

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

На правах рукописи

КАЗЕЕВА АЛИНА РАМИЛЕВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КРОВОХЛЕБКИ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*SANGUISORBA OFFICINALIS* L.) И
ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
доктор фармацевтических наук,
профессор К.А. Пупыкина

УФА 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Ботаническая характеристика кровохлебки лекарственной	16
1.2. Ареал произрастания кровохлебки лекарственной.	19
Распространение растения на территории Республики Башкортостан.	
1.3. Основные районы заготовки сырья кровохлебки лекарственной	24
1.4. Химический состав кровохлебки лекарственной	26
1.5. Стандартизация сырья кровохлебки лекарственной	27
1.6. Современные сведения о фармакологической активности кровохлебки лекарственной и применении ее в научной, народной медицине	30
Выводы к главе 1	35
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Объекты исследования	36
2.2. Методы исследования	36
2.2.1. Методы ресурсоведческих исследований	36
2.2.2. Методы определения подлинности и доброкачественности	38
2.2.3. Методы качественного и количественного анализа БАВ	39
2.2.4. Методы определения фармакологической активности	47
2.2.5. Статистическая обработка результатов исследований	48
ГЛАВА 3. РЕСУРСОВЕДЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (<i>SANGUISORBA OFFICINALIS</i> L.)	49
3.1. Определение запасов сырья кровохлебки лекарственной на территории Республики Башкортостан	49
3.2. Морфолого-анатомическое исследование травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной	54

Выводы к главе 2	68
ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНЫХ И ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (SANGUISORBA OFFICINALIS L.)	70
4.1. Определение товароведческих показателей	70
4.2. Качественный анализ травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной	74
4.2.1. Обнаружение БАВ с помощью качественных реакций	76
4.2.2. Хроматографический анализ и спектральные исследования	79
4.2.3. Изучение компонентного состава жирорастворимого комплекса	94
4.3. Сравнительный анализ количественного содержания биологически активных веществ в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной	98
4.4. Разработка методики количественного определения флавоноидов в кровохлебке лекарственной	116
4.5. Обоснование выбора методики количественного определения дубильных веществ в кровохлебке лекарственной	130
4.6. Изучение динамики накопления флавоноидов в траве и дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной	143
4.7. Стандартизация сырья кровохлебки лекарственной	145
Выводы к главе 4	148
ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРАВЫ, КОРНЕВИЩ И КОРНЕЙ КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (SANGUISORBA OFFICINALIS L.)	151
5.1. Определение противовоспалительной активности	151
5.2. Определение антиоксидантной активности	152
5.3. Определение антибактериальной активности	155

5.4. Влияние кровохлебки лекарственной на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность животных	162
Выводы к главе 6	169
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	171
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	175
ПРИЛОЖЕНИЯ	191
Приложение №1. Акт внедрения результатов диссертационной работы в работу испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения г. Москвы»	192
Приложение №2. Акт внедрения результатов диссертационной работы в работу лаборатории ГБУЗ «Центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»	193
Приложение №3. Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебную работу кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России	194
Приложение №4. Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебную работу кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России	195
Приложение №5. ИК-спектры выделенных из кровохлебки веществ	196
Приложение №6. Письмо из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» о принятии к рассмотрению проекта ФС кровохлебки лекарственной	197
Приложение №7. Титульный лист проекта ФС «Кровохлебки корневища и корни»	198
Приложение №8. Титульный лист проекта ФС «Кровохлебки трава»	199
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	204

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последнее время отмечается увеличение спроса на лекарственные препараты растительного происхождения, что связано со стремлением все большего количества людей быть ближе к природе, избежать отрицательного воздействия синтетических препаратов, увеличением доли хронических заболеваний в структуре заболеваемости [66]. Расширение исследований по изысканию источников для получения новых эффективных и безопасных лекарственных растительных средств является актуальной задачей медицины.

Одним из путей увеличения количества отечественных препаратов растительного происхождения является широкое изучение действия уже известных фармакопейных лекарственных растений, часто используемых по ограниченному числу показаний, которые содержат сложный комплекс биологически активных веществ с разносторонним фармакологическим действием. Дополнительные исследования по изучению химического состава, биологической активности таких растений представляют интерес, так как иногда позволяют выявить новый аспект их использования в медицине. В этом плане интересна для изучения кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis* L.), которая известна давно и используется в основном в качестве вяжущего, кровоостанавливающего и противовоспалительного средства при желудочно-кишечных заболеваниях. Решение вопросов более широкого использования сырья данного растения сдерживается недостаточной изученностью химического состава и отсутствием современных подходов оценки качества лекарственного растительного сырья. Действующая в настоящий момент в России нормативная документация [130] на корневища и корни кровохлебки устарела и требует переработки, в соответствии с современными требованиями [35,130]. Изучение возможности использования не только корневищ и корней кровохлебки лекарственной, но и травы, может способствовать решению проблемы комплексной и безотходной переработки данного растения в

рамках ресурсосберегающих технологий. В связи с этим, проведение комплекса фармакогностических исследований, включающих ресурсоведческое, морфолого-анатомическое, фитохимическое и фармакологическое изучение кровохлебки лекарственной, позволит обосновать и расширить возможности ее использования в медицине.

Таким образом, более углубленное изучение химического состава данного растения, решение вопросов стандартизации и обоснование использования кровохлебки лекарственной в научной медицине является актуальной задачей.

Степень разработанности темы. В настоящее время описаны методики стандартизации корневищ и корней кровохлебки лекарственной в отечественных фармакопеях с использованием титриметрического метода, в пересчете на танин, а в зарубежных - метода тонкослойной хроматографии и количественного определения дубильных веществ спектрофотометрическим методом, после осаждения дубильных веществ гольевым порошком, в пересчете на пирогаллол [36, 38, 146, 148]. В литературе приведены сведения о химическом составе корневищ и корней кровохлебки лекарственной и ограниченные данные по химическому составу травы, не проводилось изучение ее морфолого-анатомических признаков и подробного фитохимического исследования [20]. Вопросам изучения фармакологической активности корневищ и корней кровохлебки лекарственной посвящены исследования отечественных и зарубежных ученых, подтверждающие наличие противовоспалительной, вяжущей, кровоостанавливающей, выраженной антибактериальной активности, установлено антигипоксическое действие, но недостаточно изучены фармакологические свойства травы кровохлебки [5, 97, 139, 156]. Зарубежными учеными для корневищ и корней кровохлебки лекарственной установлена противовирусная, высокая антиоксидантная и иммуномодулирующая активности, а также антипролиферативная активность в отношении ряда раковых клеток. Имеются данные, что экстракт корневищ и корней кровохлебки

лекарственной защищает кожные покровы от ультрафиолетового облучения [150, 151, 154, 163].

В настоящее время в Российской Федерации диагностика и стандартизация корневищ и корней кровохлебки лекарственной проводится по фармакопейной статье 42-1082-76, не изучена трава кровохлебки и не разработаны для нее методы оценки качества сырья. В действующей фармакопейной статье на корневища и корни кровохлебки отсутствует ряд показателей регламентирующих подлинность сырья: УФ-спектральная характеристика, хроматография. Количественное определение дубильных веществ предлагается проводить методом перманганатометрии, который имеет ряд недостатков. В литературе описаны и другие методы количественного определения полифенольных соединений в растительном сырье, а именно, в пересчете на танин, галловую кислоту, пирогаллол, которые также имеют определенные недостатки [44, 47, 113]. Поэтому целесообразно использовать возможности других более современных методов анализа при разработке дополнений и изменений существующей нормативной документации на сырье кровохлебки лекарственной и разработать объективные методы оценки его качества, так как данное сырье перспективно для создания новых современных препаратов. Это и обусловило выбор темы диссертационного исследования и определило его цель.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является фармакогностическое изучение надземных и подземных органов кровохлебки лекарственной и обоснование перспективы расширения ее использования в медицине.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) провести ресурсную оценку запасов сырья кровохлебки лекарственной во флоре Республики Башкортостан;

2) провести сравнительное морфолого-анатомическое, фитохимическое исследование травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, произрастающей на территории Республики Башкортостан;

3) изучить качественный состав и количественное содержание биологически активных веществ надземной и подземной частей кровохлебки лекарственной;

4) разработать методики количественного определения основных групп биологически активных веществ в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной и определить нормы их содержания;

5) изучить динамику накопления флавоноидов в траве кровохлебки лекарственной и дубильных веществ в корневищах и корнях в зависимости от фазы вегетации растения;

6) определить критерии подлинности и показатели качества сырья;

7) провести сравнительную оценку фармакологической активности водных и спиртовых извлечений из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной;

8) разработать проекты фармакопейных статей на лекарственное растительное сырье кровохлебки лекарственной, гармонизированных в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к нормативной документации.

Научная новизна. Впервые проведено морфолого-анатомическое изучение травы кровохлебки лекарственной и уточнены анатомические признаки корневищ и корней кровохлебки. С учетом выявленных диагностически значимых признаков сырья кровохлебки разработаны показатели качества для определения подлинности травы кровохлебки лекарственной и стандартизации корневищ и корней.

С использованием современных физико-химических методов анализа (ВЭЖХ, хроматомасс-спектрометрия, УФ-, ИК- спектроскопия, спектрофотометрия) изучен состав биологически активных веществ травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной. Методом ВЭЖХ

подтверждено присутствие веществ фенольной природы: в траве – флавоноиды (рутин, лютеолин, лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, кемпферол, кверцитрин, катехин), фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты (галловая, эпигаллокатехингаллат, хлорогеновая, кофейная, феруловая), кумарин; в корневищах и корнях – флавоноиды (лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, гиперозид, катехин), фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты (галловая, эпигаллокатехингаллат, хлорогеновая и кофейная), кумарин. Такие флавоноиды как лютеолин, лютеолин-7-глюкозид в траве, корневищах и корнях обнаружены впервые. Методом препаративной хроматографии выделены индивидуальные вещества (рутин, лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, лютеолин, катехин, гиперозид, галловая, кофейная, хлорогеновая, феруловая кислоты), структура которых подтверждена сравнением спектральных характеристик (УФ-, ИК-) со стандартными образцами. Методом хроматомасс-спектрометрии изучен компонентный состав жирорастворимого комплекса травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной и установлено присутствие 13 веществ в траве, а в корневищах и корнях 15 соединений, относящихся к высомолекулярным жирным кислотам и их производным, фитостеринам и соединениям терпеновой природы.

Разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии и спектрофотометрического определения дубильных веществ после их осаждения раствором желатина в траве, корневищах и корнях кровохлебки и установлены нормы их содержания. Проведена валидационная оценка методик количественного определения флавоноидов и дубильных веществ по критериям правильность, прецизионность, линейность и специфичность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретические и экспериментальные исследования биологических свойств показали целесообразность дальнейшего фармакологического исследования травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной. Проведена сравнительная

оценка антиоксидантных, противовоспалительных, антибактериальных, нейропротективных свойств травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной.

Разработанные методики качественного анализа методом хроматографии в тонком слое сорбента, количественного определения содержания суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии и спектрофотометрического определения дубильных веществ после их осаждения раствором желатина в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной внедрены в учебный процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, ГБУЗ РБ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств», Испытательная лаборатория ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы».

На основе проведенных исследований разработаны проекты фармакопейных статей «Кровохлебки корневища и корни», «Кровохлебки трава», которые приняты к рассмотрению в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» с целью включения и дополнения к Государственной Фармакопее Российской Федерации XIII издания.

Методология и методы исследований. Методология диссертационного исследования основана на изучении отечественных и зарубежных источников литературы по фармакогностическому исследованию кровохлебки лекарственной, оценке степени изученности и актуальности темы. Согласно цели и задач исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами исследования служили образцы травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, собранные на территории Республики Башкортостан, в разных условиях произрастания и разные фазы вегетации

растения. В процессе фармакогностических исследований использовали комплекс мероприятий: ресурсоведческие методы, макро- и микроскопические методы, физико-химические методы (газожидкостная хроматография, УФ-, ИК-, хроматомасс-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия, титриметрия, гравиметрия, рентгенофлюоресцентный анализ, тонкослойная и бумажная хроматография), а также фармакологические методы. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий

Положения, выносимые на защиту:

- результаты ресурсоведческих исследований запасов сырья кровохлебки лекарственной в Республике Башкортостан;
- результаты морфолого-анатомического и сравнительного фитохимического исследования травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной;
- результаты изучения качественного состава и количественного содержания биологически активных веществ надземной и подземной частей кровохлебки лекарственной;
- результаты разработки методик количественного определения основных групп биологически активных веществ в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной и норм их содержания;
- результаты изучения динамики накопления флавоноидов в траве кровохлебки лекарственной и дубильных веществ в корневищах и корнях в зависимости от фазы вегетации растения;
- результаты определения показателей подлинности и качества сырья кровохлебки лекарственной;
- результаты сравнительной оценки фармакологической активности водных и спиртовых извлечений из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной;

- результаты разработки нормативной документации на сырье кровохлебки лекарственной.

Степень достоверности. Степень достоверности представленных результатов исследований определяется достаточными по своему объему данными и количеству материала, использованием современных методов исследования. Для обработки результатов исследований использованы методы статистической обработки полученных результатов, которые проводили стандартными методами вариационной статистики с применением программ «Excel 7.0» (MS Office, USA), «Statistica 6.0» (StatSoft, USA). Достоверность различий между выборками определялась по параметрическому критерию Стьюдента и непараметрическому критерию Манна – Уитни, критерию Фишера. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для разработанных методик стандартизации растительных средств проведена валидация. Выводы, сформулированные в диссертации, аргументированы и логически вытекают из результатов выполненных фармакогностических и фармакологических исследований.

Апробация результатов. Основные результаты исследований доложены и обсуждены на: Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики» (Владикавказ, 2013); I Международной научной конференции «Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные исследования» (Новосибирск, 2013); V Всероссийском семинаре молодых ученых с международным участием «Геномные и протеоминые технологии при создании лекарственных средств» (Волгоград, 2014); 74-й Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Современные аспекты медицины и фармации - 2014» (Запорожье, 2014); II-й научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2014); III международной

научно-практической конференции «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям» (Полтава, 2014); Международной научно-практической конференции "Фармацевтическое образование, наука и производство - ориентир на стратегию "Казахстан-2020" (Республика Казахстан, 2014); I Международной научн.-практической конференции «Лекарственные растения: биоразнообразие, технологии, применение» (Гродно, 2014); 69-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2015» (Минск, 2015); II Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (Алма-Ата, 2015); XII международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (Москва, 2015); 82-й Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2015); III научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века» ВИЛАР (Москва, 2015); XXIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2016); 79-й, 80-й, 81-й Всероссийских научных конференциях студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» БГМУ (Уфа, 2013-2016).

Внедрение результатов исследования. Полученные в результате диссертационного исследования данные используются в учебном процессе кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, внедрены в работу испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы», ГБУЗ РБ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств».

Личный вклад автора. Автор данной работы лично участвовал в постановке цели и задачей исследования, проведении экспериментальных исследований, интерпретации, анализе и обобщении полученных результатов, а также в подготовке публикаций по теме диссертации.

Связь задач исследования с проблемами фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России по проблеме «Изыскание и изучение новых лекарственных средств». Номер госрегистрации 01200507996.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02.- фармацевтическая химия, фармакогнозия. Работа представляет итог исследований, выполненный автором в творческом сотрудничестве с кафедрами фармакологии № 2, фундаментальной и прикладной микробиологии, лабораторией ЦНИЛ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, ФГБУ РАН «Институт органической химии УНЦ РАН».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 работ, из них 7 в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень рецензируемых научных изданий, оформлен патент.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 204 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, трех экспериментальных глав, общих выводов, списка литературы и приложений. В работе содержатся 46 таблиц, 89 рисунков. Список цитируемой литературы включает 167 библиографических источников, из которых 24 на иностранных языках.

Во введении сформулированы актуальность исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, практическая значимость работы, положения, выдвигаемые на защиту.

Глава 1 посвящена обзору отечественной и зарубежной литературы по исследованию кровохлебки лекарственной. Изложены данные по ботанической характеристике, ареалу обитания в Российской Федерации и на территории Республики Башкортостан, химическому составу, обзору современного состояния изученности кровохлебки лекарственной по применению в научной и народной медицине.

В главе 2 описаны материалы и методы исследования кровохлебки лекарственной.

В главе 3 приводятся результаты ресурсоведческих и морфолого-анатомических исследований кровохлебки лекарственной.

В главе 4 представлены результаты сравнительного фитохимического изучения надземных и подземных органов кровохлебки лекарственной, разработки методик количественного определения содержания флавоноидов и дубильных веществ, изучения динамики накопления флавоноидов в траве и дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки и стандартизации сырья кровохлебки лекарственной.

Глава 5 посвящена сравнительной оценке фармакологической активности водных и спиртовых извлечений из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной.

В приложении представлены основные документы, подтверждающие внедрение результатов диссертационной работы и некоторые иллюстрационные материалы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ботаническая характеристика кровохлебки лекарственной



Рисунок 1. Внешний вид кровохлебки лекарственной

Кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis* L.) относится к семейству розоцветных (Rosaceae, рис.1). Характеризуя систематическое положение растения необходимо отметить, что кровохлебка лекарственная относится к отделу покрытосеменных – Magnoliophyta; класс двудольные – Dicotyledones; подкласс розиды – Rosidae; порядок розовые (розоцветные) – Rosales.

Семейство розоцветных очень большое и содержит около 100 родов и 3000 видов, которые распространены почти во всех областях земного шара, от субтропиков до Арктики, причем основная их часть встречается в умеренной зоне северного полушария (рис. 2). Представители семейства встречаются в самых разнообразных растительных сообществах. Розоцветные не играют большой роли в образовании естественной древесной растительности, они принимают участие в образовании второго яруса и

подлеска в лесах и в кустарниковых зарослях. Однако это семейство необыкновенно ценно для человека. Многие виды семейства отличаются высокой декоративностью, с давних пор широко распространены в культуре, и стали основой для выведения множества сортов декоративных деревьев и кустарников, плодово-ягодных культур.

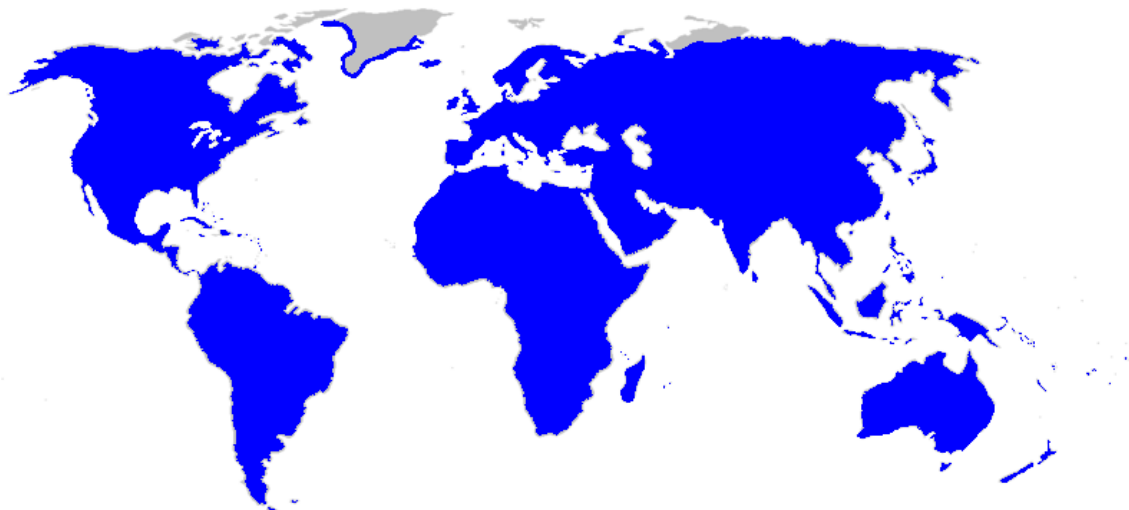


Рисунок 2. Распространение розоцветных на земном шаре.

Кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis* L.). Родовое название растения образовано от латинского *Sanguis* (кровь) и *sorbēre* (поглощать, вбирать, втягивать), что характеризует кровоостанавливающее свойство растения. Видовое определение от лат. *officinalis* (аптечный, лекарственный). Кровохлебка лекарственная получила такое название из-за своих лечебных кровоостанавливающих свойств, а также из-за сходства соцветий с пиявками насосавшимися крови. Народные названия: красноголовник, черноголовник (большинство областей РСФСР), серебряный лист, простудная (Вологодская обл.), шишечки (Горьковская обл.), луговка (Владимирская обл.), тавсисхла, челна (Азербайджанская ССР), арюнкам (Армянская ССР). В условиях Республики Башкортостан кровохлебка это многолетнее травянистое растение, высота которого 20 - 150 см, имеет толстое, горизонтальное одревесневающее корневище и длинные, тонкие, мочковатые, многочисленные корни толщиной 0,5 - 2 см и длиной до 12 см. Корни проникают на большую глубину. Стебель гладкий,

прямостоячий, одиночный, ветвистый в верхней части, ребристый, внутри полый, голый высотой 30 - 90 см. Листья непарноперистосложные, прикорневые листья на длинном черешке, крупные, с 7 - 25 листочками; стеблевые листья – сидячие. Сверху блестящие, тёмно-зелёные, иногда глянцевые, снизу тусклые, сизо-зелёные, по форме продолговато-яйцевидные, пиловидно-зубчатые. Листочки округлые или продолговато-яйцевидные, по краю городчатые или остропильчатые. Листорасположение очередное (рис.3).



Рисунок 3. Лист кровохлебки

Цветки в овальных или овально-цилиндрических головках (1,5 -3 см длиной) на длинных прямых цветоносах, темно-красные, почти черно-пурпуровые, обоеполые, актиноморфные, с 5-членным (редко 3-4-членным или более чем 5-членным) околоцветником. Чашечка из четырёх чашелистиков, опадающих при плодах, эллиптической или яйцевидной формы и в 1,5 - 2 раза длиннее и шире цветоложа. Прицветники продолговато-яйцевидные, буроватые, перепончатые, волосистые. Число тычинок, расположенных кругами, неопределенное, или в 2 - 4 раза превышает число лепестков, или редуцировано до 4 – 1. Лепестки отсутствуют. Плодолистик 1 с темно-красным бахромчато-головчатым рыльцем и с нижней завязью (рис. 4).



Рисунок 4. Соцветие кровохлебки

Плоды односемянные сухие четырёхгранные орешки длиной 3 - 3,5 мм, коричневого цвета - созревают в августе - сентябре. Цвет плодов – коричневый.

Цветет с июля до августа. Кровохлебка лекарственная размножается чаще всего семенами или вегетативно отрезками корневищ. Продолжительность жизни кровохлебки в естественных условиях до 40 лет, в посевах - 7 - 8 лет [41, 78, 81, 90].

1.2. Ареал произрастания кровохлебки лекарственной.

Распространение растения на территории Республики Башкортостан

Кровохлебка лекарственная имеет гольарктический тип ареала. Распространена в основном в северных и средних широтах, чаще всего в Западной и Восточной Сибири, на Урале и Дальнем Востоке. Значительно реже встречается в европейской части России, кроме районов крайнего северо-запада и южных сухих степей. Кроме того, встречается на Кавказе в среднем и верхнем горных поясах, в горных районах Крыма, на лугах Яйлы, и в предгорьях растет на Карпатах и в Закарпатье (рис. 5) [112].

к государственной границе РФ. Изолированные участки ареала кровохлебки лекарственной встречается на юге Средней Азии (в горах Тянь-Шаня), в Крыму и на Кавказе.

Западная часть границы ареала кровохлебки проходит вдоль Балтийского моря до Лиепай, затем перемещается к востоку, вглубь страны, и проходит через Литву, Белоруссию, Смоленскую и Московскую области к Рыбинскому водохранилищу, Вологде, Северной Двине и Архангельску, где кровохлебка встречается лишь единично, в нескольких пунктах. В Латвии, Ленинградской, Новгородской, Псковской и Калининской областях кровохлебка практически не встречается [90, 139].

На территории Республики Башкортостан кровохлебка лекарственная одно из самых распространенных растений (рис. 6) [81].

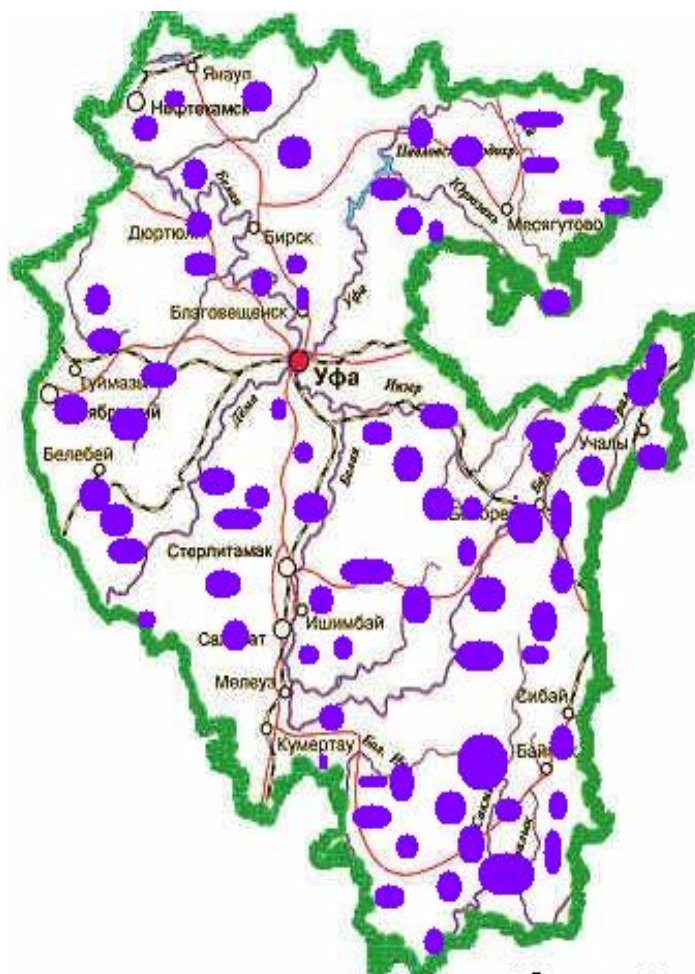


Рисунок 6. Географическое распространение кровохлебки лекарственной на территории Республики Башкортостан.

На Южном Урале кровохлебка лекарственная обладает очень широким фитоценоотическим спектром. Часто встречается кровохлебка в восточных предгорьях Южного Урала (Абзелиловский, Баймакский районы Башкортостана), обильна в горно-лесных районах Башкортостана (Белорецкий, Бурзянский, Учалинский) и Челябинской области (Златоустовский, Ашинский районы), где образует довольно плотные заросли. В горах Южного Урала кровохлебка лекарственная - самый обычный вид, где она встречается как в лесах (сосново-березовые, березовые и др.), так и на лугах. В высокогорной зоне кровохлебка произрастает в подгольцовых лугах и мелколесьях, иногда проникает в горно-тундровый пояс на вторично психрофильные луга и тундры. К югу (Зилаирское плато) доля участия кровохлебки в травостое постепенно падает. Кроме того, на Южном Урале кровохлебка также встречается в сегетальных сообществах как засоритель посевов многолетних трав [77, 79].

Очень большие заросли кровохлебки лекарственной находятся в Зауральских районах Башкортостана (Абзелиловский, Баймакский, Учалинский, Хайбуллинский). Здесь она произрастает в сосново-березовых, березовых, сосново-лиственничных лесах, лугах, осоково-травянистых болотах, остепненных лугах, на солонцеватых лугах по берегам рек Таналык, Уртазымка, Большой и Малый Кизил. Местами образует сплошные заросли. В долинах рек преобладают луга с кровохлебкой, на которых она выступает в роли доминанта, поэтому такие луга называют еще кровохлебково-злаковые, клеверо-кровохлебково-манжетковые [54, 77, 80, 114].

В Предуралье кровохлебка лекарственная является обычным видом сосновых и сосново-березовых лесов в районах Уфимского плато, Бугульминско-Белебеевской возвышенности, на Прибельской увалисто-равнинной равнине (Альшеевский, Аургазинский, Белебеевский, Давлекановский, Кармаскалинский районы) и в Месягутовской лесостепи. Часто образует заросли. Кровохлебка почти полностью избегает широколиственные леса коренных типов, но нередко встречается в

нарушенных его типах, особенно в дубово-березовых, дубово-осиновых. Доля участия кровохлебки в темнохвойных лесах очень незначительна. Интересны сообщества осоковых и осоково-травяных болот с участием кровохлебки, которые распространены главным образом в заболоченных поймах рек. Кровохлебка – обычный вид лугов различных типов, вплоть до остепненных. Луга с преобладанием кровохлебки находятся в долинах рек, где этот вид нередко доминирует [77, 79, 81].

Одним из ведущих экологических факторов, влияющих на морфологические и популяционные параметры кровохлебки лекарственной, является фактор увлажнения. Дисперсионный анализ (проведенный по трем грациям: увлажнение влажно-степное, увлажнение сухих и свежих лугов, влажные и сырые луга) показал, что наибольшее развитие (увеличение линейных размеров) вегетативных органов наблюдается в условиях увлажнения сухих и свежих лугов, в более сухих или более влажных условиях эти показатели падают. Важным климатическим фактором является сумма годовых осадков. Дисперсионный анализ, проведенный по 4 грациям количества осадков: 1) менее 400 мм; 2) 400-500 мм; 3) 500-600 мм и 4) более 600 мм показал, что достоверные различия были выявлены лишь по линейным размерам листьев, они в целом крупнее (длина розеточного листа, листовой пластинки, длина черешка и черешков листочков) в регионах с большим количеством осадков [77. 81].

Учитывая влияние почв, нужно отметить, что оптимальными условиями произрастания кровохлебки лекарственной в луговых сообществах являются почвы слабокислые, богатые, слабо- и среднегумусные почвы. В лесах произрастает на различных подтипах серых лесных почв, на лугах встречается на лугово-черноземовидных и реже на дерново-луговых, пойменных черноземовидных, типичных черноземах, выщелоченных черноземах. На лесных полянах кровохлебка лекарственная нередко произрастает на лесных и горно-лесных (Южный Урал) почвах. На остепненных лугах она чаще встречается на выщелоченных черноземах. В

редких случаях кровохлебка лекарственная обнаруживалась на болотах - на перегнойно-болотных, болотно-карбонатных, перегнойно-карбонатных почвах, а в высокогорьях - на горно-луговых субальпийских почвах [81].

1.3. Основные районы заготовки сырья кровохлебки лекарственной

Ежегодные заготовки в России в среднем составляют 3 т сухого сырья кровохлебки [112]. Промышленные заготовки сырья кровохлебки проводятся в Сибири (Томская, Новосибирская, Тюменская области, Горный Алтай, Тува, южные районы Красноярского края), на заливных лугах Оби, Чулыма, Кети, Парабели, при этом продуктивность кровохлебки лекарственной сильно варьирует – от 20 до 497 кг/га, достигая на отдельных участках 800-1000 кг/га. В Томской области запасы сырья составляют от 840 до 1212 т сырья (Асиновский р-н — 298 т, Верхнекетский — 300 т, Каргасокский — 477 т). В Туве заготовки проводятся в Каа-Хемском (13 т), Тандинском (13 т) и Эрзинском (23 т) районах (до 60 т сырья) [88]. В меньшем количестве кровохлебку заготавливают в Пермской области (0,5 т). Заготовки ведутся в Агинском и Чернышевском районах Читинской области, а также в Баргузинском, Джидинском, Кяхтинском, Селенгинском и Кабанском районах Бурятии, во многих других областях Сибири, Урала и Дальнего Востока. На лугах Хакасской автономной области средняя продуктивность кровохлебки составляет 480 кг/га (сухих корней), а в Бурятской АССР—123 — 270 кг/га [88, 139].

Промысловые заготовки кровохлебки осуществляются на Украине в Закарпатской, Львовской, Ивано-Франковской, Черновицкой, Волынской, Ровенской, Житомирской, Киевской, Черниговской, Сумской, Харьковской, северных частях Хмельницкой и Полтавской областей. На Кавказе на заливных лугах запасы сырья кровохлебки составляют 300 кг/га [139].

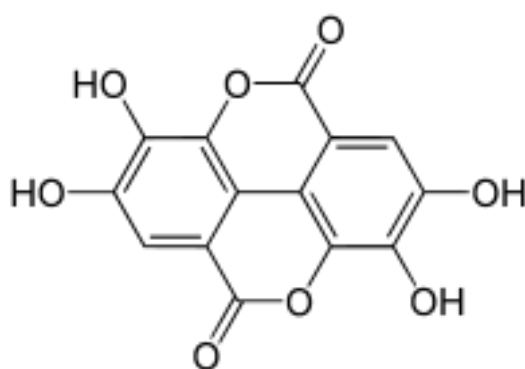
В лечебных целях используют корневища и корни растения. Их заготавливают в период плодоношения и увядания надземной части, т.е. с середины августа и до октября, но можно и в апреле, до начала вегетации растений. Корневища и корни заготавливают вручную, выкапывая специально приспособленными лопатами с желобовидными закругленными лезвиями. Необходимо учитывать, что для восстановления зарослей нужно оставлять от 30 до 50% растений (в зависимости от обилия) или 1-2 растения на 10 м². Выкопанные корневища с корнями очищают от земли, удаляют надземную часть. Потом их моют в прохладной проточной воде и в течение 2-3 дней подвяливают на солнце, а затем режут на куски длиной 15-20 см, толстые разрезают еще и вдоль и далее сушат [46, 90]. Перед тем как осуществлять процесс сушки корневищ и корней кровохлебки, их подвяливают на солнце и сушат под навесами, раскладывая тонким слоем на сетках из проволоки, ткани или бумаге и периодически перемешивая. При искусственной сушке используют тепловые сушилки при температуре 50-60°C. Выход сухого сырья 22-25 %. Высушенное сырье хранят в сухом помещении, в защищенном от света месте, оно терпкого вкуса, без запаха, снаружи темно-бурое, на изломе – желтоватое. Хранить его можно в сухих проветриваемых помещениях до 5 лет [70, 116].

Кровохлебку лекарственную успешно выращивают в ботанических садах и питомниках, в том числе в Западной Сибири, но следует учитывать, что при посеве кровохлебки желательно проводить весенний посев семенами, прошедшими стратификацию (при хранении в комнатных условиях семена сохраняют всхожесть в течение 1,5 лет). При этом, на второй год культуры масса подземных органов одного экземпляра достигает 17—27 г [84].

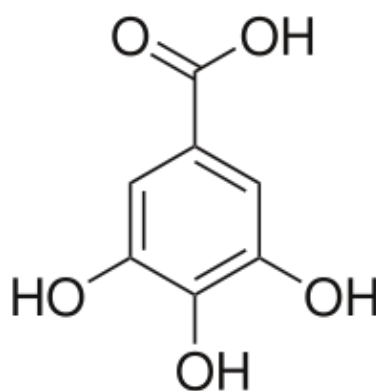
1.4. Химический состав кровохлебки лекарственной

Образование и накопление в лекарственных растениях биологически активных соединений является динамическим процессом, изменяющимся в

онтогенезе растения и зависящим от многочисленных факторов окружающей среды. Уникальной способностью кровохлебки лекарственной является способность в больших количествах накапливать соединения фенольной природы, которые накапливаются преимущественно в корневищах и корнях [133]. Полифенольный комплекс корневищ и корней кровохлебки включает преимущественно гидролизуемые дубильные вещества пирогалловой группы – до 23%, эллаговую и галловую кислоты, пирогаллол, катехин и галлокатехин. При этом корневища кровохлебки лекарственной содержат 12-13%, корни - до 17%, а каллусы (наплывы) - до 23% дубильных веществ.



Эллаговая кислота



Галловая кислота

В корневищах и корнях кровохлебки лекарственной содержится крахмал (до 30 %), эфирное масло (1,8%), сапонины: сангвисорбин и пиотерин – до 4%, красящие вещества, соли оксалата кальция, флавоноиды производные кверцетина и кемпферола, гиперин, 3,7-дирамнозид кемпферола, 3-галактозидо-7-глюкозид катехины, хромоны. Корни и корневища, кроме того, содержат стероиды: β -ситостерин, β -D-глюкозид β -ситостерина, стигмастерин; каротиноиды, витамин С; макроэлементы (мг/г): калий - 5,8, кальций - 23,1, магний - 2,9, железо - 0,4; микроэлементы (мкг/г): марганец - 0,47, медь - 0,59, цинк - 1,02, кобальт - 0,04, хром - 0,03, алюминий - 0,31, барий - 5,71, ванадий - 0,12, селен - 1,39, никель - 1,15, стронций - 6,14, свинец - 0,06, иод - 0,1, бор - 2,0. Корни и корневища способны концентрировать цинк, никель, селен, а особенно барий и стронций [3,13,34,74,138,153]. В траве кровохлебки также содержатся дубильные

вещества пирогалловой группы, катехины, но в значительно меньшем количестве. Обнаружены углеводы (до 7%), органические кислоты (до 1%), каротиноиды, аскорбиновая кислота до 0,9%, фенолкарбоновые кислоты: феруловая кислота; галловая, лутеоновая, эллаговая, 3,4'-О-диметилэллаговая кислоты и их производные. В цветках содержатся флавоноиды (антоцианы, проантоцианидины – до 7%) [107].

На образование и накопление фенольных соединений в кровохлебке лекарственной, несомненно, оказывают влияние самые различные факторы среды, но наиболее чувствительна она к водному фактору. В местах с неустойчивым водным режимом кровохлебка лекарственная испытывает угнетение в развитии и, как правило, характеризуется невысоким содержанием фенольных веществ [4, 67, 133].

1.5. Стандартизация сырья кровохлебки лекарственной

Впервые лекарственное растительное сырье кровохлебки лекарственной было включено в Государственную фармакопею СССР VIII издания (1949 г.), затем требования к качеству сырья кровохлебки лекарственной регламентировала Государственная фармакопея IX издания (1961 г.) и последние, переработанные требования, необходимые для определения подлинности и оценки качества сырья описаны в фармакопейной статье (ФС) 42-1082-76 «*Rhizomata et radices Sanguisorbae*» [35, 130]. Существующий нормативный документ на сырье не соответствует современным требованиям, регламентирующим качество сырья. В действующей фармакопейной статье отсутствует ряд показателей необходимых для качественного анализа сырья: УФ-спектральная характеристика, хроматография. Оценка качества по ФС корневищ и корней кровохлебки лекарственной проводится по следующим показателям:

- *Внешние признаки:* цельное сырье представляет собой разделенные на куски одревесневшие корневища и корни длиной до 20 см, толщиной

корневищ 0,5 – 2,5 см, корней 0,3 – 1,5 см, поверхность корней и корневищ гладкая или слегка продольно-морщинистая. Излом корневищ неровный, у корней более ровный. Цвет темно-бурый, почти черный, на изломе желтоватый или буровато-желтый. Запах отсутствует, вкус вяжущий. Измельченное сырье: кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм.

- *Микроскопия*: на поперечном срезе корня видна темно-бурая пробка, 2 – 3 слоя крупных тангенциально вытянутых клеток паренхимы с утолщенными стенками. Во внутренней рыхлой коре межклетники; лубяные волокна со слабоутолщенными неодревесневшими оболочками, расположенные группами по 2-3. Сердцевидные лучи многочисленные, однорядные. Ксилема представлена крупными сосудами и волокнами. Паренхима коры и ксилемы содержит мелкие овальные простые крахмальные зёрна и крупные друзы. Корневища отличаются от корней наличием в середине сердцевины.

- *Числовые показатели*: содержание дубильных веществ не менее 14 %; влажность не более 13%; золы общей не более 12 %; золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной, не более 5 %; корневищ и корней, почерневших или побуревших в изломе, не более 10 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, не более 5 %; содержание других частей растения (стеблей, листьев и т. д.) не более 3%; органической примеси не более 1 %, минеральной — не более 1 %.

- *Для измельченного сырья*, кроме того: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 8 мм не более 10 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, не более 10 %.

Для количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье предлагается метод окислительно-восстановительного титрования (перманганатометрии). Данный метод включен в Государственные фармакопеи X и XI изданий, основан на способности дубильных веществ быстро окисляться в сильно разбавленном кислом

растворе в присутствии индикатора индигосульфокислоты [35]. Достоинствами метода являются хорошая воспроизводимость, для проведения анализа не требуется сложной аппаратуры, много времени и он может быть осуществлен в любой лаборатории. Недостатками метода является то, что наряду с дубильными веществами происходит окисление и других групп биологически активных веществ (БАВ) – флавоноидов, витаминов, органических кислот, сахаров и др., что сильно завышает результаты определения, которые зависят также от интенсивности перемешивания титруемого раствора, освещения, скорости титрования, условным установлением конца титрования по появлению золотисто-желтой окраски и невозможностью применения единого пересчетного коэффициента для растительного сырья, содержащего танино-катехиновую смесь [43, 110].

В настоящее время все чаще в современную нормативную документацию на лекарственное растительное сырье включают физико-химические методы. Применяют метод потенциометрического титрования, который позволяет не только оценить количественное содержание суммы дубильных веществ в ЛРС, но и дифференцировать конденсированные и гидролизуемые группы танинов [109]. Описано применение метода спектрофотометрии, основанного на образовании окрашенных комплексов дубильных веществ с железо-тарtratным реактивом [18]. Применение спектрофотометрического и потенциометрического методов выявило наибольшую сходимость результатов определения дубильных веществ, причем с наименьшей погрешностью. Среди хроматографических методов широко применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая позволяет установить качественный и количественный состав дубильных веществ [44].

В Европейской (European Pharmacopoeia) и Британской (The British Pharmacopoeia) фармакопеях определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье проводится спектрофотометрическим

методом после их осаждения гольевым порошком, в пересчете на пирогаллол [44].

Таким образом, целесообразно использовать возможности других более современных методов анализа при разработке дополнений и изменений существующей нормативной документации на сырье кровохлебки лекарственной и разработать объективные методы оценки его качества, так как данное сырье перспективно для создания новых современных препаратов, а так же использования в экстенпоральной рецептуре.

1.6. Современные сведения о фармакологической активности кровохлебки лекарственной и применении ее в научной, народной медицине

Самые ранние сведения об использовании кровохлебки лекарственной в медицине встречаются в печатных источниках 1550 года. Первоисточник сообщает о применении ее в качестве кровоостанавливающего средства при чрезмерно обильных месячных и кровавом поносе. Собственно, и дословный перевод ее латинского названия говорит о способности останавливать кровь. Она упоминается в трудах А. Лоницера и П.А. Маттиолуса, которые отмечают в основном кровоостанавливающие свойства и рекомендуют кроме прочего при «женских болезнях». До сих пор, и не без оснований, бытует мнение, высказанное П.А. Маттиолусом в его «Новом травнике»: «Кровохлебка надежно останавливает всякого рода кровотечения. Лучше других лекарств эта трава помогает при слишком обильных менструациях у женщин. Питье настоя листьев в вине или воде может остановить даже кровавый понос». В древнерусских домостроевских лечебниках она была известна под названием «совиные очи» и ей приписывали не только лечебные, но и магические свойства. Кстати, кровохлебку не советуют сушить на железных противнях – считается, что при соприкосновении с металлом она утрачивает целительную силу [8, 34].

Фармакологические свойства кровохлебки определяются ее химическим составом. Высокое содержание полифенольных соединений обуславливает вяжущее, противовоспалительное и кровоостанавливающее действие галеновых препаратов кровохлебки. Растение известно с давних пор как средство, применяемое при наружных и внутренних кровотечениях, нарушениях месячного цикла, геморрое и целом ряде других заболеваний. Экспериментальным путем было доказано, что экстракт из корневищ и корней растения при местном применении обладает противовоспалительными и сосудосуживающими свойствами, а при внутрижелудочном введении тормозит перистальтику кишечника и сокращает мускулатуру матки. Входящие в состав растения дубильные вещества способствуют улучшению пищеварения и нормализации работы всего желудочно-кишечного тракта, поскольку обладают противовоспалительным, антимикробным и вяжущим действием [71].

