

СТЕПНОВА ИРИНА ВЛАДИМИРОВНА

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

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва - 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
профессор

Бубенчикова Валентина Николаевна

Официальные оппоненты:

Гравель Ирина Валерьевна – доктор фармацевтических наук, профессор, Институт фармации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедры фармацевтического естествознания, профессор кафедры

Потанина Ольга Георгиевна – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов (РУДН)», Центр научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательный центр), директор

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д.13

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, ул. Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте организации: <http://sechenov.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
Д 208.040.09, доктор фармацевтических наук,
профессор

Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 ястребиновая – *Picris hieracioides* L. Горлюха ястребиновая 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 ястребиновой объясняется не только недостаточностью изучения ее химического состава, но и отсутствием документации на сырье.

В связи с этим фармакогностическое изучение горлюхи ястребиновой является актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Зарубежные исследователи в различных органах горлюхи ястребиновой 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 ястребиновой [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 моносакхаридного состава;
5. Разработать методики количественного определения маркерных групп биологически активных веществ (гидроксикоричных кислот и полисахаридов) в горлюхи 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 ястребинковую 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 горлюхи 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 горлюхе ястребинковой траве, из них 2 кумарина (скополетин, кумарин); 6 фенолокислот (галловая, салициловая, *p*-оксибензойная, сиреневая, ванилиновая, гентизиновая), 4 гидроксикоричные кислоты (кофейная, хлорогеновая, феруловая, *p*-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 горлюхи 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 горлюхи 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

спектро스코пию, 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).

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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования выбрана трава горлюхи ястребинковой, собранная в течение 2016-2018 годов на территории областей Центральной России: Курской,

Белгородской, Орловской в районах естественного произрастания в различные фазы развития растения.

Состав биологически активных веществ травы горлюхи ястребинковой исследовали с помощью общепринятых качественных реакций, различных хроматографических методов (бумажной хроматографии, тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектором (ВЭЖХ-МС), газо – жидкостной хромато-масс-спектро스코пии, спектрофотометрических методов, денситометрии).

Морфолого - анатомические исследования проводили по общепринятым методикам ГФ – XIV издания и микроскопа «Биолам С-11» с цифровой насадкой. Фотографии обрабатывали в программе Windows Adobe Photoshop 7.0.

Для фармакологического скрининга использовали настой и пектиновые вещества, полученные из травы горлюхи ястребинковой. Экспериментальные исследования на животных проводили в соответствии с установленными документами: «Об утверждении правил лабораторной практики» (МЗ РФ, приказ №267, 2003 г.), «Правилами работ с использованием экспериментальных животных», «Правилами гуманного обращения с животными» (Report of the AVMA Panel on Euthanasia JAVMA, 2001).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием ГФ XIV издания и программы «Microsoft Exel 2013».

Результаты исследования

Исследование качественного и количественного состава биологически активных веществ

В результате проведения качественных реакций и хроматографических исследований в траве горлюхи ястребинковой обнаружены сесквитерпеновые лактоны, каротиноиды, жирные кислоты, флавоноиды, фенолокислоты и гидроксикоричные кислоты, кумарины, дубильные вещества преимущественно конденсированной группы, углеводные производные, азотсодержащие соединения (аминокислоты, азотистые основания), тритерпеновые соединения, органические кислоты, минеральные элементы.

Исследованиями, проведенными методами бумажной и тонкослойной хроматографии в сравнении со стандартными и достоверными образцами в траве горлюхи ястребинковой идентифицированы каротиноиды: β -каротин; кумарины: скополетин, кумарин; гидроксикоричные кислоты: феруловая, кофейная, хлорогеновая; флавоноиды: лютеолин, цинарозид, апигенин-7-глюкозид; тритерпеновые сапонины: олеаноловая

кислота; свободные сахара (глюкоза, фруктоза); органические кислоты: аскорбиновая, янтарная, винная, лимонная.

При проведении количественного анализа травы горлюхи ястребинковой установлено содержание каротиноидов $13,03 \pm 0,57 \text{ мг\%}$, сесквитерпеновых лактонов $0,04 \pm 0,002 \%$, флавоноидов $0,61 \pm 0,02 \%$ – $1,27 \pm 0,04 \%$, дубильных веществ $4,91 \pm 0,20 \%$, азотистых оснований $0,048 \pm 0,0009 \%$, аминокислот $10,54 \text{ мг\%}$, органических кислот $4,18 \pm 0,15 \%$, аскорбиновой кислоты $0,52 \pm 0,02 \%$, тритерпеновых соединений $0,44 \pm 0,01 \%$.

