечного сечения имеет округло-

		ребристую форму, покровная ткань - эпидермис. Форма клеток эпидермиса прямостенная, прозенхимная, имеющая прямые или скошенные. Эпидермис характеризуется устьицами аномоцитного типа, которые локализуются в междуреберье. Эпидермис стебля опушен двумя типами простых волосков: тонкостенными, многоклеточными и двурядными или многорядными многоклеточными, которые на верхушке заканчиваются двумя якоревидными крючками (якоревидный волосок). Под клетками эпидермиса в ребрах в 6-8 слоев наблюдаются клетки пластинчатой колленхимы. В междуреберьях располагаются клетки основной паренхимы, они чаще всего заполнены бурым содержимым. Крупные клетки эндодермы образуют внутренний слой первичной коры, отделяя ее от центрального цилиндра, в котором формируется пучковый тип строения. Коллатеральные пучки расположены в форме круга, более мелкие в ребрах, а уже в междуреберье пучки крупнее по размеру. Клетки флоэмы проводящих пучков мелкоклеточные, а сосуды ксилемы формируют более или менее вертикальные ряды. Склеренхима располагается большими участками над проводящими пучками и между ними. Клетки основной паренхимы формируют сердцевину стебля. Нижний эпидермис листа имеет сильно извилистые клетки, верхний эпидермис - прямые или слегка извилистые клетки, клетки эпидермиса вдоль жилок прямостенные, прозенхимной формы. Устьица располагаются на нижней и верхней стороне листа. Устьица сопровождаются 4-5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). На всей
--	--	--

		поверхности листа и по краю листа располагаются простые дву- или многорядные многоклеточные волоски, заканчивающиеся на верхушке двумя якоревидными крючками или двумя остроконечными клетками. Так же одним из диагностических признаков горлюхи ястребинковой является определенное наличие млечников, располагающихся вдоль жилок листьев. Клетки эпидермиса нижней части трубки венчика имеют прозенхимную форму с прямыми утолщенными клеточными стенками с хорошо заметной продольной морщинистостью кутикулы. Эти клетки часто сдавлены в продольном направлении. Немного выше эпидермис трубки упомянутого язычкового цветка представлен следующим типом клеток: стенки слегка извилистостенные или со скошенными или с прямыми концами. Клетки эпидермиса зубцов венчика прозенхимной формы, извилистостенные, а на верхушке с сосочковидными выростами. Среди этих выростов встречаются одноклеточные толстостенные волоски с бородавчатой кутикулой. Эпидермис язычкового цветка опушен длинными многоклеточными многорядными простыми волосками с одно-, двурядной верхушкой, которые в большом количестве встречаются в нижней части зубцов язычкового цветка. Завязь язычкового цветка имеет опушение, волоски тонкостенные, длинные, простые, представляющие собой несколько одноклеточных волосков, между собой сросшихся. По эпидермису цветка встречаются пыльцевые зерна округлой формы с шиповатыми выростами. В основании листочка обертки
--	--	---

		клетки прозенхимной формы, прямостенные. Далее по всей длине листочков обертки и по их краю клетки эпидермиса слегка извилистостенные с сосочковидными выростами. Эпидермис листочков оберток исследуемого сырья при ближайшем рассмотрении имеет опушение с характерными разнообразными простыми волосками: иногда дву- или многорядными на верхушке с двумя якоревидными крючками или же с двумя остроконечными клетками, которые встречаются вдоль главной жилки; одноклеточными толстостенными простыми волосками с острым концом (такие волоски можно встретить практически по всей длине листочков обертки); тонкостенными, имеющими большую длину многоклеточными волосками, часто со спадающимися клеточными стенками, встречаются на верхушке, по краю и по всей длине листочков обертки.
Определение основных групп биологически активных веществ	Качественные реакции: -реакция со спиртом 96% - реакция с 1% водным раствором железоаммонийных квасцов (фенольные соединения)	Появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды) Черно-зеленое окрашивание, при стоянии переходящее в почти черный осадок
Испытания		
Влажность	ГФ XIII	не более 13%
Зола общая	ГФ XIII	не более 10%
Зола нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ XIII	не более 1%
Измельченность		
Частиц, проходящих сквозь сито, с отверстиями размером 7 мм	ГФ XIII	не более 10%
Посторонние примеси		
Допустимые примеси:	ГФ XIII	