Кровохлебка лекарственная пользуется особой популярностью в китайской, тибетской и народной медицине Сибири при лечении различных заболеваний благодаря широчайшему спектру воздействия на организм. Для медицинского применения в России кровохлебка была предложена Томским и Иркутским медицинскими институтами в качестве вяжущего, кровоостанавливающего и противовоспалительного средства [8].

Экстракты из корневищ и корней кровохлебки лекарственной обладают выраженной антимикробной активностью, в частности на бактерии кишечная палочка, синегнойная палочка и золотистый стафилококк [152]. Отмечено выраженное бактерицидное действие по отношению к различным микробам дизентерийной и паратифозной групп, губительное действие на трихомонады, грибки рода *Candida* и лямблии [58]. Установлено, что настой корневищ и корней кровохлебки проявляет антипротозойную активность [60], а спиртовой экстракт — антибактериальную [156]. Также сообщается о противовирусной активности кровохлебки лекарственной по отношению к вирусу гепатита В [154].

Отвар из корневищ и корней кровохлебки используют как наружное средство при различных заболеваниях кожи, что связано с содержанием катехинов, лейкоантоцианидинов, обладающих высокой Р-витаминной активностью. Рекомендуется наружное применение отвара с целью промывания ран, язв, спринцеваний при эрозии шейки матки и кольпите [97]. Описано, что у здоровых людей вызванная горчицей гиперемия под влиянием влажного компресса из отвара корневищ и корней кровохлебки исчезает примерно втрое быстрее, чем при использовании контрольных компрессов с водой [81]. Японскими учеными установлено, что экстракт из корневищ и корней кровохлебки защищает кожные покровы от ультрафиолетового облучения [149, 163]. Современные исследования китайских ученых показали, что применение свежей травы кровохлебки лечит ожоги более эффективно, чем извлеченные из нее вяжущие компоненты - дубильные вещества, а также было отмечено, что при лечении экземы заметные улучшения наблюдались у пациентов при лечении мазью из корней кровохлебки на вазелине [143].

Экспериментальные исследования кровохлебки лекарственной, проведенные Азовцевым Г.Р. и др., показывают, что фенольные соединения оказывают антигипоксическое действие, обладают кардиотоническими и тонизирующими свойствами. Полифенольный комплекс из подземных органов растения повышает устойчивость организма к статистическим и динамическим нагрузкам [6].

При изучении водных экстрактов кровохлебки лекарственной китайскими учеными была установлена высокая антиоксидантная и иммуномодулирующая активности, причем последняя, как считают авторы, обусловлена входящими в ее состав полисахаридами [155, 167]. В исследованиях Duke J.A., X. Liu, B. Shi и др., описана высокая антипролиферативная активность корневищ и корней кровохлебки в отношении ряда раковых клеток [147, 158, 159]. Клинические исследования показали, что кровохлебка лекарственная обладает противораковой

активностью, которую связывают с 21-тетраен- 23-овой кислотой, входящей в ее состав [151, 159]. Установлено, что метиловый эфир цео-гликозида II блокирует активность тканевого фактора опухоли (TF) и фактора некроза опухоли (α -TNF), сапонин сангвисорбин ингибирует подвижность хемоаттрактант-зависимых и независимых нейтрофилов [157].

Онкопротекторные свойства кровохлебки лекарственной связывают с входящими в ее состав каротином, сапонинами, такими микроэлементами как медь, селен и бор, поэтому препараты из этого растения рекомендуются для лечения и профилактики онкологических заболеваний, например, при миоме матки. Считается, что бор регулирует репродуктивные процессы, а марганец, никель и йод нормализуют гормональный фон, тем самым предупреждая развитие опухолей [93].

Препараты кровохлебки применяют в качестве кровоостанавливающего средства при различных видах кровотечений: желудочно-кишечных, маточных, почечных, легочных и других, при чрезмерно обильных менструациях в связи с воспалительными процессами придатков матки, при кровотечениях в послеабортном периоде, при геморрагической метропатии, фибромиоме матки, а также стимулируют маточно-плацентарный кровоток [27, 28, 93, 123, 124]. Отвар из корневищ и корней кровохлебки лекарственной применяется при геморрое, так как геморрой зачастую сопровождается кровотечением, рекомендуется применять его внутрь или для приготовления сидячих ванн, уменьшающих кровотечение и рассасывающих геморроидальные узлы. Кроме того, предлагаются свечи от геморроя, в состав которых входят: корни кровохлебки; масло какао; ромашка аптечная; тыквенное масло; мята перечная; настойка прополиса (ингредиенты берутся в равных пропорциях), которые снимают воспаление, благотворно воздействуя на организм в целом [117].

Применяют кровохлебку в стоматологии при лечении стоматитов, гингивитов в качестве противовоспалительного и вяжущего вещества [117].

Основными причинами диареи у взрослых являются синдром раздраженного кишечника, спровоцированный нарушением работы нервной системы; несбалансированное питание; пищевые отравления. Понос зачастую сопровождается метеоризмом, тошнотой, усилением перистальтики кишечника, сухостью во рту. Препараты кровохлебки лекарственной эффективно применяются при лечении диареи и устраняют свойственную ей симптоматику, так как нормализуют моторную функцию кишечника, угнетают его перистальтику; нормализуют работу ЦНС; уменьшают воспалительные процессы [117, 123].

Необходимо отметить, что применяют кровохлебку не только как лекарственное средство, но и используют в кулинарии. Так, на Кавказе применяют листья кровохлебки, которые обладают приятным огуречным запахом и входят в состав некоторых салатов. Высушенные листья используют как приправу, из них готовят вкусный чай. Сушеные и измельченные корни кровохлебки лекарственной в конце XIX века в Сибири якуты добавляли в муку и такую муку использовали для приготовления блюда под названием «Бутугас» [115]. Интересно, что корневища кровохлебки применяют также в кожевенной промышленности. Отваром соцветий окрашивают холсты [123, 124].

Кровохлебка лекарственная является хорошим медоносом и популярным декоративным растением - достаточно широко применяется ландшафтными дизайнерами при благоустройстве и озеленении. Селекционеры вывели несколько красивоцветущих сортов с высоким стеблями и ярко окрашенными цветами [21].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1:

1. Анализ литературных данных и обобщение информации о применении кровохлебки лекарственной в медицине показал, что, несмотря на длительное ее применение, используется она по ограниченному числу

показаний, в основном как вяжущее, противовоспалительное, кровоостанавливающее средство.

2. Приведенные выше данные показывают, что химический состав корневищ и корней кровохлебки лекарственной и особенно травы изучен недостаточно, что подтверждает актуальность дальнейшего более подробного изучения данного растения.

3. Достаточная сырьевая база кровохлебки лекарственной в Российской Федерации, богатый набор различных групп биологически активных веществ, обладающих разнообразными видами фармакологической активности, указывают на перспективность углубленного изучения травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной с целью расширения как возможности ее использования в медицине, так и ассортимента лекарственных средств растительного происхождения.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили корневища и корни, трава кровохлебки лекарственной, собранные в 18 районах Республики Башкортостан: Альшеевский, Благоварский, Буздякский, Бурзянский, Дюртюлинский, Зианчуринский, Ишимбайский, Караидельский, Кармаскалинский, Краснокамский, Мишкинский, Нефтекамский, Нуримановский, Салаватский, Стерлитамакский, Чекмагушевский, Уфимский, Учалинский районы в 2011 – 2015 г.г. Корневища и корни кровохлебки лекарственной заготавливали в период плодоношения и увядания надземной части, вручную, выкапывая специально приспособленными лопатами, и обязательно оставляли 30-50% растений для восстановления зарослей. Выкопанные корневища и корни очищали от земли, удаляли надземную часть, мыли в прохладной проточной воде, в течение 2-3 дней подвяливали на солнце, затем резали на куски длиной 15-20 см, толстые разрезали еще и вдоль и далее сушили. Траву кровохлебки заготавливали в период цветения. Сушку сырья проводили воздушно-теневым методом под навесами в помещениях с хорошей вентиляцией, раскладывая тонким слоем и периодически перемешивая. Сырье упаковывали и хранили в соответствии с требованиями нормативной документации при комнатной температуре в сухом, хорошо вентилируемом помещении, не зараженном амбарными вредителями, без прямого попадания солнечных лучей.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Метод ресурсоведческих исследований

Определение запасов корневищ и корней кровохлебки лекарственной проводили методом учетных площадок. При камеральной обработке

вычисляли среднее арифметическое значение со средним квадратичным отклонением E_6 ($y \pm E_6$), относительная ошибка опыта при этом методе не должна превышать 15%. Получив во время полевых работ данные по величине сырой фитомассы изучаемого растения с необходимого числа учетных площадок подвергали статистической обработке и определяли такие величины, как плотность запаса, величины биологического, эксплуатационного запасов и возможный объем заготовок. Для проведения статистического анализа, использовали следующие обозначения:

a – плотность запаса;

n – число (или номер) учетных площадок;

y – сырой вес сырья с каждой учетной площадки;

$\hat{y}$ – среднее арифметическое значение веса сырья с каждой площадки;

$(y - \hat{y})$ – дисперсия, или стандартное отклонение отдельного результата от среднего арифметического;

S – стандартное отклонение;

$S_{\hat{y}}$ – стандартное отклонение среднего результата;

E_α – среднее квадратичное отклонение;

$E_{\text{отн.}}$ – относительная ошибка (относительная погрешность среднего результата);

f – число степеней свободы (равно $n - 1$);

t – критерий Стьюдента;

P – доверительный уровень (доверительная вероятность).

Для дальнейшего расчета объема запаса необходимо найти интервальное значение величины плотности запаса на данной заросли (a), которое определяется выражением: $a = \hat{y} \pm E_6$.

Среднее квадратичное отклонение E_6 устанавливается по формуле: $E_6 = t \cdot S_{\hat{y}}$. Для его определения необходимо, используя данные полевых исследований по определению фитомассы сырья на учетных площадках и соответствующие формулы, установить величину значения $S_{\hat{y}}$.

Стандартное отклонение среднего результата целесообразно рассчитывать по формуле: $S_{\hat{y}} = \sqrt{\sum (y - \hat{y})^2 / n(n - 1)}$.

Далее для вычисления величины среднего квадратичного отклонения E_{α} следует установить величину критерия Стьюдента, которая зависит от принятого доверительного уровня (Р) и значения числа степеней свободы f ($f = n - 1$). При ресурсоведческих исследованиях обычно принимают доверительный уровень, равный 95%.

Результаты изучения запасов лекарственного растительного сырья, полученные при статистической обработке данных, будут достоверны в том случае, если выборка однородна и относительная ошибка $E_{\text{отн.}}$ находится в пределах 10-15%. Для определения $E_{\text{отн.}}$ в % используют формулу: $E_{\text{отн.}} = E_{\alpha} \cdot 100 / \hat{y}$.

2.2.2. Методы определения подлинности и доброкачественности

Отбор проб, макро- и микроскопический анализ лекарственного растительного сырья (ЛРС) проводили по методикам ГФ XIII издания «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» [39]. Для проведения микроскопического анализа использовали микроскопы «Мини-Мед 501» с применением фотонасадки, микровизоре марки MVZ-103 с вмонтированной камерой.

Определение диагностически значимых признаков сырья кровохлебки лекарственной проводили по методике, предложенной Потаниной О.Г. и Самылиной И.А. [104]. Из средней пробы порошка сырья кровохлебки отбирали аналитическую пробу массой 10,0 г, измельчали сырье, просеивали сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Затем 1 – 2 г порошка помещали в пробирку, закрывали пробкой и перемешивали до получения равномерной смеси. Эту процедуру проделывают перед каждым взятием пробы. На предметное стекло, размеченное на 16 квадратов, наносили каплю

5% раствора натрия гидроксида, а затем в него, с помощью препаровальной иглы помещали исследуемый порошок сырья кровохлебки. Накрывали покровным стеклом и прогревали для просветления на пламени горелки. После охлаждения удаляли излишки раствора натрия гидроксида с помощью фильтровальной бумаги и добавляли каплями 33% раствор глицерина.

Готовый препарат помещали под микроскоп и подсчитывали количество диагностически значимых и незначимых частиц сырья кровохлебки во всем образце. Расчет (в %) вели по формуле:

$$X = \frac{D}{S} \times 100\% , \text{ где}$$

X – количество диагностически значимых частиц, %;

D – сумма диагностически значимых частиц;

S – сумма диагностически значимых и незначимых частиц

Определение товароведческих показателей качества ЛРС (влажности, золы общей, золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, степени измельченности сырья и содержания примесей) проводили по методикам ГФ-XI, XIII издания [36, 37, 38, 39].

Микробиологическую чистоту ЛРС устанавливали согласно ГФ XIII «Микробиологическая чистота» [39].

Радиологическую чистоту ЛРС устанавливали согласно ГФ XIII «Определение содержания радионуклидов в ЛРС» [39].

2.2.3. Методы качественного и количественного анализа БАВ

С помощью качественных реакций, хроматографических методов исследования проводили качественный анализ, идентификацию природных биологически активных соединений осуществляли с применением современных физико-химических методов анализа. Хроматографическое изучение проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках («Silufol UV-254», «Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ») в стандартных условиях, используя аутентичные образцы (свидетели). Учитывали, что для

более четкого разделения веществ при близких значениях R_f необходимо повторно пропускать разделяющую систему через хроматограмму.

Для хроматографических исследований использовали различные системы растворителей, в которых происходило наилучшее разделение веществ, и в результате выбрали оптимальные: аскорбиновая кислота ТСХ («этилацетат - уксусная кислота» (80:20), для проявления - водный раствор 2,6-дихлорфенолиндифенолята натрия); каротиноиды ТСХ (гексан - диэтиловый эфир (80:20), для проявления 10% спиртовый раствор кислоты фосфорномолибденовой); флавоноиды, фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты ТСХ в следующих системах растворителей: «муравьиная кислота - ледяная уксусная кислота – вода – метанол – ацетон – хлороформ» (6:6:7,5:12,5:30:60), «этилацетат - муравьиная кислота – вода» (14:3:3), «н-бутанол - уксусная кислота – вода» (4:1:5) и «этилацетат – ледяная уксусная кислота – вода» (5:1:1), для проявления - 5% спиртовый раствор хлорида алюминия, пары аммиака); кумарины ТСХ («этилацетат – бензол» (1:2); «хлороформ - петролейный эфир» (1:2), для проявления - свежеприготовленный диазореактив). Спектральные исследования проводили на спектрофотометре марки «Shimadzu UV-1800».

Фенольные соединения кровохлебки лекарственной изучали с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе «Стайер» (Аквилон, Россия) с УФ-детектором при длине волны 254 и 360 нм. Неподвижная фаза - обращенно-фазная металлическая колонка Luna C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, в качестве адсорбента использовали Phenomenex (США) с диаметром частиц 5 мкм. Подвижная фаза - вода (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель Б). Анализ осуществляли методом градиентного элюирования при комнатной температуре. Градиентная подача ацетонитрила проходила с 0 до 70% в 0,2% водном растворе трифторуксусной кислоты за 30 минут с объемной скоростью 1 мл/мин (проба 20 мкл). Для идентификации веществ

сопоставляли времена удерживания компонентов смеси и растворов сравнения.

Жирорастворимый комплекс изучали методом хроматомасс-спектрометрии. Исследования проводили в системе: хромато-масс-спектрометр фирмы Agilent Technologies, состоящий из газового хроматографа –7890 и масс-селективного детектора 5973N с квадрупольным анализатором. Программное обеспечение – ChemStation E 02.00. Идентификацию зарегистрированных масс-спектров компонентов проводили с помощью библиотеки масс-спектров NIST-05 и с использованием методики «SIM» (сканирование индивидуально выбранных диагностических ионов). Относительное содержание компонентов смеси (количественный анализ) вычисляли из соотношений площадей хроматографических пиков (метод простой нормировки). Хроматомасс-спектрограмма образцов записана по полному ионному току. Условия масс-спектрометрического анализа – энергия ионизирующих электронов 70 эВ, регистрация спектров в диапазоне массовых значений от 39 до 550 Да со скоростью 2,5 скан/сек. Разделение компонентов смеси проводили на капиллярной колонке (длина 30м, диаметр 0,25 мм, привитая фаза содержащая 5% диметилфенилсиликона и 95% диметилсиликона) при программировании температуры от 50⁰С до 280⁰С со скоростью 10⁰С в мин (объем пробы 1 мкл). Давление в инжекторе с 8,8 до 22,0 psi.

Количественное определение биологически активных соединений проводили с использованием известных или модифицированных методик методами титриметрии, фотоколориметрии, спектрофотометрии.

Аминокислотный и элементный состав сырья определяли рентгенофлуоресцентным методом на спектрометре «PacificScientific-6520». Анализ проб проводится «бесстандартным» методом с относительной ошибкой 1-10 % в зависимости от соединения. При этом, проводится дополнительная калибровка прибора по эталонным образцам, для уменьшения относительной ошибки (менее ± 0.1 %).

Методика количественного определения полисахаридов

Для определения полисахаридов аналитическую пробу травы, корневищ и корней кровохлебки измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 2 мм. Около 1-2 г измельченного сырья, помещали в колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл воды, закрывали пробкой и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры, закрывали пробкой, взвешивали и доводили массу до первоначальной водой. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр белая лента под вакуумом. 20 мл фильтрата помещали в колбу вместимостью 150 мл, приливали 60 мл 95%спирта этилового, перемешивали и помещали на водяную баню на 20 минут. Образовавшийся осадок отфильтровывали через стеклянный фильтр ПОР-16 диаметр 40 мм под вакуумом. Осадок на фильтрате промывали 20 мл смеси воды и спирта этилового 95% в соотношении 1:3. Осадок с фильтрата количественно переносили 20 мл HCl 8% в коническую колбу и присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на водяной бане 2 часа. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры (рН нейтральный). Затем раствор количественно переносили в мерную колбу на 50 мл и доводили объем раствора водой до метки, раствор фильтровали через бумажный фильтр (*раствор А*).

Брали 2 мерные колбы вместимостью 25 мл, помещали по 1 мл 1% раствора пикриновой кислоты и 3 мл 20% раствора Na_2CO_3 . Затем в одну колбу прибавляли 5 мл раствора А (*раствор В*), а в другую 5 мл воды (*раствор сравнения*). Содержание колб перемешивали и помещали на водяную баню на 1 час. Колбы охлаждали, и объем растворов доводили водой до метки, перемешивали.

В случае образования опалесценции испытуемый раствор фильтровали через бумажный складчатый фильтр белая лента. Оптическую плотность *раствора В* измеряли на спектрофотометре при длине волны 460 нм в кювете

с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряли оптическую плотность комплекса глюкозы с пикриновой кислотой в щелочной среде.

Содержание суммы моносахаридов после гидролиза полисахаридов в пересчете на глюкозу и абсолютно сухое сырье в % вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_o \cdot 100 \cdot 100}{D_{ст} \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

D - оптическая плотность анализируемого раствора;

D_{ст} – оптическая плотность раствора РСО глюкозы;

m_о – масса навески РСО глюкозы в граммах

m – масса навески сырья в граммах

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приготовление раствора РСО глюкозы. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 0,1400 г (точная навеска) глюкозы, растворяли в воде и доводили объем раствора водой до метки. 10 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивали. 1 мл раствора содержит 0,00056 г глюкозы.

1 мл раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 мл 1% раствора кислоты пикриновой и 3 мл 20% раствора натрия карбоната, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане 1 час. Раствор охлаждали и доводили водой до метки.

Методика количественного определения сапонинов

Для определения сапонинов аналитическую пробу травы, корневищ и корней кровохлебки измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 2 мм. Затем брали около 1,0 г (точная навеска) сухого измельченного сырья, помещали в колбу объемом 250 мл, прибавляли 100 мл спирта этилового 70 %, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали в течение 60 минут на кипящей водяной бане (60-65 °С). После охлаждения до комнатной температуры спиртовое извлечение аккуратно сливали. Сырье в колбе заливали 50 мл хлороформа и нагревали на водяной бане при температуре 60-65°С с обратным холодильником в течение 60 минут, затем охлаждали. Хлороформное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, экстракцию

повторяли, собирая фильтрат в ту же мерную колбу. Объем полученного раствора доводили хлороформом до метки и перемешивают. 10 мл хлороформного извлечения упаривали до сухого остатка, затем остаток растворяли в 10 мл кислоты серной концентрированной и перемешивали. Полученный раствор термостатировали в течение 60 минут при температуре 70 °С. После охлаждения 1 мл полученного раствора переносили в колбу объемом 10 мл и доводили концентрированной серной кислотой до метки. Измерение оптической плотности полученного раствора проводили при длине волны 310 нм для корневищ и корней кровохлебки лекарственной (в пересчете на кислоту олеаноловую) и 312 нм для травы кровохлебки (в пересчете на кислоту урсоловую). В качестве раствора сравнения использовали кислоту серную концентрированную. Параллельно измеряли оптическую плотность стандартных растворов кислоты олеаноловой и урсоловой.

Приготовление раствора СО кислоты олеаноловой и урсоловой. Около 0,04 г (точная навеска) кислоты олеаноловой или урсоловой растворяли в 100 мл кислоты серной концентрированной и периодически взбалтывали. Полученный раствор термостатировали в течение 60 минут при температуре 70°С. После охлаждения, 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу объемом 10 мл, и доводят до метки кислотой серной концентрированной.

Содержание тритерпеновых соединений в пересчете (X, %) на кислоту олеаноловую или урсоловую и абсолютно сухое сырье в % вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D_x \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{D_{см} \cdot m \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

D - оптическая плотность анализируемого раствора;

D_x - оптическая плотность раствора СО кислоты урсоловой, олеаноловой;

m - масса сырья, г;

m₀ - масса СО кислоты урсоловой, олеаноловой г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Методика количественного определения суммы оксикоричных кислот

Для определения суммы оксикоричных кислот аналитическую пробу травы, корневищ и корней кровохлебки измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 0,5 мм. Затем брали около 2,0 г (точная навеска) сухого измельченного сырья, помещали в коническую колбу вместимостью 300 мл, прибавляли 50 мл 95% спирта и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры, извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл, избегая попадания сырья на фильтр. Колбу промывали 10 мл спирта и фильтровали в ту же мерную колбу. Экстракцию повторяли с 25 мл 95% спирта в течение 15 минут. После охлаждения до комнатной температуры, сырье переносили на фильтр с ватой, промывали 10 мл спирта и доводили объем раствора до метки спиртом.

На стартовую линию хроматографической бумаги «Ленинградская С» наносили 0,2 мл полученного извлечения полосой 3 см и отмечали границы пятна, затем хроматографировали восходящим способ в хлороформе. После прохождения фронтом растворителя 5 см, бумагу вынимали и высушивали на воздухе до удаления следов хлороформа. Отмеченный участок на стартовой линии вырезали и помещали в колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 95% спирта и интенсивно встряхивали в течение 30 минут. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 327 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно 95% спирта [138].

Содержание суммы оксикоричных кислот (X) в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{531 \cdot m \cdot 0,2 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность анализируемого образца;

531 – удельный показатель хлорогеновой кислоты;

m – масса сырья, г;

w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Методика количественного определения кумаринов

Для определения кумаринов аналитическую пробу травы, корневищ и корней кровохлебки измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстием диаметром 0,5 мм. Затем брали около 0,1 г (точная навеска) сухого измельченного сырья, помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 200 мл гексана и экстрагировали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов. Жидкость декантировали, сырье высушивали на воздухе до исчезновения запаха гексана. Затем к сырью в колбе прибавляли 100 мл хлороформа, взвешивали, и присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1,5 часов. Колбу охлаждали и доводили до первоначального веса хлороформом. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 5 мл фильтрата помещали в мерную колбу на 25 мл, доводили объем раствора до метки хлороформом и измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 310 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали хлороформ [131].

Содержание кумаринов (X) в пересчете на кумарин и абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{356 \cdot m \cdot 5 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

m – навеска сырья, г;

356 - удельный показатель поглощения кумарина в хлороформе;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

2.2.4. Методы определения фармакологической активности

Проведена сравнительная оценка противовоспалительной активности водных и спиртовых извлечений из сырья кровохлебки на скрининговой модели формалинового отека лапы у мышей.

Изучена антиоксидантная активность извлечений из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной методом хемолюменисценции.

Для оценки чувствительности бактерий к исследуемым растворам кровохлебки лекарственной использовали диско-диффузный метод. Посев колоний производили в чашки Петри. Для приготовления бактериологической суспензии используется метод прямого суспензирования в стерильном изотоническом растворе колоний в 18-24 часов культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде. Для этого стерильной бактериологической петлей или ватным тампоном собрали несколько морфологически сходных колоний и суспензировали полученный материал в стерильном изотоническом растворе. Бактериальную суспензию засекали на агар в течение 15 минут. Для получения сплошного газона равномерно наносили суспензию штриховыми движениями по всей поверхности агара в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносили диски с исследуемым раствором. Аппликацию дисков проводили с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 20 мм. В одну чашку Петри помещали не более 6 дисков. Диски аккуратно прижимали пинцетом. После аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали в течение 18 - 24 ч при температуре 35°C. Затем чашки Петри помещали кверху дном на темную матовую поверхность и измеряли штангенциркулем с точностью до 1 мм диаметр зон задержки роста микроорганизмов.

2.2.5. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку экспериментальных данных ($P = 95\%$) фитохимических исследований проводили в соответствии с требованиями ГФ-ХІІІ издания «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний», с использованием критерия Стьюдента. Статистическую обработку результатов фармакологических исследований проводили по методу Литчфильда и Уилкоксона, Достоверной считали разницу при $p < 0,05$ [31, 37, 38, 29].

ГЛАВА 3. РЕСУРСОВЕДЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*SANGUISORBA OFFICINALIS* L.)

3.1. Определение запасов сырья кровохлебки лекарственной на территории Республики Башкортостан

В настоящее время более половины лекарственного растительного сырья заготавливается от дикорастущих лекарственных растений. Особенно велика роль дикорастущих лекарственных растений в нашей стране, так как в сравнении с другими Европейскими странами, здесь сохранились значительные территории, занятые естественной растительностью. Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов России является одной из актуальнейших проблем.

На территории Республики Башкортостан кровохлебка лекарственная одно из самых распространенных растений. Наиболее сильное влияние на кровохлебку лекарственную оказывает фитоценотический фактор. Так, исследования, проводимые Е.В. Кучеровым, Г.К. Байковым, И.Б. Гуфрановой, А.А. Мулдашевым, А.Х. Галеевой, а также сотрудниками кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии БГМУ, при изучении произрастания кровохлебки лекарственной на территории РБ показали, что лесные растения отличаются более крупными вегетативными органами, а наиболее мелколистные формы встречаются на остепненных лугах. Кроме того, на морфологические признаки и ресурсоведческие характеристики кровохлебки лекарственной сильное влияние оказывают различные экологические факторы [77, 79, 81, 91]:

- фактор увлажнения - наибольшее развитие вегетативных органов, плотность запасов кровохлебки лекарственной наблюдается в условиях увлажнения сухих и свежих лугов, в более сухих или более влажных условиях эти показатели падают; отмечается, что при увеличении

пастбищной нагрузки наблюдается уменьшение общих размеров растений, как надземных, так и подземных;

- температурный фактор - в более холодных регионах число листочков на розеточных листьях достоверно увеличивается в среднем с 5 до 6, а в более теплых регионах несколько увеличивается число розеток на одном растении, что говорит о большей разветвленности корневищ;

- сумма годовых осадков - достоверные различия выявлены лишь по линейным размерам листьев, они в целом крупнее (длина розеточного листа, листовая пластинка, длина черешка и черешков листочков) в регионах с большим количеством осадков;

- типы почв – для произрастания кровохлебки лекарственной характерны различные типы почв: тяжелосуглинистые, среднесуглинистые; в лесах на различных подтипах серых лесных почв; на лугах - на лугово-черноземовидных и реже на дерново-луговых, пойменных черноземовидных, типичных черноземах, выщелоченных черноземах; на остепненных лугах - на выщелоченных черноземах; в редких случаях кровохлебка обнаруживается на болотах - на перегнойно-болотных, болотно-карбонатных, перегнойно-карбонатных почвах; в высокогорьях - на горно-луговых субальпийских почвах; кислотность почв колеблется в относительно нешироких пределах (рН 5,2-7,9).

Нами было обследовано 18 районов Республики Башкортостан в период с 2011 по 2015 год (рис. 7), где заготавливалось сырье кровохлебки лекарственной и использовалось в дальнейшем для фитохимических исследований. В ходе подготовительного этапа ресурсоведческих работ проводилась работа с материалами геоботанических и флористических обследований в Республике Башкортостан (РБ), схемами лесхозов различных районов РБ, таксационными лесоустроительными и землеустроительными материалами, в которых имеются карты растительности с пояснительными текстами к ним, сведениями о размещении

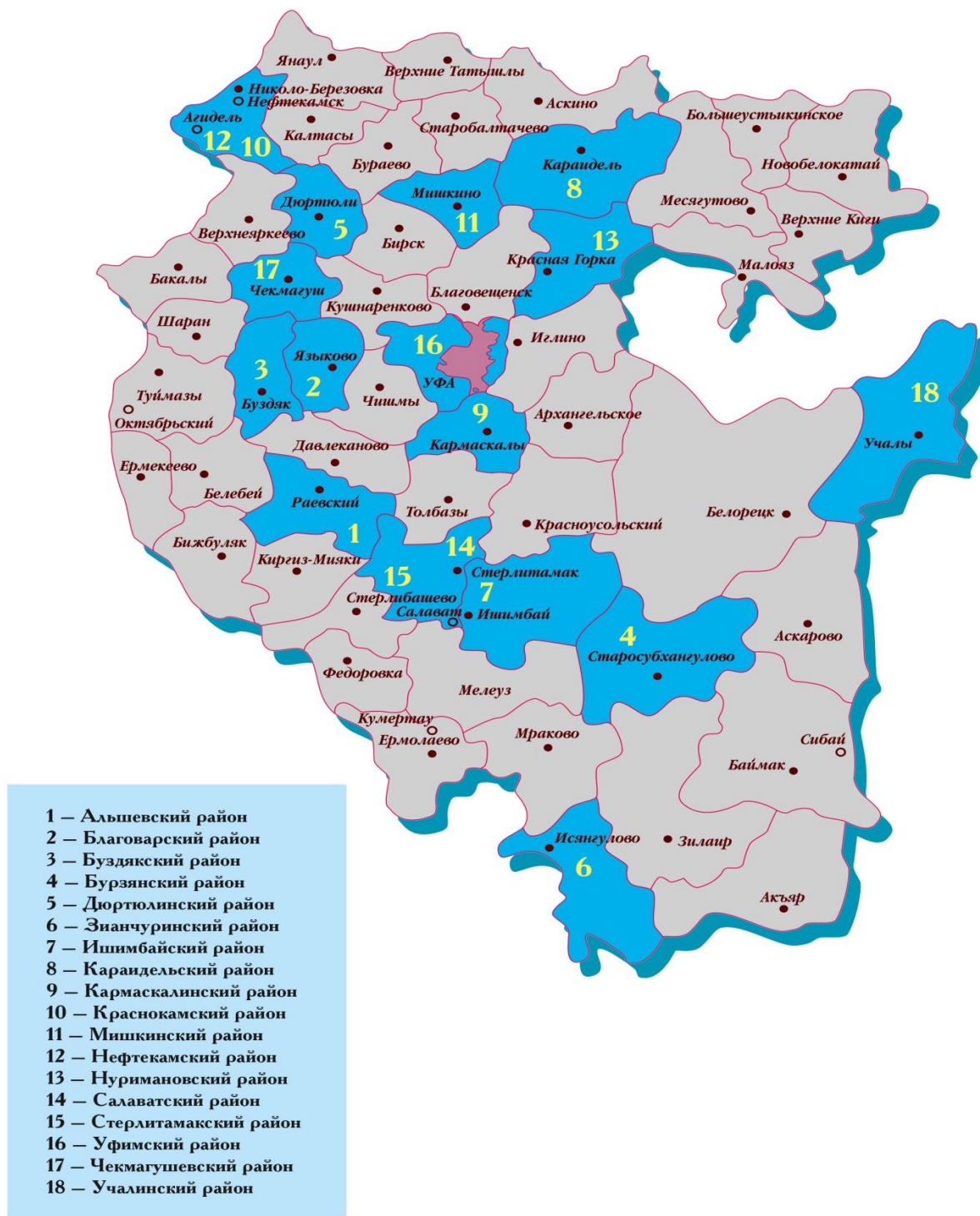


Рисунок 7. Основные районы заготовки сырья кровохлебки в РБ.

лекарственных растений на территории районов РБ [77, 79, 91]. На основании этого составлялись маршруты ресурсоведческих исследований для изучения кровохлебки лекарственной.

Определение запасов травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной на конкретных зарослях было проведено лишь в 9 районах РБ, где кровохлебка лекарственная образовывала плотные заросли. Для оценки

запасов сырья кровохлебки лекарственной были использованы метод учетных площадок (для надземных органов) и модельных экземпляров (для подземных органов). При этом в пределах ключевого участка закладывали маршрутные ходы, а на них - учетные площадки размером 1 м^2 . По методу модельных экземпляров на каждой учетной площадке посчитывали число экземпляров изучаемого растения, а затем отбирали экземпляры для определения веса модельного экземпляра. Таким образом, в результате полевых работ определяли среднее число экземпляров на единицу площади и вес модельного экземпляра, которые учитывали в дальнейшем при камеральной обработке при расчете плотности запаса с учетом рассчитанной ранее ошибки (г/м^2) и затем, с учетом площади заросли, определяли запасы сырья: биологический, эксплуатационный и возможный объем заготовок. По методу учетных площадок определение проводили на конкретных зарослях, с каждой учетной площадки собирали все сырье (вполне развившиеся, взрослые растения) и сразу же его взвешивали. Результаты веса сырого сырья записывали по каждой площадке отдельно. В дальнейшем при камеральной обработке вычисляли среднее арифметическое со средним квадратичным отклонением E_b ($y \pm E_b$). Относительная ошибка опыта не должна превышать 15%. Получив, во время полевых работ, данные по величине сырой фитомассы изучаемых растений с необходимого числа учетных площадок, затем подвергали их статистической обработке (гл. 2.2.1), рассчитывали плотность запаса, величины биологического, эксплуатационного запасов и возможный объем заготовок (ВОЗ). Результаты определения запасов кровохлебки лекарственной в некоторых районах РБ представлены в таблице 1.

Анализируя полученные результаты можно отметить, что запасы травы кровохлебки, определенные методом учетных площадок, варьируют от 0,032 т до 0,843 т, а корневищ и корней, определенных методом модельных экземпляров – от 0,008 т до 0,172 т. Наибольшая урожайность

Таблица 1

Определение запасов сырья кровохлебки лекарственной в некоторых районах Республики Башкортостан

Географическое положение	Местообитание кровохлебки в РБ	Площадь заросли га	<i>Метод учетных площадок (трава)</i>				<i>Метод модельных экземпляров (корневища и корни)</i>					
			Урожайность, г/м ²	Запас сырья (сухой вес)			Средн. числен экз. на 1м ²	Вес модельн. экз. в г	Урожайность, г/м ²	Запас сырья (сухой вес)		
				Биологический, т	Эксплуатационный, т	ВОЗ, т				Биологический, т	Эксплуатационный, т	ВОЗ, т
Благоварский район	д. Кашкалыма, открытая луговая поляна	20,0	29,0±3,74	1,076; 1,824	1,076	0,051	6,3±1,2	4,8±0,9	30,24±8,1	0,702; 2,322	0,702	0,033
Дюртюлинский район	с. Старобаишево, открытая луговая поляна	18,0	164,9±22,01	5,440; 9,401	5,440	0,260	4,5±1,5	5,1±1,2	22,9±9,4	0,185; 1,876	0,185	0,009
Кармаскалинский район	д. Кабаково, открытая поляна, расположена на берегу р. Белой	15,0	267,2±27,15	7,984; 12,056	7,984	0,380	4,3±1,0	5,9±0,9	25,4±8,6	0,308; 1,597	0,308	0,015
Нефтекамский район	лесная поляна, вокруг смешанный лес	10,0	37,7±5,42	0,672; 1,213	0,672	0,032	4,8±1,3	5,6±1,5	26,9±10,2	0,162; 1,183	0,162	0,008
Чекмагушевский район	с. Николаевка, озеро, открытая луг. поляна	23,0	33,8±4,60	1,415; 2,472	1,415	0,067	7,0±1,5	5,3±1,2	37,1±11,6	0,799; 3,467	0,799	0,038
Стерлитамакский район	д. Покровка, луговая поляна	20,0	27,5±3,26	1,049; 1,701	1,049	0,050	6,0±1,4	5,5±1,3	33,0±10,9	0,560; 2,740	0,560	0,027
Салаватский район	д. Толбазы, открытая луговая поляна	25,0	36,6±6,00	1,538; 3,037	1,538	0,073	7,3±1,2	6,5±1,1	47,5±11,2	1,569; 4,368	1,569	0,075
Уфимский район	с. Красный Яр, лев. Берег р. Белой	32,0	282,3±30,5	17,704; 27,464	17,704	0,843	10,4±1,6	8,1±1,4	84,24±19,5	3,619; 9,859	3,619	0,172
Зианчуринский район	д. Юнаево, лесная поляна	28,0	43,8±6,72	2,125; 4,007	2,125	0,101	8,5±1,4	5,9±1,2	50,2±13,1	1,680; 5,348	1,680	0,080

кровохлебки наблюдается на лугах, что обеспечивается высокой плотностью кровохлебки в популяциях, а наименьшая - в лесных популяциях, где численность кровохлебки и средняя масса надземных органов значительно ниже. Таким образом, результаты наших исследований, а также проведенные ранее [77, 79, 91] показывают, что запасы кровохлебки лекарственной на территории Республики Башкортостан достаточно высокие, однако в данном регионе кровохлебка лекарственная не заготавливается.

3.2. Морфолого-анатомическое исследование травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной

Для внедрения в медицинскую практику новых видов лекарственного растительного сырья, необходимо проведение исследований по разработке показателей подлинности и доброкачественности. Подлинность сырья устанавливали по наличию диагностических признаков, которые определяли приемами макроскопического анализа, описанными в ГФ РФ- XIII издания [39]. При осмотре составных компонентов аналитической пробы сырья, который проводили визуально и с помощью лупы (10х), обращали внимание на характер растительного сырья, цвет, запах. При этом выявили характерные внешние признаки травы кровохлебки лекарственной (рис. 8):



Рисунок 8. Травя кровохлебки лекарственной

- *Цельное сырье*: олиственные стебли длиной до 40 см, прямые, в верхней части ветвистые, ребристые, полые, голые. Листья непарноперистосложные, прикорневые – крупные на длинном черешке с 7 - 25 листочками; стеблевые листья – сидячие. Листочки по форме продолговато-яйцевидные, по краю остро-пильчатые. Цветки собраны в овальные или овально-цилиндрические головки от 1,5 до 3 см длиной на длинных прямых цветоносах, обоеполые, актиноморфные, с 5-членным околоцветником. Чашечка состоит из четырех чашелистиков эллиптической или яйцевидной формы, которые в 1,5 - 2 раза длиннее и шире цветоложа. Прицветники продолговато-яйцевидной формы, буроватой окраски, перепончатые и волосистые. Тычинок, расположенных кругами, неопределенное количество. Лепестки отсутствуют. Плодолистик 1 с темно-красным бахромчато-головчатым рыльцем, с нижней завязью. Плоды - сухие четырехгранные орешки длиной 3 - 3,5 мм.

Цвет стеблей зеленый, в некоторых местах с буроватым оттенком; листьев – сверху темно-зеленые, блестящие, снизу - сизовато-зеленые, тусклые; цвет цветков - темно-красный, темно-пурпуровый, плоды коричневые. Запах слабый. Вкус водного извлечения вяжущий.

- *Измельченное сырье*: кусочки стеблей, листьев, цветков, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет стеблей, листьев зеленый, цветков темно-красный или темно-пурпурный. Запах слабый. Вкус водного извлечения вяжущий.

- *Порошок*: зеленого цвета с темно-красными включениями, проходящий сквозь сито с отверстиями размером 0,16 мм. Запах слабый.

При изучении внешних признаков корневищ и корней кровохлебки лекарственной подтверждены и уточнены характерные морфологические особенности сырья, в соответствии с описанием в фармакопейной статье № 42-1082-76 «Кровохлебки корневища и корни»:

- *Цельное сырье*: одревесневшие куски цельных или разрезанных корневищ, с отходящими немногочисленными корнями, и отдельные корни.

Корневища длиной 10-15 см, толщиной до 2,0 см, по форме цилиндрические, деревянистые; корни длиной до 20 см, толщиной 0,3 – 1,5 см гладкие или слегка продольно-морщинистые. Излом корневищ неровный, у корней более ровный, под лупой у корневищ заметно лучистое строение.

Цвет корневищ и корней снаружи темно-бурый, почти черный, на изломе желтоватый или буровато-желтый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий (рис. 9).



Рисунок 9. Корневища и корни кровохлебки лекарственной

- *Измельченное сырье*: Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм. Цвет желтоватый, коричневато-желтый с темно-коричневой, почти черной пробкой. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий.

- *Порошок*. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Цвет желтоватый, коричневато-желтый с темно-коричневыми, почти черными или желтоватыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий.

Микроскопический анализ сырья кровохлебки проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIII издания «Техника микроскопического анализа лекарственного растительного сырья» [39]. Определение микродиагностических признаков и их проявляемости в пробах порошков сырья проводили, отбирая 25-30 частиц однородных по

внешнему виду, из которых готовили препараты и рассматривали под микроскопом, сравнивая с описанием в соответствующей нормативной документации. Для изучения микродиагностических признаков травы кровохлебки и выделения диагностически значимых признаков проведено последовательное изучение ее составных частей.

Анатомо-микродиагностические признаки стебля

Клетки эпидермиса с прямыми стенками, вытянутые по длине стебля. На поверхности встречаются устьица, окруженные 4-5 клетками (аномоцитный тип). На поперечном срезе стебля видны кора и центральный цилиндр с разрушенной сердцевинной (стебель полый). Кора представлена уголково-колленхимой и клетками паренхимы. Центральный цилиндр имеет пучковое строение, характерное для двудольного растения – открытые коллатеральные пучки, расположенные по окружности. Камбиальная зона хорошо выражена (рис. 10-13).

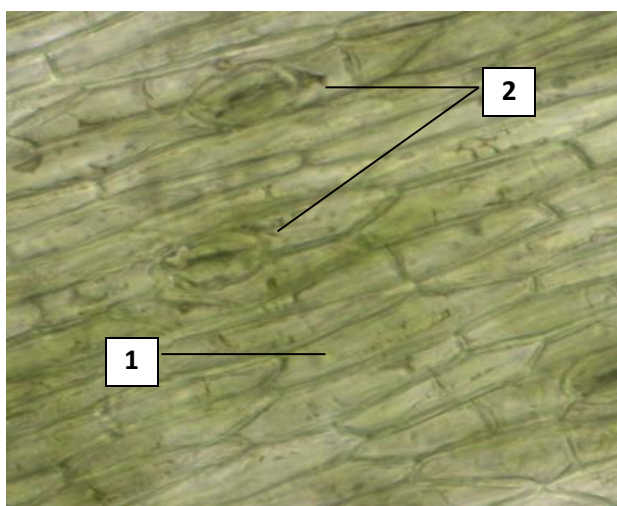


Рис.10. Эпидерма стебля (x100). Обозначения: 1 – вытянутые клетки эпидермиса; 2- устьица.