В составе сырья горлюхи ястребинковой методом газо-жидкостной хроматографии идентифицировано 17 жирных кислот. Жирные кислоты представлены насыщенными и ненасыщенными, среди которых встречаются как мононенасыщенные, так и полиненасыщенные. Содержание насыщенных жирных кислот составляет 53,51%. Среди насыщенных кислот преобладают пальмитиновая (26,40%) и миристиновая (9,25%) кислоты. Содержание ненасыщенных жирных кислот составляет 46,48%, среди которых преобладают полиненасыщенные жирные кислоты (41,65%): линолевая (16,45%) и линоленовая (25,10%). Горлюху ястребинковую можно рассматривать как источник омега-3 жирных кислот. Мононенасыщенные жирные кислоты представлены олеиновой (3,70%) и пальмитолеиновой (1,22%) кислотами.

Впервые методом газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии изучены органические кислоты. Органические кислоты представлены 12 соединениями, среди которых преобладают левоулиновая ($1197,29 \pm 23,50 \text{ мг/кг}$), лимонная ($1382,90 \pm 25,21 \text{ мг/кг}$) и яблочная ($1141,37 \pm 20,04 \text{ мг/кг}$) кислоты.

Согласно метода ВЭЖХ в траве горлюхи ястребинковой определено 16 аминокислот, из них незаменимых 7: треонин, фенилаланин, лизин, валин, изолейцин, лейцин, метионин. Содержание аминокислот соответствовало $10,54 \text{ мг\%}$.

Элементный состав определяли с помощью метода эмиссионного спектрального анализа, в траве горлюхи ястребинковой обнаружено 25 минеральных элементов. Среди макроэлементов заметно преобладает калий; среди микроэлементов отмечено высокое содержание меди, цинка, бария, марганца, стронция, железа, титана, алюминия, кремния. Установлена экологическая безопасность сырья горлюхи, содержание свинца в нем не превышало установленное ПДК для лекарственного растительного сырья.

Фенолкарбоновые кислоты изучали методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии на газожидкостном хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс-спектрометрическим детектором. Установлено наличие 7 фенолкарбоновых кислот. Содержание их колеблется от $10,53 \pm 0,24 \text{ мг/кг}$ до $538,26 \pm 9,99 \text{ мг/кг}$. Среди

фенолкарбоновых кислот доминируют п-кумаровая ($538,26 \pm 9,99$ мг/кг), феруловая ($120,98 \pm 3,35$ мг/кг), ванилиновая ($154,68 \pm 3,19$).

Далее фенольные соединения изучали методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс спектрометрии. Для анализа использовали водно – спиртовые извлечения, этилацетатные, хлороформные фракции, полученные из травы горлюхи ястребинковой. При проведении расшифровки ВЭЖХ-МС хроматограмм и установлении предполагаемой структуры основными критериями выступали: время удерживания веществ, сравнение УФ- и масс-спектров полученных пиков со стандартными образцами веществ и данными литературы (рисунки 1,2). В результате в траве горлюхи ястребинковой подтверждено наличие 8 веществ, идентифицированных ранее хроматографическими методами: кумаринов – скополетина, кумарина, гидроксикоричных кислот: феруловой, кофейной, хлорогеновой; флавоноидов: лютеолина, цинарозида (лютеолин-7-O- β -D-глюкозида), апигенин-7-O- β -D-глюкозида.

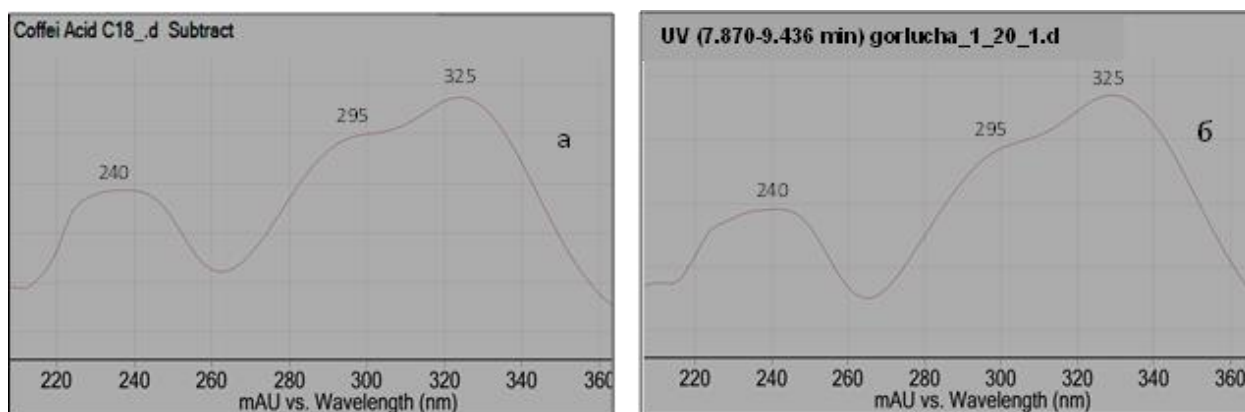


Рисунок-1а - УФ – спектр стандартного образца кофейной кислоты (Dr. Ehrenstorfer GmbH); б - УФ – спектр идентифицируемого соединения водно-спиртового извлечения горлюхи ястребинковой со временем удерживания $7,87 \div 9,44$