-Органические примеси -Минеральные примеси		не более 1,0% не более 1,0 %
Тяжелые металлы	ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Соответствует требованиям
Содержание радионуклидов	ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Соответствует требованиям
Остаточные количества пестицидов	ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Соответствует требованиям
Микробиологическая чистота	ОФС «Микробиологическая чистота», ГФ XIII	Категория 4 А
Количественное определение		
Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту	Спектрофотометрия	не менее 2,0%
Содержание полисахаридов	Гравиметрия	не менее 7,0%
Экстрактивных веществ, извлекаемых водой	ГФ XIII	не менее 30%
Упаковка	ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»	
Маркировка		
Транспортирование		
Хранение	ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»	
Срок годности	2 года	

Приложение 2

Министерство образования и науки РФ
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»



УТВЕРЖДАЮ
Директор по организационно-методической деятельности
ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»
Г.М. Зомитева
2017 г.

**о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности**

1. **Авторы внедрения:** Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна
2. **Источник предложения** фрагмент кандидатской диссертации «Фармакогностическое изучение горлюхи ястребинковой»
3. **Название объекта внедрения:** анализ сырья горлюхи по морфолого-анатомическим признакам
4. **Наименование организации, где используются результаты исследования:** ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»
5. **Дата начала отсчета внедрения:** используется с октября 2017 года в учебном и научном процессе кафедры общей, биологической, фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», при морфолого-анатомическом анализе сырья
6. **Заключение об эффективности внедрения:** Разработанный морфолого-анатомический анализ сырья характеризуется простотой выполнения, позволяет провести анализ цельного сырья с установлением всех морфологических и микродиагностических признаков и установить подлинность сырья по данным показателям

Руководитель подразделения, из которого исходит внедрение:
д.ф.н., профессор Бубенчикова В.Н., зав. каф. фармакогнозии и ботаники КГМУ

Ответственный за внедрение: д.б.н., доцент, зав. каф. общей, биологической, фармацевтической химии и фармакогнозии ОГУ имени И.С. Тургенева Юшкова Е.И.

Приложение 3

Министерство образования и науки РФ
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»



АКТ

о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности

1. **Авторы внедрения:** Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна
2. **Источник предложения** проект фармакопейной статьи «Горлюхи ястребинковой трава»
3. **Название объекта внедрения:** методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой
4. **Наименование организации, где используются результаты исследования:** ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»
5. **Дата начала отсчета внедрения:** используется с октября 2017 года в учебном и научном процессе кафедры общей, биологической, фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», при морфолого-анатомическом анализе сырья
6. **Заключение об эффективности внедрения:** Использование данной методики позволяет определить содержание суммы гидроксикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой спектрофотометрическим методом, основанным на экстракции суммы гидроксикоричных кислот 50% спиртом этиловым с последующим измерением оптической плотности в области 330 нм в пересчете на хлорогеновую кислоту. Методика хорошо воспроизводима.

Руководитель подразделения, из которого исходит внедрение:
д.ф.н., профессор Бубенчикова В.Н., зав. каф. фармакогнозии и ботаники КГМУ

Ответственный за внедрение: д.б.н., доцент, зав. каф. общей, биологической, фармацевтической химии и фармакогнозии ОГУ имени И.С. Тургенева Юшкова Е.И.

Приложение 4

Министерство образования и науки РФ
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»



АКТ

о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности

1. **Авторы внедрения:** Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна
2. **Источник предложения** фрагмент кандидатской диссертации «Фармакогностическое изучение горюхи ястребинковой»
3. **Название объекта внедрения:** анализ сырья горюхи по морфолого-анатомическим признакам
4. **Наименование организации, где используются результаты исследования:** ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»
5. **Дата начала отсчета внедрения:** используется с октября 2017 года в учебном и научном процессе кафедры фармакологии, клинической фармакологии и фармации ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», при морфолого-анатомическом анализе сырья
6. **Заключение об эффективности внедрения:** Разработанный морфолого-анатомический анализ сырья характеризуется простотой выполнения, позволяет провести анализ цельного сырья с установлением всех морфологических и микрوديagnostических признаков и установить подлинность сырья по данным показателям

Руководитель подразделения, из которого исходит внедрение:
д.ф.н., профессор Бубенчикова В.Н., зав. каф. фармакогнозии и ботаники
КГМУ

Ответственный за внедрение: к.б.н., доцент Лебедев А.В.