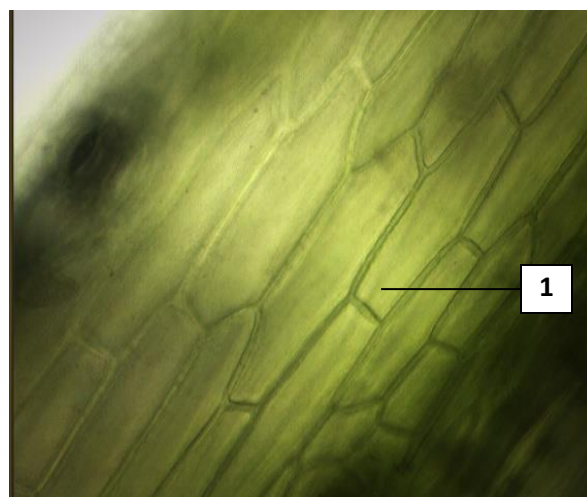


Рис. 11. Эпидерма стебля (x100). Обозначения: 1 – вытянутые клетки эпидермиса.



Рис.12. Поперечный срез стебля (x100). Обозначения: 1 – эпидерма; 2- кора; 3 – центральный цилиндр; 4 – паренхима сердцевины; 5-проводящие пучки.

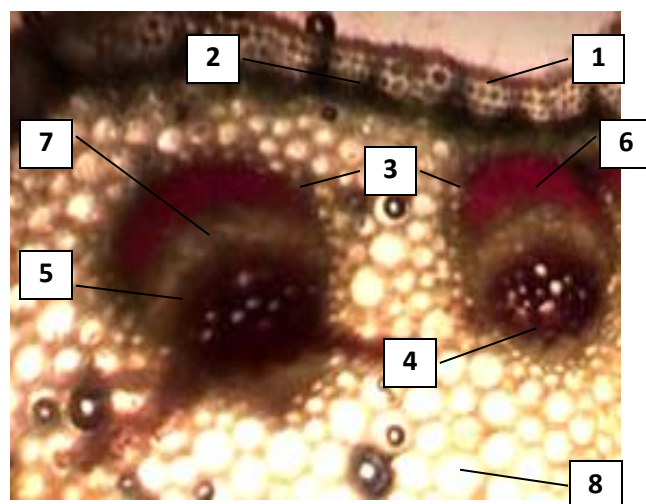


Рис. 13. Поперечный срез стебля (x200). Обозначения: 1 – эпидерма; 2- колленхима; 3–открытые проводящие пучки; 4–ксилема; 5-флоэма; 6-склеренхима; 7-камбий; 8- клетки паренхимы.

Анатомо-микродиагностические признаки листьев

Клетки эпидермиса верхней стороны листьев слабоизвилистые с утолщенной клеточной стенкой (рис.14); клетки нижнего эпидермиса с извилистой утолщенной стенкой (рис.15); устьица расположены на обеих сторонах листа (амфистоматический тип), преимущественно на нижней эпидерме, округлые, окружены 3-5 клетками (аномоцитный тип). По жилкам листа встречаются многочисленные друзы оксалата кальция, на нижней стороне листа - волоски двух типов – простые и головчатые, вместилища с желтым содержимым (рис. 16-21).

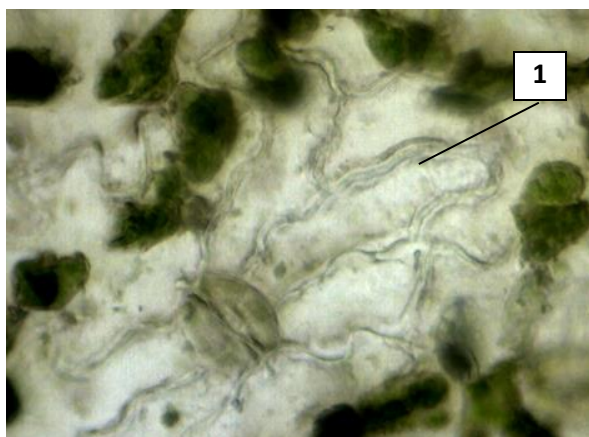


Рис.14. Верхний эпидермис листа (x100). Обозначения: 1 – слабоизвилистые клетки с утолщениями стенки; 2- эпидермальные клетки вдоль жилок вытянутые; 3 – устьица аномоцитного типа.

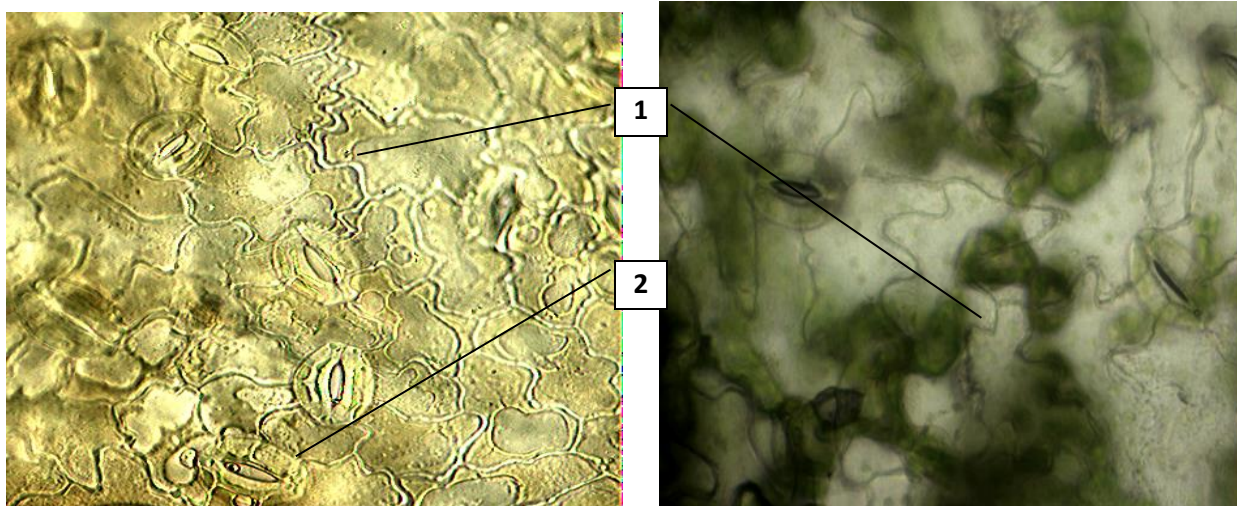


Рис.15. Нижний эпидермис листа (x100). Обозначения: 1 – клетки извилистые, с утолщенной стенкой; 2 – устьица аномоцитного типа.

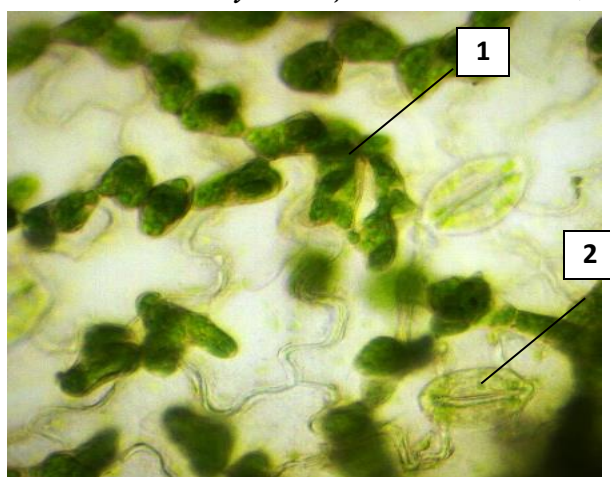


Рис.16. Губчатый мезофилл листа (x200). Обозначения: 1 – клетки с хлорофиллом; 2- устьица.

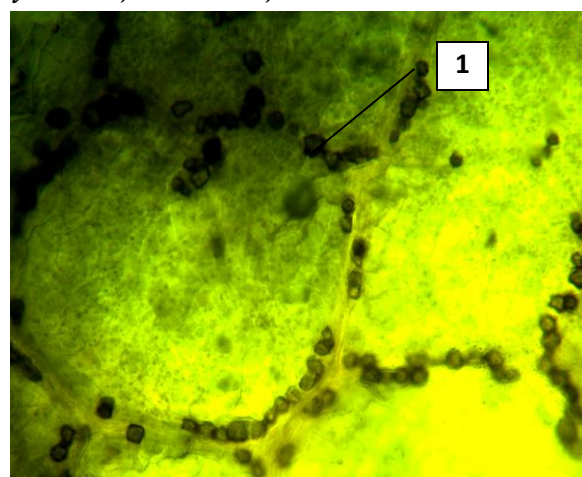


Рис. 17. Эпидермис листа (x100). Обозначения: 1 – друзы оксалата кальция по жилкам.



Рис.18. Нижний эпидермис листа (x100). Обозначения: 1 – вместилище с желтым содержимым.



Рис.19. Нижний эпидермис листа (x100). Обозначения: 1 – головчатый волосок.

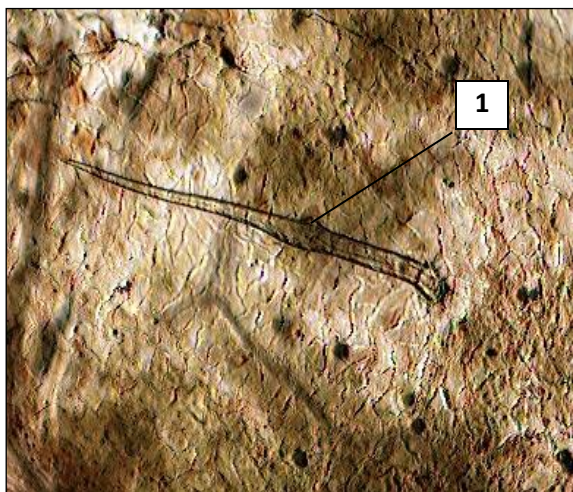


Рис.20. Нижний эпидермис листа (x100). Обозначения: 1 – простой волосок.



Рис.21. Нижний эпидермис листа (x100). Обозначения: 1 – друзы оксалата кальция.

При рассмотрении прилистника обнаружили, что на верхней стороне эпидермальные клетки слабоизвилистые, а на нижней стороне клетки извилистые, с крупными устьицами, окруженными 3-4 околоустьичными клетками (аномоцитный тип), встречаются простые волоски (рис. 22-25).

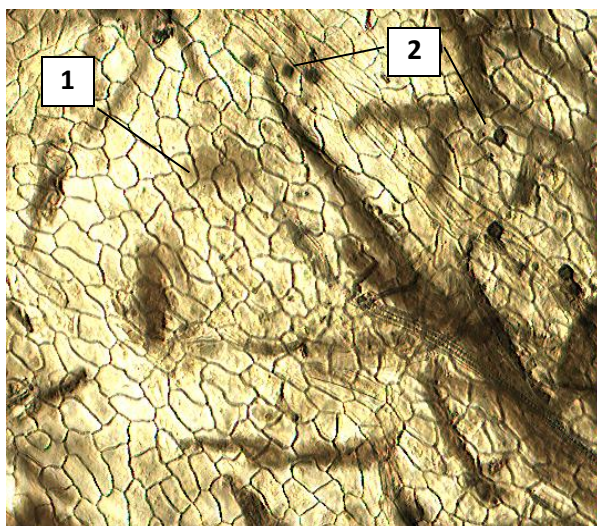


Рис.22. Верхний эпидермис прилистника (x100). Обозначения: 1 – слабоизвилистые клетки; 2- друзы оксалата кальция.



Рис.23. Нижний эпидермис прилистника (x200). Обозначения: 1 – клетки извилистые; 2- устьица.

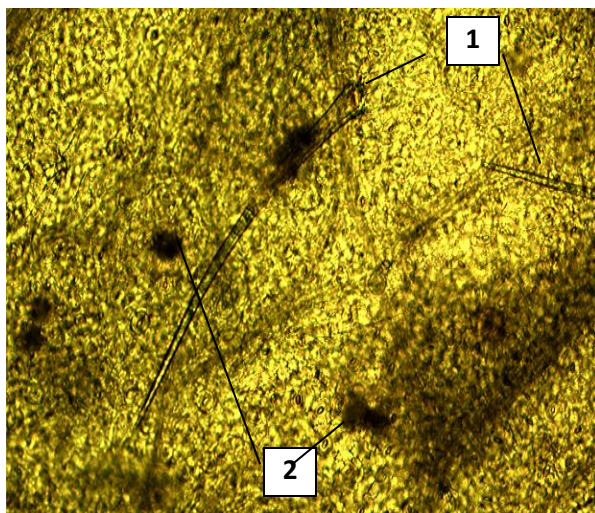


Рис.24. Нижний эпидермис прилистника (x100). Обозначения: 1 – простые волоски; 2 - друзы оксалата кальция.

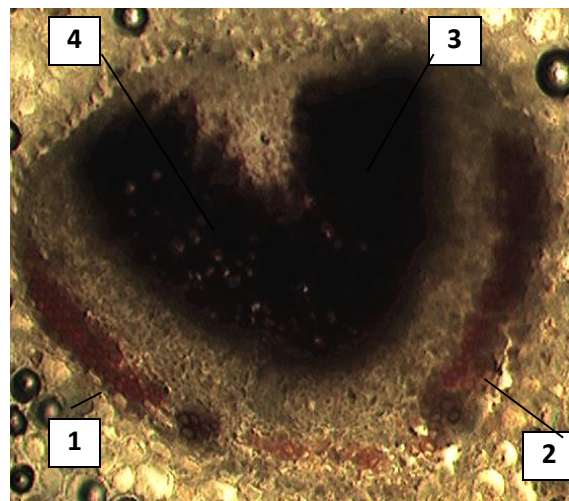


Рис.25. Поперечный срез черешка (x200). Обозначения: 1 – эпидерма; 2- кора; 3-центральный цилиндр; 4- проводящий пучок.

Анатомо-микродиагностические признаки цветка

Эпидермис верхней стороны лепестков цветка представлен многоугольными вытянутыми клетками, плотно прилегающими друг к другу, имеются устьица аномоцитного типа, многочисленные простые волоски, друзы оксалата кальция, пыльцевые зерна (рис. 26 – 31).

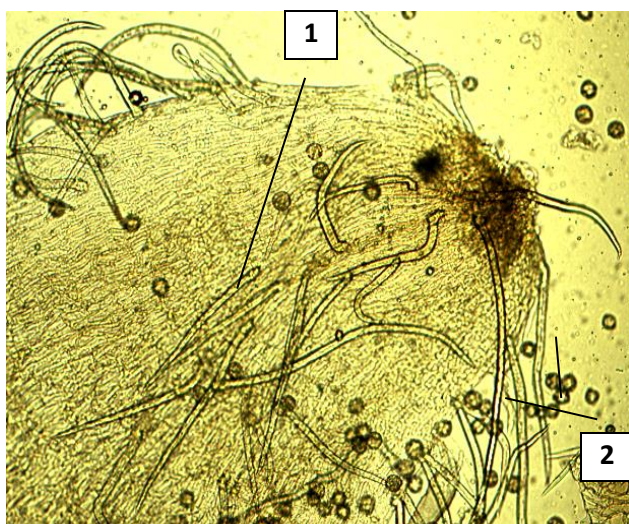


Рис. 26. Фрагмент цветка (x100). Обозначения: 1 – простые волоски; 2 – пыльца.

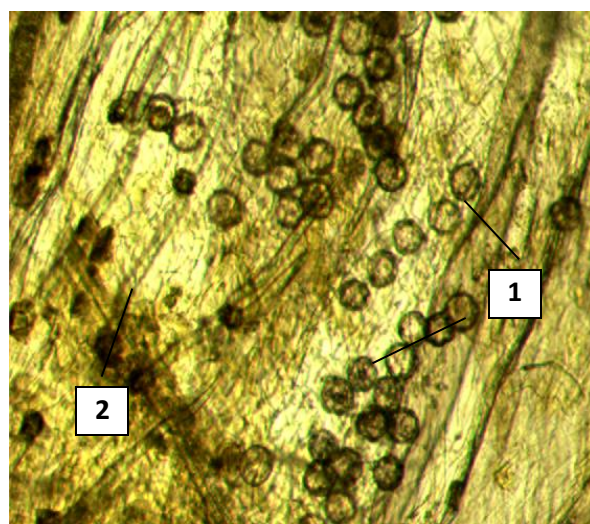


Рис. 27. Эпидермис цветка (x200). Обозначения: 1- пыльцевые зерна; 2- волоски.

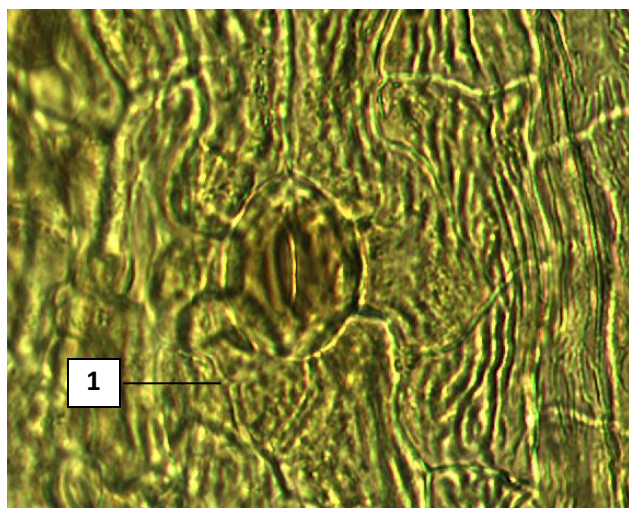


Рис. 28. Эпидермис цветка (x400).
Обозначения: 1 – устьице.

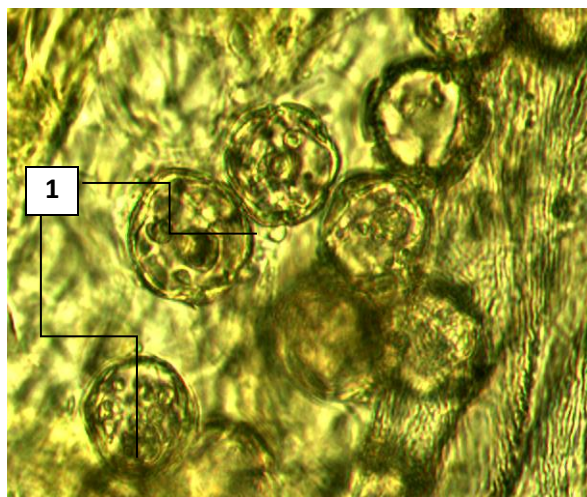


Рис. 29. Эпидермис цветка (x400).
Обозначения: 1- пыльцевые зерна.

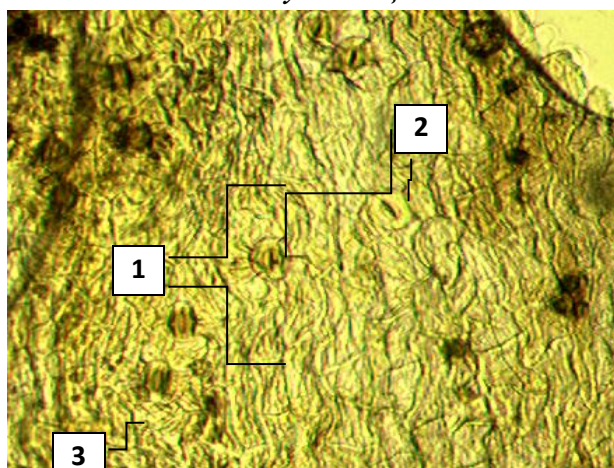


Рис. 30. Эпидермис цветка (x100).
Обозначения: 1-вытянутые клетки, 2- устьица; 3 – друзы.

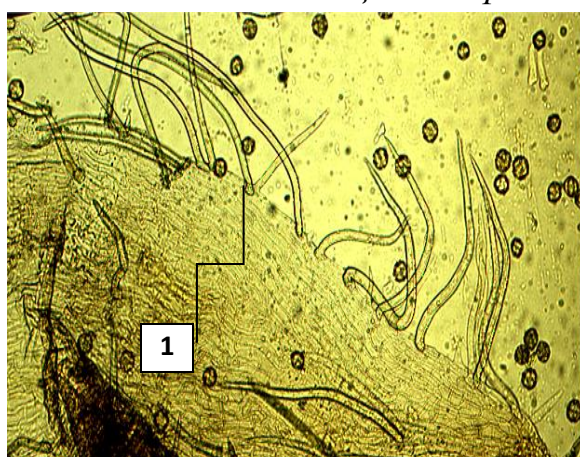


Рис. 31. Эпидермис цветка (x100).
Обозначения: 1- по краю многочисленные простые волоски.

Таким образом, к диагностически значимым признакам для травы кровохлебки лекарственной можно отнести: клетки эпидермиса с утолщенной стенкой – слабоизвилистые на верхней стороне и извилистые на нижней стороне листа, клетки вытянутой формы вдоль главной жилки; амфистоматический тип листа с устьицами аномоцитного типа; простые и головчатые волоски на нижней стороне листа; многочисленные друзы оксалата кальция вдоль жилок; вместилище с желтым содержимым с нижней стороны листа; многоугольные клетки эпидермиса лепестков цветка с многочисленными простыми волосками; устьицами аномоцитного типа, друзы оксалата кальция, характерные пыльцевые зерна.

Порошок травы: под микроскопом видны обрывки эпидермиса с характерными извилистыми утолщенными стенками, устья аномоцитного типа, простые и головчатые волоски эпидермиса, друзы оксалата кальция, вместилище с желтым содержимым, многочисленные простые волоски цветка, пыльцевые зерна, обрывки паренхимы и сосудов.

Для изучения микродиагностических признаков корневищ и корней кровохлебки лекарственной их предварительно замачивали в спирто-глицериновой смеси и выдерживали для размягчения. Затем делали тонкие срезы, окрашивали раствором флороглюцина с концентрированной соляной кислотой, для выделения механических элементов тканей. В результате установили наличие следующих диагностических признаков (рис.32 – 43).

Корневище кровохлебки: снаружи корневище покрыто 4–5 рядами клеток, образующих пробку; первичная кора; сплошное камбиальное кольцо из 2-5 рядов клеток; мощные радиальные лучи около 40; механические клетки в ксилеме напоминают годовичные кольца и располагаются в 2–4 слоя; сердцевина хорошо выражена и представлена крупными паренхимными клетками (рис. 32 – 37).

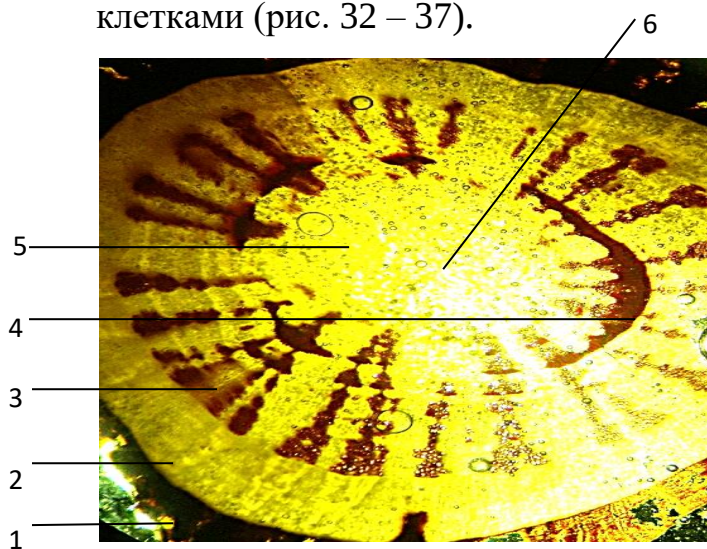


Рис. 32. Корневище кровохлебки: (x100). Обозначения: 1 – перидерма; 2 – кора; 3 – сердцевидные лучи; 4 – камбиальное кольцо; 5 – центральный цилиндр; 6 – сердцевина.

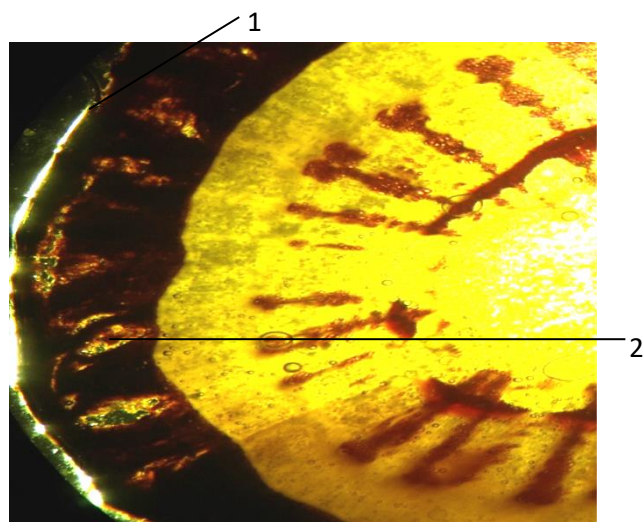


Рис. 33. Корневище кровохлебки: (x100). Обозначения: 1 – пробка, состоящая из 4-5 рядов клеток; 2 – межклетники.

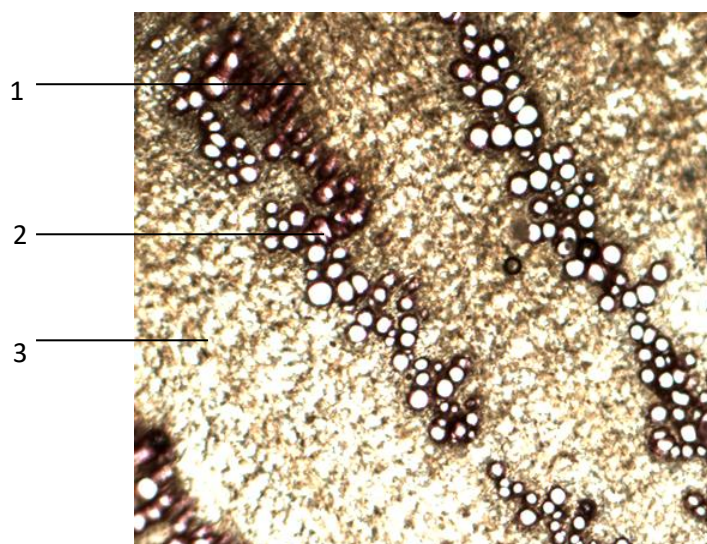


Рис. 34. Корневище кровохлебки (x100). Обозначения: 1 – радиальные лучи; 2 – ксилема; 3 – группы механических волокон.

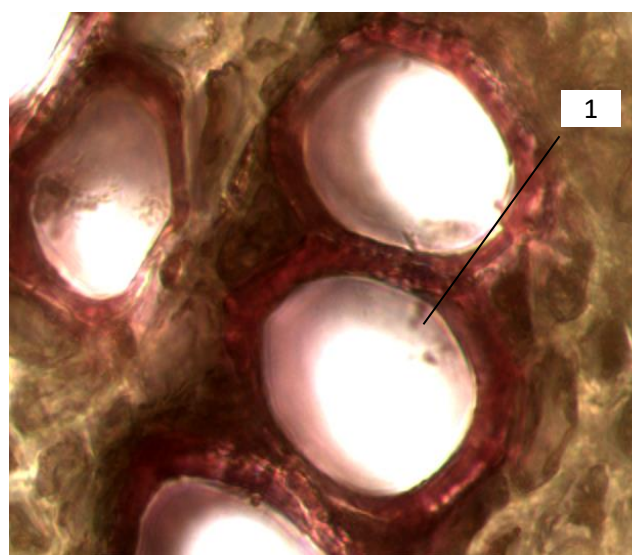


Рис. 35. Корневище кровохлебки (x400). Обозначения: 1 – крупные сосуды ксилемы.

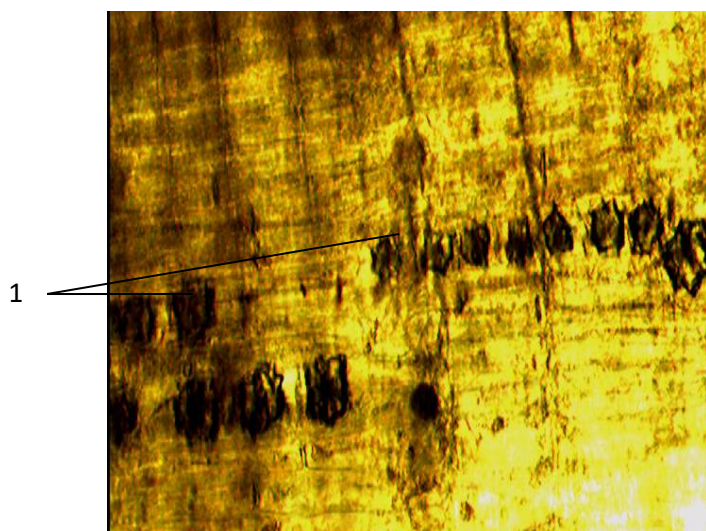


Рис. 36. Корневище кровохлебки (x100). Обозначения: 1 – друзы.

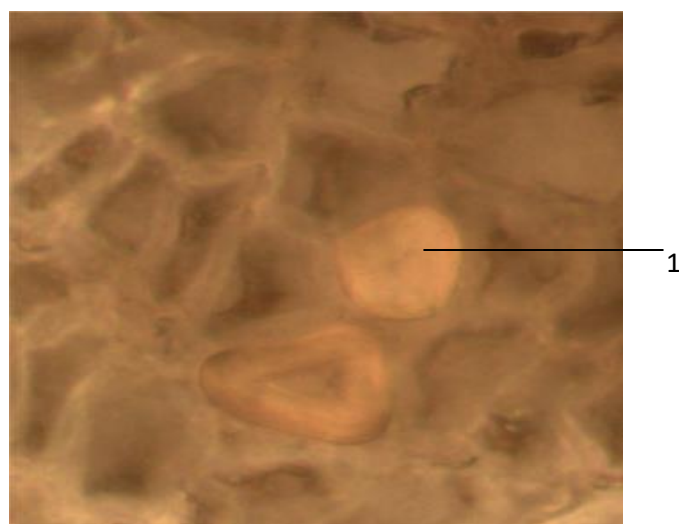


Рис. 37. Корневище кровохлебки: (x400). Обозначения: 1 – крахмальные зерна.

Корни кровохлебки лекарственной вторичного строения: пробка, первичная кора, центральный цилиндр; в центральном осевом цилиндре формируется камбий; лубяные волокна со слабоутолщенными неодревесневшими оболочками расположены в коре группами по 2-3; радиальные ряды паренхимы изгибаются под перидермой и образуют межклетники; камбиальное кольцо неровное, но хорошо выраженное,

состоит из 2–5 слоев клеток; ксилема также сильно паренхиматизирована; сосуды образуют небольшие группы, в которых можно проследить заложение сосудов по годам вегетации; в корне формируются мощные вторичные радиальные лучи; вся паренхима корня содержит много крахмальных зерен, а друзы появляются лишь с переходом особей в имматурное состояние; в центре корня располагаются сосуды первичной ксилемы; в центре корня иногда встречаются участки опробковевших тканей – происходит отмирание клеток и в них увеличивается число друз; возрастные изменения в корне сводятся к увеличению толщины перидермы, вторичных флоэмы и ксилемы (рис.38 - 43).

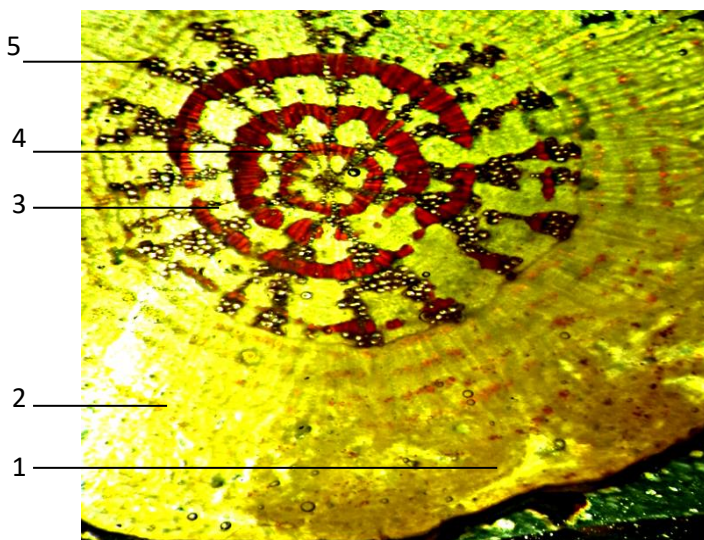


Рис. 38. Корень кровохлебки вторичного строения (x100). Обозначения: 1 – пробка; 2 – первичная кора; 3 – камбиальное кольцо; 4 – центральный цилиндр; 5 – радиальные лучи.

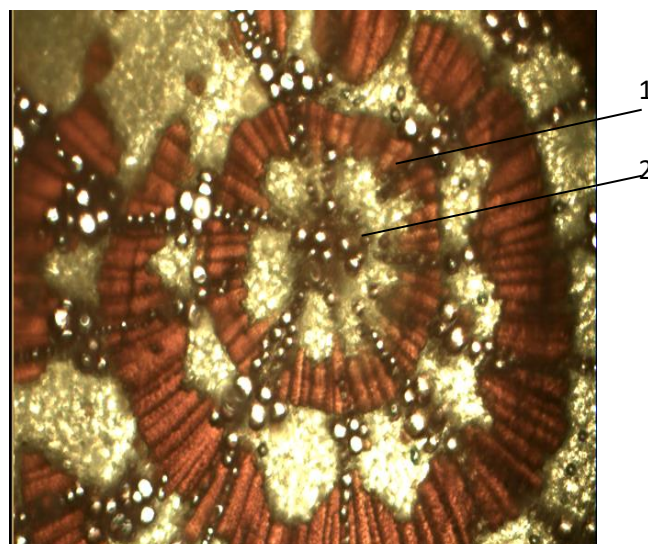


Рис.39. Корень кровохлебки (x100). Обозначения: 1- вторичная флоэма; 2 – вторичная ксилема.

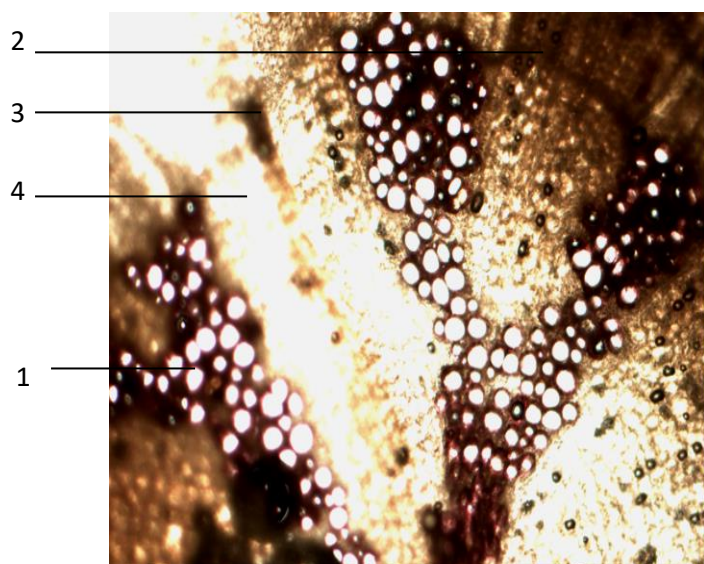


Рис. 40. Корень кровохлебки (x100).
Обозначения: 1 – сосуды ксилемы; 2 – камбиальное кольцо; 3 – вторичные радиальные лучи; 4 – крахмальные зерна.

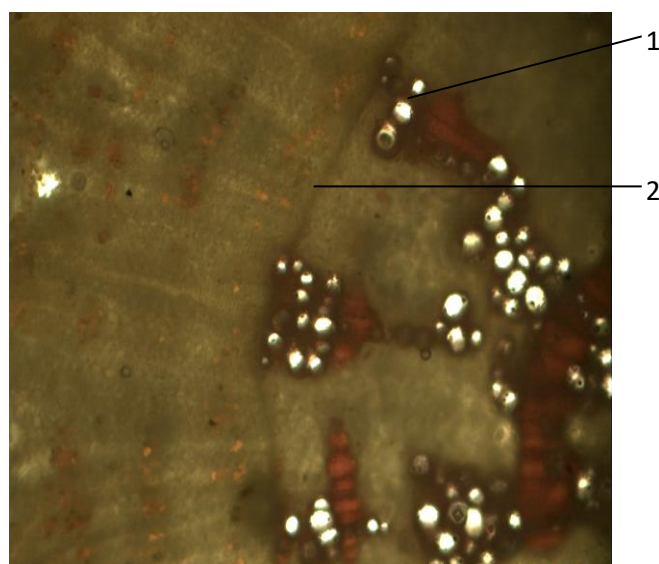


Рис.41. Корень кровохлебки (x100).
Обозначения: 1 – группы лубяных волокон; 2 – камбиальное кольцо.

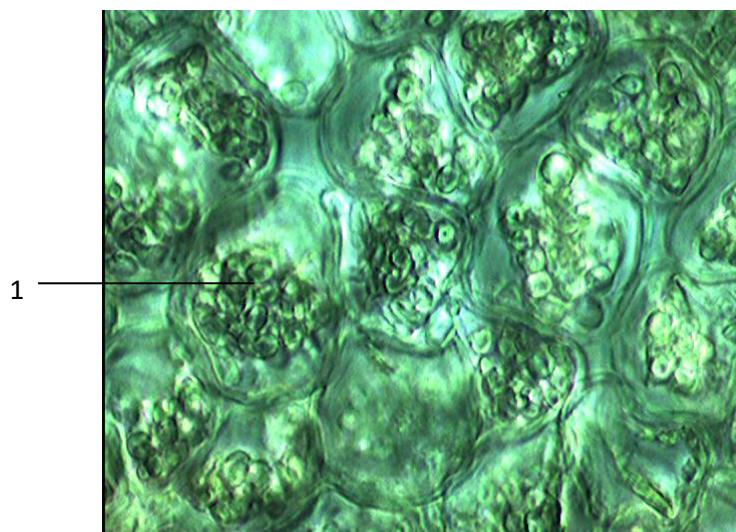


Рис.42. Корень кровохлебки (x400).
Обозначения: 1 – крахмальные зерна

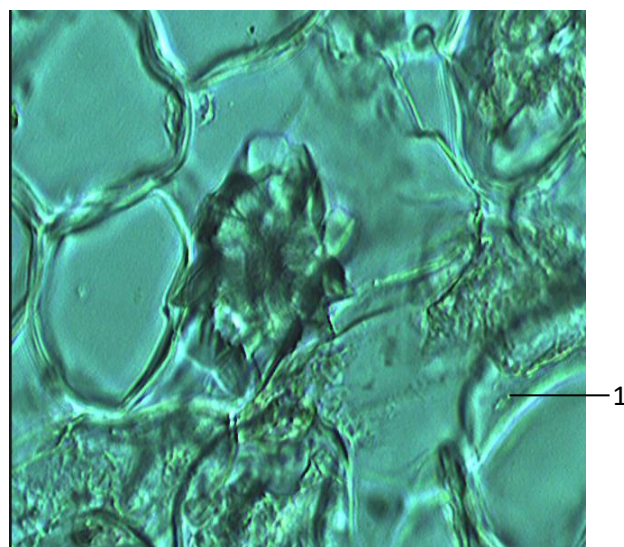


Рис.43. Корень кровохлебки (x400).
Обозначения: 1 – друзы оксалата кальция.

Таким образом, проведено сравнение описанных в существующей нормативной документации [130] микродиагностических признаков корневищ и корней кровохлебки лекарственной с полученными нами более подробными данными микроскопического анализа. В результате к диагностически значимым признакам корневищ и корней кровохлебки

лекарственной можно отнести следующие: у корневища хорошо выраженную сердцевину, представленную крупными паренхимными клетками; снаружи корневище покрыто 4–5 рядами клеток, образующих пробку; выражена кора; сплошное камбиальное кольцо из 2–5 рядов клеток; мощные радиальные лучи; механические клетки в ксилеме напоминают годовичные кольца. Корни кровохлебки имеют вторичное строение: выражены пробка, кора, центральный цилиндр; в центральном цилиндре формируется камбий; под перидермой располагается вторичная флоэма с группами ситовидных трубок в мощной лубяной паренхиме; имеются межклетники; камбиальное кольцо неровное, но хорошо выраженное; ксилема сильно паренхиматизирована; мощные вторичные радиальные лучи; много крахмальных зерен; в центре корня располагаются сосуды первичной ксилемы.

Измельченное сырье и порошок. При рассмотрении микропрепарата видны обрывки тонкостенной паренхимы, друзы оксалата кальция, мелкие крахмальные зерна; обрывки сетчатых, лестничных, спиральных сосудов; обрывки либриформа, лубяных волокон.

Микроскопический анализ использован нами не только для качественной характеристики сырья кровохлебки, но также произведена количественная оценка диагностически значимых признаков (ДЗП) сырья кровохлебки лекарственной по методике, предложенной Потаниной О.Г. и Самылиной И.А. [104]. Для анализа использовали сырье травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, предварительно измельченных до состояния порошка (гл.2.2.2). Готовый препарат помещали под микроскоп и подсчитывали количество диагностически значимых и незначимых частиц в сырье кровохлебки лекарственной. В качестве значимых учитывали основные анатомо-диагностические значимые признаки травы, корневищ и корней кровохлебки. Результаты исследования представлены в таблице 2. Среднее значение количества диагностически значимых признаков травы кровохлебки лекарственной составило $36,52 \pm 3,47\%$, а корневищ и корней -

51,85±3,69 %, что важно при оценке качества сырья и сохранности в нем основных групп БАВ.

Таблица 2

**Метрологическая характеристика диагностически значимых признаков
травы, корневищ и корней кровохлебки**

Объект исследования	n	$\bar{X}_{cp}$	S_x	P, %	t(P,f)	ϵ_α	$\epsilon\%$	$\bar{X}_{cp} \pm \epsilon_\alpha$
Трава	15	36,52	1,614	95	2,15	3,47	9,50	36,52±3,47
Корневища и корни	15	51,85	1,716	95	2,15	3,69	7,11	51,85±3,69

Таким образом, изучены и выявлены характерные диагностически значимые макроскопические и микроскопические признаки травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, необходимые для определения подлинности сырья.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3:

1. Проведены ресурсоведческие исследования кровохлебки лекарственной в некоторых районах Республики Башкортостан и определены ее запасы. Установлено, что объемы возможных ежегодных заготовок составляют для травы кровохлебки от 0,032 т до 0,843 т, а корневищ и корней - от 0,008 т до 0,172 т в пересчете на воздушно-сухую массу сырья.
2. В результате проведения макроскопического анализа сырья кровохлебки лекарственной выявлены характерные внешние признаки, позволяющие идентифицировать сырье: для травы – это морфологические особенности стеблей, листьев, цветков и соцветий, их окраска, запах; для корневищ и корней – особенности и окраска наружной пробки, характер и окраска излома.
3. Изучены и выявлены характерные диагностически значимые микроскопические признаки травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, необходимые для определения подлинности сырья.

4. Для травы кровохлебки характерны: клетки эпидермиса – слабоизвилистые с четко видными утолщениями на верхней стороне и извилистые с утолщенной стенкой на нижней стороне листа, вытянутой формы вдоль главной жилки; амфистоматический тип листа с устьицами аномоцитного типа; простые и головчатые волоски на нижней стороне листа; многочисленные друзы оксалата кальция вдоль жилок; вместилище с желтым содержимым с нижней стороны листа; многоугольные клетки эпидермиса лепестков цветка с многочисленными простыми волосками; в эпидермисе цветка устьица аномоцитного типа, друзы оксалата кальция, характерные пыльцевые зерна.

5. Для корневища кровохлебки характерна хорошо выраженная сердцевина, представленная крупными паренхимными клетками; снаружи корневище покрыто 4–5 рядами клеток, образующих пробку; первичная кора; сплошное камбиальное кольцо из 2–5 рядов клеток; мощные радиальные лучи; механические клетки в ксилеме напоминают годовичные кольца. Корни кровохлебки имеют вторичное строение, выражены: пробка, первичная кора, центральный цилиндр; в центральном цилиндре формируется камбий; под перидермой располагается вторичная флоэма с группами ситовидных трубок в мощной лубяной паренхиме; имеются межклетники; камбиальное кольцо неровное, но хорошо выраженное; ксилема сильно паренхиматизирована; мощные вторичные радиальные лучи; много крахмальных зерен; в центре корня располагаются сосуды первичной ксилемы.