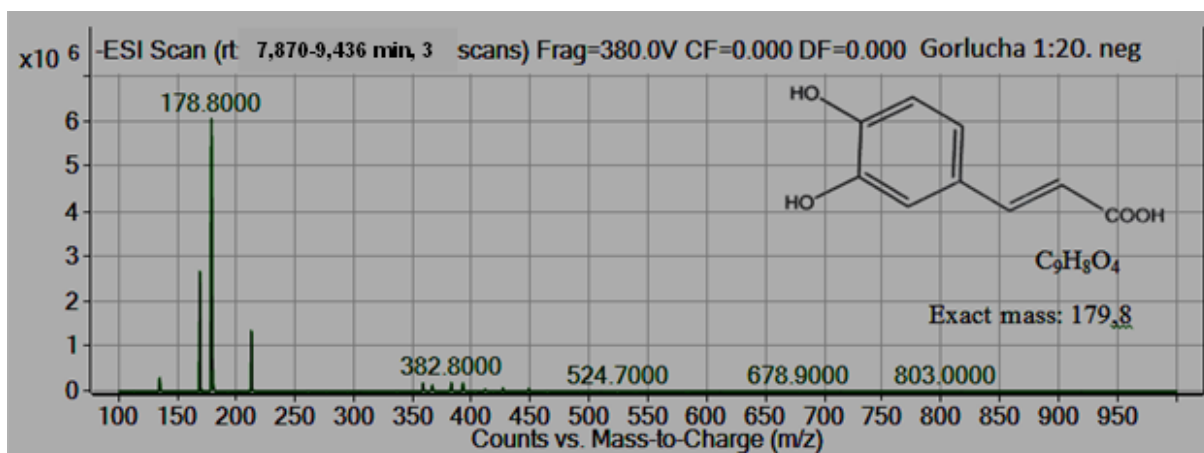


Рисунок-1в – Масс-спектр идентифицируемого соединения водно-спиртового извлечения горлюхи ястребинковой со временем удерживания $7,87 \div 9,44$ в режиме ХИ АPCI. Neg. Scan

Кроме того, в траве горюхи ястребинковой с максимальной достоверностью идентифицированы галловая и п-кумаровая кислоты; флавоноиды: кверцетрин (кверцетин-7-O- β -D-глюкозид), апигенин-4'-O- β -D-глюкозид.

Среди гидроксикоричных кислот преобладают кофейная ($0,28 \pm 0,0114\%$) и феруловая ($0,250 \pm 0,010028\%$).

Флавоноидные соединения травы горюхи 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-O- β -D-глюкозид), среди гликозидов апигенина – апигенин- 4'-O- β -D-глюкозид и апигенин –7-O- β -D-глюкозид (космоссин).

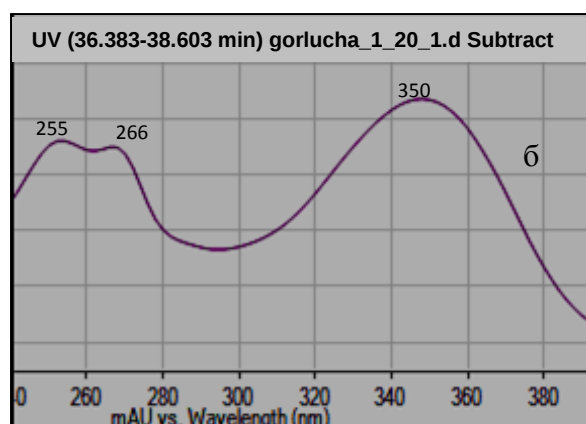
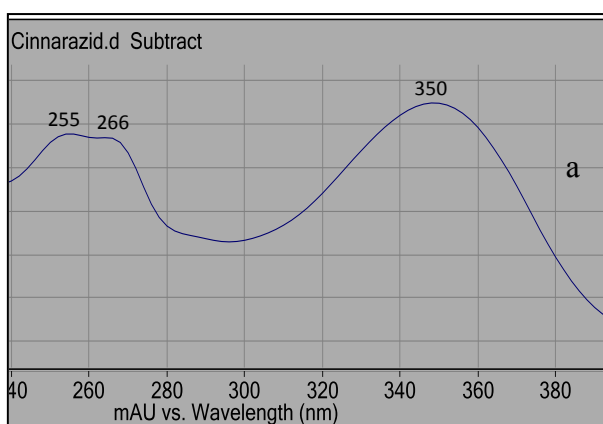


Рисунок 2а – УФ – спектр стандартного образца цинарозида («Фитопанацея»); 2б - УФ – спектр идентифицируемого соединения водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой со временем удерживания 36,38-38,60.