Приложение 5

Министерство образования и науки РФ
ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

«ОУ ВЕРБАТО»
Директор по организационно-методической деятельности
«ОУ Вербата ИК Тургенева»
Г.М. Зомитева
_____ 2017 г.

АКТ
о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности

- 1. Авторы внедрения:** Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна
- 2. Источник предложения** проект фармакопейной статьи «Горлюхи ястребинковой трава»
- 3. Название объекта внедрения:** методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой
- 4. Наименование организации, где используются результаты исследования:** ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»
- 5. Дата начала отсчета внедрения:** используется с октября 2017 года в учебном и научном процессе кафедры фармакологии, клинической фармакологии и фармации ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», при морфолого-анатомическом анализе сырья
- 6. Заключение об эффективности внедрения:** Использование данной методики позволяет определить содержание суммы гидроксикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой спектрофотометрическим методом, основанным на экстракции суммы гидроксикоричных кислот 50% спиртом этиловым с последующим измерением оптической плотности в области 330 нм в пересчете на хлорогеновую кислоту. Методика хорошо воспроизводима.

Руководитель подразделения, из которого исходит внедрение:
д.ф.н., профессор Бубенчикова В.Н., зав. каф. фармакогнозии и ботаники
КГМУ

Ответственный за внедрение: к.б.н., доцент Лебедев А.В.

Приложение 6

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
по качеству ООО Фирма «Здоровье»

М.А. Смирнова

» июня 2018 г.

АКТ

о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности

1. **Авторы внедрения:** Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна.
2. **Источник предложения:** диссертационное исследование на тему «Фармакогностическое изучение горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.)».
3. **Название объекта внедрения:** изучение морфолого – анатомического строения травы горлюхи ястребинковой.
4. **Наименование организации, где используются результаты исследования:** ОКК ООО Фирма «Здоровье».
5. **Дата начала отсчета внедрения:** используется с января 2018 года в работе ОКК ООО Фирма «Здоровье» при морфолого – анатомическом анализе лекарственного растительного сырья.
6. **Заключение об эффективности внедрения:** Разработанный микродиагностический анализ травы горлюхи ястребинковой характеризуется простотой выполнения, позволяет провести анализ цельного сырья с выявлением всех микродиагностических признаков характерных для горлюхи ястребинковой.

Руководитель подразделения,
из которого исходит внедрение:д.ф.н., зав. каф. фармакогнозии и ботаники КГМУ
профессор

Бубенчикова В. Н.

Ответственный за внедрение:

начальник ОКК ООО Фирма «Здоровье»

Белоус Т. А.

Приложение 7



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
по качеству ООО Фирма «Здоровье»
 М.А. Смирнова

« 19 » июня 2018 г.

АКТ

о внедрении (использовании) результатов
научной и инновационной деятельности

1. **Авторы внедрения:** Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна.
2. **Источник предложения:** диссертационное исследование на тему «Фармакогностическое изучение горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.)»
3. **Название объекта внедрения:** определение суммы полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой.
4. **Наименование организации, где используются результаты исследования:** ОКК ООО Фирма «Здоровье».
5. **Дата начала отсчета внедрения:** используется с января 2018 года в работе ОКК ООО Фирма «Здоровье» при определении суммарного содержания полисахаридов в лекарственном растительном сырье.
6. **Заключение об эффективности внедрения:** данная методика позволяет определить суммарное содержание полисахаридов методом гравиметрии, при экстракции водой очищенной и осаждении спиртом этиловым. Методика валидирована по показателям линейности, воспроизводимости и правильности.

Руководитель подразделения,
из которого исходит внедрение:
д.ф.н., зав. каф. фармакогнозии и ботаники КГМУ
профессор



Бубенчикова В. Н.

Ответственный за внедрение:
начальник ОКК ООО Фирма «Здоровье»



Белоус Т. А.

Приложение 8

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
по качеству ООО Фирма «Здоровье» М.А. Смирнова

« 19 июля » 2018 г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Авторы: зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО КГМУ Министерства здравоохранения РФ, доктор фарм. наук, проф. Бубенчикова В.Н., заочный аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО КГМУ Министерства здравоохранения РФ Степнова И.В.