6. Установлено среднее значение количества диагностически значимых признаков травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, которые служат количественной характеристикой их проявляемости в сырье.

7. Определены показатели подлинности травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, необходимые для включения их в проекты фармакопейных статей фармакопейных статей «Кровохлебки корневища и корни», «Кровохлебки трава».

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНЫХ И ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*SANGUISORBA OFFICINALIS* L.)

Для внедрения в медицинскую практику новых лекарственных средств, а также новых видов лекарственного растительного сырья, необходимо, кроме доклинических и клинических испытаний, проводить исследования, позволяющие разработать показатели их качества и подробно изучить химический состав лекарственного растительного сырья (акты внедрения № 1-4, приложение № 1-4).

4.1. Определение товароведческих показателей

В аналитических пробах образцов пяти серий сырья, изготовленных в лабораторных условиях, определяли числовые показатели качества сырья кровохлебки лекарственной. Образцы сырья хранили в сухом, чистом, хорошо вентилируемом помещении, не зараженном амбарными вредителями, без прямого попадания солнечных лучей. По методикам ГФ-ХІ - ХІІІ изданий определяли числовые показатели влажности, золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, содержание примесей [35, 36, 37, 38, 39]. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Ситовой анализ сырья кровохлебки лекарственной показал, что сырье различной степени измельченности, поэтому определялись частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, для цельного сырья; частицы, не проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм - для измельченного сырья и измельченные частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 0,25 мм; для порошка - измельченные частицы, не проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм и частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 0,18 мм. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Показатели качества сырья кровохлебки лекарственной

Наименование показателя	Пределы значений показателей	Норма содержания для включения в НД
Влажность: - корневища и корни - трава	8,73 - 12,14% 7,95 - 12,36%	не более 13% не более 13%
Зола общая: - корневища и корни - трава	9,86% - 11,43% 8,42% - 9,28%	не более 12% не более 10%
Зола, н/р в 10% растворе HCl: - корневища и корни - трава	2,17% - 4,20 % 0,76% - 1,52%	не более 5% не более 2%
Количество частиц: - <u>корневища и корни</u> : <i>цельное сырье</i> : - частиц проходящих сквозь сито с d=2 мм <i>измельченное сырье</i> : - частиц, не проходящих сквозь сито с d=5 мм - частиц, проходящих сквозь сито с d=0,25 мм <i>порошок</i> : - частиц, не проходящих сквозь сито с d=2 мм - частиц, проходящих сквозь сито с d=0,18 мм - <u>трава</u> <i>цельное сырье</i> : - частиц проходящих сквозь сито с d=2 мм <i>измельченное сырье</i> : - частиц, не проходящих сквозь сито с d=7 мм - частиц, проходящих сквозь сито с d=0,5 мм <i>порошок</i> : - частиц, не проходящих сквозь сито с d=2 мм - частиц, проходящих сквозь сито с d=0,18 мм	2,94% - 4,78% 5,67% - 9,15% 4,89% - 9,56% 5,24% - 9,32% 4,97% - 9,13% 4,36% - 7,68% 6,03% - 9,51% 4,38% - 9,65% 6,54% - 9,78% 5,84% - 9,46%	не более 5% не более 10% не более 10% не более 10% не более 10% не более 8% не более 10% не более 10% не более 10% не более 10%

Примеси:		
- корневищ и корней, почерневших или побуревших в изломе	6,48% - 9,17%	не более 10%
- стеблей (в том числе отделенных при анализе)	25,58% - 49,26%	не более 50%
<i>органические</i>		
- корневища и корни	0,23% - 0,91%	не более 1%
- трава	0,31% - 0,96%	не более 1%
<i>минеральные</i>		
- корневища и корни	0,18% - 0,87%	не более 1%
- трава	0,27% - 0,93%	не более 1%

По наличию частиц сырья, изменивших окраску, или присутствию растений, не относящихся к определенной морфологической группе оценивали органические примеси, а наличие частиц пыли или песка характеризовало минеральные примеси. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Для сырья кровохлебки лекарственной были определены также показатели микробиологической и радиологической чистоты. Микробиологический анализ проводился при определении количественного содержания жизнеспособных бактерий и грибов, а также по выявлению микроорганизмов, которые не должны присутствовать в нестерильных лекарственных средствах (*Escherichia coli*). Исследование проводилось двухслойным агаровым методом (табл. 4). Было установлено, что исследуемые образцы сырья кровохлебки лекарственной соответствуют требованиям ОФС 1.2.4.0002.15 (гл. 2.2.2) категория 4А.

Таблица 4

Показатели определения микробиологической чистоты кровохлебки

Показатели микробиологической чистоты	Нормы содержания	Объект исследования	
		Трава	Корневища и корни
Число аэробных бактерий в 1 г (мл)	не более 10^7	1×10^6	4×10^6
Число грибов в 1 г (мл)	не более 10^5	14×10^3	18×10^3

Наличие <i>Eshcerichia coli</i> в 1г (мл)	не более 10^2	Отс.	Отс.
Наличие <i>Salmonella</i> в 1г (мл)	Отс.	Отс.	Отс.
Наличие <i>Pseudomoas aeruginosa</i> в 1г (мл)	Отс.	Отс.	Отс.

Радиологический анализ проводили на приборе – радиометре β и γ излучений «Прогресс». Для исследования сырье кровохлебки закладывали в кюветы и определяли дозу излучения в течение 5,5 часов. Кривые спектра травы, корневищ и корней кровохлебки, полученные в результате подсчетов, подставлялась в библиотеку спектров заранее известных излучателей (табл.5). На основании результатов радиологического контроля установлено, что сырье кровохлебки лекарственной соответствует требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 п.п.1.6.10 по содержанию радионуклидов и не превышает уровня, а α , β и γ загрязнители отсутствуют.

Таблица 5

Показатели радиологического контроля кровохлебки

Показатели радиологической чистоты	Объект исследования	
	Трава	Корневища и корни
Удельная активность Sr-90, Бк/кг (л), норма <200	32,5±1,8	39,4±1,9
Удельная активность Cs-137, Бк/кг (л), норма <400	40,7±2,0	46,1±2,3
Показатель соответствия 'В'	0,12±0,04	0,18±0,07
Результат анализа	Соответ.	Соответ.

4.2. Качественный анализ травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной

Несмотря на то, что корневища и корни кровохлебки давно применяются в официальной медицине, спектр их применения в медицине ограничивается в основном вяжущим, противовоспалительным и кровоостанавливающим действием за счет содержания дубильных веществ. Однако, наличие и других групп биологически активных соединений может расширить возможности ее использования в медицине. Кроме того, надземная часть кровохлебки вообще малоизученна, поэтому более детальное изучение химического состава травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной представляет интерес для разработки объективных методов стандартизации сырья [101, 107].

Для установления присутствия в сырье кровохлебки лекарственной различных групп биологически активных соединений использовали проведение качественных реакций и хроматографический анализ водных и спиртовых извлечений, а идентификацию обнаруженных веществ проводили с использованием спектральных методов исследования. Схема изучения качественного состава БАВ сырья кровохлебки лекарственного представлена на рисунке 44.

Избирательную экстракцию сырья кровохлебки лекарственной проводили для более детального изучения фенольного комплекса в аппарате Сокслета. Получали водно-спиртовое извлечение (70%) в соотношении 1:10, затем его упаривали и к остатку добавляли горячую воду. Для удаления липофильных веществ, проводили обработку гексаном, а далее осуществляли последовательную экстракцию хлороформом, этилацетатом и бутанолом. Полученные извлечения анализировали на присутствие фенольных соединений. При изучении агликонов флавоноидов спиртовые извлечения из кровохлебки лекарственной подвергали гидролизу и экстрагировали диэтиловым эфиром. Отдельно изучали жирорастворимый комплекс БАВ.



Рисунок 44. Схема изучения качественного состава БАВ сырья кровохлебки

4.2.1. Обнаружение БАВ с помощью качественных реакций

Отдельные группы биологически активных соединений травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной обнаруживали качественными реакциями (табл. 6).

Таблица 6

Результаты качественных реакций на отдельные группы БАВ кровохлебки лекарственной

Группа БАВ	Условия проведения	Аналитический эффект	Результат реакции	
			трава	корневища и корни
Полисахариды	1. Реакция с 5 мл водного извлечения и 20 мл 95% спирта этилового, нагревание 1-2 минуты на водяной бане.	1. Образование хлопьев, а при стоянии осадка.	+	+
Аминокислоты	1. Реакция с 2 мл извлечения и 2 мл 0,1% раствора нингидрина, нагревание на водяной бане 2-3 мин, охлаждение.	1. Красно-фиолетовое окрашивание.	+	+
Алкалоиды	1. Реакция с 2 мл подкисленного извлечения и раствором танина.	1. Образование белого осадка.	-	-
	2. Реакция с 2 мл извлечения и раствором пикриновой кислоты.	2. Образование желтого осадка.	-	-
	3. Реакция с 2 мл извлечения и реактивом Зоненштейна.	3. Образование желтоватого осадка	-	-

Сапонины	1.5 мл водного извлечения встряхивали; 2. Реакция Лафона: к 2 мл извлечения добавляли 1 мл кислоты серной конц., 1 мл спирта этилового и 1 каплю 10%-ного р-ра серно-кислого железа, нагревали 2-3 мин.	1.Образование обильной и стойкой пены. 2. Образование сине-зеленого окрашивания.	+	+
Антрагликозиды	1.Реакция с 2 мл извлечения и несколькими каплями 10% р-ра щелочи; 2. Реакция Борн-трегера: к 4 мл извлечения добавляли разв.к-ты хлористоводородной до слабо-кислой реакции, 4 мл эфира и к эфирному слою приливали 4 мл р-ра аммиака.	1.Образование вишнево-красного окрашивания. 2.Эфирный слой окрашивается в слабо-желтый цвет, затем появляется красное окрашивание	- -	- -
Флавоноиды	1. Реакция с 2 мл спирт. извлечения и 3-4 мл 2% спирт. р-ра хлорида алюминия; 2. Реакция с 2 мл спирт. извлечения и 5-7 кап. конц. к-ты хлористоводородной и 10-15 мг метал. цинка, нагревали 2-3 мин	1.Образование желто-зеленого окрашивания (флавоны, флавонолы). 2.Образование розовой окраски (флавоны, флавонолы).	+	+

	на водяной бане. 3. Реакция с 2 мл извлечения и раст вором аммиака.	3. Образование сине-фиолетово- го окрашивания (антоцианы).	+	-
Кумарины	1. Лактонная проба с раство- ром щелочи. 2. Реакция азосочетания.	1. Образование желтого окраши- вания. 2. Образование вишневого или крово-красно- го окрашивания.	+	+
Хромоны	1. Реакция с 2 мл извлечения и по каплям конц. кислотой серной.	1. Образование лимонно-желто- го окрашивания.	-	+
Дубильные вещества	1. Реакция с 2 мл извлечения и по каплям 1% раст- вором желатина; 2. Реакция с 2 мл извлечения и 2-3 каплями раствора железо-аммоние- вых квасцов.	1. Образование помутнения, ис- чезающего при добавлении из- бытка желатина; 2. Образование черно-синего окрашивания на гидролизуемые ДВ, переходяще- го в черное.	+	+

В результате проведения качественных реакций (гл. 2.2.3), в извлечениях травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной обнаружены следующие группы БАВ: полисахариды, аминокислоты, сапонины, флавоноиды (флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванололы, в траве - антоцианы), кумарины, дубильные вещества, в подземных органах хромоны.

4.2.2. Хроматографический анализ и спектральные исследования

Те группы БАВ, которые не смогли обнаружить с помощью качественных реакций, изучали методами хроматографического анализа. Обнаружение веществ проводили методом тонкослойной хроматографии (на пластинках («Silufol UV-254», «Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ»).

Согласно схеме изучения качественного состава БАВ проводили последовательное исследование водорастворимых веществ, переходящих в водное извлечение; веществ, хорошо извлекаемых из сырья водно-спиртовыми растворами и жирорастворимых веществ, извлекаемых гексаном.

Органические кислоты и аскорбиновая кислота

Разделение органических кислот проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А. Из травы, корневищ и корней кровохлебки готовили водное извлечение: около 1,0 грамма измельченного сырья кровохлебки лекарственной, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2,0 мм, заливали 250 мл воды очищенной и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч, затем извлечение охлаждали и фильтровали. Экспериментальным путем подбирались хроматографическая система, в которой происходило наилучшее разделение органических кислот. Были использованы следующие системы: №1 - н-бутанол-муравьиная кислота-вода (5:0,5:2); №2 - н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5); №3 - этилацетат-муравьиная кислота-вода (3:1:1); №4 - этилацетат-уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (100:11:11:25). Использовали спиртовый раствор бромкрезолового зеленого 0,2% в качестве проявителя. В качестве стандартных образцов применяли 0,2% водные растворы щавелевой, винной, аскорбиновой, лимонной и яблочной кислот. Наилучшее разделение органических кислот наблюдалось в системе №4. На хроматограммах появлялись желтые пятна на синем фоне, что свидетельствовало о присутствии органических кислот. Вид полученных хроматограмм

представлен на рисунке 45. В результате в водных извлечениях травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной обнаружены такие органические кислоты, как щавелевая, винная, лимонная, аскорбиновая и яблочная.

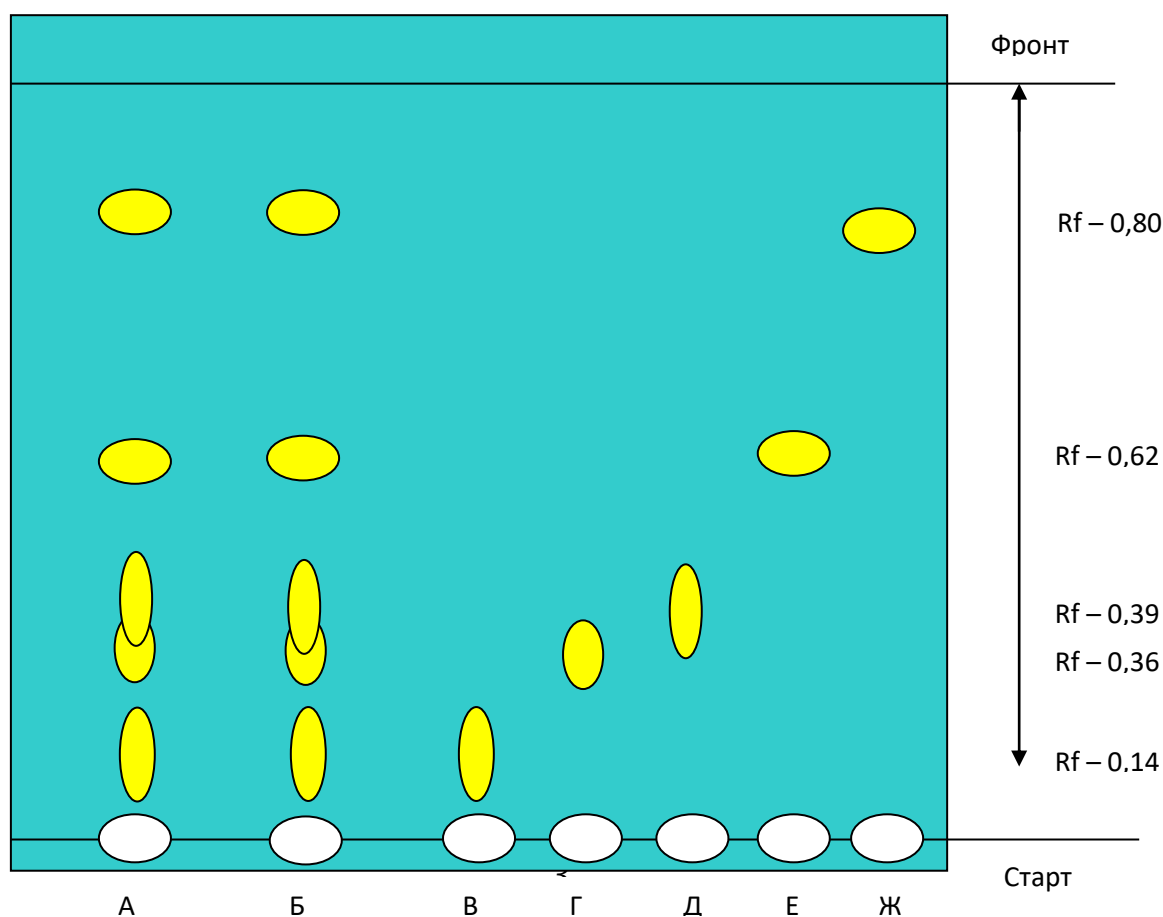


Рисунок 45. Схема хроматограммы органических кислот кровохлебки лекарственной: А – трава кровохлебки, Б – корневища и корни кровохлебки, В – щавелевая кислота, Г – винная кислота, Д – лимонная кислота, Е – аскорбиновая кислота, Ж – яблочная кислота.

Свободные сахара

Хроматографическое обнаружение свободных сахаров проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV- 254». Для этого готовили водно-спиртовое извлечение: около 1,0 г измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 50 мл 50 % спирта этилового и

нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа с обратным холодильником. Смесь охлаждали и фильтровали. В качестве стандартных образцов использовали 0,05% спиртовые растворы (50%) глюкозы, фруктозы, арабинозы, галактозы и рамнозы. Хроматографирование вели в системе растворителей «н-бутанол – ацетон – вода» в соотношении 4:5:1. Длина пробега фронта растворителей 15 см. Хроматограммы вынимали из камеры, высушивали и обрабатывали анилинфталатным реактивом, затем прогревали при температуре 100-105°C в сушильном шкафу. При этом, на хроматограмме проявлялись пятна красновато-коричневого цвета, что свидетельствовало о присутствии моносахаридов (рис.46).

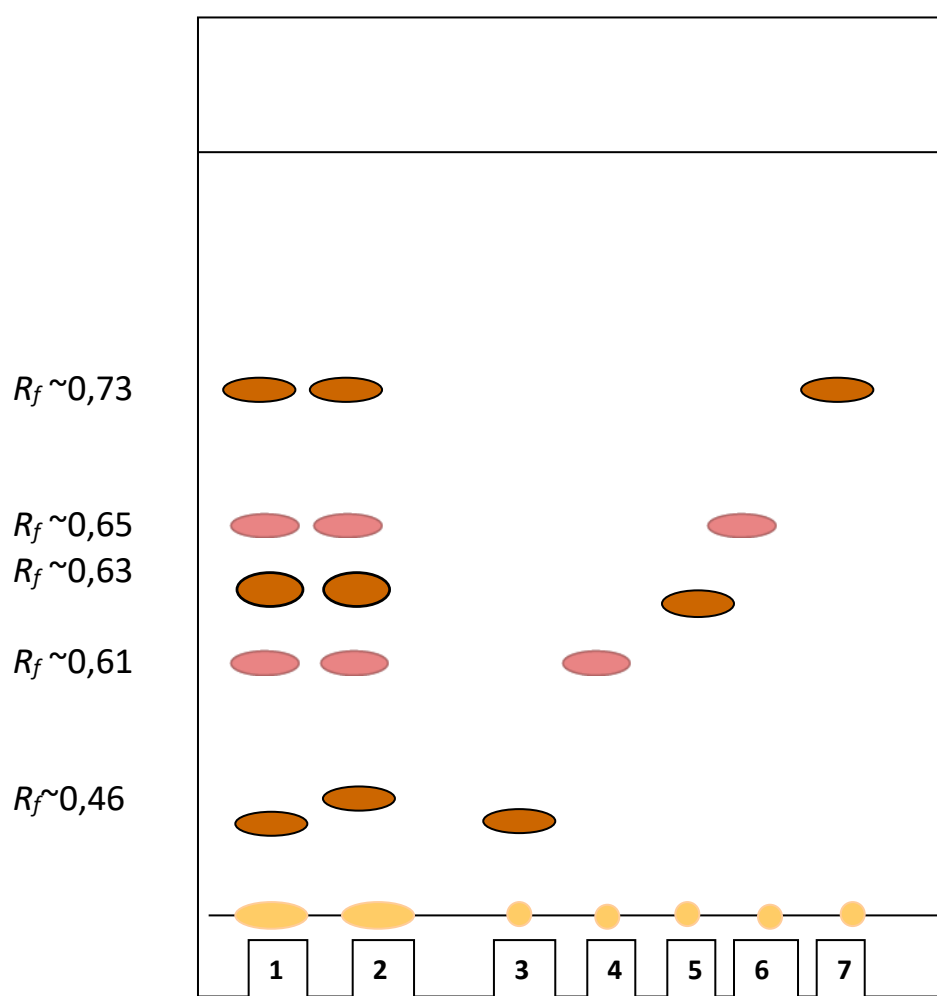


Рис. 46. Схема хроматограммы сахаров кровохлебки лекарственной:
 1 – извлечение из корневищ и корней; 2 – извлечение из травы; 3 – галактоза;
 4 – глюкоза; 5 – фруктоза; 6 – арабиноза; 7 – рамноза.

В результате установлено присутствие в анализируемых образцах кровохлебки лекарственной веществ со значениями R_f (0,46; 0,61; 0,63; 0,65; 0,73). Сравнение окраски пятен, их расположения на хроматограммах с веществами свидетелями позволило установить присутствие веществ углеводной природы – галактозы, глюкозы, фруктозы, арабинозы, рамнозы.

Сапонины

Проведенные предварительно качественные реакции подтвердили присутствие сапонинов в сырье кровохлебки лекарственной. Следующим этапом было проведение хроматографического анализа хлороформных и спиртовых извлечений из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, что дает возможность идентифицировать сапоненины. Исследования осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» и «Silufol». Разделение веществ проводили в различных системах растворителей: «гексан-этилацетат» (2:1); «хлороформ-этилацетат» (9:1); «петролейный эфир-хлороформ - кислота уксусная» (10:4:0,4). После хроматографирования пластинки обрабатывали 20 % раствором кислоты серной и проводили нагревание при температуре 108-110°C в сушильном шкафу в течение 8-10 минут. При этом наблюдали, что наилучшее разделение происходило в системе: «петролейный эфир - хлороформ - кислота уксусная» (10:4:0,4), пятна исследуемых образцов кровохлебки и веществ-свидетелей на хроматограммах окрашивались в розово-вишневый цвет, переходящий в голубой, что свидетельствовало о присутствии веществ тритерпеновой природы [118]. Результаты исследования представлены в таблице 7.

Экспериментальные исследования, проведенные в сравнении с достоверными образцами свидетелей тритерпеноидов, показали, что в хлороформных и спиртовых извлечениях, полученных из травы кровохлебки, присутствует урсоловая кислота, а в извлечениях из корневищ и корней кровохлебки - олеаноловая кислота.

Показатели хроматографического анализа сапонинов кровохлебки в системе петролейный эфир-хлороформ - кислота уксусная (10:4:0,4)

Исследуемый образец	Значения R_f зон адсорбции	
	«Sorbfil»	«Silufol»
Хлороформное извлечение из корневищ и корней кровохлебки	0,27	0,16
Спиртовое извлечение и корневищ и корней кровохлебки (70%)	0,26	0,17
Хлороформное извлечение из травы кровохлебки	0,23	0,13
Спиртовое извлечение из травы кровохлебки (70%)	0,25	0,14
Олеаноловая кислота	0,27	0,16
Урсоловая кислота	0,23	0,13

Далее для подтверждения результатов хроматографического анализа сапонинов кровохлебки лекарственной проводили спектральные исследования. К полученному спиртовому извлечению сапонинов из сырья кровохлебки лекарственной прибавляли кислоту серную концентрированную в соотношении 1:4, выдерживали 10 минут и определяли оптическую плотность на спектрофотометре Shimadzu в области 220–450 нм (раствор сравнения – кислота серная концентрированная) [118]. Полученные УФ-спектры травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной и стандартного раствора кислоты олеаноловой представлены на рисунке 47.

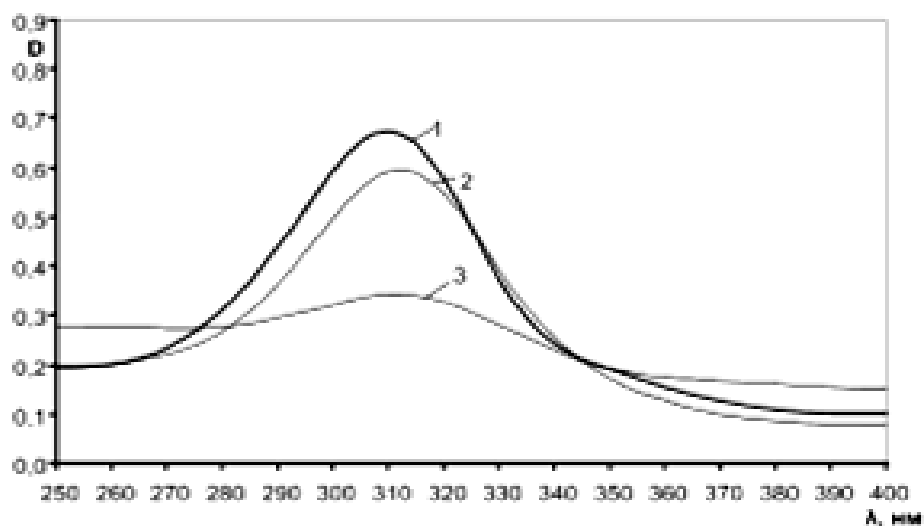


Рисунок 47. Спектры поглощения кислоты олеаноловой (1), корневищ и корней кровохлебки (2), травы кровохлебки (3).

У сапонинов корневищ и корней кровохлебки лекарственной и стандарта кислоты олеаноловой один максимум поглощения при длине волны $\lambda_{\max}$ 310 нм, а отсутствие перегибов в области $\lambda_{\max}$ 300–305 нм и $\lambda_{\max}$ 320–325 нм показывает, что данное вещество относится к соединениям ряда β -амирина в отличие от изомера - кислоты урсоловой. У сапонинов травы кровохлебки максимум поглощения несколько смещен и наблюдается при длине волны 312 нм и совпадает с максимумом стандартного раствора кислоты урсоловой (рис. 48).

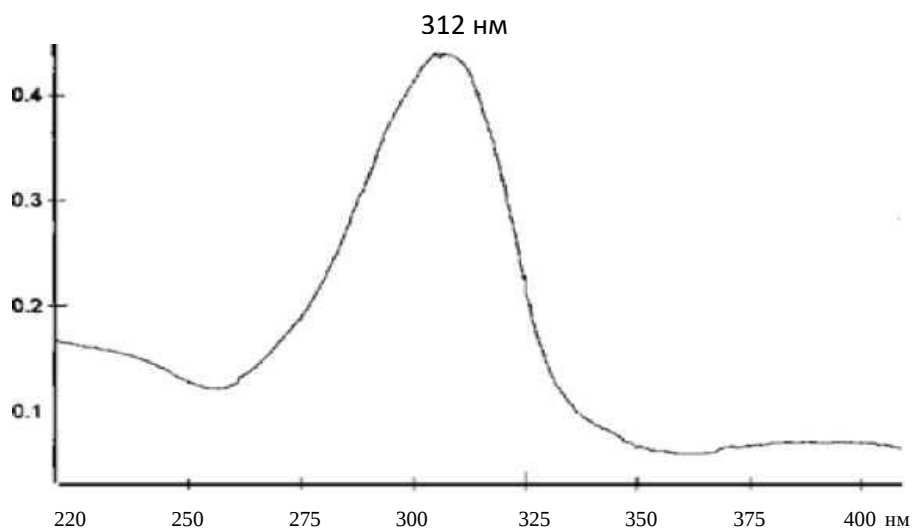


Рисунок 48. Спектр стандартного раствора кислоты урсоловой.

Поэтому считаем, что основным сапонином корневищ и корней кровохлебки лекарственной является кислота олеаноловая, что совпадает с результатами хроматографического исследования, а травы – кислота урсоловая.

Фенольные соединения

Флавоноиды, оксикоричные и фенолкарбоновые кислоты сырья кровохлебки лекарственной обнаруживали методом тонкослойной хроматографии в этилацетатной фракции, а также анализировали спиртовые извлечения из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной (70% спирт этиловый, соотношение сырье-экстрагент 1:10) в следующих системах растворителей: «кислота муравьиная - кислота ледяная уксусная – вода – метанол – ацетон – хлороформ» (6:6:7,5:12,5:30:60), «этилацетат - кислота муравьиная – вода» (14:3:3), «н-бутанол - кислота уксусная – вода» (4:1:5) и «этилацетат – кислота ледяная уксусная – вода» (5:1:1).

Наилучшее разделение флавоноидов из травы кровохлебки наблюдалось в системе растворителей «этилацетат – кислота ледяная уксусная – вода» (5:1:1), а из корневищ и корней кровохлебки - в системе растворителей «этилацетат - кислота муравьиная – вода» (14:3:3). Зоны флавоноидов обнаруживали по собственной флюоресценции в УФ-свете (при $\lambda = 254$ и 366 нм) и после обработки хромогенными реактивами: пары аммиака, 5% спиртовый раствор алюминия хлорида. Зоны оксикоричных и фенолкарбоновых кислот обнаруживали по собственной флюоресценции в УФ-свете, и после обработки проявляющими реактивами (пары аммиака, 3% спиртовый раствор треххлористого железа, раствор диазотированной сульфаниловой кислоты). Для сравнения использовали достоверные образцы свидетелей флавоноидов, оксикоричных и фенолкарбоновых кислот (гл. 2.2.3).

Для флавоноидов отмечалась характерная желтая окраска в видимом свете и желто-зеленая, коричневая флюоресценция в УФ-свете, которая усиливалась после обработки проявляющими реактивами. Для оксикоричных

и фенолкарбоновых кислот наблюдалась ярко-голубая, зеленовато-голубая или фиолетовая флюоресценция, которая становилась ярче после обработки проявляющими реактивами.

При исследовании извлечений из травы на хроматограммах обнаружено 10 зон адсорбции, а при исследовании корневищ и корней кровохлебки – 7 зон. При сравнении с достоверными образцами веществ, было установлено:

- в траве кровохлебки лекарственной присутствие 5 флавоноидов (рутин ($R_f \sim 0,41$), кверцетин ($R_f \sim 0,98$), лютеолин-7-глюкозид ($R_f \sim 0,74$); лютеолин ($R_f \sim 0,96$); катехин ($R_f \sim 0,94$)); наблюдались зоны, окрашенные в голубой цвет со значениями $R_f \sim 0,47$ и $0,80$, которые в сравнении со свидетелями отнесены к хлорогеновой и кофейной кислотам; зона голубовато-фиолетового цвета со значением $R_f \sim 0,76$ феруловая кислота; зоны темно-серого цвета со значением $R_f \sim 0,91$ (галловая кислота) и зона со значением $R_f \sim 0,54$ неидентифицирована;

- в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной присутствие 3 флавоноидов - гиперозида ($R_f \sim 0,62$), лютеолин-7-глюкозида ($R_f \sim 0,74$), катехина ($R_f \sim 0,94$); зоны, окрашенные в голубой цвет - с $R_f \sim 0,48$ (хлорогеновая кислота) и с $R_f \sim 0,79$ (кофейная кислота), интенсивно темно-коричневая зона со значением $R_f \sim 0,92$ (галловая кислота) и зона с $R_f \sim 0,57$ неидентифицирована.

Для выделения агликонов флавоноидов проводили кислотный гидролиз при нагревании 96% спиртового раствора из сырья кровохлебки лекарственной с 2 н. раствором кислоты хлористоводородной в течение 30 мин. Извлечение агликонов осуществляли диэтиловым эфиром, высушивали безводным сульфатом натрия; сухой остаток растворяли в 96% спирте этиловом. Хроматографирование вели в системе этилацетат – кислота ледяная уксусная - вода (5:1:1). В результате в эфирной фракции корневищ и корней кровохлебки обнаружили зоны адсорбции, отнесенные по

хроматографическому поведению к кверцетину ($R_f \sim 0,98$), а в траве – к лютеолину ($R_f \sim 0,96$) и кемпферолу ($R_f \sim 0,88$).

Выделение веществ фенольной природы проводили следующим образом: наиболее интенсивные зоны флавоноидов, фенолкарбоновых и оксикоричных кислот счищали с пластинки и элюировали 96% спиртом этиловым при нагревании на водяной бане с обратным холодильником. Состав элюированных фракций контролировали хроматографически. Для получения достаточного количества исследуемых веществ операцию повторяли. Очистку веществ проводили путем рехроматографии и кристаллизацией.

В дальнейшем, для идентификации выделенных веществ, осуществляли спектральные исследования (УФ-, ИК- спектроскопию). Выделенные вещества идентифицировали по форме УФ-спектров поглощения, наличию максимумов поглощения, характерным сдвигам максимумов при использовании соответствующих диагностических добавок и сравнению этих данных со стандартными образцами, относящиеся к определенным классам флавоноидов и оксикоричных кислот. В ИК-спектрах отмечали наличие характеристических полос, соответствующих валентным колебаниям определенных функциональных групп. Число полос поглощения в колебательном спектре, ширина, форма, интенсивность позволяют определить структуру и химический состав анализируемого вещества, при сравнении со спектрами известных индивидуальных веществ. После сопоставления результатов хроматографического анализа (значения R_f) и спектральных исследований было подтверждено присутствие в сырье кровохлебки лекарственной следующих веществ: рутин ($\lambda = 360$ и 258 нм), кверцетин ($\lambda = 371$ и 255 нм), лютеолин-7-глюкозид ($\lambda = 350$ и 266 нм), лютеолин ($\lambda = 350$ и 256 нм), гиперозид ($\lambda = 360$ и 254 нм), катехин ($\lambda = 272$ и 380 нм), хлорогеновая ($\lambda = 324$ и 235 нм), кофейная ($\lambda = 320$ и 290 нм), галловая ($\lambda = 276$ и 222 нм), феруловая кислоты ($\lambda = 317$ и 210 нм) (рис. 49-58 и приложение №5).

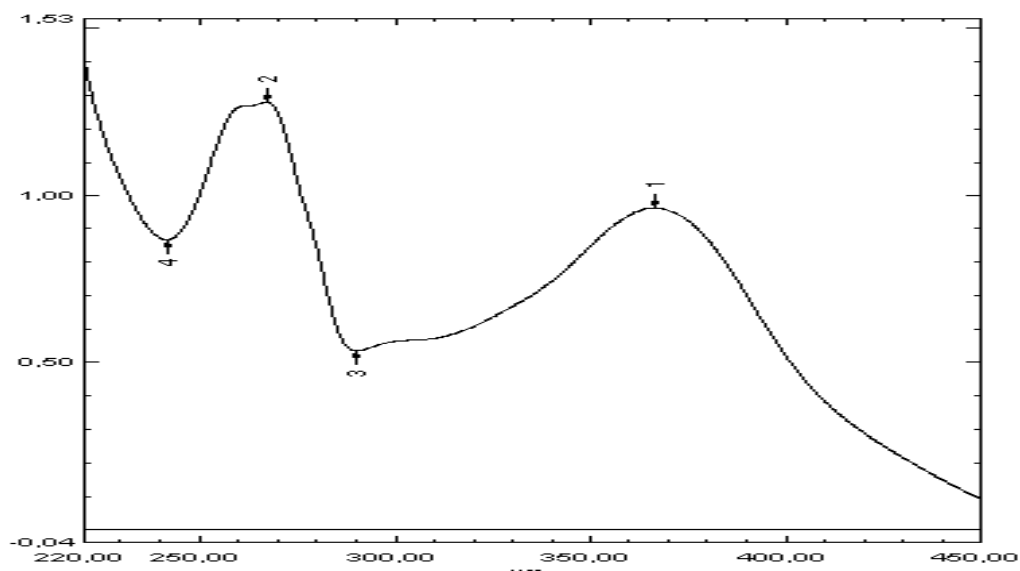


Рисунок 49. Спектр выделенного из кровохлебки рутина.

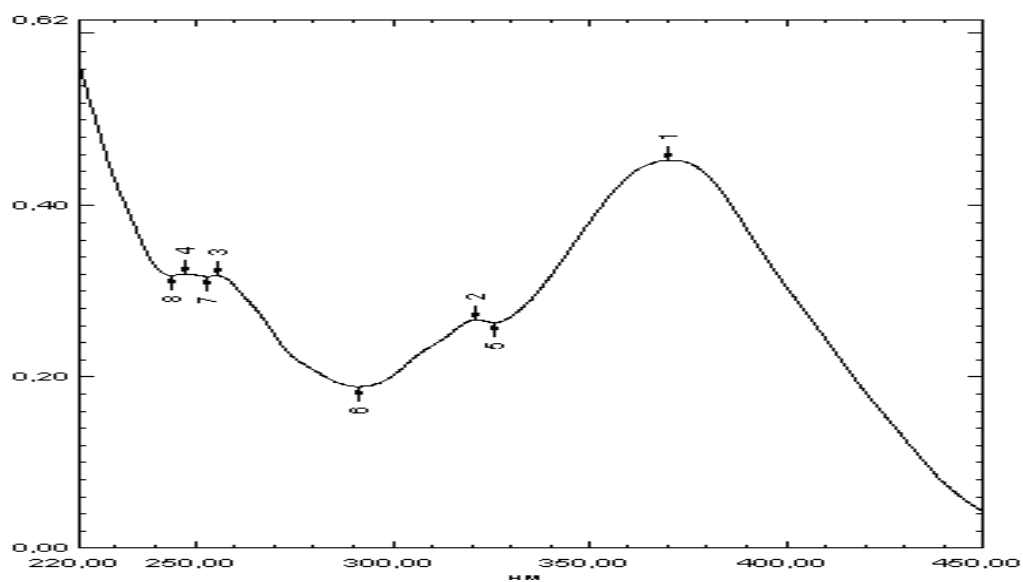


Рисунок 50. Спектр выделенного из кровохлебки кверцетина.

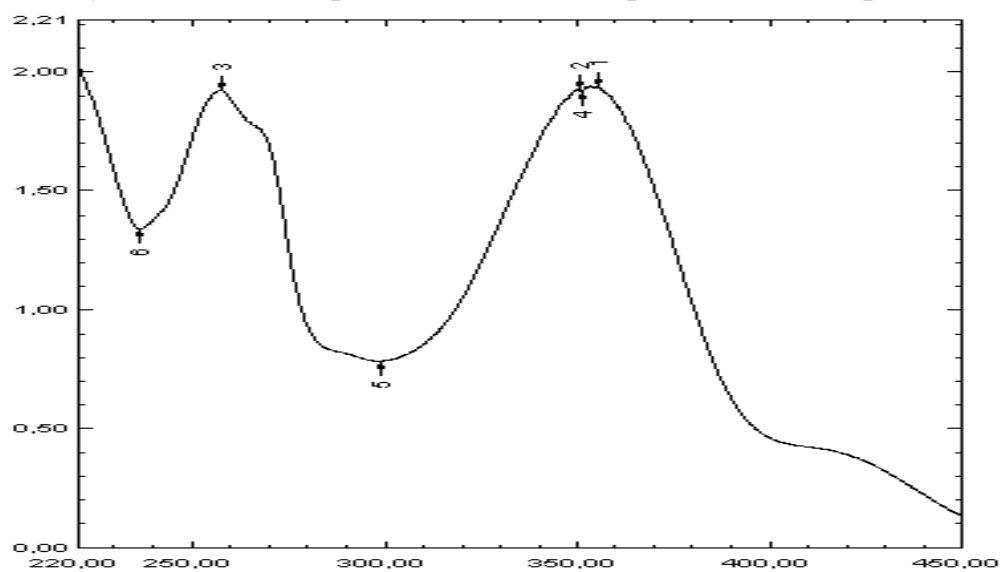


Рисунок 51. Спектр выделенного из кровохлебки лутеолин-7-глюкозида

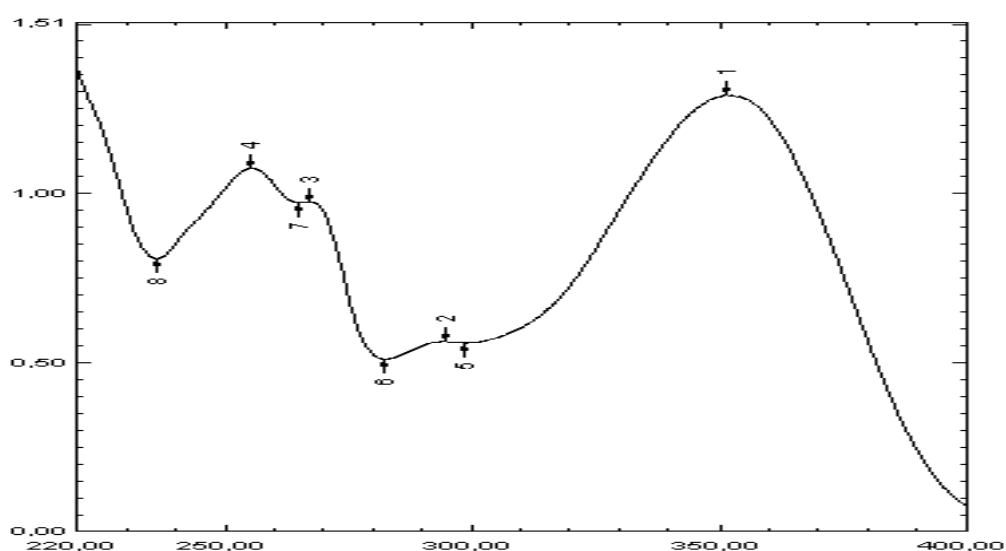


Рисунок 52. Спектр выделенного из кровохлебки лютеолина.

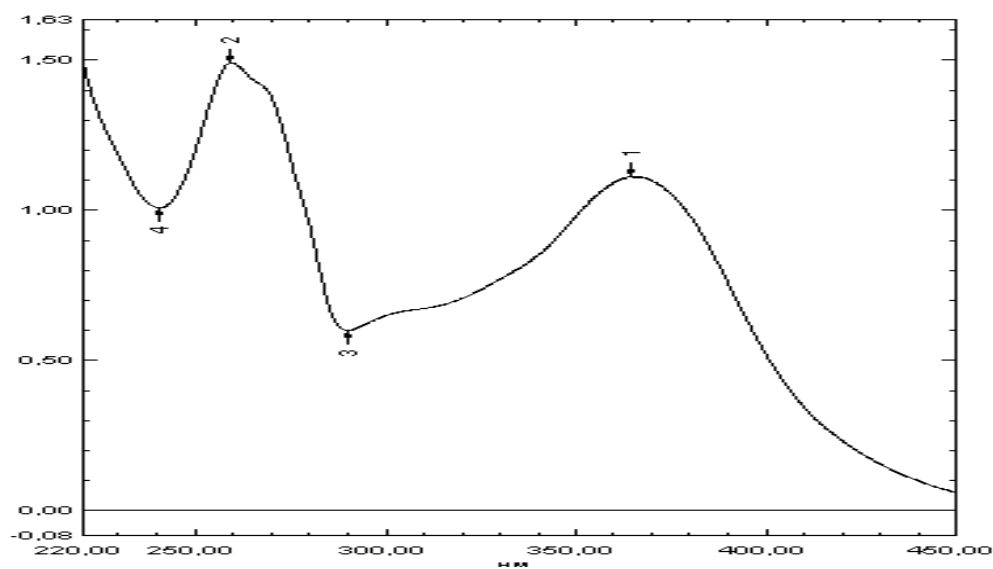


Рисунок 53. Спектр выделенного из кровохлебки гиперозида.