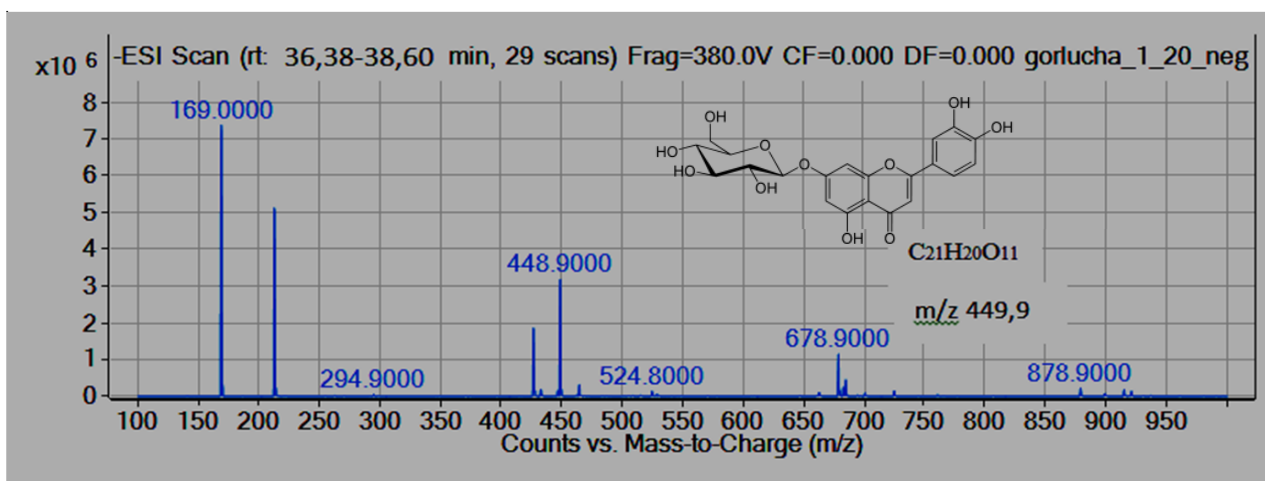


Рисунок-2в - Масс-спектр идентифицируемого соединения водно-спиртового извлечения горюхи ястребинковой со временем удерживания 36,38-38,60 в режиме ХИ АPCI Neg. Scan.

К флавонолам отнесено 1 соединение, представленное кверцимеритрином. Среди флавоноидов преобладают лютеолин ($2,37 \pm 0,0971$ мг/г) и цинарозид ($0,28 \pm 0,01000$ мг/г). Флавонол кверцимеритрин содержится в минорных количествах.

Для выделения полисахаридов из травы горлюхи ястребинковой использовали фракционирование их различными растворителями: водой очищенной, смесью растворов кислоты щавелевой и аммония оксалата, 10% раствором натрия гидроксида. В результате выделены фракции: водорастворимый полисахаридный комплекс – $10,20 \pm 0,22\%$, пектиновые вещества – $8,26 \pm 0,23\%$, гемицеллюлоза А – $25,97\%$, гемицеллюлоза Б – $6,84 \pm 0,25\%$. Исследование состава полисахаридных комплексов проводили после кислотного гидролиза кислотой серной 2М методом бумажной хроматографии, количественное содержание их определяли денситометрически после хроматографирования гидролизатов в тонких слоях сорбента в системе растворителей: н-бутанол-кислота уксусная-вода очищенная (3:1:1) (таблица 1).

Таблица 1 – Состав моносахаридов в полисахаридных комплексах травы горлюхи ястребинковой

Полисахаридные фракции	Содержание фракции, %	Состав и содержание моносахаридов	
		наименование	содержание, %
Водорастворимый полисахаридный комплекс	$10,20 \pm 0,22$	фруктоза	$11,80 \pm 0,53$
		галактоза	$9,40 \pm 0,40$
		ксилоза	$2,30 \pm 0,10$
		рамноза	$0,90 \pm 0,04$
		глюкуроновая кислота	$3,60 \pm 0,14$
Пектиновые вещества	$8,26 \pm 0,23$	арабиноза	$1,90 \pm 0,08$
		галактоза	$1,30 \pm 0,06$
		ксилоза	$0,30 \pm 0,001$
		рамноза	$0,20 \pm 0,004$
		галактуроновая кислота	$89,70 \pm 3,98$
Гемицеллюлоза А	$25,97 \pm 0,54$	галактоза	$1,90 \pm 0,08$
		глюкоза	$2,30 \pm 0,10$
		ксилоза	$8,30 \pm 0,31$
		рамноза	$0,70 \pm 0,03$
Гемицеллюлоза Б	$6,84 \pm 0,25$	галактоза	$1,60 \pm 0,07$
		глюкоза	$2,10 \pm 0,09$
		ксилоза	$7,60 \pm 0,29$
		рамноза	$0,90 \pm 0,04$

Данные результаты свидетельствуют о том, что трава горлюхи ястребинковой может использоваться в качестве источника водорастворимого полисахаридного комплекса и пектиновых веществ.