Объект апробации: проект ФСП «Горлюхи ястребинковой трава».

Источник информации: результаты исследования кандидатской диссертации

Где и кем проведена апробация: ОКК ООО Фирма «Здоровье».

Цель апробации: расширение сырьевой базы лекарственного растительного сырья.

Результаты апробации: ФСП «Горлюхи ястребинковой трава» составлена по требованиям, предъявляемым НД. Проведенные исследования качества травы горлюхи ястребинковой соответствуют показателям ФСП. Данный вид сырья будет включен в план развития ООО Фирма «Здоровье».

Начальник ОКК
ООО Фирма «Здоровье»



Т.А. Белоус



ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ФАРМОБОРОНА

Адрес: 141074, Королев, Московская область, ул. Гагарина 46А
Тел.: +7 495 511-01-10 | e-mail: leader@farmoborona.ru
Сайт: www.farmoborona.ru

Сертифицированная система менеджмента качества в соответствии с ГОСТ Р ИСО 9001-2011 (9001:2008)

Утверждаю

Руководитель испытательной лаборатории
ООО ИЦ «ФАРМОБОРОНА»

Бобкова С.Ю.



АКТ

об апробации результатов научной и инновационной деятельности

1. Авторы внедрения: Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна

2. Источник предложения: диссертационное исследование на тему «Фармакогностическое изучение горюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.)».

3. Название объекта внедрения: определение суммы фенольных соединений в траве горюхи ястребинковой.

4. Наименование организации, где используются результаты исследования: ООО Испытательный Центр «ФАРМОБОРОНА».

5. Дата начала отсчета внедрения: используется с января 2018 года в работе ООО Испытательный Центр «ФАРМОБОРОНА» при определении суммарного содержания фенольных соединений в лекарственном растительном сырье.

6. Заключение об эффективности внедрения: данная методика позволяет определить суммарное содержание фенольных соединений в траве горюхи ястребинковой методом спектрофотометрии, при экстракции спиртом этиловым 50% и длине волны 325 нм.

Методика валидирована по показателям линейности, воспроизводимости и правильности.

Руководитель подразделения, из которого исходит внедрение:
д.ф.н., профессор, зав. каф. фармакогнозии и ботаники КГМУ

В.Н. Бубенчикова

Ответственный за внедрение:
Заведующий аналитической лабораторией

О.А.Капитурова



ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ФАРМОБОРОНА

Адрес: 141074, Королев, Московская область, ул. Гагарина 46А
Тел.: +7 495 511-01-10 | e-mail: leader@farmoborona.ru
Сайт: www.farmoborona.ru

Сертифицированная система менеджмента качества в соответствии с ГОСТ Р ИСО 9001-2011 (9001:2008)

Утверждаю

Руководитель испытательной
лаборатории ООО ИЦ «ФАРМОБОРОНА»

Бобкова С.Ю.



«12» сентября 2018 г.

АКТ

об апробации результатов научной и инновационной деятельности

1. Авторы внедрения: Бубенчикова Валентина Николаевна, Степнова Ирина Владимировна

2. Источник предложения: диссертационное исследование на тему «Фармакогностическое изучение горюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.)».

3. Название объекта внедрения: определение суммы полисахаридов в траве горюхи ястребинковой.

4. Наименование организации, где используются результаты исследования: ООО Испытательный Центр «ФАРМОБОРОНА».

5. Дата начала отсчета внедрения: используется с января 2018 года в работе ООО Испытательный Центр «ФАРМОБОРОНА» при определении суммарного содержания полисахаридов в лекарственном растительном сырье.

6. Заключение об эффективности внедрения: данная методика позволяет определить суммарное содержание полисахаридов в траве горюхи ястребинковой методом гравиметрии, при экстракции водой очищенной и осаждении спиртом этиловым.

Методика валидирована по показателям линейности, воспроизводимости и правильности.

Руководитель подразделения, из которого исходит внедрение:
д.ф.н., профессор, зав. каф. фармакогнозии и ботаники КГМУ

В.Н. Бубенчикова

Ответственный за внедрение:
Заведующий аналитической лабораторией

О.А.Капитурова