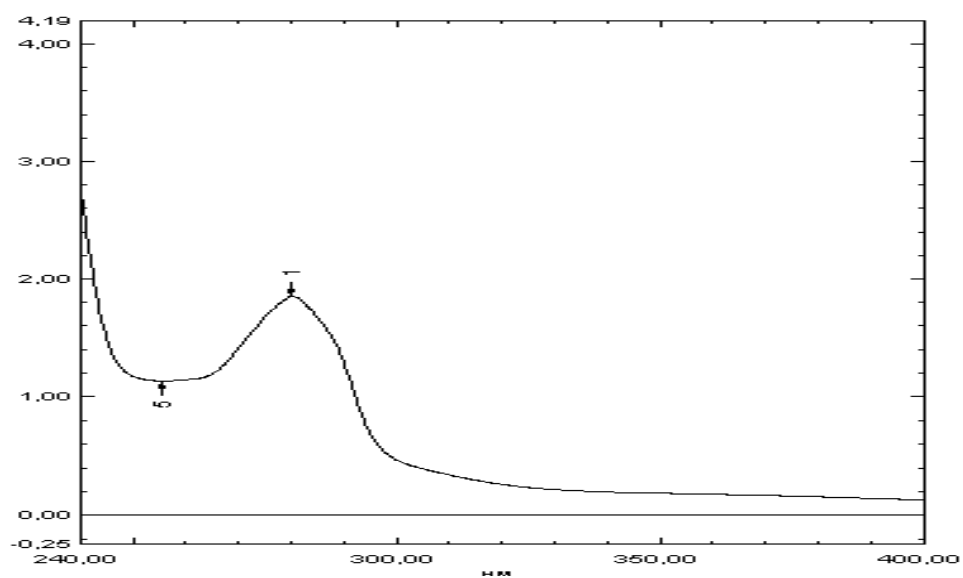


Рисунок 54. Спектр выделенного из кровохлебки катехина.

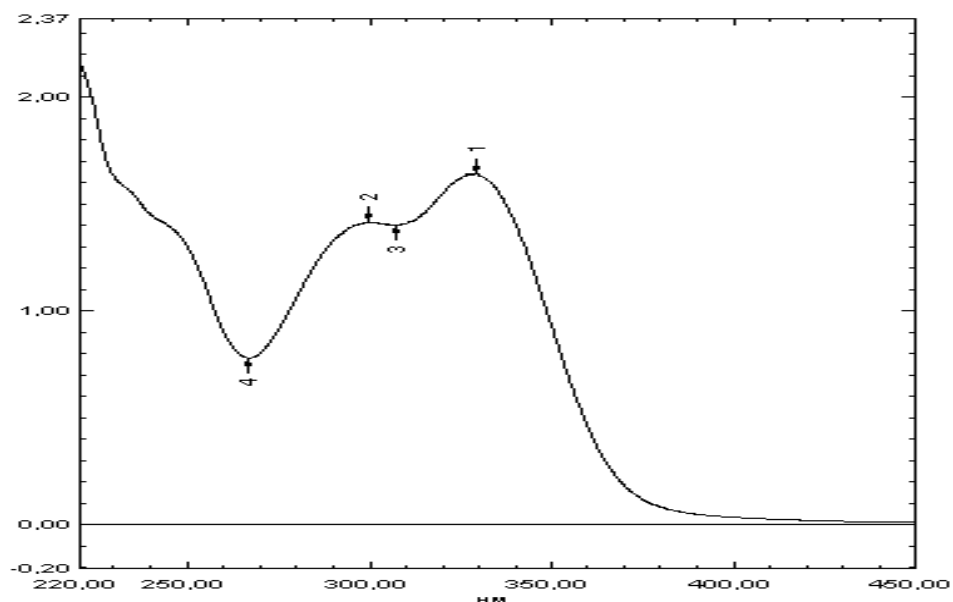


Рисунок 55. Спектр выделенной из кровохлебки хлорогеновой кислоты.

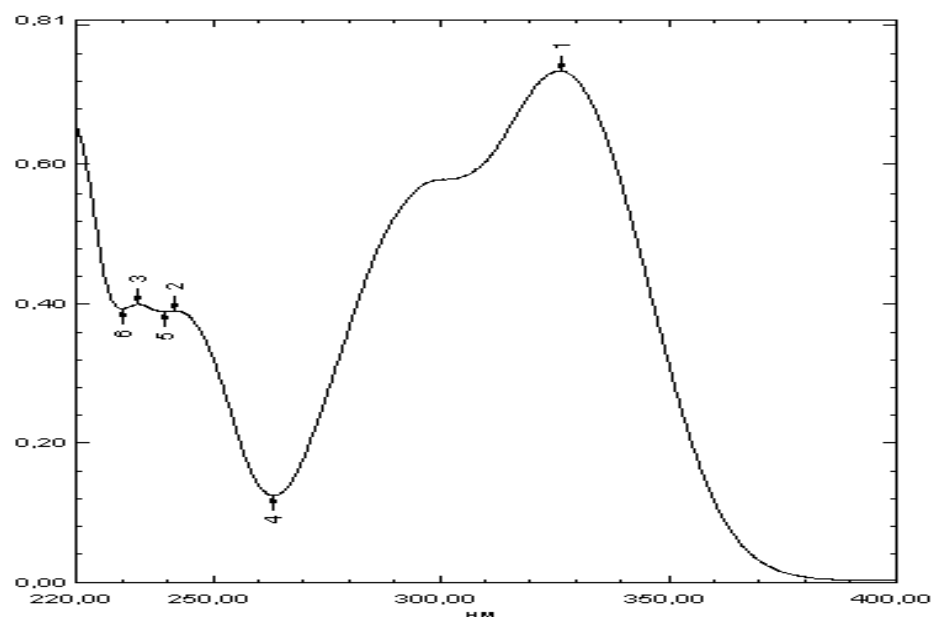


Рисунок 56. Спектр выделенной из кровохлебки кофейной кислоты.

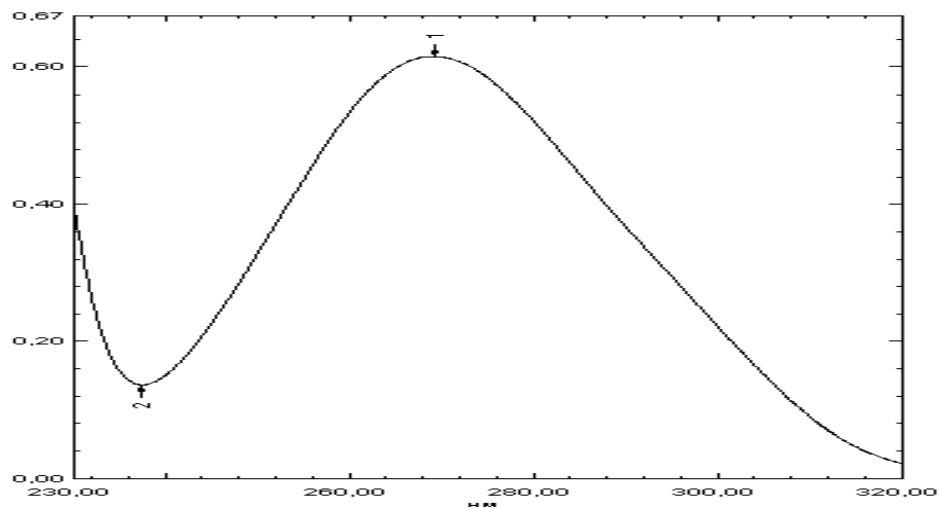


Рисунок 57. Спектр выделенной из кровохлебки галловой кислоты.

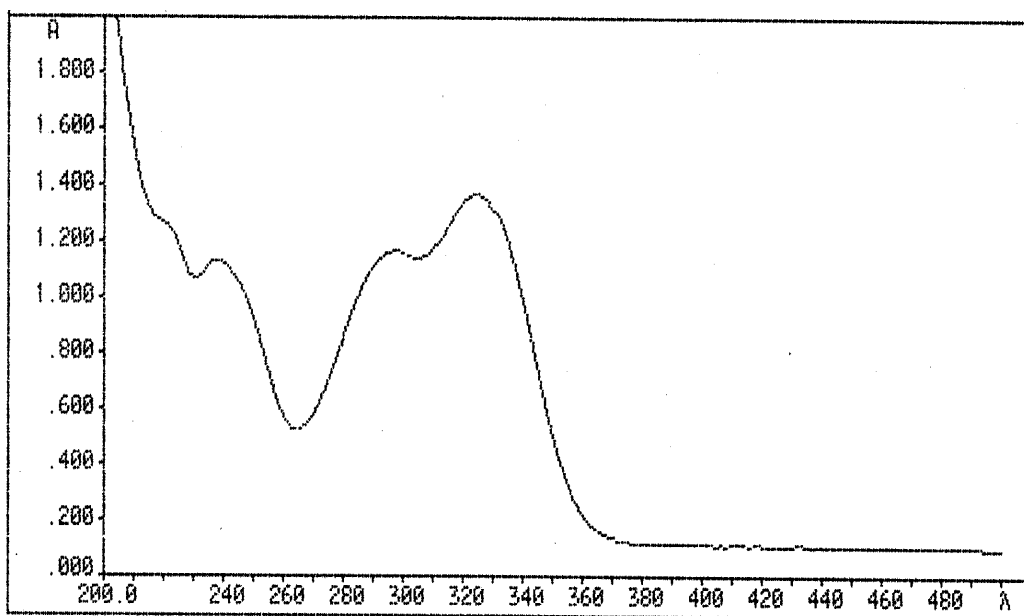


Рисунок 58. Спектр выделенной из кровохлебки феруловой кислоты.

Изучение качественного анализа фенольного комплекса сырья кровохлебки лекарственной проводили также с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе с УФ-детектором (гл.2.2.3). Для анализа получали спиртовое извлечение из сырья кровохлебки лекарственной: 10,0 г измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл 70% спирта этилового и проводили экстракцию на кипящей водяной бане в течение 1 часа, присоединяя к обратному холодильнику. Затем смесь охлаждали и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводили до метки 70% спиртом этиловым (*испытываемый раствор*). Параллельно готовили серию 0,05% растворов сравнения флавоноидных соединений и оксикоричных кислот в спирте этиловом. Хроматографировали по 20 мкл исследуемого раствора и растворов сравнения. Идентификацию проводили путем сопоставления времен удерживания компонентов смеси и растворов сравнения стандартных образцов флавоноидов и оксикоричных кислот. Результаты исследований представлены на рисунках 59 и 60.

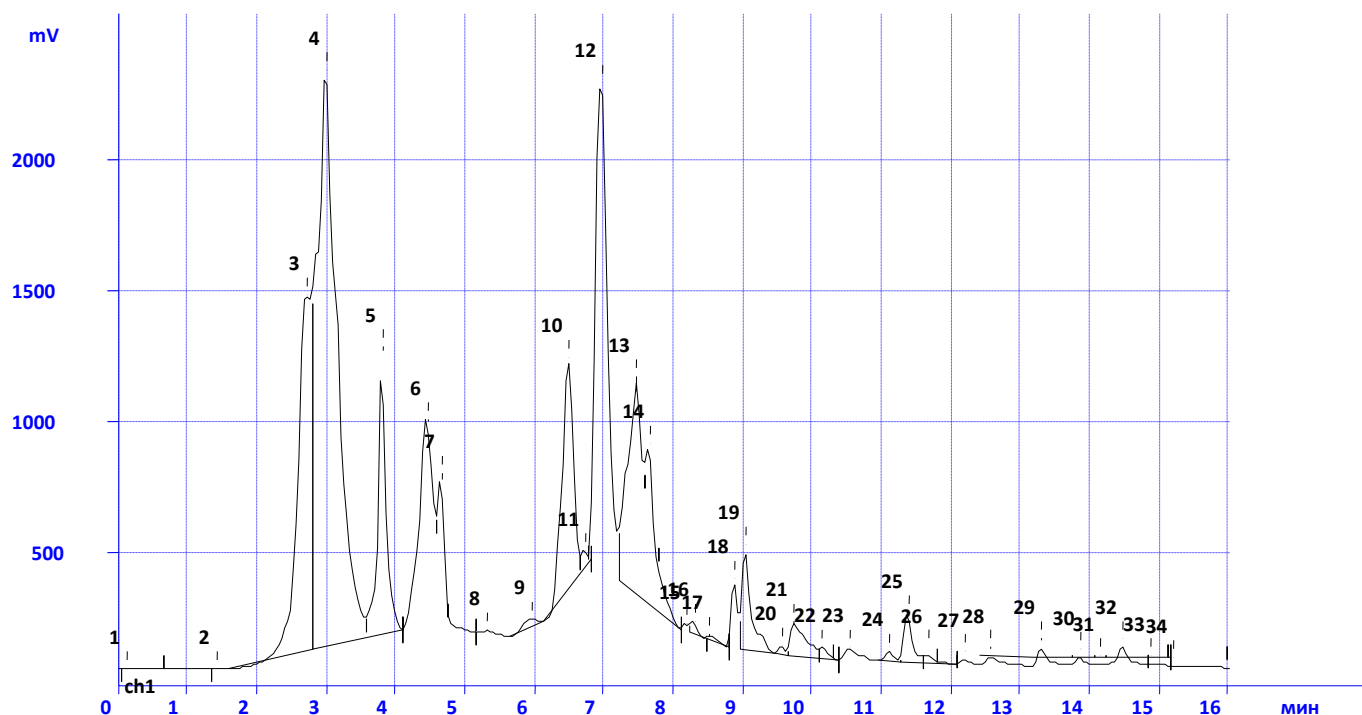


Рисунок 59. Хроматограмма спиртового извлечения из травы кровохлебки

В траве кровохлебки лекарственной установлено присутствие 34 веществ, из которых 7 флавоноидов (рутин, кверцитрин, лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, лютеолин, кемпферол, катехин), 5 фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты (галловая, эпигаллокатехингаллат, хлорогеновая, кофейная, феруловая) и кумарин.

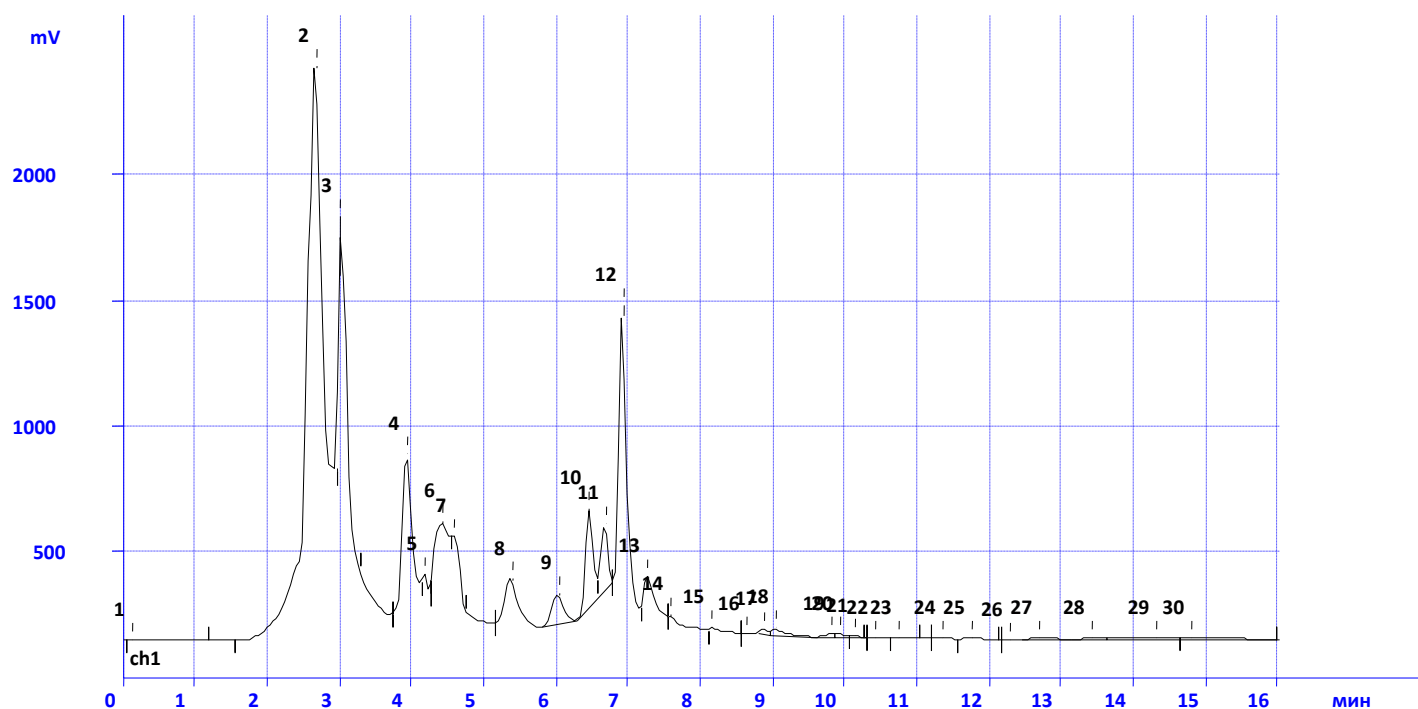


Рисунок 60. Хроматограмма спиртового извлечения из корневищ и корней кровохлебки

В корневищах и корнях кровохлебки лекарственной установлено присутствие 30 веществ, из которых 4 флавоноида (лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, гиперозид, катехин), 4 фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты (галловая, эпигаллокатехингаллат, хлорогеновая и кофейная) и кумарин.

Кумарины в сырье кровохлебки лекарственной обнаруживали методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» в хлороформной фракции в двух системах «этилацетат – бензол» (1:2) и «хлороформ - петролейный эфир» (1:2) [100]. В системе «этилацетат – бензол» (1:2) наблюдалось наилучшее разделение. Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки 10% спиртовым раствором гидроксида калия, затем подсушивали и прогревали при температуре 110-120°C (2-3 мин), далее обрабатывали свежеприготовленным диазореактивом. Оценивая полученные результаты установили, что кумарины флюоресцируют в УФ-свете до обработки хромогенными реактивами ярко-голубым цветом, а после обработки пятна приобретали флюоресценцию оранжевую, кирпично-красную или сине-фиолетовую. В качестве сравнения использовали свидетели кумаринов: умбеллиферон ($R_f \sim 0,28$), скополетин ($R_f \sim 0,55$), герниарин ($R_f \sim 0,75$), кумарин ($R_f \sim 0,80$). Наблюдалось появление 4 зон адсорбции и в траве, и в корневищах и корнях кровохлебки, из которых 1 вещество идентифицировано как кумарин ($R_f = 0,80$) (табл.8).

Таблица 8

**Хроматографический анализ кумаринов кровохлебки в системе
этилацетат-бензол (1:2)**

Значения R_f		Окраска пятен в УФ-свете		Идентифицированное вещество
травя	корневища и корни	до обработки проявляющим реактивом	после обработки раствором калия гидроксида, диазореактивом	
0,14	-	желтая	желтовато-зеленая	-
0,34	0,32	бурая	красная	-
-	0,45	желтая	желто-зеленая	-

0,67	0,69	голубая	оранжевая	-
0,80	0,79	ярко-голубая	фиолетовая	<i>кумарин</i>

Таким образом, качественный анализ фенольных соединений сырья кровохлебки лекарственной с использованием качественных реакций, хроматографических и спектральных методов исследования позволил установить присутствие флавоноидов, фенолкарбоновых и оксикоричных кислот, кумаринов.

4.2.3. Изучение компонентного состава жирорастворимого комплекса

Поскольку в состав жирорастворимого комплекса могут переходить ценные биологически активные вещества (каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты, стерины, терпены и др.), которые за счет известного их действия способны улучшить и дополнить полезные свойства сырья кровохлебки лекарственной, представляло интерес изучить состав жирорастворимого комплекса травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, чтобы обосновать возможности расширения ее использования в медицине. Из измельченного сырья путем исчерпывающей экстракции органическим растворителем (гексаном) получали жирорастворимый комплекс и проводили качественный и количественный анализ липофильных веществ методом хроматомасс-спектрометрии (гл. 2.2.3.). Результаты представлены на рисунках 61, 62 и в таблицах 9, 10.

Таблица 9

Компонентный состав жирорастворимого комплекса травы кровохлебки

№	Компоненты	Кол-во, %	R _t * мин.
1.	Масляная кислота	0,36	6,06
2.	Лимонен	6,52	6,25
3.	Пальмитиновая кислота	3,81	17,88
4.	Фитол	2,52	19,33

5.	Линолевая кислота	2,94	19,60
6.	Стеариновая кислота	3,44	22,95
7.	γ -ситостерол	35,05	35,25

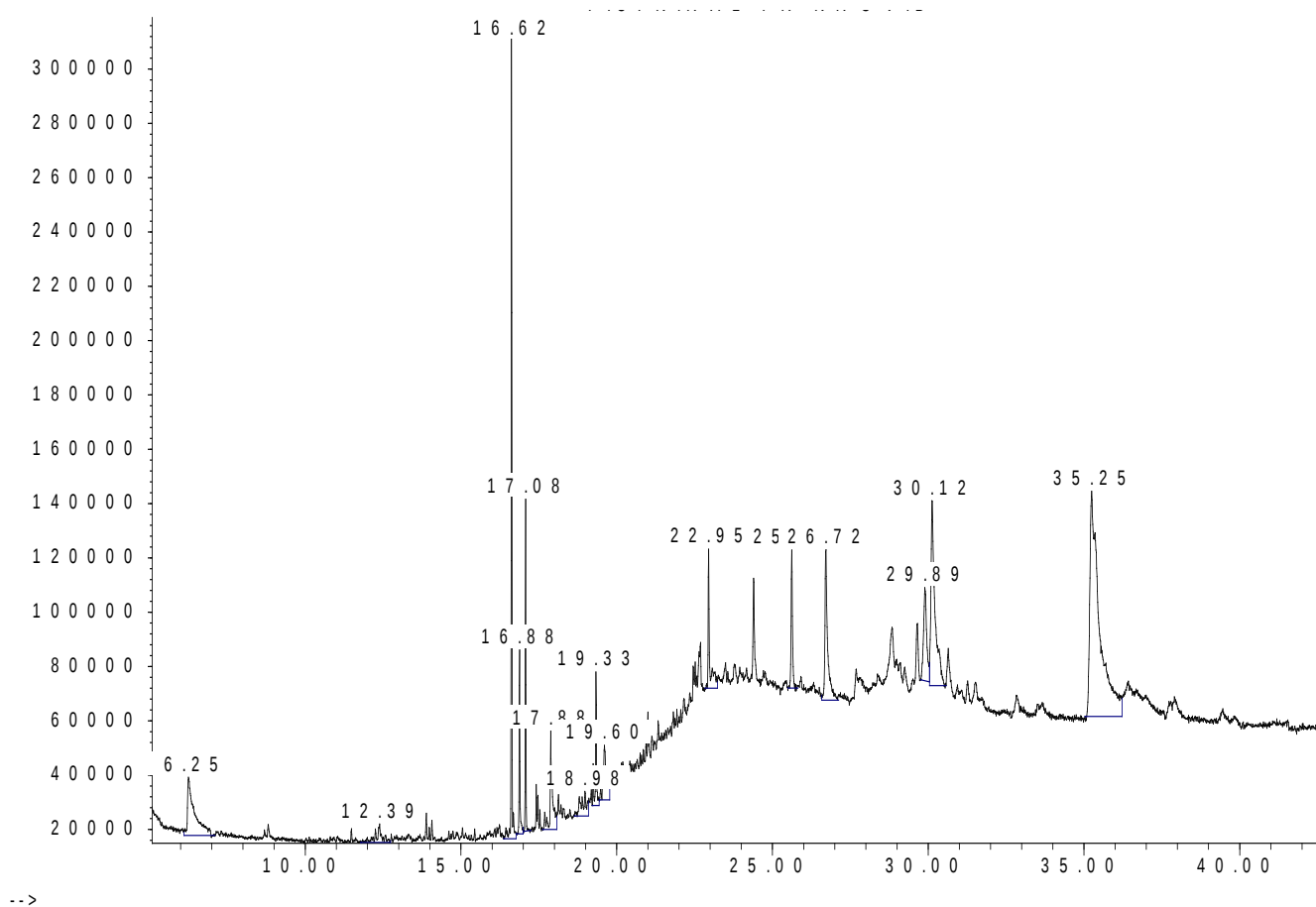


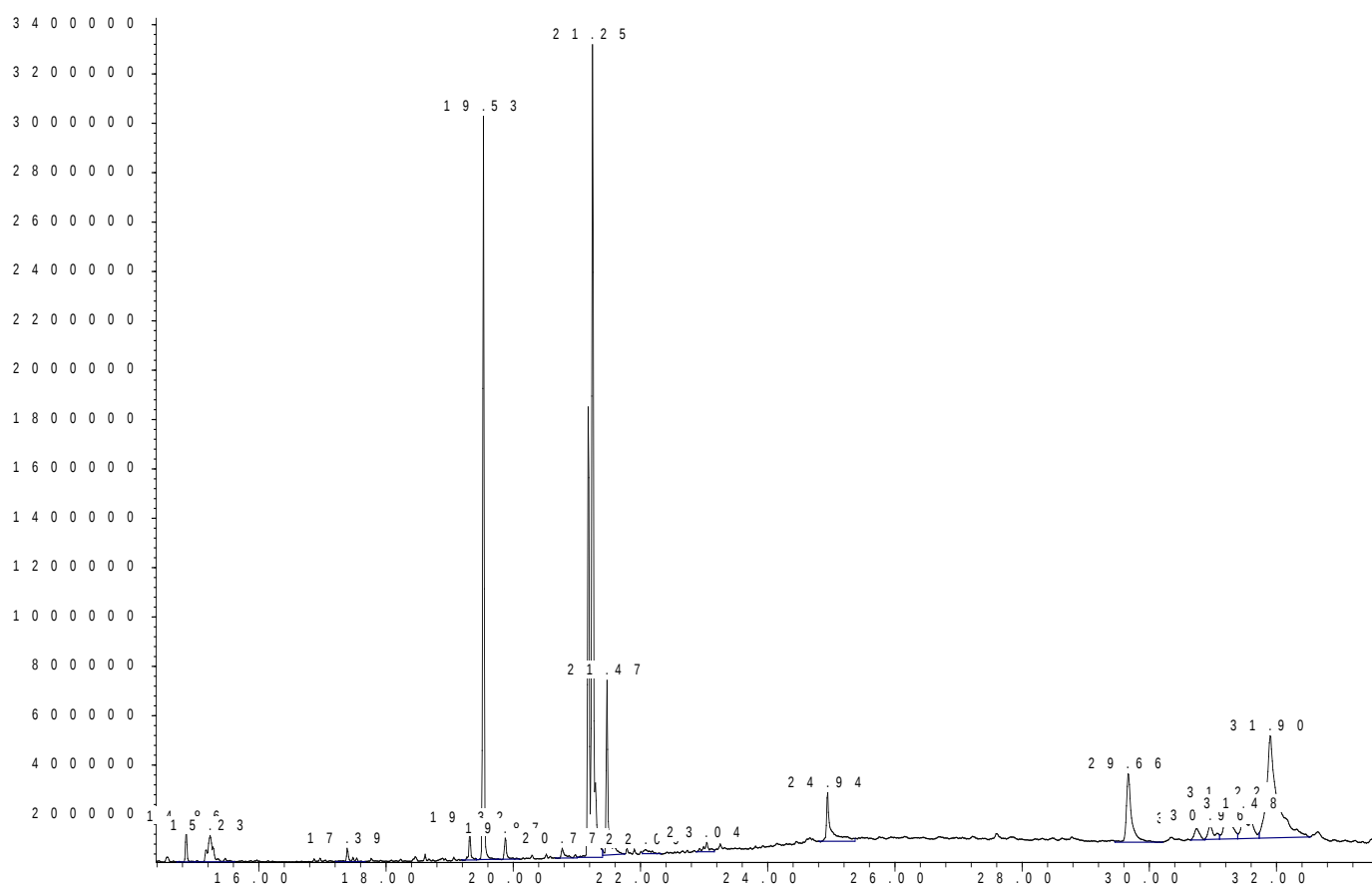
Рисунок 61. Хроматограмма компонентного состава липофильной фракции из травы кровохлебки

Анализируя полученные данные можно отметить, что в липофильной фракции травы кровохлебки обнаружено 13 соединений, среди которых в большем количестве содержатся высомолекулярные жирные кислоты и их производные (масляная, пальмитиновая, линолевая, стеариновая кислоты), производные стеринов (β -ситостерол), дитерпеновый спирт фитол, в меньшем количестве содержится соединение терпеновой природы (лимонен) и углеводороды.

Таблица 10

**Компонентный состав жирорастворимого комплекса корневищ и корней
кровохлебки**

№	Компоненты	Кол-во, %	R _t ,* мин.
1.	Пеларгоновая кислота	0,72	15,23
2.	Миристиновая кислота	0,65	17,39
3.	Метилловый эфир пальмитолеиновой кислоты	0,86	19,32
4.	Метилловый эфир пальмитиновой кислоты	16,26	19,53
5.	Пальмитиновая кислота	0,78	19,87
6.	Олеиновая кислота	35,17	21,25
7.	Стеариновая кислота	5,48	21,47
8.	Метилловый эфир 11-эйкозеновой кислоты	0,74	23,04
9.	β -ситостерол	17,04	31,90



*Рисунок 62. Хроматограмма компонентного состава липофильной фракции
из корневищ и корней кровохлебки*

В результате изучения липофильной фракции корневищ и корней кровохлебки идентифицировано 15 соединений, относящихся к различным химическим группам из которых представляют интерес высомолекулярные жирные кислоты и их производные (миристиновая, пеларгоновая, пальмитиновая, олеиновая, стеариновая кислоты) и производные стерина (β -ситостерол).

Для идентификации *каротиноидов* гексановое извлечение наносили капилляром на пластинку «Silufol», рядом вещество - свидетель (0,001% раствор β – каротина). Пластинку помещали в камеру с системой растворителей «гексан – диэтиловый эфир» (80:20). Хроматографирование вели ~ 20 мин (пробег растворителя ~ 13 см). После этого хроматограмму высушивали, обрабатывали 10 % раствором фосфорномолибденовой кислоты в этиловом спирте и нагревали при температуре 60-80°C (рис. 63). На хроматограмме обнаруживались пятна синего цвета на желто-зеленом фоне, что свидетельствовало о присутствии в каротиноидов.

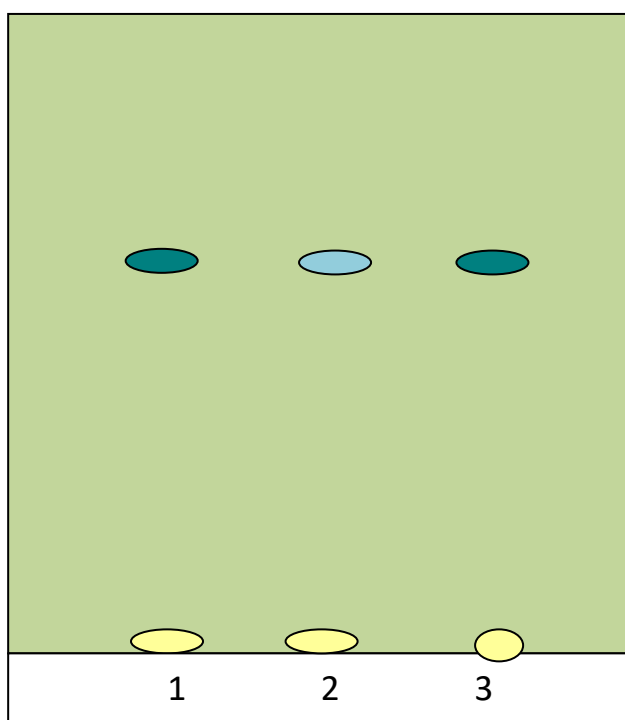


Рисунок 63. Схема хроматограммы каротиноидов кровохлебки лекарственной: 1 – извлечение из травы; 2 – извлечение из корневищ и корней; 3 – β -каротин.

В результате исследования установлено наличие пятна интенсивно синего цвета на уровне со свидетелем β – каротина в траве кровохлебки лекарственной и бледно-синее пятно при анализе извлечения из корневищ и корней кровохлебки, что свидетельствует о меньшем их содержании в данном виде сырья по сравнению с травой.

4.3. Сравнительный анализ количественного содержания биологически активных веществ в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной

Определение количественного содержания основных групп биологически активных веществ, обнаруженных в надземных и подземных органах кровохлебки лекарственной проводилось с использованием известных и модифицированных методик. Исследования проводились с образцами сырья, заготовленными в 18 районах Республики Башкортостан.

Количественное определение органических кислот и аскорбиновой кислоты

Органические кислоты интересны тем, что влияют на работу желудочно-кишечного тракта и другие системы организма человека, поддерживают кислотно-щелочное равновесие, тормозят развитие бактерий.

Количественное определение содержания свободных органических кислот проводили по фармакопейной методике алкалиметрическим методом прямого титрования, основанным на нейтрализации органических кислот раствором гидроксида натрия [37]. Результаты исследований представлены в таблице 11. При этом наибольшее содержание органических кислот отмечалось в траве кровохлебки лекарственной, в отличие от корневищ и корней.

Показатели содержания органических кислот

№	Район исследования	Содержание органических кислот, %	
		трава	корневища и корни
1	Альшеевский район	$1,75 \pm 0,07$	$1,38 \pm 0,06$
2	Благоварский район	$1,81 \pm 0,08$	$1,42 \pm 0,07$
3	Буздякский район	$1,89 \pm 0,09$	$1,56 \pm 0,06$
4	Бурзянский район	$1,52 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,04$
5	Дюртюлинский район	$1,98 \pm 0,06$	$1,42 \pm 0,06$
6	Зианчуринский район	$1,46 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,04$
7	Ишимбайский район	$1,59 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,03$
8	Караидельский район	$2,27 \pm 0,09$	$1,49 \pm 0,07$
9	Кармаскалинский район	$2,20 \pm 0,08$	$1,45 \pm 0,05$
10	Краснокамский район	$2,02 \pm 0,10$	$1,55 \pm 0,07$
11	Мишкинский район	$1,63 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,04$
12	Нефтекамский район	$1,67 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,05$
13	Нуримановский район	$1,69 \pm 0,07$	$1,26 \pm 0,07$
14	Салаватский район	$1,52 \pm 0,05$	$1,29 \pm 0,06$
15	Стерлитамакский район	$1,81 \pm 0,07$	$1,42 \pm 0,07$
16	Учалинский район	$1,94 \pm 0,04$	$1,35 \pm 0,05$
17	Уфимский район	$1,78 \pm 0,05$	$0,75 \pm 0,03$
18	Чекмагушевский район	$1,63 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,02$

Определение содержания аскорбиновой кислоты (витамина С) имеет важное значение, так как она активно участвует в окислительно-восстановительных процессах, в том числе в липидном и пигментном обмене, свертываемости крови, обладает десенсибилизирующим действием, повышает сопротивляемость организма. Поэтому присутствие аскорбиновой

кислоты в растительном сырье улучшает его целебные свойства и расширяет возможности применения.

Количественное определение аскорбиновой кислоты проводилось титриметрическим методом, основанным на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия. Определение проводили в кислой среде и в точке эквивалентности окраска раствора изменялась до розового цвета [37]. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12

Показатели содержания аскорбиновой кислоты

№	Район исследования	Содержание аскорбиновой кислоты, %	
		трава	корневища и корни
1	Альшеевский район	0,383±0,014	0,202±0,011
2	Благоварский район	0,337±0,012	0,140±0,008
3	Буздякский район	0,316±0,012	0,098±0,006
4	Бурзянский район	0,307±0,011	0,066±0,003
5	Дюртюлинский район	0,488±0,014	0,225±0,012
6	Зианчуринский район	0,379±0,013	0,215±0,012
7	Ишимбайский район	0,297±0,011	0,070±0,002
8	Караидельский район	0,492±0,015	0,228±0,013
9	Кармаскалинский район	0,521±0,016	0,231±0,014
10	Краснокамский район	0,325±0,011	0,084±0,004
11	Мишкинский район	0,372±0,011	0,194±0,008
12	Нефтекамский район	0,379±0,013	0,201±0,011
13	Нуримановский район	0,329±0,010	0,041±0,002
14	Салаватский район	0,352±0,012	0,175±0,008
15	Стерлитамакский район	0,327±0,012	0,028±0,002
16	Учалинский район	0,385±0,013	0,223±0,011
17	Уфимский район	0,334±0,012	0,056±0,003

18	Чекмагушевский район	0,315±0,011	0,042±0,003
----	----------------------	-------------	-------------

В результате исследования можно отметить, что большее содержание аскорбиновой кислоты наблюдалось в траве кровохлебки лекарственной, а в корневищах и корнях ее меньше.

Количественное определение каротиноидов

Каротиноиды широко распространены в растительном мире, относятся к группе жирорастворимых витаминов, являются провитамином витамина А и оказывают противовоспалительное, ранозаживляющее, регенерирующее действие.

Поскольку в результате хроматографического исследования было выявлено интенсивно светящееся пятно при анализе извлечения из травы кровохлебки лекарственной и очень слабо окрашенное пятно при изучении извлечения их корневищ и корней, то их количественное определение проводили именно в траве кровохлебки спектрофотометрическим методом. В качестве аналитической длины волны выбрано 450 нм, при которой наблюдается характерный максимум β-каротина, раствор сравнения - н-гексан. Содержание суммы каротиноидов вычисляли в пересчете на в мг % [41]. Результаты исследования приведены в таблице 13.

Таблица 13

Показатели содержания каротиноидов

№	Район исследования	Содержание каротиноидов, мг%
		травы
1	Альшеевский район	33,79 ± 1,39
2	Благоварский район	32,05 ± 1,19
3	Буздякский район	32,84 ± 1,42
4	Бурзянский район	31,69 ± 1,36
5	Дюртюлинский район	31,81 ± 1,37

6	Зианчуринский район	34,01 ± 1,29
7	Ишимбайский район	33,05 ± 1,31
8	Караидельский район	35,13 ± 1,56
9	Кармаскалинский район	32,08 ± 1,44
10	Краснокамский район	34,78 ± 1,28
11	Мишкинский район	35,89 ± 1,62
12	Нефтекамский район	31,17 ± 1,10
13	Нуримановский район	32,77 ± 1,32
14	Салаватский район	33,86 ± 1,26
15	Стерлитамакский район	34,15 ± 1,30
16	Учалинский район	34,98 ± 1,61
17	Уфимский район	32,69 ± 1,59
18	Чекмагушевский район	33,87 ± 1,28

Количественное определение полисахаридов

Лекарственное растительное сырье кровохлебки лекарственной, по литературным данным, содержит полисахариды, поэтому для нас представляло интерес провести сравнительную оценку содержания полисахаридов в траве и корневищах с корнями.

Содержание суммы полисахаридов в сырье кровохлебки лекарственной определяли спектрофотометрическим методом. Основные этапы методики включают: экстракция полисахаридов из сырья водой; их осаждение спиртом этиловым 95%; гидролиз полисахаридов при нагревании с 8% раствором кислоты хлористоводородной; образование окрашенного комплекса продуктов гидролиза (моносахаридов) с пикриновой кислотой в щелочной среде. Измерение оптической плотности полученного раствора проводили при длине волны 460 нм (гл. 2.2.3). Данный максимум поглощения характерен для комплекса глюкозы с пикриновой кислотой (рис. 64).

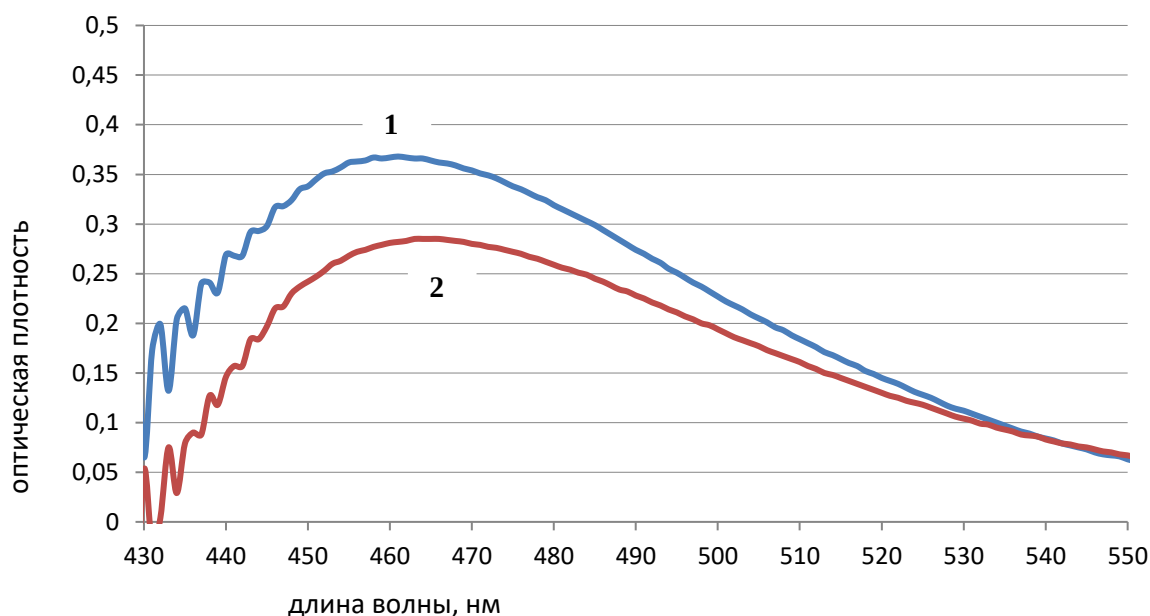


Рисунок 64. Спектр поглощения комплекса глюкозы с пикриновой кислотой (1) и комплекса моносахаридов после гидролиза полисахаридов кровохлебки (2).

Результаты количественного определения суммы полисахаридов в пересчете на глюкозу в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной представлены в таблице 14.

Таблица 14

Показатели содержания полисахаридов

№	Район исследования	Содержание полисахаридов, %	
		травы	корневища и корни
1	Альшеевский район	$0,54 \pm 0,02$	$3,67 \pm 0,12$
2	Благоварский район	$0,64 \pm 0,03$	$3,96 \pm 0,15$
3	Буздякский район	$0,88 \pm 0,04$	$4,27 \pm 0,21$
4	Бурзянский район	$0,76 \pm 0,04$	$4,82 \pm 0,16$
5	Дюртюлинский район	$1,05 \pm 0,05$	$5,18 \pm 0,24$
6	Зианчуринский район	$0,91 \pm 0,03$	$4,35 \pm 0,21$
7	Ишимбайский район	$0,75 \pm 0,03$	$3,86 \pm 0,11$
8	Караидельский район	$0,92 \pm 0,03$	$4,96 \pm 0,22$

9	Кармаскалинский район	$0,43 \pm 0,02$	$4,14 \pm 0,11$
10	Краснокамский район	$0,81 \pm 0,03$	$3,59 \pm 0,15$
11	Мишкинский район	$1,02 \pm 0,05$	$5,03 \pm 0,23$
12	Нефтекамский район	$0,57 \pm 0,02$	$4,89 \pm 0,11$
13	Нуримановский район	$0,77 \pm 0,03$	$3,85 \pm 0,17$
14	Салаватский район	$0,89 \pm 0,04$	$4,38 \pm 0,21$
15	Стерлитамакский район	$0,73 \pm 0,03$	$3,52 \pm 0,15$
16	Учалинский район	$0,62 \pm 0,02$	$3,77 \pm 0,14$
17	Уфимский район	$0,65 \pm 0,03$	$4,81 \pm 0,13$
18	Чекмагушевский район	$0,84 \pm 0,04$	$3,98 \pm 0,14$

На основании полученных результатов исследования, можно отметить, что больше полисахаридов накапливается в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной в отличие от травы.

Количественное определение сапонинов

Сапонины обладают разнообразным спектром фармакологической активности – иммуномодулирующей, мочегонной, отхаркивающей и др., поэтому представляют интерес для изучения.