Разработка методик количественного определения гидрохикоричных кислот и полисахаридов

Предыдущими исследованиями установлено, что действующими веществами травы горлюхи ястребинковой являются фенольные соединения, среди которых преобладают гидрохикоричные кислоты и полисахариды. В связи с чем, стандартизация сырья проведена по двум группам веществ: гидрохикоричным кислотам и полисахаридам. Для количественного определения суммы гидрохикоричных кислот изучена возможность использования спектрофотометрической методики. При изучении УФ-спектров водно-спиртовых извлечений из сырья горлюхи ястребинковой установлено, что максимум поглощения наблюдается при длине волны 325 нм, аналогичный максимум поглощения имеется и у кофейной кислоты. Расчет содержания суммы гидрохикоричных кислот вели с использованием удельного показателя поглощения кислоты кофейной в спирте этиловом 50%, определенным в области максимума поглощения (325 нм) и равным 782. При разработке методики спектрофотометрического определения суммы гидрохикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой подобраны оптимальные условия проведения экстракции: оптимальный растворитель, извлекающий максимальное количество гидрохикоричных кислот - спирт этиловый 50%, степень измельчения сырья - 1 мм, 2 мм, экстракция до наступления равновесия, время экстракции 45 мин. Разработанная нами методика была валидирована по показателям: линейность (коэффициент корреляции $R_2=0,999186$, $y=3,287x-0,002$), правильность (при добавлении стандартного образца кофейной кислоты отсутствовала систематическая ошибка), повторяемость ($E_{отн}=5,01\%$), воспроизводимость (RSD не превышает 9,58%).

Разработанная методика была использована для анализа сырья горлюхи ястребинковой, заготовленной в различных областях центральной России и в различные годы. Содержание суммы гидрохикоричных кислот в исследуемых образцах травы горлюхи колебалось от $2,29\pm 0,11\%$ до $3,81\pm 0,15\%$, основанием для чего послужило установление нормы содержания гидрохикоричных кислот не менее 2,0%.

Количественное определение водорастворимых полисахаридов проводили гравиметрическим методом, в основе которого лежит экстрагирование суммы полисахаридов из сырья горлюхи горячей водой с дальнейшим их осаждением спиртом этиловым 96%. Экспериментальным путем подобраны оптимальные условия экстракции и

осаждения полисахаридов: содержание суммы полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой колеблется от $7,81 \pm 0,29\%$ до $12,41 \pm 0,38\%$, установлена норма содержания полисахаридов не менее 7%.

Установление сроков заготовки сырья

Установление сроков заготовки сырья проводили по изучению закономерности накопления гидроксикоричных кислот и полисахаридов по фазам вегетации растения. Результаты проведенного исследования показали, что максимальное количество гидроксикоричных кислот и полисахаридов накапливается в фазу цветения (таблица 2) что позволило определить данную фазу как фазу заготовки сырья горлюхи ястребинковой.

Таблица 2 – Содержание суммы гидроксикоричных кислот и полисахаридов в траве горлюхе ястребинковой в зависимости от фаз вегетации

Место сбора сырья	Фаза развития	Метрологическая характеристика				
		X ср, %	S ²	S	Δx	Eотн,%
Содержание гидроксикоричных кислот						
Курская область, Курский р-н, 2016	Фаза бутонизации	1,81	0,00073	0,0270	0,07	4,16
	Фаза цветения	2,45	0,00077	0,0277	0,08	3,27
	Фаза плодоношения	2,08	0,00133	0,03647	0,10	4,81
	Содержание полисахаридов					
	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

Морфолого-анатомические исследования

Для установления характеристик подлинности проведен макроскопический анализ с выявлением морфологических диагностических признаков сырья: смесь цельных или частично измельченных округло-ребристых стеблей с листьями и цветками, могут встречаться незрелые плоды. Стебли опушены вильчатыми и якоревидными волосками. Листья продолговато-эллиптические, зубчатые или цельнокрайние, длинночерешковые или сидячие. Цветки язычковые, собраны в корзинки. Корзинки многоцветковые, на верхушках стеблей и ветвей в общем щитковидно-метельчатом соцветии. Отгиб венчика в 2-3 раза длиннее его трубки. Обертки корзинок колокольчатые; листочки оберток линейно-ланцетные, расположены в три ряда, опушенные. Цвет стеблей, листьев светло-зеленый, иногда зеленый, цветков – желтый. Запах травянистый, вкус водного извлечения горький.

При проведении микроскопического исследования изучены микродиагностические признаки сырья (стебля, листа, язычкового цветка, листочка обертки). Установлено что, стебель на поперечном сечении имеет округло-ребристую форму. Клетки эпидермиса стебля прямостенные, прозенхимной формы с прямыми или со скошенными концами. Эпидермис стебля опушен простыми тонкостенными многоклеточными волосками, имеющими на верхушке два якоревидных ключка (якоревидные волоски).

Клетки верхнего эпидермиса листа прямостенные или слегка извилистостенные, клетки нижнего эпидермиса сильно извилистостенные. Устьица аномоцитного типа, располагаются как на нижнем, так и на верхнем эпидермисе. Эпидермис листа опушен простыми, дву-, многорядными многоклеточными волосками на верхушке с двумя якоревидными крючками или же с двумя остроконечными клетками. Вдоль жилок листа отмечено наличие млечников.

Клетки эпидермиса листочков обертки в основании прозенхимной формы, прямостенные, далее по длине клетки эпидермиса слегка извилистостенные с сосочковидными выростами. Эпидермис листочков обертки опушен: дву- или многорядными простыми волосками на верхушке с двумя якоревидными крючками или с двумя остроконечными клетками, одноклеточными остроконечными толстостенными простыми волосками, тонкостенными длинными многоклеточными волосками, часто со спадающимися клеточными стенками.

Клетки эпидермиса нижней части трубки венчика прозенхимной формы с простыми утолщенными клеточными стенками с хорошо заметной продольной морщинистостью кутикулы. 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. Завязь язычкового цветка опушена тонкостенными длинными простыми волосками, состоящими из одноклеточных волосков, сросшихся между собой. По эпидермису цветка встречаются пыльцевые зерна округлой формы.

Разработанные характеристики подлинности и установленные показатели содержания действующих веществ были положены в основу проекта нормативного документа «Горлюхи ястребинковой трава».

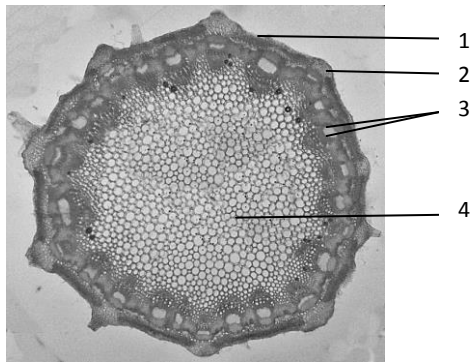


Рисунок 3- Поперечный срез стебля (Увел. 40х)
1-эпидермис; 2-первичная кора;3-проводящий пучок; 4-паренхима сердцевины

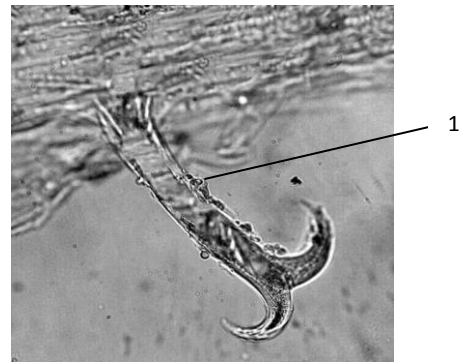


Рисунок 4- Фрагмент эпидермиса стебля (Увел. 400х)
1-двурядный многоклеточный простой волосок на верхушке с двумя якоревидными крючками (якоревидный волосок)

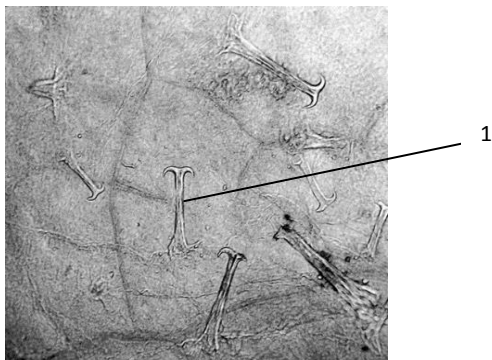


Рисунок 5- Фрагмент поверхности листа (Увел. 100х)
1-многорядный многоклеточный простой волосок с двумя якоревидными крючками

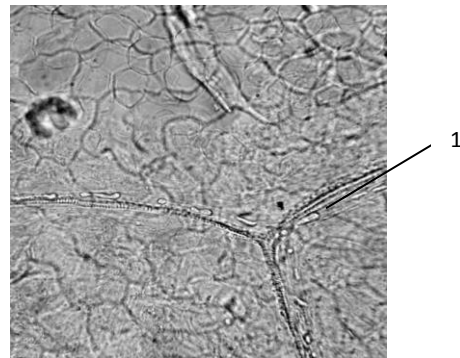


Рисунок 6- Фрагмент эпидермиса листа вдоль жилки (Увел.400х)
1-млечники



Рисунок 7- Фрагмент эпидермиса листочка обертки (Увел. 400х)
1-сосочковидные выросты эпидермиса; 2-одноклеточный остроконечный толстостенный простой волосок

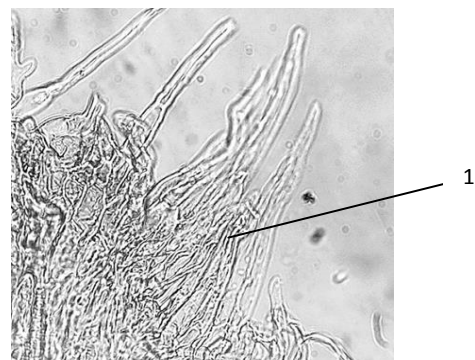


Рисунок 8- Фрагмент эпидермиса верхушки листочка обертки (Увел. 400х)
1-тонкостенные длинные многоклеточные волоски часто со спадающимися клеточными стенками