Для определения количественного содержания тритерпеновых соединений кровохлебки лекарственной использовали метод спектрофотометрии [118]. Спектры поглощения взаимодействия кислоты серной концентрированной и тритерпеноидов идентифицировали по характерным максимумам поглощения растворов из травы кровохлебки при 312 нм (кислота урсоловая) и корневищ и корней кровохлебки при 310 нм (кислота олеаноловая). Параллельно измеряли оптическую плотность стандартных образцов растворов кислоты олеаноловой и урсоловой. Раствором сравнения являлась кислота серная концентрированная. Числовые показатели содержания тритерпеновых сапонинов в сырье кровохлебки

лекарственной, собранной в различных районах Республики Башкортостан, представлены в таблице 15.

Таблица 15

Показатели содержания сапонинов

№	Район исследования	Содержание сапонинов, %	
		трава в пересчете на урсоловую кислоту	корневища и корни в пересчете на олеаноловую кислоту
1	Альшеевский район	0,83 ± 0,04	3,42 ± 0,11
2	Благоварский район	0,78 ± 0,03	2,96 ± 0,10
3	Буздякский район	0,64 ± 0,02	3,47 ± 0,15
4	Бурзянский район	0,75 ± 0,03	3,55 ± 0,12
5	Дюртюлинский район	0,85 ± 0,04	3,69 ± 0,16
6	Зианчуринский район	0,78 ± 0,02	2,87 ± 0,11
7	Ишимбайский район	0,56 ± 0,01	3,65 ± 0,11
8	Караидельский район	0,67 ± 0,02	3,37 ± 0,13
9	Кармаскалинский район	0,73 ± 0,03	2,98 ± 0,11
10	Краснокамский район	0,68 ± 0,02	3,42 ± 0,13
11	Мишкинский район	0,82 ± 0,04	3,58 ± 0,15
12	Нефтекамский район	0,64 ± 0,01	2,97 ± 0,12
13	Нуримановский район	0,72 ± 0,02	3,49 ± 0,13
14	Салаватский район	0,64 ± 0,01	2,86 ± 0,11
15	Стерлитамакский район	0,79 ± 0,02	3,44 ± 0,12
16	Учалинский район	0,88 ± 0,04	3,71 ± 0,17
17	Уфимский район	0,68 ± 0,01	3,38 ± 0,14
18	Чекмагушевский район	0,77 ± 0,02	2,93 ± 0,15

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что установлено присутствие сапонинов в сырье кровохлебки лекарственной, причем в корневищах и корнях преобладает олеаноловая кислота, а в листьях

урсоловая. В большем количестве сапонины накапливаются в корневищах и корнях кровохлебки, в отличие от травы.

Количественное определение суммы оксикоричных кислот

Определение содержания суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 327 нм. Метод основан на хроматографическом разделении спиртового извлечения из сырья кровохлебки лекарственной восходящим способом в хлороформе. При этом сопутствующие жирорастворимые вещества увлекаются хлороформом, а на линии старта остается пятно, содержащее сумму оксикоричных кислот, которое элюируют, препаративно выделяют оксикоричные кислоты и количественно определяют в пересчете на хлорогеновую кислоту (гл. 2.2.3). Результаты исследования представлены в таблице 16.

Таблица 16

Показатели содержания оксикоричных кислот

№	Район исследования	Содержание оксикоричных кислот, %	
		трава	корневища и корни
1	Альшеевский район	1,13 ± 0,05	1,81 ± 0,08
2	Благоварский район	1,20 ± 0,04	1,76 ± 0,07
3	Буздякский район	1,17 ± 0,05	1,70 ± 0,06
4	Бурзянский район	1,14 ± 0,07	1,69 ± 0,06
5	Дюртюлинский р-он	1,26 ± 0,06	1,85 ± 0,08
6	Зианчуринский район	1,19 ± 0,05	1,74 ± 0,07
7	Ишимбайский район	1,14 ± 0,06	1,79 ± 0,06
8	Караидельский район	1,30 ± 0,06	1,91 ± 0,08
9	Кармаскалинский р-он	1,28 ± 0,05	1,88 ± 0,07
10	Краснокамский район	1,15 ± 0,05	1,73 ± 0,06
11	Мишкинский район	1,25 ± 0,04	1,69 ± 0,06

12	Нефтекамский район	$1,21 \pm 0,06$	$1,82 \pm 0,06$
13	Нуримановский район	$1,16 \pm 0,06$	$1,68 \pm 0,05$
14	Салаватский район	$1,21 \pm 0,06$	$1,76 \pm 0,08$
15	Стерлитамакский район	$1,18 \pm 0,05$	$1,71 \pm 0,07$
16	Учалинский район	$1,24 \pm 0,06$	$1,75 \pm 0,06$
17	Уфимский район	$1,14 \pm 0,06$	$1,69 \pm 0,07$
18	Чекмагушевский район	$1,16 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,06$

На основании полученных результатов установлено, что содержание оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую больше в корневищах и корнями кровохлебки лекарственной в отличие от травы.

Количественное определение кумаринов

Определение количественного содержания кумаринов в сырье кровохлебки лекарственной проводили спектрофотометрическим методом, так как кумарины способны поглощать в УФ-области спектра с наличием максимумов (I полоса поглощения при 210 – 270 нм и II полоса - 290 – 360 нм). Сумму кумаринов определяли в пересчете на кумарин при длине волны 310 нм [100]. Результаты исследования представлены в таблице 17.

Таблица 17

Показатели содержания кумаринов

№	Район исследования	Содержание кумаринов, %	
		трава	корневища и корни
1	Альшеевский район	$0,322 \pm 0,011$	$0,068 \pm 0,003$
2	Благоварский район	$0,287 \pm 0,008$	$0,057 \pm 0,001$
3	Буздякский район	$0,291 \pm 0,007$	$0,063 \pm 0,002$
4	Бурзянский район	$0,294 \pm 0,009$	$0,060 \pm 0,001$
5	Дюртюлинский р-он	$0,296 \pm 0,0071$	$0,060 \pm 0,0018$

6	Зианчуринский район	$0,308 \pm 0,010$	$0,068 \pm 0,002$
7	Ишимбайский район	$0,297 \pm 0,007$	$0,061 \pm 0,001$
8	Караидельский район	$0,319 \pm 0,011$	$0,059 \pm 0,001$
9	Кармаскалинский р-он	$0,324 \pm 0,013$	$0,071 \pm 0,002$
10	Краснокамский район	$0,298 \pm 0,010$	$0,065 \pm 0,002$
11	Мишкинский район	$0,326 \pm 0,014$	$0,073 \pm 0,003$
12	Нефтекамский район	$0,285 \pm 0,007$	$0,062 \pm 0,002$
13	Нуримановский район	$0,318 \pm 0,011$	$0,058 \pm 0,001$
14	Салаватский район	$0,320 \pm 0,009$	$0,067 \pm 0,003$
15	Стерлитамакский район	$0,296 \pm 0,008$	$0,066 \pm 0,002$
16	Учалинский район	$0,312 \pm 0,012$	$0,065 \pm 0,002$
17	Уфимский район	$0,304 \pm 0,009$	$0,064 \pm 0,002$
18	Чекмагушевский район	$0,313 \pm 0,011$	$0,060 \pm 0,001$

В результате исследований установлено, что содержание кумаринов больше в траве кровохлебки лекарственной, чем в корневищах и корнях.

Изучение аминокислотного состава

Аминокислоты являются важной группой биологически активных соединений, они содержатся во всех живых организмах и необходимы для поддержания жизни человека и животных. Аминокислоты являются предшественниками большой группы природных биологически активных веществ: белков, ферментов, алкалоидов, флавоноидов и других, способствуют поддержанию азотистого баланса.

Аминокислотный состав сырья определяли рентгенофлуоресцентным методом на спектрометре «PacificScientific-6520». Результаты изучения динамики накопления аминокислот в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной представлены в таблице 18.

Содержание свободных аминокислот в исследуемых образцах кровохлебки лекарственной

Объект исследования	Вид сырья	Содержание свободных аминокислот														
		лизин	метионин	цистеин	гистидин	аргинин	треонин	серин	пролин	глицин	валин	изолейцин	лейцин	тирозин	фенилаланин	Суммарное содержание
Альшеевский район	корн.и корни	0,29	0,28	0,53	0,13	0,65	0,42	0,49	1,76	0,81	0,35	0,43	0,10	0,08	0,43	6,75
	трава	0,36	0,24	0,70	0,13	0,81	0,45	0,61	2,29	1,02	0,33	0,56	0,46	0,15	0,42	8,53
Благоварский район	корн.и корни	0,08	0,21	0,54	0,06	0,51	0,34	0,41	1,54	0,70	0,54	0,06	0,03	0,08	0,35	5,45
	трава	0,36	0,24	0,81	0,20	0,62	0,42	0,55	2,10	0,85	0,21	0,70	0,49	0,10	0,36	8,01
Буздякский район	корн.и корни	0,43	0,04	0,44	0,18	0,25	0,15	0,25	1,28	0,71	0,88	0,32	0,34	0,20	0,21	5,68
	трава	0,20	0,13	0,61	0,13	0,49	0,27	0,40	1,73	0,90	0,74	0,38	0,30	0,18	0,32	6,78
Бурзянский район	корн.и корни	0,19	0,17	0,61	0,07	0,59	0,36	0,45	1,64	0,75	0,34	0,46	0,22	0,05	0,39	6,29
	трава	0,42	0,28	0,77	0,21	0,58	0,35	0,59	2,02	0,88	0,42	0,65	0,46	0,15	0,45	8,23
Дюртюлинский район	корн.и корни	0,21	0,12	0,68	0,05	0,48	0,26	0,37	1,55	0,67	0,38	0,46	0,19	0,03	0,30	5,75
	трава	0,38	0,26	0,79	0,21	0,60	0,44	0,56	2,13	0,88	0,23	0,72	0,53	0,11	0,38	8,22

Зианчуринский район	корн.и корни	0,24	0,28	0,57	0,14	0,77	0,47	0,61	1,89	0,88	0,14	0,58	0,10	0,06	0,45	7,18
	травы	0,47	0,28	0,84	0,17	0,81	0,46	0,62	1,67	0,96	0,34	0,59	0,47	0,12	0,47	8,27
Ишибайский район	корн.и корни	0,02	0,19	0,54	0,04	0,48	0,32	0,39	1,46	0,69	0,57	0,43	0,04	0,07	0,32	5,56
	травы	0,36	0,21	0,75	0,11	0,75	0,39	0,56	2,33	0,89	0,32	0,50	0,49	0,06	0,48	8,20
Кармаскалинский район	корн.и корни	0,15	0,23	0,57	0,09	0,55	0,37	0,45	1,61	0,73	0,50	0,43	0,04	0,08	0,37	6,17
	травы	0,39	0,22	0,70	0,12	0,78	0,41	0,56	2,22	1,02	0,25	0,51	0,48	0,13	0,48	8,27
Караидельский район	корн.и корни	0,24	0,14	0,67	0,06	0,50	0,29	0,38	1,54	0,68	0,32	0,45	0,21	0,04	0,31	5,83
	травы	0,37	0,27	0,81	0,15	0,63	0,37	0,58	2,26	0,86	0,33	0,69	0,43	0,11	0,43	8,29
Краснокамский район	корн.и корни	0,18	0,17	0,54	0,06	0,48	0,29	0,40	1,47	0,78	0,26	0,61	0,23	0,03	0,25	5,75
	травы	0,36	0,24	0,78	0,18	0,61	0,42	0,54	2,12	0,91	0,21	0,73	0,51	0,12	0,37	8,10
Мишкинский район	корн.и корни	0,23	0,18	0,68	0,05	0,56	0,31	0,44	1,72	0,75	0,31	0,54	0,17	0,03	0,34	6,31
	травы	0,37	0,20	0,77	0,13	0,78	0,41	0,58	2,30	0,92	0,27	0,51	0,49	0,08	0,49	8,30
Нефтекамский район	корн.и корни	0,10	0,21	0,53	0,07	0,53	0,35	0,42	1,36	0,71	0,54	0,42	0,01	0,08	0,36	5,69
	травы	0,39	0,28	0,81	0,17	0,64	0,37	0,59	2,08	0,87	0,32	0,71	0,45	0,12	0,45	8,25
Нуримановский район	корн.и корни	0,60	0,05	0,58	0,20	0,11	0,10	0,14	0,66	0,56	0,60	0,50	0,44	0,03	0,03	4,60
	травы	0,26	0,15	0,32	0,23	0,28	0,22	0,29	1,29	0,98	1,14	0,35	0,42	0,30	0,21	6,40

Салаватский район	корн.и корни	0,12	0,22	0,53	0,08	0,53	0,35	0,41	1,54	0,71	0,57	0,39	0,02	0,08	0,37	5,92
	трава	0,42	0,23	0,72	0,15	0,79	0,44	0,58	2,03	0,88	0,28	0,54	0,47	0,15	0,48	8,16
Стерлитамакский район	корн.и корни	0,22	0,18	0,73	0,07	0,43	0,28	0,32	1,87	0,54	0,34	0,46	0,24	0,03	0,27	5,98
	трава	0,35	0,22	0,69	0,10	0,78	0,43	0,59	2,17	0,99	0,34	0,55	0,43	0,12	0,38	8,14
Уфимский район	корн.и корни	0,11	0,20	0,53	0,06	0,49	0,32	0,39	1,51	0,68	0,51	0,11	0,05	0,06	0,31	5,33
	трава	0,16	0,25	0,58	0,04	0,77	0,45	0,63	2,00	1,04	0,56	0,41	0,01	0,21	0,49	7,60
Учалинский район	корн.и корни	0,21	0,25	0,55	0,12	0,60	0,39	0,47	1,64	0,74	0,48	0,42	0,09	0,08	0,41	6,45
	трава	0,35	0,28	0,63	0,12	0,82	0,48	0,60	2,29	0,97	0,36	0,49	0,48	0,15	0,46	8,48
Чекмагушевский район	корн.и корни	0,19	0,16	0,69	0,06	0,52	0,30	0,39	1,53	0,72	0,35	0,42	0,19	0,06	0,35	5,93
	трава	0,39	0,26	0,72	0,10	0,81	0,45	0,62	2,04	0,82	0,35	0,58	0,47	0,16	0,44	8,21

В результате исследования установлено присутствие 14 аминокислот, из которых восемь незаменимых и шесть заменимых. При этом суммарное их содержание в траве кровохлебки лекарственной превосходит в 1,2 - 1,4 раза корневища с корнями, при этом наибольшее их количество отмечается в образцах сырья, собранных в Альшеевском, Учалинском и Мишкинском районах (8,53%, 8,48% и 8,30%). В корневищах и корнях содержание аминокислот меньше, и преобладает их количество в образцах сырья, также собранных в Альшеевском, Учалинском и Мишкинском районах (6,75%, 6,45% и 6,31%).

Изучение макро- и микроэлементного состава

В растениях макро- и микроэлементы накапливаются в наиболее благоприятном для организма человека соотношении, в доступной, хорошо усваиваемой форме и, что важно, преимущественно в комплексе с различными биополимерами (белками, аминокислотами, витаминами, кислотами цикла Кребса и др.) [2, 12]. Ценность макро- и микроэлементов заключается в том, что они играют определенную роль в обмене веществ, влияют на физиологические процессы, оказывают лечебный эффект, и многие постоянно присутствуют в организме человека, растений и животных. Для человека незаменимы J, Cu, Co, Zn, F, Mn, а жизненно необходимы Ba, B, Be, Cr, Bi, Au, наряду с ними биологическая роль некоторых микроэлементов недостаточно выяснена авторами [42].

Изучение элементного состава проводилось в различных частях кровохлебки лекарственной – траве, корневищах и корнях рентгенофлуоресцентным методом (глава 2.2.3). Результаты исследования представлены в таблице 19. Проводя оценку результатов определения элементного состава, можно отметить следующее: среди *макроэлементов* в траве кровохлебки лекарственной в большем количестве накапливаются калий, натрий, фосфор, а в корневищах и корнях кальций. Максимальное количество *калия* содержится в образцах сырья из Дюргюлинского,

Кармаскалинского, Караидельского районов (травы - 1,30%; 0,96%; 0,93% соответственно, корневища и корни - 0,88%; 0,85%; 0,82%). *Натрий* - наибольшее количество отмечается в Учалинском, Кармаскалинском и Альшеевском районах (травы - 0,29%; 0,28%; 0,27%; корневища и корни - 0,26%; 0,24%; 0,23%). *Кальций* – наибольшее количество в образцах сырья из Учалинского, Дюртюлинского и Альшеевского районов (корневища и корни - 1,56%; 1,39%; 1,28%; травы - 1,25%; 1,23%; 1,19%). *Фосфор* максимальное количество в образцах сырья из Дюртюлинского, Ишимбаевского и Альшеевского районов (травы - 0,19%; 0,18%; 0,17%; корневища и корни - 0,15%; 0,14%; 0,14%).

Микроэлементы в большем количестве накапливаются в подземных органах кровохлебки лекарственной (железо, медь, марганец и йод), а цинка больше содержится в траве. *Цинк* – в траве содержание в 5-6 раз больше, чем в корневищах и корнях и наибольшее количество в образцах из Чекмагушевского, Буздякского и Стерлитамакского районов (травы - 53,12 мг/кг; 52,13 мг/кг; 47,86 мг/кг; корневища и корни - 24,10 мг/кг; 22,90 мг/кг; 21,75 мг/кг); *железо* - наибольшее количество отмечается в образцах сырья из Зиначурина, Бурзянского и Краснокамского районов (корневища и корни - 617,87 мг/кг; 537,86 мг/кг; 495,66 мг/кг; травы - 128,75 мг/кг; 128,61 мг/кг; 127,72 мг/кг); *медь* – наибольшее количество накапливается в образцах сырья из Бурзянского, Нефтекамского и Альшеевского районов (корневища и корни - 14,30 мг/кг; 13,54 мг/кг; 13,44 мг/кг; травы - 10,81 мг/кг; 10,76 мг/кг; 10,78 мг/кг); *марганец* - наибольшее количество отмечается в образцах сырья из Мишкинского, Учалинского и Кармаскалинского районов (корневища и корни - 391,67 мг/кг; 391,19 мг/кг; 385,57 мг/кг; травы - 363,30 мг/кг; 361,46 мг/кг; 357,59 мг/кг); *йод* - больше содержится в образцах сырья из Уфимского, Альшеевского и Кармаскалинского районов (корневища и корни - 0,21 мг/кг; 0,19 мг/кг; 0,18 мг/кг; травы - 0,12 мг/кг; 0,11 мг/кг; 0,10 мг/кг).

Элементный состав различных видов сырья кровохлебки лекарственной

Объект исследования	Вид сырья	Макроэлементы, %				Микроэлементы, мг/кг				
		К	Na	Ca	P	Zn	Fe	Cu	Mn	J
Альшеевский район	корн.и корни	0,48	0,23	1,28	0,14	18,68	213,17	13,44	370,85	0,11
	трава	0,78	0,27	1,19	0,18	43,69	122,18	10,78	346,75	0,19
Благоварский район	корн.и корни	0,16	0,22	1,02	0,14	20,47	282,20	13,06	364,27	0,10
	трава	0,54	0,25	0,81	0,15	24,18	119,36	10,60	299,38	0,14
Будзякский район	корн.и корни	0,65	0,21	1,20	0,02	22,90	355,73	11,48	334,65	0,10
	трава	0,82	0,24	0,99	0,13	52,13	102,51	6,03	216,51	0,16
Бурзянский район	корн.и корни	0,21	0,21	1,22	0,09	19,15	537,86	14,30	359,42	0,10
	трава	0,52	0,26	1,19	0,15	39,92	128,61	10,81	290,93	0,14
Дюртюлинский район	корн.и корни	0,88	0,17	1,39	0,15	3,46	209,33	9,84	373,78	0,08
	трава	1,30	0,19	1,23	0,19	38,18	102,52	9,66	345,16	0,16
Зианчуринский район	корн.и корни	0,45	0,18	1,18	0,14	11,51	617,87	13,15	356,13	0,10
	трава	0,91	0,22	0,53	0,16	44,25	128,75	11,12	215,04	0,15
Ишимбайский район	корн.и корни	0,13	0,20	1,22	0,14	20,31	235,12	12,42	361,26	0,09
	трава	0,79	0,25	1,02	0,17	43,26	126,78	10,67	316,66	0,16
Кармаскалинский район	корн.и корни	0,85	0,24	0,99	0,09	11,10	212,38	10,47	385,57	0,10
	трава	0,96	0,28	0,75	0,18	37,05	121,52	10,43	357,59	0,18
Караидельский район	корн.и корни	0,82	0,17	0,93	0,14	5,93	227,66	9,91	376,28	0,08
	трава	0,93	0,19	0,49	0,16	33,20	109,73	9,62	356,88	0,14
Краснокамский район	корн.и корни	0,34	0,21	1,27	0,10	15,44	495,66	11,34	362,36	0,10
	трава	0,89	0,27	0,79	0,16	39,44	127,72	10,54	201,62	0,12

Мишкинский район	корн.и корни	0,43	0,15	0,85	0,13	8,78	216,58	10,60	391,67	0,09
	трава	0,51	0,23	0,81	0,15	23,48	119,17	9,18	363,30	0,14
Нефтекамский район	корн.и корни	0,11	0,22	1,14	0,11	21,40	242,35	13,54	309,74	0,10
	трава	0,85	0,19	1,08	0,13	36,72	112,38	10,76	349,26	0,12
Нуримановский район	корн.и корни	0,65	0,13	1,03	0,08	21,21	360,40	6,11	336,79	0,06
	трава	0,82	0,27	0,32	0,08	35,62	101,21	3,51	220,61	0,15
Салаватский район	корн.и корни	0,10	0,21	1,02	0,11	20,33	248,09	13,07	356,13	0,10
	трава	0,87	0,21	0,76	0,18	42,98	123,66	10,74	328,61	0,12
Стерлитамакский район	корн.и корни	0,31	0,22	1,01	0,12	21,75	325,28	13,30	371,15	0,10
	трава	0,72	0,19	0,98	0,15	47,86	122,17	10,05	301,98	0,13
Уфимский район	корн.и корни	0,28	0,20	1,06	0,11	4,02	212,04	9,82	366,15	0,12
	трава	0,91	0,28	0,92	0,18	52,42	59,69	7,52	321,45	0,21
Учалинский район	корн.и корни	0,34	0,26	1,56	0,12	9,04	204,49	11,09	391,19	0,10
	трава	0,32	0,29	1,25	0,13	20,90	123,60	10,06	361,46	0,17
Чекмагушевский район	корн.и корни	0,15	0,23	1,00	0,14	24,10	344,72	12,68	364,61	0,11
	трава	0,87	0,25	0,95	0,16	53,12	124,75	9,84	300,19	0,14

При сравнительной оценке количественного содержания биологически активных веществ в траве, корневищах и корнях кровохлебки, для нас особый интерес представляло изучение таких групп веществ, как дубильные вещества, которые преобладают в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной, а также флавоноидов, которых достаточно много содержится в траве кровохлебки. Кроме того, как мы считаем, именно их присутствие обуславливает специфическую активность сырья кровохлебки и имеет наибольшее значение в формировании ее лечебного эффекта, т.к. известно, что флавоноиды оказывают противовоспалительное, спазмолитическое, гепатопротекторное, капилляроукрепляющее, иммуномодулирующее действия, а дубильные вещества оказывают противовоспалительное, кровоостанавливающее, вяжущее действия и взаимодействуют с воспаленной слизистой оболочкой. Учитывая, что методика количественного определения дубильных веществ имеет определенные недостатки, а для определения содержания флавоноидов необходимо подбирать оптимальные условия, необходимо было разработать объективные методики оценки содержания данных групп БАВ в сырье кровохлебки лекарственной.

4.4. Разработка методики количественного определения флавоноидов в кровохлебке лекарственной

Согласно литературным данным, надземные и подземные органы кровохлебки лекарственной содержат разные группы флавоноидов, имеющие широкий спектр терапевтического действия [107]. Поэтому, для их количественного определения необходимо было подобрать условия, позволяющие наиболее полно извлечь флавоноиды сырья. Для количественного определения флавоноидов был выбран метод дифференциальной спектрофотометрии, так как они обладают поглощением в УФ-области.

Изучение спектральных характеристик этанольных извлечений из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной и стандартных

образцов свидетелей флавоноидов показало, что полученные спектры не совпадали ни с одним веществом стандартом и это понятно, так как в спиртовых извлечениях из сырья кровохлебки лекарственной присутствуют сопутствующие вещества. В связи с этим, чтобы исключить их влияние, было использовано добавление комплексообразующей добавки - раствора алюминия хлорида (III), с которым флавоноиды образуют устойчивые в кислой среде комплексы и наблюдается батохромное смещение полос поглощения. При этом спектр приобретает четкий вид с ясно выраженными максимумами поглощения (рис. 65-66).

Спектр поглощения травы кровохлебки имеет близкий максимум к спектру рутина ($\lambda_{max}=410\pm2$ нм) (рис. 65), а спектр поглощения корневищ и корней кровохлебки имеет близкий максимум к спектру лютеолин-7-глюкозида ($\lambda_{max}=398\pm2$ нм) (рис. 66), поэтому эти флавоноиды были выбраны в качестве доминирующих в сумме, на которые в дальнейшем вели пересчет. Полученные данные согласуются с результатами хроматографического анализа (ТСХ, ВЭЖХ) спиртовых извлечений из указанных видов сырья кровохлебки.

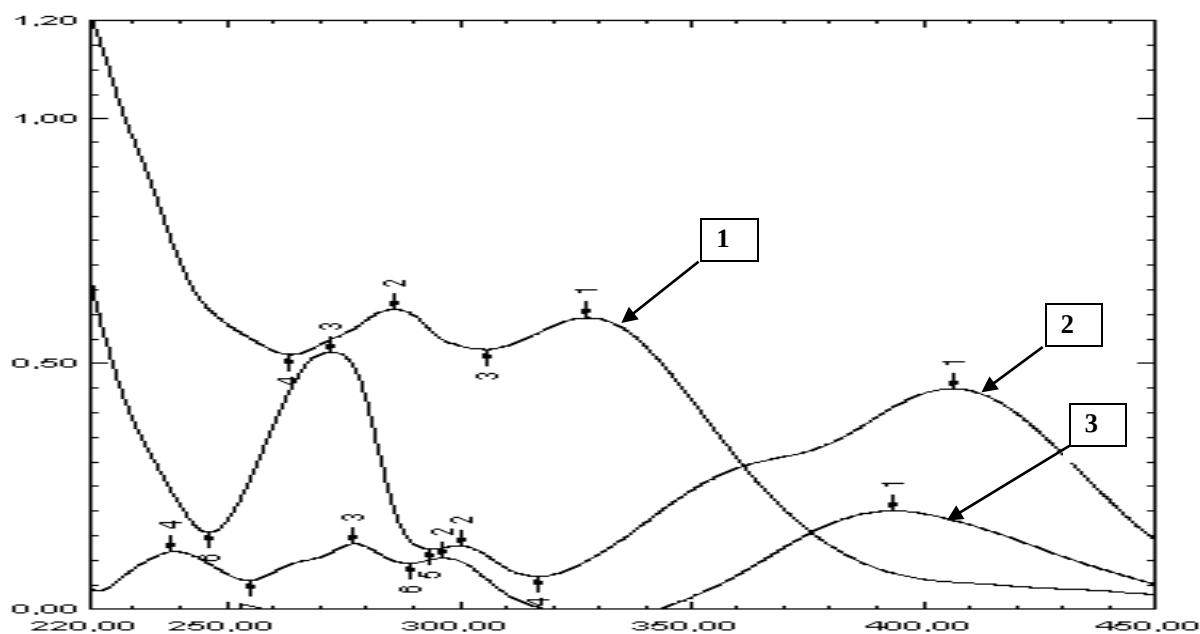


Рисунок 65. Спектры поглощения спиртового раствора из травы кровохлебки (1), дифференциальный спектр вещества стандарта – рутина (2) и извлечения из травы кровохлебки с добавлением раствора алюминия хлорида (3) ($\lambda_{max}=410\pm2$ нм).

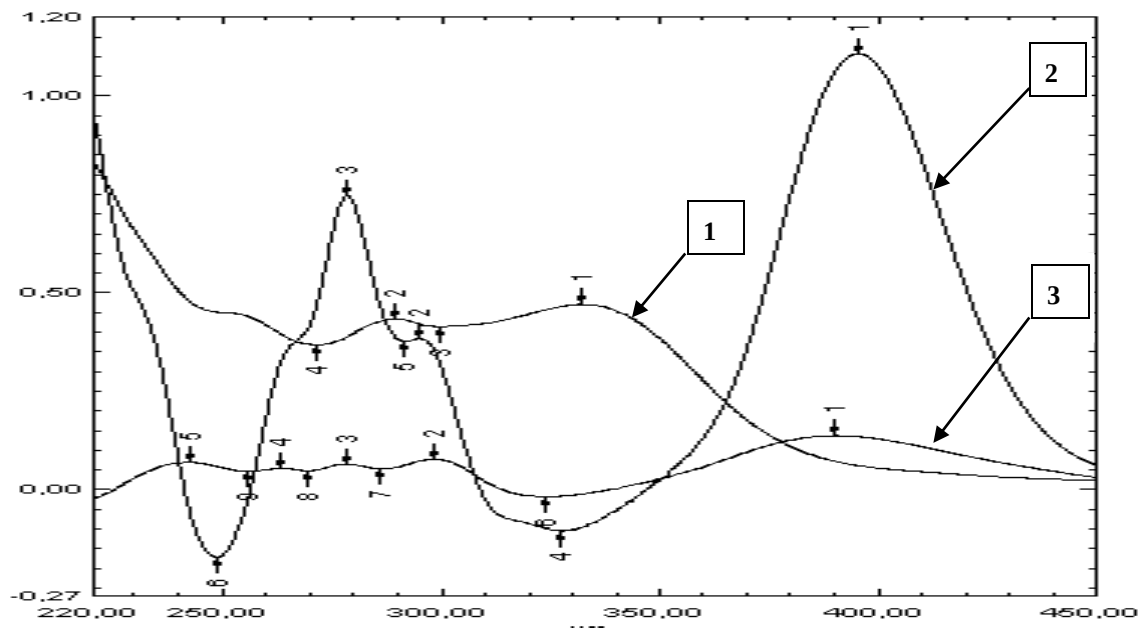


Рисунок 66. Спектры поглощения спиртового раствора из корневищ и корней кровохлебки (1), дифференциальный спектр вещества стандарта – лютеолин-7-глюкозида (2) и извлечения из корневищ и корней кровохлебки с добавлением раствора алюминия хлорида (3) ($\lambda_{\max}=398\pm2$ нм).

В дальнейшем нами было проведено изучение влияния различных факторов на выход флавоноидов из сырья кровохлебки лекарственной:

- концентрация экстрагента,
- измельченность сырья, так как размер частиц сырья влияет на полноту и скорость перехода в раствор экстрагируемых веществ,
- соотношение «сырье – экстрагент»,
- время и кратность экстракции.

При сравнительной оценке влияния экстрагента на выход флавоноидов был использован спирт этиловый различной концентрации: 90%, 80%, 70%, 50% и 40%. В полученных извлечениях определяли оптическую плотность в интервале длин волн, характерных для флавоноидов (табл. 20, рис. 67-68). В результате было установлено, что оптимальным экстрагентом, при использовании которого наблюдались более высокие значения оптической плотности является спирт этиловый 70%, который и был выбран для дальнейших исследований.

Выбор экстрагента

Концентрация спирта этилового	Оптическая плотность ($D_{ср.}$)	
	травя	корневища и корни
40%	$0,425 \pm 0,019$	$0,178 \pm 0,007$
50%	$0,427 \pm 0,022$	$0,189 \pm 0,008$
70%	$0,510 \pm 0,025$	$0,218 \pm 0,011$
80%	$0,376 \pm 0,017$	$0,175 \pm 0,006$
90%	$0,364 \pm 0,008$	$0,162 \pm 0,005$

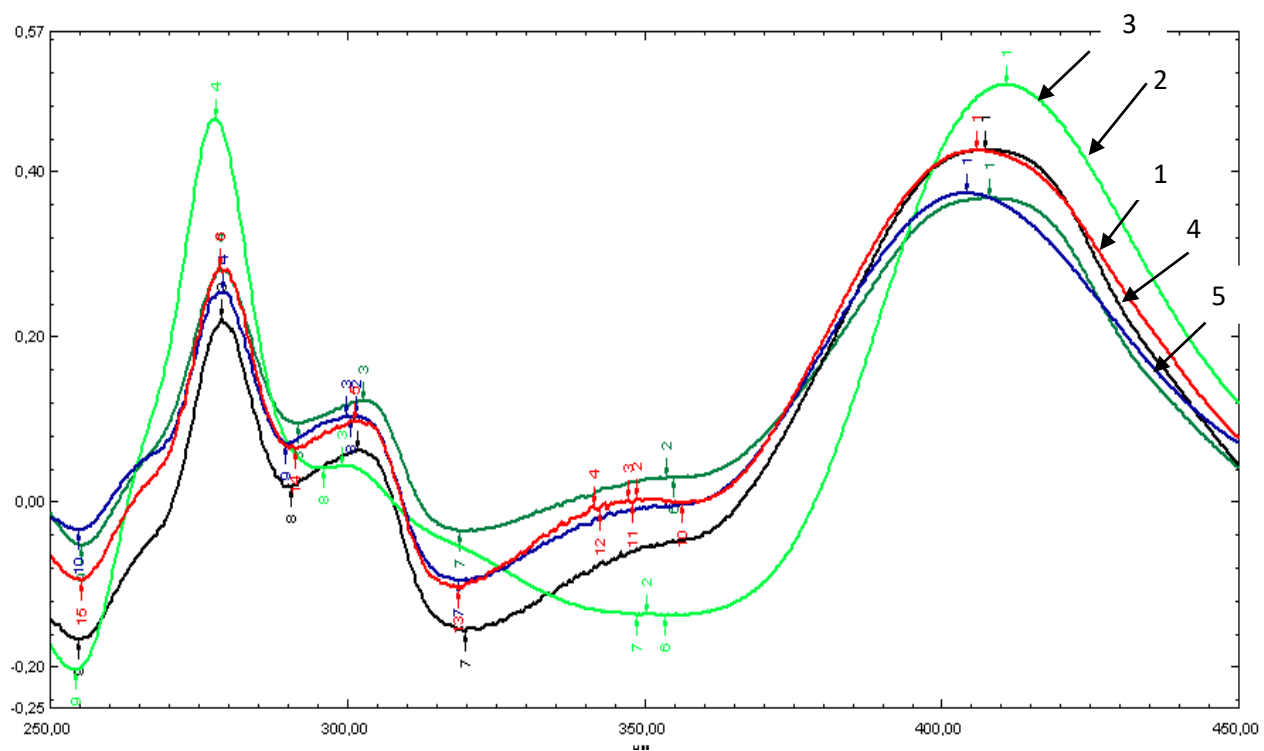


Рисунок 67. УФ-спектры спиртовых растворов из травы кровохлебки с добавлением алюминия хлорида 1- 40%, 2-50%, 3-70%, 4-80%,5-90%.

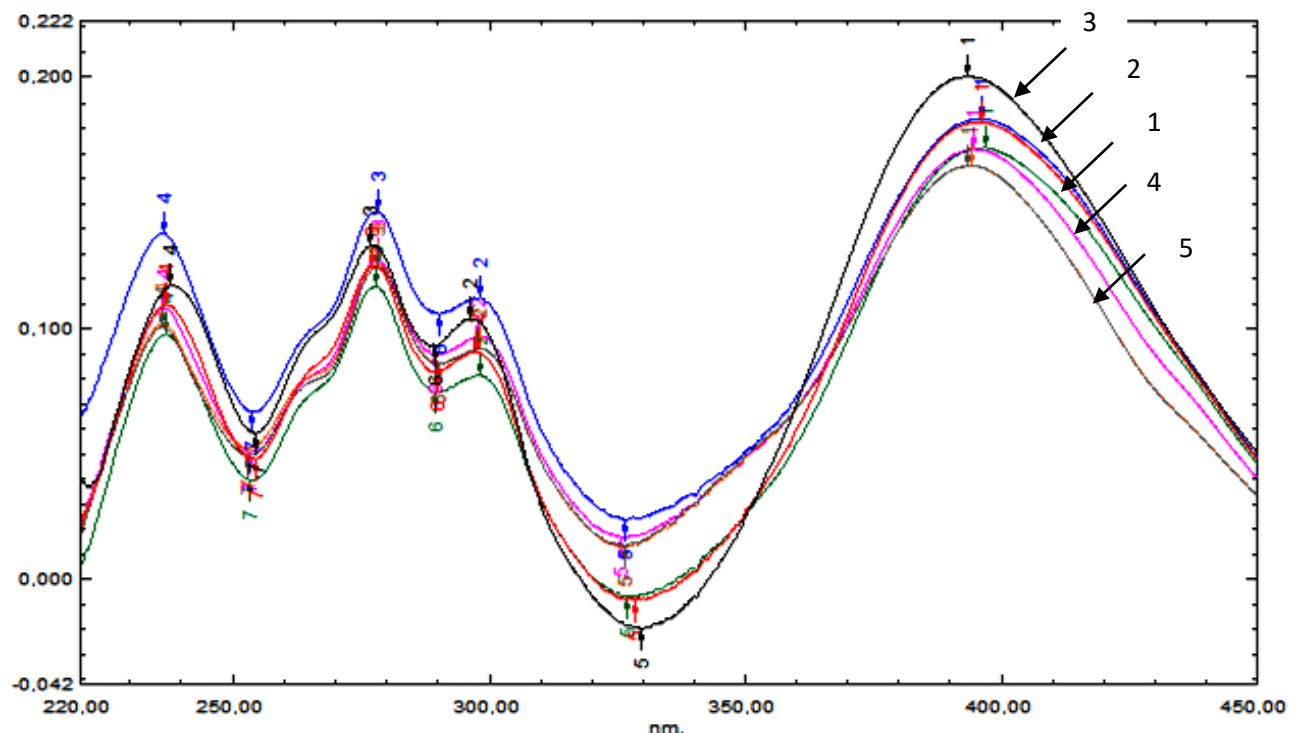


Рисунок 68. УФ-спектры спиртовых растворов из корневищ и корней кровохлебки с добавлением алюминия хлорида 1- 40%, 2-50%, 3-70%, 4-80%,5-90%.

Результаты исследований по выбору степени измельченности сырья, соотношения сырья и экстрагента, времени экстракции представлены в таблице 21.

Таблица 21

Влияние различных факторов на выход флавоноидов

Наименование параметра	Оптическая плотность (D_{cp})	
	трава	корневища и корни
<i>Измельченность сырья</i>		
1 мм	0,333±0,009	0,232±0,008
2 мм	0,419±0,013	0,286±0,013
3 мм	0,468±0,015	0,275±0,011
5 мм	0,412±0,011	0,216±0,006
<i>Соотношение сырье – экстрагент</i>		
1:30	0,409±0,010	0,377±0,010
1:50	0,549±0,016	0,463±0,014

1:100	0,508±0,012	0,425±0,010
1:150	0,346±0,009	0,307±0,009
1:200	0,184±0,004	0,171±0,005
<i>Время экстракции при температуре кипения</i>		
15 мин	0,417±0,014	0,296±0,007
30 мин	0,526±0,016	0,344±0,013
45 мин	0,479±0,014	0,328±0,010
60 мин	0,466±0,012	0,314±0,006
75 мин	0,364±0,011	0,296±0,008

Проведенные исследования показывают, что оптимальными условиями для максимального извлечения флавоноидов из сырья кровохлебки лекарственной являются следующие:

- степень измельченности для травы- частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметра 3 мм, а для корневищ и корней – 2 мм;
- соотношение сырье:экстрагент - 1:50 при первичной экстракции, время нагревания 30 минут на кипящей водяной бане .

При исследовании кратности экстракции было установлено, что оптимальным параметром является двукратная экстракция, когда флавоноиды извлекаются из сырья наиболее полно (рис. 69).

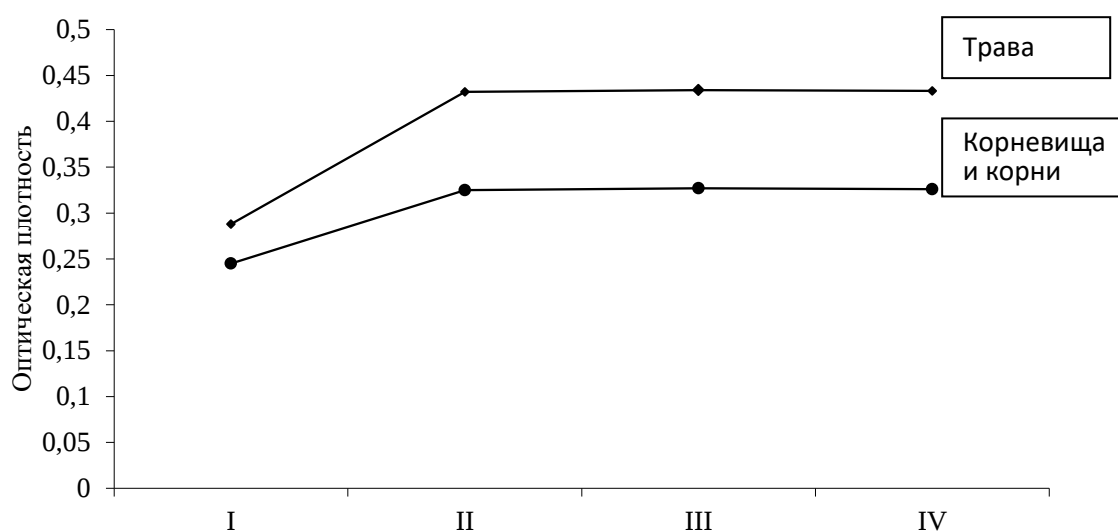


Рисунок 69. Кратность экстракции флавоноидов из сырья кровохлебки

Следующим этапом было изучение влияния на выход флавоноидов концентрации комплексообразователя, объема добавляемого раствора алюминия хлорида (III) и продолжительность реакции комплексообразования (табл. 22).

Таблица 22

Условия реакции комплексообразования флавоноидов

Концентрация комплексообразователя	Оптическая плотность комплекса (D_{cp})				
	Длина волны				
	<i>Трава</i>				
	395 нм	400 нм	405 нм	410 нм	415 нм
<i>1%AlCl₃</i>	0,359±0,008	0,387±0,009	0,410±0,011	0,491±0,009	0,486±0,011
<i>2%AlCl₃</i>	0,348±0,007	0,374±0,008	0,402±0,011	0,489±0,012	0,481±0,006
<i>5%AlCl₃</i>	0,366±0,010	0,392±0,010	0,426±0,013	0,497±0,013	0,490±0,008
<i>8%AlCl₃</i>	0,348±0,007	0,365±0,007	0,413±0,009	0,490±0,011	0,487±0,007
<i>10%AlCl₃</i>	0,326±0,005	0,351±0,006	0,378±0,008	0,475±0,010	0,469±0,006
	<i>Корневища и корни</i>				
	390 нм	395 нм	400 нм	405 нм	410 нм
<i>1%AlCl₃</i>	0,194±0,002	0,205±0,005	0,212±0,006	0,210±0,005	0,208±0,003
<i>2%AlCl₃</i>	0,231±0,004	0,233±0,005	0,246±0,006	0,244±0,005	0,242±0,002
<i>5%AlCl₃</i>	0,219±0,002	0,230±0,003	0,238±0,004	0,231±0,003	0,229±0,001
<i>8%AlCl₃</i>	0,209±0,002	0,214±0,005	0,231±0,006	0,227±0,005	0,227±0,003
<i>10%AlCl₃</i>	0,232±0,010	0,221±0,004	0,240±0,008	0,236±0,007	0,238±0,006

Анализируя полученные результаты можно отметить, что оптимальной концентрацией раствора комплексообразователя, при которой наблюдаются более высокие показатели оптической плотности, для травы кровохлебки является 5% спиртовой раствор алюминия хлорида (III), а для корневищ и корней кровохлебки – 2% раствор. Количество добавляемого раствора алюминия хлорида (III), необходимого для проведения реакции

комплексобразования, составляет для травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственных 2 мл.