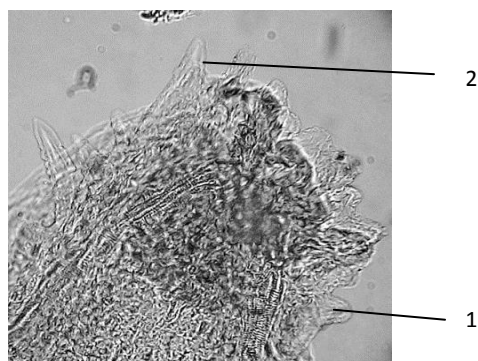


Рисунок 9- Фрагмент эпидермиса верхушки зубцов венчика язычкового цветка (Увел.280х)

1-сосочковидные выросты; 2-простой одноклеточный толстостенный волосок с бородавчатой кутикулой

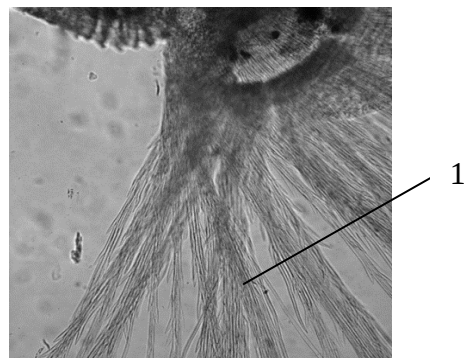


Рисунок 10- Фрагмент завязи язычкового цветка (Увел. 100х)

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

Фармакологический скрининг травы горлюхи ястребинковой

Изучение острой токсичности водного извлечения (настоя) из травы горлюхи ястребинковой показало, что по классификации Е.А. Лужникова (2000) он относится к практически нетоксичным.

У исследуемого настоя выявлена противовоспалительная активность, выражающаяся в снижении воспалительной реакции на различных стадиях процессов воспаления: экссудации, пролиферации. Так, по результатам исследования антиэкссудативной активности на модели асептического воспаления, вызванном введением формалина, установлено, что испытуемый настой угнетает развитие отека конечности на 43,17%. Исследование пролиферативной активности на модели ватной гранулемы показало, что введение настоя способствует снижению разрастания гранулематозно – фибринозной ткани у крыс на 59,19% по сравнению с контрольными животными.

Исследование антиокислительной активности проводили с помощью методики, основанной на взаимодействии между соединениями восстанавливающего характера, содержащимися в извлечениях из травы горлюхи ястребинковой и калия перманганатом. Расчет антиокислительной активности проводили в пересчете на флавоноиды: цинарозид, рутин и кверцетин, известные своими антиоксидантными свойствами. Содержание гидроокислительных кислот и флавоноидов определяли по разработанным нами спектофотометрическим методикам. Анализ полученных результатов показал, что исследуемые извлечения из травы горлюхи ястребинковой обладают антиокислительной активностью. Максимальная антиокислительная активность выявлена у извлечений спирта этилового 70%. Высокая антиокислительная активность данного извлечения

коррелирует с данными количественного определения гидроксикоричных кислот и флавоноидов.

Водно – спиртовый экстракт из надземной части растения в реакции со стабильным радикалом ДФПГ проявил высокую антирадикальную активность.

Исследование антибактериальной активности в опытах *in vitro* при культивировании тест – штаммов микроорганизмов на питательной среде показало, что антимикробную активность проявлял настой, полученный из травы горлюхи ястребинковой в отношении грибов рода *Candida* и тест культуры *Pseudomonas aeruginosa*, а также пектиновые вещества в отношении грибов рода *Candida*.

В медицине растительное сырье используют в основном в виде водных и водно-спиртовых извлечений: настоев, отваров, жидких экстрактов. Настой травы горлюхи ястребинковой готовили в соотношении 1:10 согласно ГФ XIV издания, статьи «Настои и отвары». Жидкий экстракт получали в лабораторных условиях методом перколяции, в соответствии с требованиями ГФ XIV издания, статьи «Экстракты», в качестве экстрагента использовали спирт этиловый 50%. Полученные настои и жидкий экстракт были охарактеризованы по внешнему виду, сухому остатку, pH, содержанию действующих веществ. Согласно принципа сквозной стандартизации «растительное сырье – лекарственный препарат» была проведена оценка качества жидкого экстракта по содержанию гидроксикоричных кислот, а настоя по содержанию гидроксикоричных кислот и полисахаридов. С этой целью были адаптированы методики спектрофотометрического определения суммы гидроксикоричных кислот и гравиметрического определения суммы полисахаридов, разработанные нами для сырья горлюхи ястребинковой.