При изучении времени, необходимого для образования стабильных комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом (табл. 23), было установлено, что реакция комплексобразования развивается в течение 30 мин и комплексы остаются стабильны в течение 1 часа.

Таблица 23

Время комплексобразования

Оптическая плотность (D _{ср})				
Время в мин	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Трава	0,466±0,011	0,479±0,013	0,480±0,010	0,479±0,010
Корневища и корни	0,248±0,008	0,256±0,010	0,256±0,006	0,257±0,009

Анализируя полученные результаты, было установлено, что в качестве аналитических длин волн, полученных путем сопоставления максимумов поглощения веществ-стандартов и флавоноидов сырья кровохлебки, предлагаются точки, располагающихся между их максимальными значениями: 410 нм - для травы кровохлебки (максимум рутина), 400 нм - для корневищ и корней кровохлебки (максимум лютеолин-7-глюкозида). Поэтому эти значения длин волн были выбраны для проведения количественного определения флавоноидов.

В результате проведенных выше исследований была разработана методика определения суммы флавоноидов в сырье кровохлебки лекарственной.

Методика количественного определения флавоноидов

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья, проходящего сквозь сито размером 3 мм для травы и 2 мм для корневищ и корней кровохлебки лекарственной, помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл 70% спирта этилового и нагревают в течение 30 мин на

кипящей водяной бане с обратным холодильником. Охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр, предварительно смоченный спиртом. Экстракцию повторяют, помещая фильтр обратно в колбу для экстракции, прибавляют 50 мл 70% спирта этилового и кипятят еще 30 мин. Извлечение фильтруют в ту же мерную колбу на 100 мл. После охлаждения объем извлечения доводят до метки 70% спиртом этиловым и перемешивают (*раствор А*).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл *раствора А* и прибавляют 2 мл 5% спиртового раствора алюминия хлорида в 95% спирте для травы кровохлебки или 2 мл 2% раствора алюминия хлорида для корневищ и корней кровохлебки и доводят объем раствора до метки 95% спиртом (*раствор Б*). Через 30 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 410 нм для травы кровохлебки и 400 нм для корневищ и корней кровохлебки. Раствор сравнения состоит из 1,0 мл *раствора А*, 0,1 мл 30% уксусной кислоты и доведенный 95% спиртом до метки.

Параллельно, в тех же условиях, измеряют оптическую плотность раствора комплекса стандартных веществ с алюминия хлоридом: в две мерные колбы вместимостью 25 мл помещают по 1,0 мл раствора СО рутина (для травы) или СО лютеолина-7-глюкозида, в одну колбу прибавляют 2 мл 5% спиртового раствора хлорида алюминия в 95% спирте (для травы) или 2 мл 2% раствора алюминия хлорида для корневищ и корней кровохлебки лекарственной, а в другую – 0,1 мл 30% уксусной кислоты. Объем в колбах доводят до метки 95% спиртом, перемешивают и через 30 мин измеряют оптическую плотность.

Приготовление СО рутина: 0,05 г стандартного образца рутина (точная навеска) предварительно высушенного при температуре 130-135⁰С в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95% этилового спирта при нагревании на водяной бане при периодическом перемешивании. Охлаждают, количественно переносят в другую мерную колбу на 100 мл, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают.

Приготовление СО лютеолин-7-глюкозида: 0,05 г стандартного образца лютеолин-7-глюкозида (точная навеска) предварительно высушенного при температуре 130-135⁰С в течение 3 часов, растворяют в 85 мл 95% этилового спирта при нагревании на водяной

бане при периодическом перемешивании. Охлаждают, количественно переносят в другую мерную колбу на 100 мл, доводят объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивают.

Приготовление раствора алюминия хлорида: 5% раствор - берут 5,0 г алюминия хлорида (ГОСТ 3759-75); 2% раствор – берут 2,0 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл 95% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора 95% спиртом до метки. Срок годности раствора при хранении в колбе с притертой пробкой 6 мес.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин или лютеолин-7-глюкозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot C_0 \cdot 200 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot V \cdot V_3 \cdot 100 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

D - оптическая плотность анализируемого *раствора Б*;

D₀ - оптическая плотность раствора комплекса ГСО рутина с алюминия хлоридом или лютеолин-7-глюкозида с алюминия хлоридом;

C₀ - концентрация СО рутина или лютеолин-7-глюкозида в пересчете на сухое вещество, г;

V - объем анализируемой пробы;

V₁ - объем анализируемого раствора стандарта (1 мл);

V₂ - объем разведения в мерной колбе анализируемой пробы (25 мл);

V₃ - объем разведения в мерной колбе раствора стандарта (25 мл);

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Числовые показатели содержания флавоноидов в сырье кровохлебки лекарственной определяли в аналитических пробах образцов пяти серий. Результаты исследований представлены в таблице 24.

Таблица 24

Показатели содержания флавоноидов в образцах кровохлебки

№ серии	Дата контроля	Содержание флавоноидов, %	
		в траве в пересчете на рутин	в корневищах и корнях в пересчете на лютеолин-7-глюкозид

0151	02.01.12.	3,85±0,18	1,68±0,08
0252	03.01.13.	3,74±0,17	1,77±0,07
0353	04.01.14.	4,12±0,19	1,52±0,06
0454	05.09.14.	3,98±0,17	1,85±0,08
0555	11.01.16.	3,67±0,16	1,76±0,06

Метрологические характеристики методики количественного определения флавоноидов в сырье кровохлебки лекарственной представлены в таблице 25, на основании которых можно отметить, что ошибка опытов не превышала предельно допустимых значений.

Таблица 25

**Метрологические характеристики методики количественного
определения флавоноидов в кровохлебке лекарственной**

Объект исследования	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	t(P,f)	$\Delta \bar{x}$	$\varepsilon, \%$
Трава	5	3,960	0,043	0,014	95	2,78	0,12	3,03
Корневища и корни	5	1,731	0,018	0,006	95	2,78	0,05	2,89

Отсутствие систематической ошибки методики подтверждено «опытами с добавками» стандартных образцов к навеске сырья кровохлебки лекарственной. Результаты определения представлены в таблице 26.

Таблица 26

Определение флавоноидов с добавками стандартного вещества

Содержание флавоноидов, мг	Добавлено рутина, мг	Должно быть флавоноидов, мг	Найдено флавоноидов, мг	Δx , мг	$\varepsilon, \%$
<i>Трава</i>					
38,435	0,25	38,685	39,465	0,78	1,98
38,512	0,50	39,012	39,922	0,91	2,28

38,606	0,75	39,356	38,476	-0,88	2,29
Содержание флавоноидов, мг	Добавлено лютеолин-7-глюкозида, мг	Должно быть флавоноидов, мг	Найдено флавоноидов, мг	Δx , мг	ε , %
<i>Корневища и корни</i>					
17,235	0,25	17,485	18,015	0,53	2,94
17,338	0,50	17,838	18,408	0,57	3,10
17,514	0,75	18,264	17,764	-0,50	2,81

Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье кровохлебки лекарственной по показателям: правильность, прецизионность (сходимость и воспроизводимость), специфичность и линейность (табл. 27, 28).

Таблица 27

Параметры валидационной оценки методики количественного определения флавоноидов в траве кровохлебки лекарственной

Определяемый параметр валидации	Результаты экспериментального исследования	Показатель критерия
Правильность	Средняя величина составила $100 \pm 2,18\%$	Средняя величина должна находиться в пределах $100,0 \pm 5,0 \%$
Сходимость	RSD 1-ый день – 1,45% RSD 2-ой день – 1,27%	Коэффициент вариации (отн. станд. отклонение) RSD не $> 2\%$
Воспроизводимость	Лаборатория №1: RSD = 1,63%; кр.Стьюдента – 0,89. Лаборатория №2: RSD = 1,48%; кр.Стьюдента – 0,59.	Относительное стандартное отклонение RSD не более 2%; Критерий Стьюдента должен быть меньше табличного 2,57.
Специфичность	Подтверждено совпадение спектров СО рутина и извлечения из травы кровохлебки ($\lambda_{\max}=410$ нм).	Спектр поглощения комплекса стандартного вещества рутина должен быть идентичен спектру

		поглощения комплекса с извлечением из сырья.
Линейность	Линейность определялась на пяти уровнях концентраций (80, 90, 100, 110, 120%) от теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве кровохлебки: $r=0,9976$.	Коэффициент корреляции между рядом полученных значений должен быть не ниже 0,99 .

Таблица 28

Параметры валидационной оценки методики количественного определения флавоноидов в корневищах и корнях кровохлебки

Определяемый параметр валидации	Результаты экспериментального исследования	Показатель критерия
Правильность	Средняя величина составила $100 \pm 2,95\%$	Средняя величина должна находиться в пределах $100,0 \pm 5,0 \%$
Сходимость	RSD 1-ый день – 1,86% RSD 2-ой день – 1,74%	Коэффициент вариации (отн. станд. отклонение) RSD не $> 2\%$
Воспроизводимость	Лаборатория №1: RSD = 1,56%; кр.Стьюдента – 0,62. Лаборатория №2: RSD = 1,38%; кр.Стьюдента – 0,45.	Относительное стандартное отклонение RSD не более 2%; Критерий Стьюдента должен быть меньше табличного 2,57
Специфичность	Подтверждено совпадение спектров СО лютеолин-7-глюкозида и извлечения из корневищ и корней кровохлебки ($\lambda_{\max} = 400 \text{ нм}$).	Спектр поглощения комплекса стандартного вещества лютеолин -7-глюкозида должен быть идентичен спектру поглощения комплекса с извлечением из сырья.
Линейность	Линейность определялась на пяти уровнях концентраций (80, 90, 100, 110, 120%) от теоретического содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид в	Коэффициент корреляции между рядом полученных значений должен быть не ниже 0,99 .

	корневищах и корнях кровохлебки: $r=0,9984$.	
--	--	--

Разработанные методики количественного определения флавоноидов в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной использовали для определения флавоноидов в различных образцах сырья, собранных в 18 районах Республики Башкортостан. Результаты исследований представлены в таблице 29.

Таблица 29

Показатели содержания флавоноидов в кровохлебке лекарственной

№	Район исследования	Содержание флавоноидов, %	
		травы в пересчете на рутин	корневища и корни в пересчете на лютеолин-7-глюкозид
1	Альшеевский район	4,18 ± 0,22	1,79 ± 0,06
2	Благоварский район	3,96 ± 0,20	1,65 ± 0,07
3	Буздякский район	3,87 ± 0,17	1,59 ± 0,06
4	Бурзянский район	3,66 ± 0,18	1,67 ± 0,07
5	Дюртюлинский р-он	4,25 ± 0,24	1,85 ± 0,08
6	Зианчуринский район	3,54 ± 0,15	1,54 ± 0,07
7	Ишимбайский район	3,75 ± 0,16	1,75 ± 0,07
8	Караидельский район	3,93 ± 0,22	1,61 ± 0,08
9	Кармаскалинский р-он	3,87 ± 0,19	1,68 ± 0,07
10	Краснокамский район	3,64 ± 0,14	1,66 ± 0,06
11	Мишкинский район	4,05 ± 0,21	1,74 ± 0,06
12	Нефтекамский район	3,41 ± 0,13	1,72 ± 0,06
13	Нуримановский район	3,69 ± 0,18	1,62 ± 0,05
14	Салаватский район	3,57 ± 0,15	1,56 ± 0,06
15	Стерлитамакский район	3,58 ± 0,15	1,52 ± 0,06
16	Учалинский район	3,98 ± 0,21	1,73 ± 0,06

17	Уфимский район	$3,60 \pm 0,15$	$1,61 \pm 0,07$
18	Чекмагушевский район	$3,72 \pm 0,15$	$1,58 \pm 0,06$

Оценивая полученные результаты, было установлено, что в траве кровохлебки лекарственной содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин изменялось от 3,54% до 4,25%, а в корневищах и корнях - содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид кровохлебки лекарственной изменялось от 1,52% до 1,85%. Учитывая эти показатели, предлагается установить следующие нормы: в траве - «содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин» - не менее 3,5 %, в корневищах и корнях - «содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид» - не менее 1,5 %.

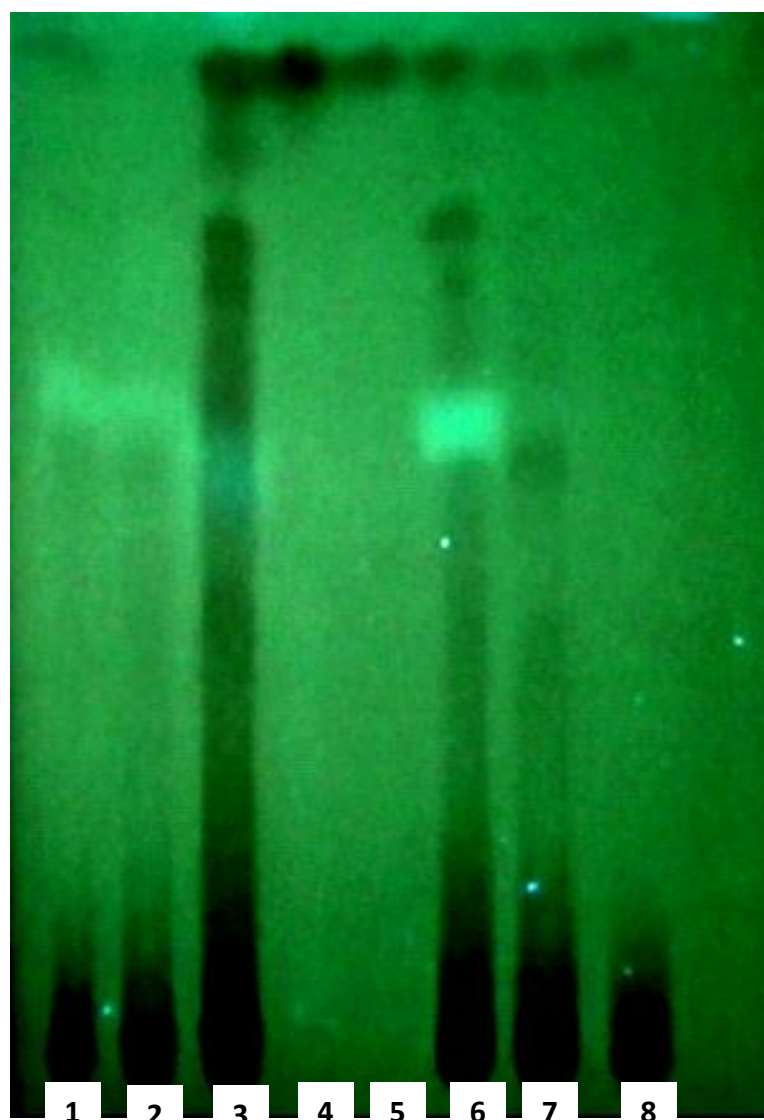
Таким образом, изучены условия и разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье кровохлебки лекарственной, по которым в дальнейшем рекомендуется проводить стандартизацию (акт внедрения №1-4, приложение №1-4). Следует отметить, что в траве кровохлебки лекарственной высокое содержание флавоноидов в пересчете на рутин, сопоставимое с известным источником рутина – травой гречихи посевной, что говорит о ее перспективности, как источнике рутина и возможности использования в качестве капилляроукрепляющего средства.

4.5. Обоснование выбора методики количественного определения дубильных веществ в кровохлебке лекарственной

Корневища и корни кровохлебки лекарственной являются официальным лекарственным растительным сырьем (ЛРС), рекомендуемым в качестве вяжущего и кровоостанавливающего средства при желудочно-кишечных заболеваниях. Диагностика и стандартизация сырья кровохлебки лекарственной в настоящее время проводится по ФС 42-1082-76, которая устарела и требует переработки в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к нормативной документации на

лекарственное растительное сырье [130]. Количественное определение дубильных веществ во всех нормативных документах на лекарственное растительное сырье, содержащее данную группу биологически активных веществ, проводится методом окислительно-восстановительного титрования, который включен в Государственную фармакопею XI – XIII издания [36-39]. Преимущества и недостатки данного метода были описаны в литературном обзоре (гл. 1.5) и отмечены другие методы, которые в настоящее время используются при определении дубильных веществ в лекарственном растительном сырье в пересчете на танин, галловую кислоту, пирогаллол, [43, 47]. В Государственной фармакопее XIII издания предлагается два метода определения дубильных веществ в ЛРС: 1 метод – также окислительно-восстановительного титрования (перманганатометрия); 2 метод спектрофотометрический основан на определении суммы дубильных веществ после осаждения кожным порошком в пересчете на пирогаллол. Поэтому нашей задачей было провести сравнительную характеристику применения различных методов количественного определения дубильных веществ в сырье кровохлебки и выбрать наиболее объективный и адекватный метод, который исключал бы влияние сопутствующих веществ на выход дубильных веществ.

Изучение качественного состава суммы полифенолов кровохлебки лекарственной и выделения преобладающего компонента проводили с использованием метода хроматографии в тонком слое сорбента. Хорошее разделение веществ наблюдалось в системе «этилацетат – муравьиная кислота – вода (14:3:3)». Обнаружение зон исследуемых веществ проводили по окраске пятен в видимом и УФ-свете, интенсивным свечением пятен на хроматограмме, которое совпадало по значению R_f и окраске со стандартными растворами кислоты галловой и катехина. Полученные изображения на хроматограмме исследовали методом денситометрии, использующимся для качественной и количественной оценки анализируемых веществ (рис. 70-71).



*Рисунок 70. Хроматограмма извлечений из кровохлебки лекарственной:
1, 2, 6 – извлечения из травы; 3, 7, 8 – извлечения из корневищ и
корней; 4 – СО галловой кислоты, 5 - СО катехина.*

При использовании метода денситометрии программа обработки хроматографических данных позволяет вводить изображения хроматограмм в прибор и компьютер, сохранять их с высоким качеством и разрешением; производить автоматический или ручной поиск пятен; проводить обработку пятен, переводить их в форму хроматографических пиков, рассчитывать значения R_f , площади и высоту пиков.

Анализируя денситограммы, в сравнении со свидетелями, можно отметить присутствие в траве, корневищах и корнях кислоты галловой (R_f

$\sim 0,89$) с преобладанием в подземных органах и катехина ($R_f \sim 0,95$) в траве и корнях.

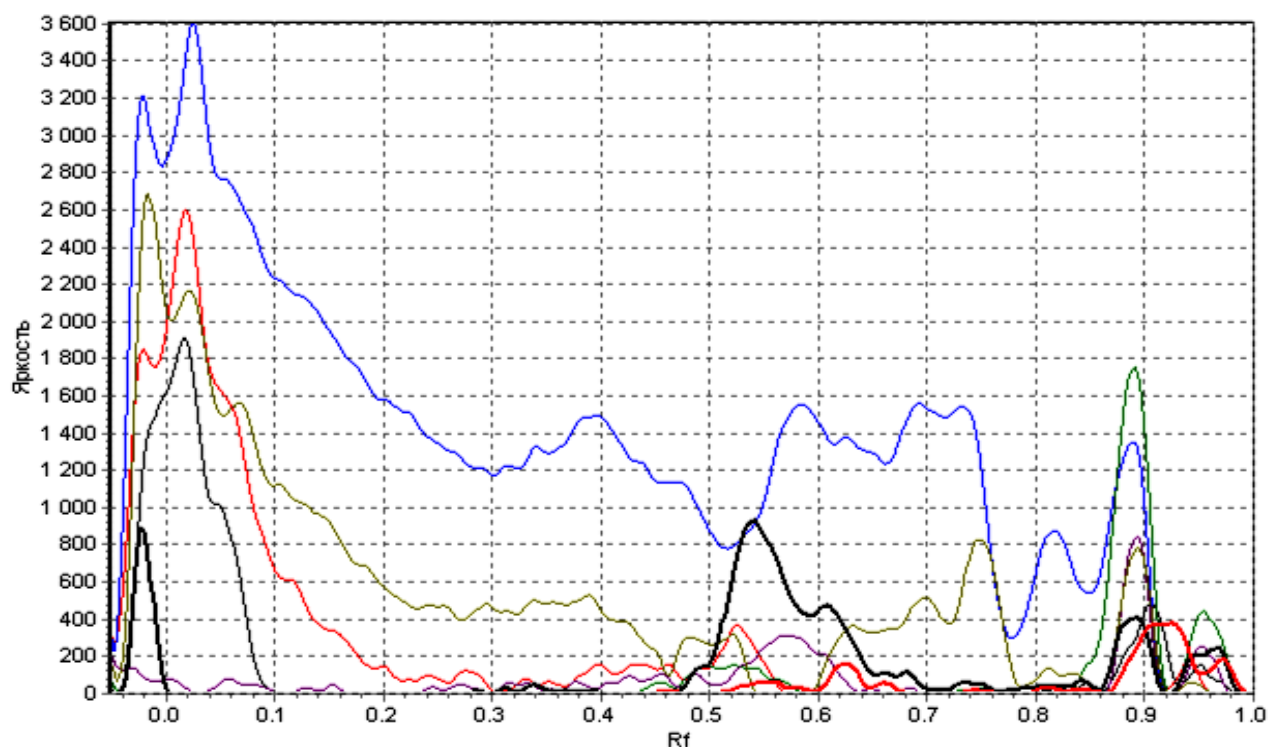


Рисунок 71. Денситограммы извлечений из кровохлебки лекарственной
красный, черный и темно-серый треки – трава; зеленый, синий,
сиреневый треки – корневища и корни

При выборе рациональной методики количественного определения дубильных веществ нами были использованы некоторые наиболее общепринятые методы, основанные на их окисляющих свойствах: *метод 1* [39] - перманганатометрический метод; *метод 2* [47] – спектрофотометрический метод, основанный на образовании окрашенных комплексов с железо-тарtratным реактивом в присутствии фосфатного буфера с $pH=8,2$; *метод 3* - спектрофотометрический метод определения суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую после их осаждения, разработанный Самылиной И.А., Абоянц Р.К., Гринько Е.Н. [113], но модифицированный нами в отношении раствора осаждения, так как авторы предлагают использовать раствор коллагена, а мы используем 1% раствор желатина.

В ходе определения дубильных веществ по методу 2 проводили изучение спектров поглощения растворов извлечений из сырья кровохлебки лекарственной, проводили сравнение со спектрами поглощения стандартного раствора кислоты галловой. В результате было отмечено, что спектры поглощения продуктов реакции дубильных веществ и стандартного образца кислоты галловой с железо-тартартным реактивом в присутствии фосфатного буфера имеют близкие значения и максимум отмечается при длине волны 545 нм (рис.72).

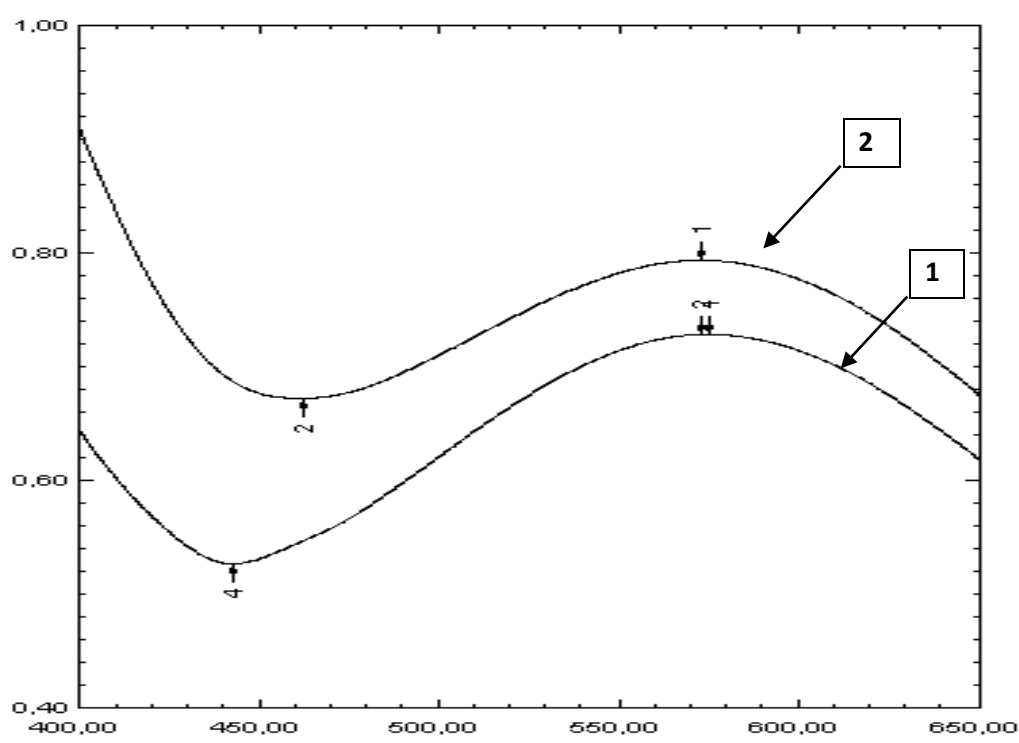


Рисунок 72. Спектр поглощения извлечения из кровохлебки лекарственной (1) и раствора СО кислоты галловой (2).

При изучении спектров поглощения водных растворов кровохлебки лекарственной и спектра поглощения стандартного раствора кислоты галловой по методу 3, было отмечено, что они совпадали и имели максимум поглощения при длине волны 277 ± 2 нм (рис. 73). УФ-спектр поглощения извлечения из кровохлебки после осаждения дубильных веществ 1% раствором желатина также имел максимум при 277 ± 2 нм, но значения оптической плотности были ниже, что подтверждает отделение группы дубильных веществ от сопутствующих, не осаждаемых раствором желатина.

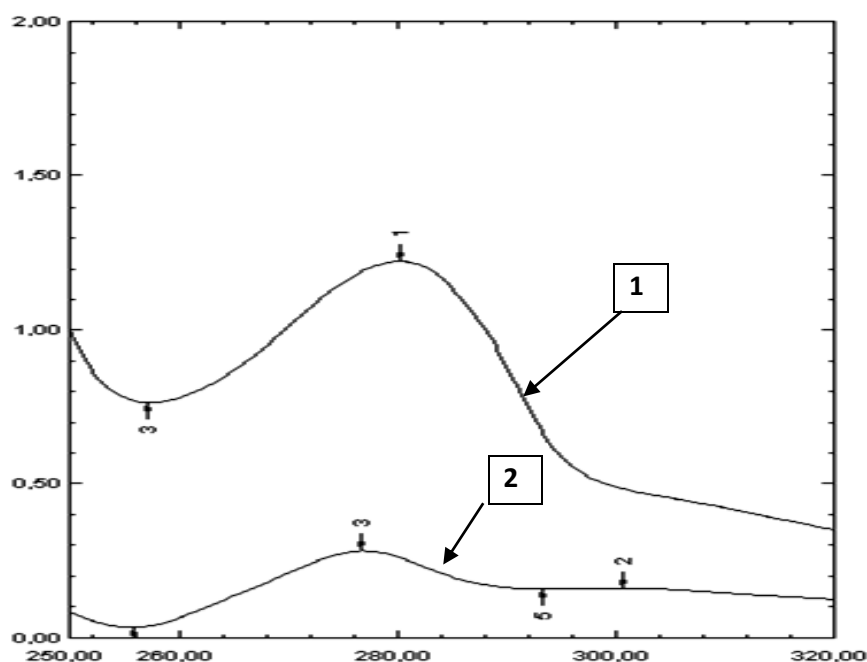


Рис. 73. Спектры поглощения: 1 - извлечение из кровохлебки (сумма дубильных веществ); 2 -извлечение кровохлебки после осаждения ДВ.

Сравнительное изучение количественного содержания дубильных веществ в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной, определенных тремя методами, мы проводили в образцах сырья кровохлебки лекарственной 6 районов Республики Башкортостан, в которых в большем количестве накапливались другие группы БАВ, по результатам предыдущих исследований, приведенных в главах 4.3, 4.4 (табл. 30).

Таблица 30

Показатели содержания дубильных веществ в кровохлебке

Наименование района	Метод 1 (ГФ-XI)	Метод 2 (СПФ с железотартратным р-вом)	Метод 3 СПФ после осаждения ДВ в пересчете на галловую кислоту)		
			Сумма ДВ,%	Осаждаемые ДВ, %	Не осаж. ДВ, %
Трава кровохлебки					
Учалинский	12,09 0,51	9,76 ± 0,36	6,12 ± 0,24	4,63 ± 0,23	1,49± 0,05
Альшеевский	11,3 ± 0,48	9,38 ± 0,34	6,35± 0,26	4,71 ± 0,24	1,64± 0,08
Караидельский	11,05±0,43	8,89 ± 0,32	5,77 ± 0,25	4,14 ± 0,25	1,45± 0,07
Кармаскалинский	10,55±0,39	8,05 ± 0,29	5,14 ± 0,23	3,78 ± 0,11	1,36± 0,06

Дюртюлинский	10,38±0,33	7,96 ± 0,24	5,09 ± 0,25	3,64 ± 0,15	1,45± 0,04
Мишкинский	10,14±0,28	7,39 ± 0,19	5,07 ± 0,24	3,11 ± 0,13	1,96± 0,05
<i>Корневища и корни кровохлебки</i>					
Учалинский	25,07±0,58	22,28 ± 0,63	19,73±0,67	14,52±0,48	5,21±0,25
Альшеевский	23,19±0,51	19,65 ± 0,59	17,06±0,62	11,45±0,44	6,61±0,22
Караидельский	22,58±0,45	19,26 ± 0,54	16,65±0,56	10,87±0,33	5,78±0,19
Кармаскалинский	21,87±0,41	18,84 ± 0,46	16,39±0,48	10,43±0,37	5,96±0,18
Дюртюлинский	21,06±0,39	17,37 ± 0,42	15,89±0,42	9,64±0,35	6,25±0,21
Мишкинский	20,95±0,35	16,65 ± 0,38	14,25±0,36	8,46±0,28	5,69±0,20

Обобщая полученные результаты количественного определения содержания дубильных веществ можно отметить, что все указанные методы недостаточно специфичны для данной группы БАВ. Методы 1 и 2 дают завышенные результаты, обусловленные участием в реакциях других групп биологически активных веществ. Использование метода 2 также дает недостаточно точные результаты, это связано с тем, что при экстракции в водное извлечение переходят не только дубильные вещества, но и другие сопутствующие соединения и с железо-тартратным реактивом взаимодействует в основном сумма катехинов, а в кровохлебке лекарственной преобладают вещества гидролизуемой (пирогалловой) группы. Наиболее достоверным для количественного определения дубильных веществ, на наш взгляд, является метод 3, так как использование данного метода позволяет отдифференцировать группу дубильных веществ путем осаждения с помощью раствора желатина от сопутствующих веществ, вести пересчет на преобладающую в сырье кислоту галловую и получить более объективные результаты. Поэтому данный метод предложен нами для проекта ФС «Корневища и корни кровохлебки».

Оценивая результаты накопления дубильных веществ по районам местообитания в РБ можно отметить, что наибольшее количество дубильных веществ накапливается у растений, произрастающих в условиях

достаточного увлажнения и освещенности на открытых и свежих лугах, лесных полянах (районы – Учалинский, Альшеевский, Караидельский), а в более сухих местообитаниях, на остепненных лугах эти показатели снижаются (Кармаскалинский, Дюртюлинский, Мишкинский).

Таким образом, количественное определение дубильных веществ в сырье кровохлебки проводили по следующей методике: около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещали в колбу вместимостью 500 мл и добавляли 250 мл воды и кипятили в течение 30 мин при периодическом перемешивании на водяной бане с обратным холодильником. Раствор охлаждали до комнатной температуры, доводили до 250 мл водой, процеживали через вату, избегая попадания частиц сырья в водное извлечение. Первые 50 мл фильтрата отбрасывали. *Определение общего количества дубильных веществ:* 2-4 мл раствора (аликвотная проба) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили водой до метки (*раствор А*). Измеряли оптическую плотность *раствора А* на спектофотометре при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду. Общее количество дубильных веществ (X_1) в пересчете на кислоту галловую (%) рассчитывали по формуле:

$$X_1 = \frac{D_1 * 250 * 50 * 100}{m * V * 508 * (100 - w)}, \text{ где}$$

Определение дубильных веществ, которые осаждаются с помощью раствора осаждения: 30 мл водного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 2-10 мл реактива осаждения (1% раствор желатина в 10% растворе натрия хлорида), взбалтывали 30-60 мин, отстаивали, фильтровали и 1-4 мл полученного фильтрата переносили в колбу вместимостью 50 мл, доводя раствор водой до метки. Получали раствор Б. Измеряли оптическую плотность раствора Б при длине волны 277 нм. В качестве сравнения использовали воду. Содержание дубильных

веществ (X_2), осаждаемых с помощью раствора осаждения, рассчитывали по формуле:

$$X_2 = \frac{(D_1 - D_2) * 250 * 50 * 100}{m * V * 508 * (100 - w)}, \text{ где}$$

D_1 – значение плотности оптической раствора А;

D_2 - значение плотности оптической раствора Б;

m - масса навески сырья (г); V - объем пробы (мл);

250 – количество общего объема раствора (мл);

50 - объем раствора А или Б (мл);

508 - значение удельного показателя поглощения кислоты галловой;

W – значение влажности сырья (%)

Метрологические характеристики методики количественного определения дубильных веществ приведены в таблице 31. Основным показателем для включения в нормативную документацию является показатель «Осаждаемые дубильные вещества». Метрологическая характеристика методики показывает, что при 5 независимых определениях ошибка среднего результата не превышает $\pm 2,91\%$ для травы кровохлебки и $\pm 3,04\%$ для корневищ и корней.

Таблица 31

Метрологические характеристики определения ДВ в кровохлебке

№	Группа БАВ	n	f	P, %	T (P,f)	X_{cp} , %	S^2	S	ΔX	E_{cp} , %
<i>Трава кровохлебки</i>										
1	Сумма ДВ	5	4	95	2,78	5,56	0,003	0,057	0,16	2,88
2	Осаждаемые ДВ	5	4	95	2,78	3,78	0,002	0,039	0,11	2,91
<i>Корневища и корни кровохлебки</i>										
3	Сумма ДВ	5	4	95	2,78	16,48	0,025	0,158	0,44	2,67
4	Осаждаемые ДВ	5	4	95	2,78	10,87	0,014	0,118	0,33	3,04

Отсутствие систематической ошибки методики подтверждено «опытами с добавками» стандартного образца кислоты галловой к навеске сырья кровохлебки. Результаты определения представлены в таблице 32.

Таблица 32

**Определение дубильных веществ с добавками стандартного
вещества кислоты галловой**

Содержание дубильных в-в в аликвоте, мкг	Добавлено к-ты галовой, мкг	Ожидаемое содержание, мкг	Полученное содержание, мкг	Ошибка	
				абс., мкг	отн.,%
Трава кровохлебки					
37,82	50	87,82	89,46	1,64	1,83
37,82	100	137,82	135,07	- 2,75	2,03
37,82	150	187,82	184,70	-3,12	1,69
Корневища и корни кровохлебки					
108,74	50	158,74	156,48	-2,26	1,44
108,74	100	228,74	232,20	3,46	1,49
108,74	150	258,74	254,62	-4,12	1,62

По результатам оценки содержания дубильных веществ в надземных и подземных органах кровохлебки лекарственной установлено, что в большем количестве они накапливаются в корневищах и корнях, поэтому предлагается стандартизацию корневищ и корней проводить именно по этому показателю.

Проведена валидационная оценка методики количественного определения суммы дубильных веществ в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной по критериям правильность, прецизионность, линейность и специфичность (табл. 33).

Параметры валидационной оценки методики количественного определения дубильных веществ в корневищах и корнях, траве кровохлебки лекарственной

Определяемый параметр валидации	Результаты экспериментального исследования	Показатель критерия
<i>Трава</i>		
Правильность	Средняя величина составила $100 \pm 1,52\%$	Средняя величина должна находиться в пределах $100,0 \pm 5,0 \%$
Сходимость	RSD 1-ый день – 1,71% RSD 2-ой день – 1,56%	Коэффициент вариации (отн. станд. отклонение) RSD не $> 2\%$
Воспроизводимость	Лаборатория №1: RSD = 1,33%; кр.Стьюдента – 0,27. Лаборатория №2: RSD = 1,24%; кр.Стьюдента – 0,19.	Относительное стандартное отклонение RSD не более 2%; Критерий Стьюдента должен быть меньше табличного 2,57.
Специфичность	Подтверждено совпадение спектров СО кислоты галловой и извлечения из травы кровохлебки ($\lambda_{\max} = 277 \text{ нм}$).	Спектр поглощения комплекса стандартного вещества кислоты галловой должен быть идентичен спектру поглощения комплекса с извлечением из сырья.
Линейность	Линейность определялась на пяти уровнях концентраций (80, 90, 100, 110, 120%) от теоретического содержания суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую в корневищах и корнях кровохлебки: $r=0,9956$.	Коэффициент корреляции между рядом полученных значений должен быть не ниже 0,99 .
<i>Корневища и корни</i>		
Правильность	Средняя величина составила $100 \pm 1,85\%$	Средняя величина должна находиться в пределах $100,0 \pm 5,0 \%$
Сходимость	RSD 1-ый день – 1,92%	Коэффициент вариации

	RSD 2-ой день – 1,78%	(отн. станд. отклонение) RSD не > 2%
Воспроизводимость	Лаборатория №1: RSD = 1,54%; кр.Стьюдента – 0,47. Лаборатория №2: RSD = 1,29%; кр.Стьюдента – 0,33.	Относительное стандартное отклонение RSD не более 2%; Критерий Стьюдента должен быть меньше табличного 2,57.
Специфичность	Подтверждено совпадение спектров СО кислоты галловой и извлечения из корневищ и корней кровохлебки ($\lambda_{\max} = 277$ нм).	Спектр поглощения комплекса стандартного вещества кислоты галловой должен быть идентичен спектру поглощения комплекса с извлечением из сырья.
Линейность	Линейность определялась на пяти уровнях концентраций (80, 90, 100, 110, 120%) от теоретического содержания суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую в корневищах и корнях кровохлебки: $r=0,9975$.	Коэффициент корреляции между рядом полученных значений должен быть не ниже 0,99 .

Поскольку данный показатель планируется для введения в нормативную документацию, то проводили оценку содержания осаждаемых дубильных веществ для сырья кровохлебки лекарственной. Исследование проводилось на 5 сериях, результаты представлены в таблиц 34.

Таблица 34

Результаты определения содержания дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки

№ серии	Дата контроля	Содержание дубильных веществ, %		
		осаждаемых ДВ	неосаждаемых ДВ	сумма ДВ
Трава				
1210	10.04.11.	4,71 ± 0,24	1,64± 0,08	6,35± 0,26
1111	13.04.12.	4,14 ± 0,25	1,45± 0,07	5,77 ± 0,25

1312	06.04.13.	$3,78 \pm 0,11$	$1,36 \pm 0,06$	$5,14 \pm 0,23$
1413	15.04.14.	$3,64 \pm 0,15$	$1,45 \pm 0,04$	$5,09 \pm 0,25$
1514	21.04.15.	$3,11 \pm 0,13$	$1,96 \pm 0,05$	$5,07 \pm 0,24$
<i>Корневища и корни</i>				
0410	19.04.11.	$14,52 \pm 0,48$	$5,21 \pm 0,25$	$19,73 \pm 0,67$
0511	22.04.12.	$9,06 \pm 0,28$	$5,69 \pm 0,20$	$14,75 \pm 0,36$
0612	25.04.13.	$10,42 \pm 0,39$	$6,23 \pm 0,19$	$16,65 \pm 0,56$
0713	28.04.14.	$11,45 \pm 0,44$	$6,61 \pm 0,22$	$18,05 \pm 0,62$
0814	30.04.15.	$8,44 \pm 0,35$	$6,25 \pm 0,21$	$15,89 \pm 0,42$

Оценивая полученные результаты можно отметить, что в траве кровохлебки лекарственной содержание осаждаемых дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую изменялось от 3,11% до 4,71%, а в корневищах и корнях - от 8,44% до 14,52%. Учитывая эти показатели, предлагается установить следующие нормы: в траве - «содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую» - не менее 3,0 %, в корневищах и корнях кровохлебки - «содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую» - не менее 8,0%.

Таким образом, разработана методика спектрофотометрического количественного определения дубильных веществ в сырье кровохлебки лекарственной после осаждения их 1% раствором желатина в пересчете на кислоту галловую. Проведена сравнительная оценка количественного определения ДВ в траве, корневищах и корнях кровохлебки лекарственной тремя методами. Установлено, что метод спектрофотометрии после осаждения дубильных веществ более избирателен по сравнению с титриметрическим и спектрофотометрическим методом при взаимодействии с железо-тарtratным реактивом (акт внедрения №1-4, приложение №1-4).

4.6. Изучение динамики накопления флавоноидов в траве и дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной

Для выбора оптимального времени заготовки сырья кровохлебки лекарственной изучалась динамика накопления основных групп биологически активных веществ в разные периоды вегетации. В качестве основных групп биологически активных веществ в траве кровохлебки выбраны флавоноиды в пересчете на рутин, а в корневищах и корнях – дубильные вещества, так как, именно эти группы соединений обуславливают их основные фармакологические свойства и применение. Исследования проводились в период с 2012-2014 гг. Сезонная динамика накопления флавоноидов в траве кровохлебки представлена на рисунке 74.

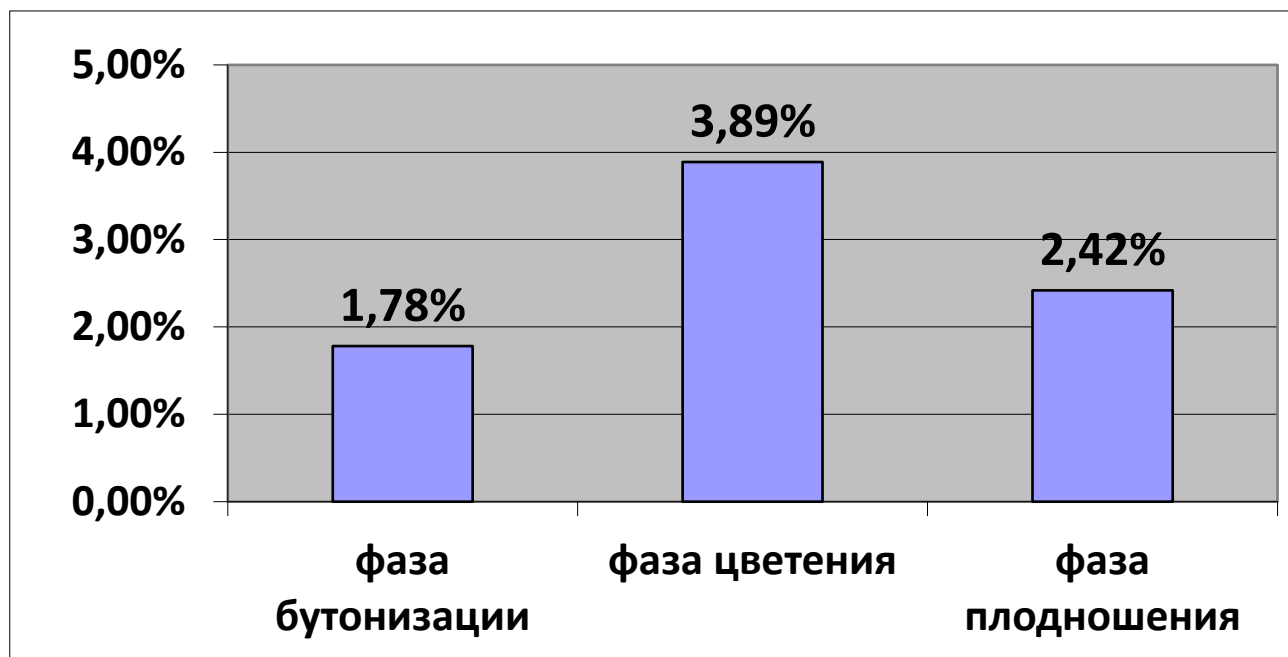


Рисунок 74. Динамика накопления флавоноидов в траве кровохлебки в разные фазы вегетации

Анализируя полученные результаты следует отметить, что наибольшее содержание флавоноидов в пересчете на рутин отмечается в фазу цветения.