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 ($10,54 \text{ мг } \%$); 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 горлюхе 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 обёртки 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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бубенчикова, В. Н. Изучение тритерпеновых соединений горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // Фармацевтическое образование, наука о практике: горизонты развития : материалы Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием, посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ. – Курск: ФГБОУ ВО КГМУ, 2016. – С. 432 - 435.
2. Бубенчикова, В. Н., **Степнова, И.В.** Изучение веществ первичного биосинтеза травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В.Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова**, Е. А. Воробьёва // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2016. – Т. 11, № 5 (65). – С. 67-70.
3. Бубенчикова, В. Н. Изучение азотсодержащих соединений горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В.Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 11. – С. 1133-1135.
4. Бубенчикова, В. Н. Изучение органических кислот травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // Молодые учёные и фармация XXI века: сборник трудов четвертой науч.-практ. конф. аспирантов и молодых учёных. – М., ВИЛАР, 2016. – С. 174-176.
5. Бубенчикова, В. Н. Изучение фенольных соединений растений семейства астровых флоры Центрального Черноземья / В. Н. Бубенчикова, В. Н. Левченко, **И.В. Степнова**, Р. А. Бубенчиков, Н. Н. Гончаров // III Гаммермановские чтения: сборник научных трудов науч.-метод. конф. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 24-25.
6. **Степнова, И. В.**, Бубенчикова, В. Н. Исследование каротиноидов травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / **И.В. Степнова**, В. Н. Бубенчикова // Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине: материалы V науч.-практ. конф. – Москва, 2017 – С. 201-203.
7. Бубенчикова, В. Н. Исследование дубильных веществ горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // XXIV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сборник материалов (тезисы докладов). – Москва, 2017. – С. 125.

8. 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 // Инновационные достижения в современной фармации и медицине: материалы международной науч.-практ. конф. – Казахстан, 2017. – Т. 2. – № 1(78). – С. 145-148.
9. Бубенчикова, В. Н. Минеральный состав травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // Ильинские чтения. Актуальные вопросы развития Российской фармации: материалы конф.– Санкт-Петербург, 2017. – С. 6-7.
10. Бубенчикова, В. Н. Фенолкарбоновые кислоты травы горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // Свободные радикалы в химии и жизни: сборник тезисов докладов II международной конф. – Минск, 2017. – С. 57-58.
11. Бубенчикова, В. Н., **Степнова, И.В.** Изучение антиоксидантной активности травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // **Традиционная медицина**. – 2017. – №3(50). – С. 33-35.
12. Бубенчикова, В.Н. Стандартизация сырья горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова**, М. С. Шкабунова // Ильинские чтения. Актуальные вопросы развития Российской фармации: материалы конф.– Санкт-Петербург, 2017. – С. 8-10.
13. Бубенчикова, В. Н., **Степнова, И.В.** Жирнокислотный и минеральный состав травы горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // **Химия растительного сырья**. –2018. – № 1. – С. 113-119.
14. Бубенчикова, В. Н., **Степнова, И.В.** Изучение морфолого-анатомического строения горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Кондратова, **И. . Степнова** // **Фармация**. – 2018. – Т. 67. – № 2. – С. 31-35.
15. Бубенчикова, В. Н., **Степнова, И.В.** Горлюха ястребинковая – перспективный источник биологически активных веществ / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // **Фармация и Фармакология**. – 2018. – № 1. – С. 33-46.
16. Бубенчикова, В. Н. Флавоноиды горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.) / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова**, М. С. Шкабунова // XXV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сборник материалов (тезисы докладов). – Москва, 2018. – С. 61.
17. Бубенчикова, В. Н. Исследование фенольных соединений горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // Фенольные соединения: свойства,

активность, инновации: сборник научных статей по материалам X Междунар. симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». Москва, 2018 . – С. 246-250.

18. Бубенчикова, В. Н., **Степнова, И.В.** Разработка методики количественного определения полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова**, М. С. Шкабунова // **Фармация**. – 2018. - № 5. – с.19 – 23.

19. Бубенчикова, В.Н. Валидация методики количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в траве горлюхи ястребинковой / В.Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова** // Перспективы лекарственного растениеводства: сборник трудов междунар. науч. конф. – М., ВИЛАР, 2018. – С. 336-342.

20. Бубенчикова, В.Н., **Степнова, И.В.** Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности травы горлюхи ястребинковой / В.Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова**, Н.В. Попова // **Традиционная медицина**. – 2018. – №3(54). – С. 25-28.

21. Бубенчикова, В.Н. Вопросы стандартизации сырья горлюхи ястребинковой / В. Н. Бубенчикова, **И. В. Степнова** // IV Гаммермановские чтения: сборник научных трудов науч.-метод. конф. – Санкт-Петербург, 2018. – С.45-48.

22. Бубенчикова, В.Н. Исследование гидроксикоричных кислот горлюхи ястребинковой / В.Н. Бубенчикова, **И.В. Степнова**, Е.В. Гришина // XXVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сборник материалов (тезисы докладов). – Москва, 2019. – С. 101.

23. Bubenchikova, V.N., **Stepnova, I.V.** The composition of biologically active substances and pharmacological activity of gorlyuha hawk (*Picris hieracioides* L.) / V.N. Bubenchikova, **I.V. Stepnova** // **International journal of pharmaceutical research**. – 2019. – Vol. 11, Issue 2. – P. 279-297.