Динамика накопления дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной представлена на рисунке 75. В результате установлено, что наибольшее содержание дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной отмечается в фазу плодonoшения.

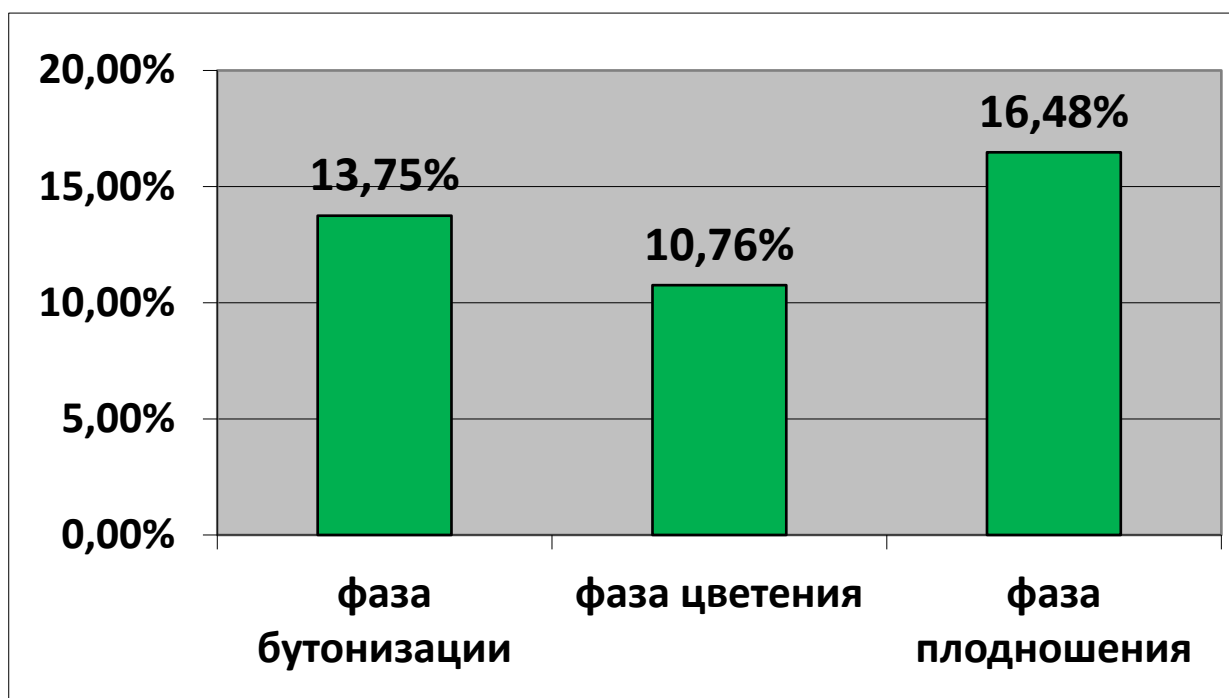


Рисунок 75. Динамика накопления дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки

В результате исследований установлено, что фенольные соединения неравномерно распределены по органам кровохлебки лекарственной. В корневищах и корнях кровохлебки содержится большее количество фенольных соединений (в том числе и флаванов) по сравнению с листьями и стеблями. Содержание фенольных соединений изменяется в процессе вегетации. В корневищах и корнях наибольшее содержание суммы растворимых фенольных соединений отмечено в фазу бутонизации и плодоношения, а в траве – в фазу цветения.

Таким образом, изучена сезонная динамика накопления основных групп биологически активных веществ в сырье кровохлебки лекарственной в разные фазы вегетации растения и установлено, что наибольшее содержание флавоноидов в пересчете на рутин в траве отмечается в фазу цветения, а дубильных веществ в корневищах и корнях в фазу плодоношения, следовательно, эти периоды вегетации растения являются оптимальными для заготовки сырья.

4.7. Стандартизация сырья кровохлебки лекарственной

Результаты проведенных товароведческих, морфолого-анатомических и фитохимических исследований легли в основу разработки проекта фармакопейной статьи (ФС) на корневища и корни кровохлебки лекарственной с целью переработки устаревшей фармакопейной статьи и создания новой, а также на траву кровохлебки, в которых предложены критерии подлинности и доброкачественности сырья, необходимые для стандартизации (табл. 35, 36) (акты внедрения № 6-8, приложения №6-8).

Таблица 35

Показатели качества корневищ и корней кровохлебки лекарственной

<i>Показатели</i>	<i>Методы анализа</i>	<i>Нормы</i>
Внешние признаки	ГФ-ХІ, вып.1, визуально с помощью лупы или стереомикроскопа	смесь одревесневших кусков, длина которых до 20 см, толщина - 0,5 – 2,5 см; поверхность корней и корневищ гладкая или слегка продольно-морщинистая; излом корневищ неровный, у корней более ровный; цвет темно-бурый, почти черный, на изломе желтоватый, желтовато-бурый; запах отсутствует.
Микроскопия	ГФ-ХІ, вып.1	Характерные диагностически значимые признаки корневищ и корней кровохлебки
Качественные реакции	С раствором железо-аммонийных квасцов Цветная реакция со спиртовым раствором алюминия хлорида (III)	Черно-синее окрашивание (дубильные вещества) Желто-зеленое окрашивание (флавоноиды)
	ТСХ	Соответствует ФС

Числовые показатели: <i>Измельченное сырье</i> Содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид	Спектрофотометрия Спектрофотометрия	Не менее 8,0% Не менее 1,5%
Влажность	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 13%
Золы общей	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 12%
Золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты НСL	ГФ-ХІ, вып.2	Не более 5 %
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями 5 мм	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 10%
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 10%
Примеси - корневищ и корней, почер-невших или побуревших в изломе	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 10%
Органической примеси	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 1%
Минеральной примеси	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 1%
Микробиологическая чистота	ОФС 42-0016-04, ОФС 42-0067-07, ГФ XII (т.1, разд. 32)	Категория 4А
Радиологическая чистота	СанПиН 2.3.2.1078-01 п.п. 1.6.10, ОФС 42-0011-03	Радионуклиды отсутствуют

Таблица 36

Показатели качества травы кровохлебки лекарственной

<i>Показатели</i>	<i>Методы анализа</i>	<i>Нормы</i>
Внешние признаки	ГФ-ХІ, вып.1, визуально с помощью лупы или стереомикроскопа	смесь листьев, соцветий, кусочков стеблей ребристых, полых, голых, зеленого цвета; листья сверху блестящие темно-зеленые, снизу тусклые сизо-зеленые; цветки темно-красные, в

		продолговато-овальных головках на прямых цветоносах; запах своеобразный или отсутствует.
Микроскопия	ГФ-ХІ, вып.1	Характерные диагностически значимые признаки травы кровохлебки
Качественные реакции	С раствором железо-аммонийных квасцов Цветная реакция со спиртовым раствором алюминия хлорида (III); ТСХ	Черно-синее окрашивание (дубильные вещества) Желто-зеленое окрашивание (флавоноиды) Соответствует ФС
Числовые показатели: <i>Измельченное сырье</i> Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин Содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую	Спектрофотометрия Спектрофотометрия	Не менее 3,5% Не менее 3,0%
Влажность	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 13%
Золы общей	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 10%
Золы, нерастворимой в 10 % растворе кислоты HCL	ГФ-ХІ, вып.2	Не более 2 %
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверст. 7 мм	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 10%
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 0,5 мм	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 10%
Органической примеси	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 1%
Минеральной примеси	ГФ-ХІ, вып.1	Не более 1%
Микробиологическая чистота	ОФС 42-0016-04, ОФС 42-0067-07, ГФ XII (т.1, разд. 32)	Категория 4А
Радиологическая чистота	СанПиН 2.3.2.1078-01 п.п. 1.6.10, ОФС 42-0011-03	Радионуклиды отсутствуют

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4:

1. Определены критерии подлинности и показатели качества травы, корневищ и корней кровохлебки.

2. Проведено сравнительное изучение химического состава травы, корневищ и корней кровохлебки. С использованием методов качественного анализа, хроматографических и спектральных исследований установлено присутствие таких групп БАВ как, полисахариды, органические кислоты, аскорбиновая кислота, аминокислоты, сапонины, каротиноиды, флавоноиды, дубильные вещества, оксикоричные, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, макро- и микроэлементы. Присутствие веществ фенольной природы подтверждено методом ВЭЖХ: в траве идентифицировано 7 флавоноидов (рутин, кверцитрин, лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, лютеолин, кемпферол, катехин), 5 фенолкарбоновых и оксикоричных кислот (галловая, эпигаллокатехингаллат, хлорогеновая, кофейная, феруловая) и кумарин; в корневищах и корнях – идентифицировано 4 флавоноида (лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, гиперозид, катехин), 4 соединения, относящиеся к фенолкарбоновым и оксикоричным кислотам (галловая, эпигаллокатехингаллат, хлорогеновая и кофейная) и кумарин, причем такие флавоноиды как лютеолин, лютеолин-7-глюкозид обнаружены впервые. Выделены и идентифицированы индивидуальные вещества методом препаративной хроматографии (рутин, лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, лютеолин, катехин, гиперозид, галловая, кофейная, хлорогеновая, феруловая кислоты), структура которых подтверждена сравнением спектральных характеристик (УФ-, ИК-). Методом хроматомасс-спектрометрии изучен компонентный состав жирорастворимого комплекса травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной и установлено присутствие в траве 13 веществ, а в корневищах и корнях 15 соединений, относящихся к высомолекулярным жирным кислотам и их производным, фитостеринам и соединениям терпеновой природы.

3. Определено количественное содержание различных групп биологически активных веществ и установлено, что в траве преобладают органические кислоты ($2,27 \pm 0,09\%$), аскорбиновая кислота ($0,521 \pm 0,02\%$), каротиноиды ($0,036 \pm 0,001\%$), кумарины ($0,326 \pm 0,014\%$), флавоноиды ($4,25 \pm 0,22\%$), аминокислоты (суммарное содержание $8,53 \pm 0,37\%$), а в корневищах и корнях – полисахариды ($5,18 \pm 0,24\%$), сапонины ($3,71 \pm 0,17\%$), оксикоричные кислоты ($1,91 \pm 0,08\%$), дубильные вещества в пересчете на кислоту галловую ($14,52 \pm 0,51\%$). Определен макро- и микроэлементный состав и установлено, что в траве в большем количестве накапливаются калий, натрий, фосфор, цинк, а в корневищах и корнях – кальций, железо, медь, марганец, йод.

4. Разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов и суммы дубильных веществ после их осаждения раствором желатина в траве, корневищах и корнях кровохлебки. Установлены нормы их содержания: в траве «содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин» - не менее 3,5 %, «содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую» - не менее 3,0 %; в корневищах и корнях - «содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид» - не менее 1,5 %, «содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую» - не менее 8,0%. Проведена их валидационная оценка, которая показала соответствие критериям правильность, прецизионность, линейность и специфичность.

5. Изучена сезонная динамика накопления основных групп биологически активных веществ в сырье кровохлебки лекарственной в разные фазы вегетации растения и установлено, что наибольшее содержание флавоноидов в траве отмечается в фазу цветения, а дубильных веществ в корневищах и корнях в фазу плодоношения, следовательно, эти периоды вегетации растения являются оптимальными для заготовки сырья.

6. Разработаны критерии подлинности и показатели качества сырья кровохлебки лекарственной и предложены нормы их содержания: *в траве* -

влажность не более 13%; содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 3,5%; %; содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую не менее 3%; зола общая не более 10%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 2%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями 7 мм – не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%; *в корневищах и корнях*: влажность не более 13%; содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую не менее 8%; содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид не менее 1,5%; зола общая не более 12%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 5%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями 5 мм – не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм – не более 10%; примеси корневищ и корней, почерневших или побуревших в изломе не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%. Определена микробиологическая чистота сырья кровохлебки и проведен радиологический контроль.

7. Разработаны проекты ФС «Кровохлебки корневища и корни» и «Кровохлебки трава».

ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРАВЫ, КОРНЕВИЩ И КОРНЕЙ КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ (*SANGUISORBA OFFICINALIS* L.)

5.1. Определение противовоспалительной активности

Для сравнительной оценки противовоспалительной активности водных извлечений из сырья кровохлебки применяли скрининговую модель формалинового отека лапы у мышей [132].

Исследования проводились на 36 взрослых белых мышах – самцах массой 19 – 25 г. Для экспериментов отбирали животных со средней двигательной активностью, преобладающих в популяции и, следовательно, можно утверждать, что у этих мышей будет развиваться наиболее типичная реакция на любое воздействие.

Подопытных животных содержали в условиях вивария (с естественным режимом освещения; при температуре 22-24°C) и свободным доступом к воде и пище. Перед постановкой эксперимента животные проходили карантин в течение 10-14 дней. Затем животным вводили внутривенно с помощью специального зонда водные извлечения, приготовленные из травы и корней кровохлебки, в количестве 0,08 – 0,1 мл в превентивном режиме курсом в течение 7 дней. Контрольная группа получала воду. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак-натрия «Хемофарм А.Д.» в дозе 10 мг/кг. В последний день через час после введения извлечений вводили флогоген. Острое воспаление индуцировали введением под подошвенный апоневроз правой лапки мыши 0,05 мл 1% раствора формалина. Это вызвало развивающийся во времени отек лапки [1, 2]. Через 5ч животных усыпляли под эфирным наркозом, соблюдая «Правила работы с лабораторными животными» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977г. № 755).

Противовоспалительный эффект оценивали по уменьшению отека лапок и проводили статистическую обработку результатов исследования [31]. Результаты исследования представлены в таблице 37.

Таблица 37

**Противовоспалительная активность извлечений из сырья
кровохлебки лекарственной**

Группа	Прирост массы конечности, мг Me (25% – 75%)
Контроль	90,0 [70,0 – 96,0]
Водный раствор травы кровохлебки (1:10)	66,0 [54,0 – 70,0]*
Водный раствор корневищ и корней кровохлебки (1:10)	81,0 [70,0 – 86,0]
Спиртовый экстракт травы 1:10	60,0 [52,0 – 70,0]*
Спиртовый экстракт корневищ и корней кровохлебки (1:10)	77,0 [66,0 – 92,0]
Диклофенак-натрий (10 мг/кг)	72,0 [68,0 - 82,0]
* - различия достоверны по сравнению с контрольной группой по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$)	

Анализируя полученные данные можно отметить, что все протестированные водные извлечения кровохлебки лекарственной при внутрижелудочном введении проявляли противовоспалительную активность, но более выраженной она была для спиртовых экстрактов в отличие от водных и для травы кровохлебки по сравнению с корневищами и корнями. Введение извлечений из травы кровохлебки лекарственной достоверно уменьшало отек лапок у мышей на 26,7% при применении водного раствора и на 33,3% при использовании спиртового экстракта из травы кровохлебки. При применении извлечений из корневищ и корней отек лапок уменьшался в

меньшей степени: на 10% при использовании водного раствора и на 14,4% при применении спиртового экстракта.

5.2.Определение антиоксидантной активности

Антиоксидантную активность водных извлечений определяли методом регистрации хемилюминесценции на приборе «Хемилюминомер ХЛМ-003» в системах, моделирующих процессы выработки активных форм кислорода (АФК) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) [89, 127].

В качестве МС, где генерировались АФК, использовали 10 мл фосфатного буфера (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl) с добавлением раствора люминола (10⁻⁵ М) и цитрата натрия (50 мМ). Основными наиболее информативными характеристиками ХЛ служили светосумма свечения, определяющаяся по интенсивности излучения, и амплитуда максимального свечения.

Влияние исследуемых водных экстрактов на ПОЛ изучали в липидах куриного желтка, сходных по составу с липидами крови. Окисление липидов инициировалось введением сернокислого железа, катализирующего окисление ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов, и образование продуктов перекисного окисления. По интенсивности свечения судили о процессах ПОЛ. Результаты исследования свидетельствуют о существенном ингибирующем влиянии исследуемых образцов кровохлебки лекарственной на кинетику свободнорадикального окисления в системе АФК и ПОЛ.

При добавлении в модельную систему, где генерировались АФК, водных извлечений травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной уменьшалась амплитуда быстрой вспышки, удлинялся латентный период, медленная вспышка начиналась позже и угасала раньше, значение максимальной светимости снижалось (рис. 76). Вследствие этого самая показательная характеристика хемилюминесценции – светосумма свечения -

была меньшей по сравнению с контролем. Результаты исследования представлены на рисунке 76 и в таблице 38.

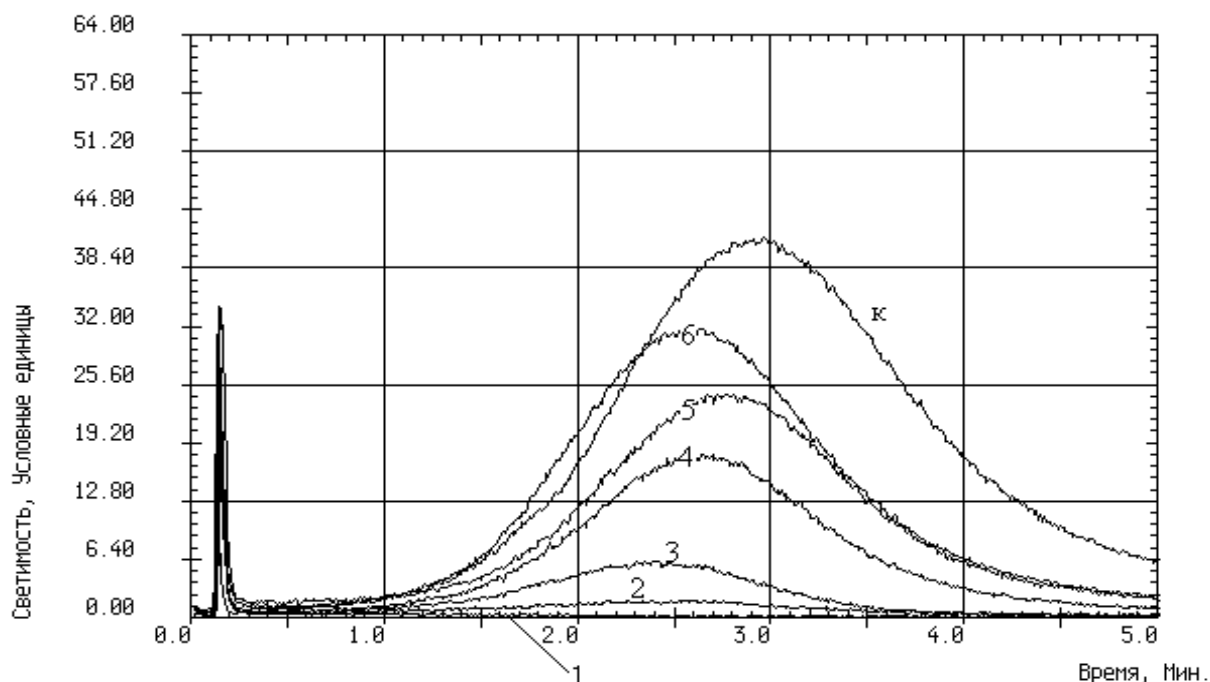


Рисунок 76. Влияние водных извлечений корневищ с корнями и травы кровохлебки лекарственной на процессы СРО в модельной системе АФК: К – контроль, 1, 3, 4 – водные извлечения из корневищ с корнями кровохлебки 1,0 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,01 мг/мл; 2, 5, 6 – водные извлечения из травы кровохлебки 1,0 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,01 мг/мл.

Таблица 38

Влияние травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной на светосумму МС, генерирующей АФК

Опыт	Концентрация, мг/мл	ХЛ в модели АФК, %.
Контроль		100
Водные извлечения из корневищ и корней кровохлебки	0,01	36,9±3,5*
	0,1	13,2±2,4**
	1,0	2,0±0,8***
Водные извлечения из травы кровохлебки	0,01	68,3±2,8*
	0,1	54,9±0,2*
	1,0	6,5±0,1***

Угнетение ХЛ зависело от объема добавляемого в модельную систему водного извлечения травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной (0,01 мг/мл; 0,1 мг/мл; 1,0 мг/мл). Чем концентрация вводимого раствора была выше, тем сильнее подавлялось свечение, что свидетельствовало о дозозависимом эффекте исследуемых экстрактов.

Внесение водных извлечений травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной в МС желточных липопротеидов даже в наименьшей концентрации сопровождалось уменьшением амплитуды быстрой и медленной вспышек, увеличением длительности латентного периода, снижением значения максимальной светимости (рис. 77, кривые 5, 6). Уровень свечения МС при добавлении водных извлечений травы, корневищ и корней кровохлебки в концентрациях 0,1 и 1,0 мг/мл подавлялся практически до нуля, следовательно, водные экстракты исследуемых образцов кровохлебки лекарственной могут рассматриваться как активные антиоксиданты перекисного окисления липидов.

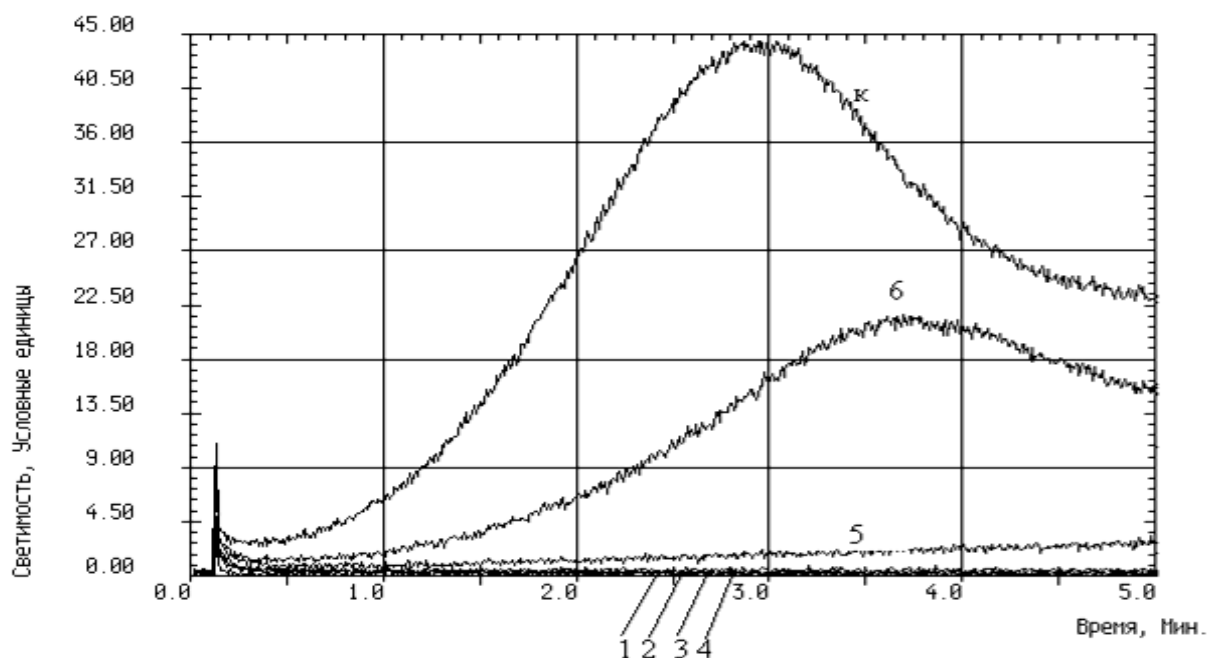


Рисунок 77. Влияние водных извлечений корневищ с корнями и травы кровохлебки лекарственной на процессы СРО в модельной системе ПОЛ: К – контроль, 1, 3, 5 – водные извлечения из корневищ с корнями кровохлебки 1,0 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,01 мг/мл; 2, 4, 6 – водные извлечения из травы кровохлебки 1,0 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,01 мг/мл.

В таблице 39 приведены данные о влиянии водных извлечений травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной на ХЛ модельной системы, инициирующей реакции ПОЛ.

Таблица 39

**Влияние травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной
на светосумму хемилюминесценции МС ПОЛ**

Опыт	Концентрация, мг/мл	ХЛ в модели ПОЛ, %
Контроль		100
Водные извлечения из корневищ с корнями кровохлебки	0,01	6,8±1,7*
	0,1	1,4±0,2*
	1,0	0,5±0,1***
Водные извлечения из травы кровохлебки	0,01	45,7±2,2*
	0,1	2,1±0,3*
	1,0	1,3±0,1***

Таким образом, в обеих МС исследуемые водные извлечения травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной действовали в одинаковом направлении, а именно, снижали процессы образования свободных радикалов. Выявлена способность исследуемых образцов сырья кровохлебки лекарственной подавлять генерацию АФК и ПОЛ в модельных системах, что характеризует их антиоксидантные свойства, которые наиболее выражены при введении водных извлечений корневищ и корней кровохлебки лекарственной в модельные системы АФК и ПОЛ в концентрации 0,1 и 1,0 мг/мл.

5.3. Определение антибактериальной активности

Сравнительную оценку чувствительности микроорганизмов к исследуемым растворам кровохлебки лекарственной проводили используя диско-диффузный метод (гл.2.2.4). Посев колоний производили в чашки Петри. После аппликации дисков, пропитанных исследуемыми растворами кровохлебки лекарственной, чашки Петри помещали в термостат и

инкубировали при температуре 35°C в течение 18 - 24 ч. Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм, штангенциркулем.

Приготовление извлечений из растительного сырья кровохлебки: настой и отвар из сырья кровохлебки готовили в соответствии с требованиями ГФ-ХП издания в соотношении 1:10 с учетом коэффициента водопоглощения из сырья, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 5 мм. Спиртовые извлечения из растительного сырья готовили в соотношении сырье-экстрагент 1:10, кипятили 30 мин на водяной бане, затем растворитель отгоняли, получали сухой экстракт и его растворяли в воде дистиллированной в соотношении 1:10. Полученные водные и спиртовые извлечения из растительного сырья использовали для пропитки стерильных дисков, которые помещали в чашки Петри с засеянными культурами микроорганизмов и оценивали их микробиологическую активность.

Объекты исследования: 1 – отвар корневищ и корней

2 - спиртовой экстракт корневищ и корней

3 - настой травы

4 – спиртовой экстракт травы.

Результаты определения антимикробной активности травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной в отношении *Staphylococcus aureus* представлены на рисунках 78, 79 и в таблице 40.

Таблица 40

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Staphylococcus aureus*

Культура микроорганиз-ма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ и корней	спирт.экстр. корневищ и корней	настой травы	спирт. экстр. травы	контроль	
					фузидин	нитрофурантоин
№1 – <i>Staphylococcus aureus</i>	10	11	6	7	17	20
№ 2 – <i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	7	6	6		
Среднее значение	8,75	9	6	6,5		



Рис. 78 – активность исследуемых образцов в отношении к *Staphylococcus aureus* в сравнении с фузидином (мм)

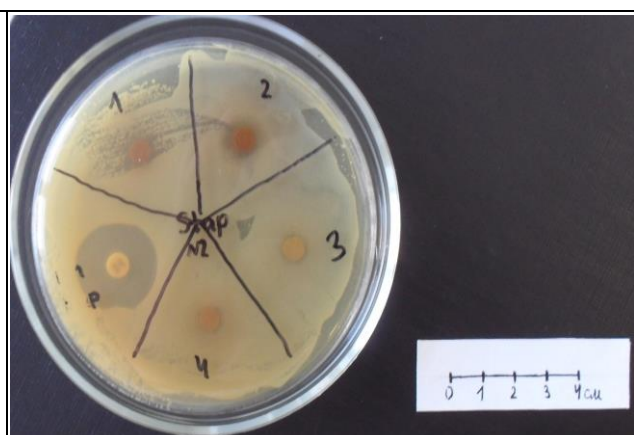


Рис.79 – активность исследуемых образцов в отношении к *Staphylococcus aureus* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

В результате исследования установлено, что в среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ и корней кровохлебки (9мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ и корней кровохлебки (8,75 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы (6,5 мм и 6 мм) спиртовый и водный экстракт соответственно.

Оценка антимикробной активности травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной в отношении *Enterococcus faecalis* представлена на рисунках 80 и 81 и в таблице 41.



Рис.80 – активность исследуемых образцов в отношении к *Enterococcus faecalis* в сравнении с гатифлоксацин (мм)

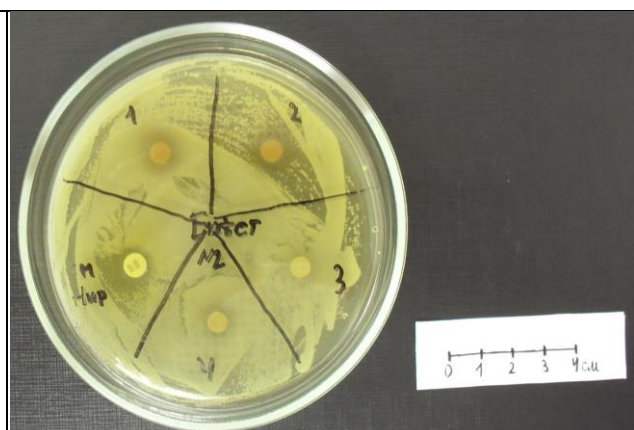


Рис.81 – активность исследуемых образцов в отношении к *Enterococcus faecalis* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Enterococcus faecalis*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ и корней	спирт.экс тр. корневищ и корней	настой травы	спирт. экстр. травы	контроль гатифлоксацин	контроль нитрофурантоин
№1 - <i>Enterococcus faecalis</i>	8	9	6	7	27	8
№ 2 - <i>Enterococcus faecalis</i>	7,5	8	6	6,5		
Среднее значение	7,75	8,5	6	6,75		

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ и корней кровохлебки (8,5 мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ и корней кровохлебки (7,75 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы (6,75 мм и 6 мм) спиртовый и водный экстракт соответственно.

Определение антимикробной активности травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Результаты исследования представлены на рисунках 82 и 83, и в таблице 42.

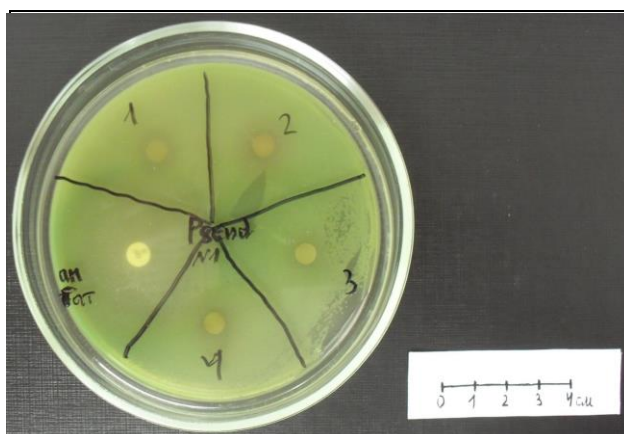


Рис.81. – активность исследуемых образцов в отношении к *Pseudomonas aeruginosa* в сравнении с гатифлоксацином (мм)

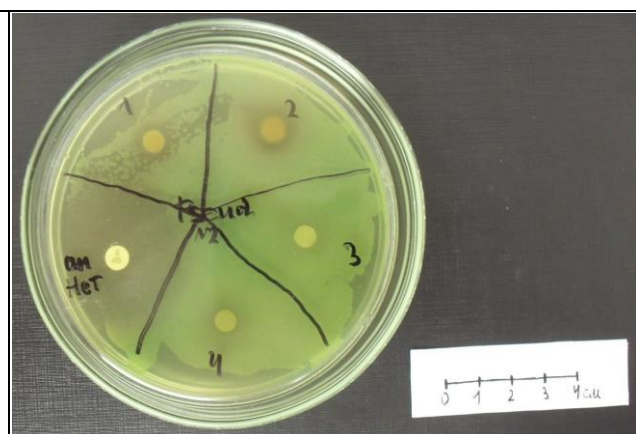


Рис.82. – активность исследуемых образцов в отношении к *Pseudomonas aeruginosa* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

Таблица 42

Влияние растительных экстрактов на задержку роста *Pseudomonas aeruginosa*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ и корней	спирт.экстр. корневищ и корней	настой травы	спирт.экстр. травы	контроль	
					гатифлоксацин	гатифлоксацин
№1 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	7	-	6	30,5	28
№ 2 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	9	-	6		
Среднее значение	8	8	-	6		

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма при использовании спиртового и водного экстракта из корневищ с корнями кровохлебки имеют равные значения и составляют 8 мм. В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы спиртовой экстракт задерживает рост на 6мм, а водный – показал отрицательный результат, т.е. задержки роста нет.

Сравнительная оценка антимикробной травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной в отношении *Klebsiella pneumoniae* представлена на рисунках 83 и 84, и в таблице 43.

Таблица 43

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Klebsiella pneumoniae*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ и корней	спирт.экстр. корневищ и корней	настой травы	спирт.экстр. травы	контроль	
					Гатифлоксацин	нитрофурантоин
№1 - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2	-	-	31	29
№ 2 - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	3	1	1		

Среднее значение	1,5	2,5	0,5	0,5		
------------------	-----	-----	-----	-----	--	--

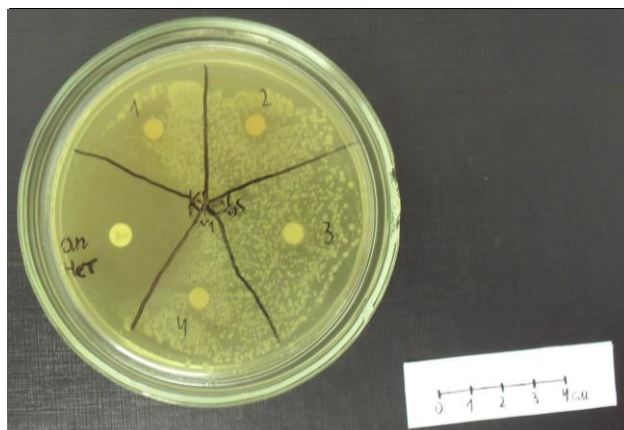


Рис.83 – активность исследуемых образцов в отношении *Klebsiella pneumoniae* в сравнении с гатифлоксацин (мм)

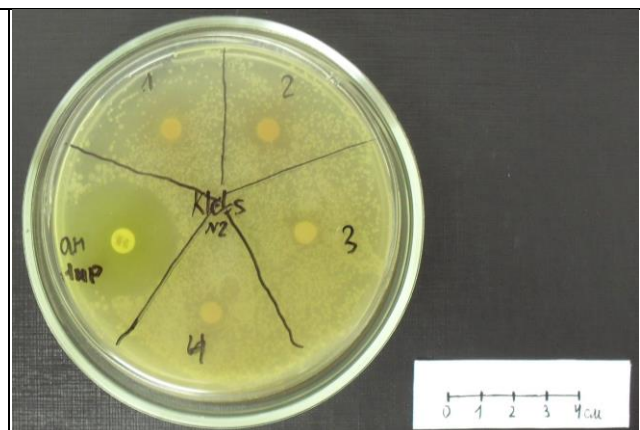


Рис.84 – активность исследуемых образцов в отношении *Klebsiella pneumoniae* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов корневищ и корней кровохлебки на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ и корней кровохлебки (2,5 мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ и корней кровохлебки (1,5 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы: при использовании спиртового и водного экстракта из корневищ с корнями кровохлебки имеют равные значения и составляют 0,5 мм.

Изучение антимикробной активности травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной в отношении *Candida albicans*. Результаты исследования представлены на рисунках 87 и 88 и в таблице 44.

Таблица 44

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Candida albicans*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ и	спирт.экстр. корневищ	настой травы	спирт.экстр. травы	контроль	
					гатифл оксаци	нитро фуран

	корней	щ и корней			Н	ТОИН
№1 - <i>Candida albicans</i>	2	4	1	1	37	14
№ 2 - <i>Candida albicans</i>	3	4	1	1		
Среднее значение	2,5	4	1	1		

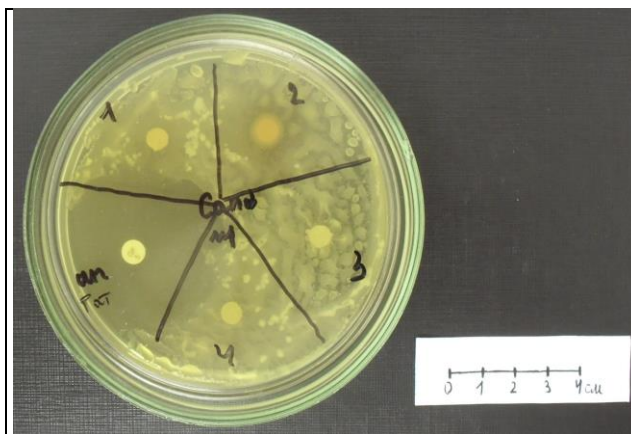


Рис.87 – активность исследуемых образцов в отношении *Candida albicans* в сравнении с гатифлоксацином (мм)

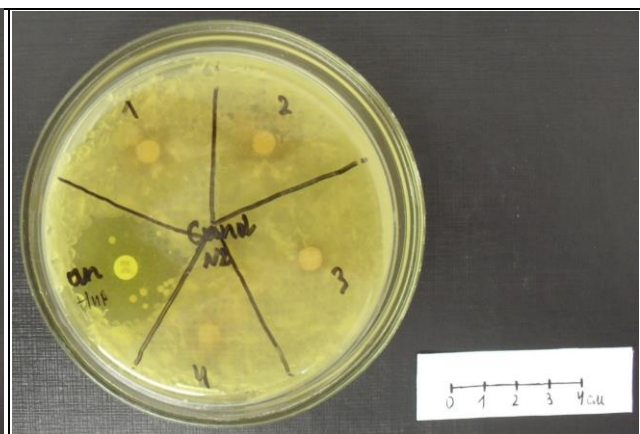


Рис.88 – активность исследуемых образцов в отношении *Candida albicans* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ и корней кровохлебки (4 мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ и корней кровохлебки (2,5 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы: при использовании спиртового и водного экстракта из корневищ и корней кровохлебки имеют равные значения и составляют 1,0 мм.

Анализируя полученные результаты можно отметить, что наиболее выраженную антимикробную активность проявили экстракты из корневищ и корней кровохлебки лекарственной в отличие от травы (рис.89). Если сравнивать извлечения водные и спиртовые, то преимущество принадлежит спиртовым экстрактам. Это связано с тем, что в корневищах и корнях кровохлебки содержится большее количество полифенольных соединений (дубильных веществ), чем в траве. Кроме того, в спиртовые экстракты, в

отличие от водных, переходят кроме дубильных веществ и другие фенольные соединения, лучше растворимые в водно-спиртовых растворах, например флавоноиды, фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты, принимающие участие в проявлении общей антимикробной активности.

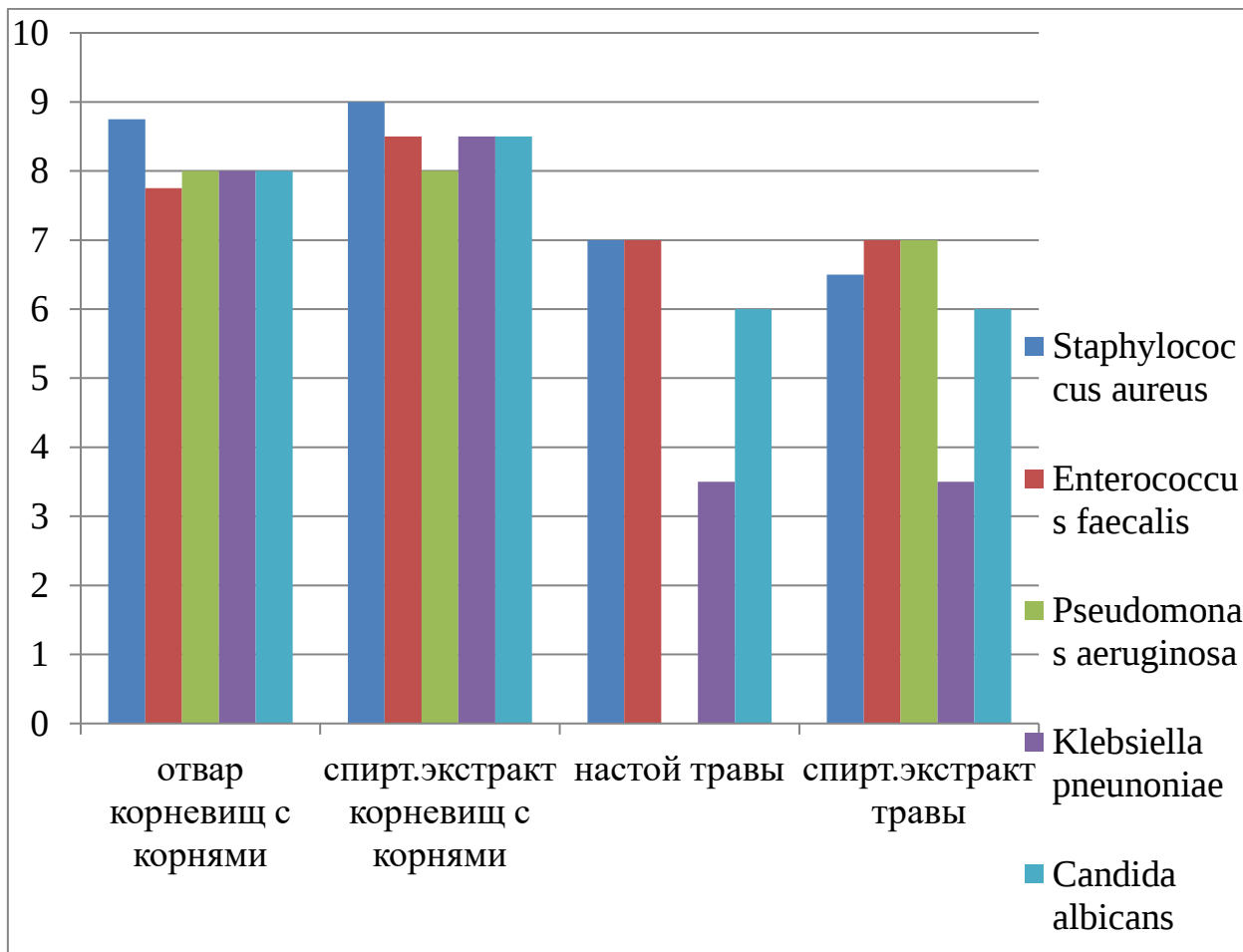


Рисунок 89. Диаграмма распределения антибактериальной активности

При анализе зон задержки роста микроорганизмов под влиянием извлечений из кровохлебки более высокие показатели отмечались при влиянии на культуры *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, меньшие значения наблюдались при влиянии на *Klebsiella pneumoniae* и *Candida albicans*.

5.4. Влияние кровохлебки лекарственной на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность животных

В качестве объектов исследования служили водные и спиртовые экстракты из травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной,

приготовленные в соответствии с требованиями ГФ-ХІ издания. Спиртовый экстракт был сухой и разводился перед применением в воде. Фармакологические исследования проводились на взрослых белых мышах-самцах массой 19 – 25 г. Для экспериментов отбирали животных со средней двигательной активностью, преобладающих в популяции и, следовательно, можно утверждать, что у этих мышей будет развиваться наиболее типичная реакция на любое воздействие. Подопытных животных содержали в условиях вивария (с естественным режимом освещения; при температуре 22-24°C; относительной влажности воздуха 40-50%) и свободным доступом к воде и пище. Исследования проводили в соответствии с правилами качественной лабораторной практики при проведении доклинических исследований.

Подопытные животные были разделены на 5 групп по 6 животных, которым в течение 10 дней внутрижелудочно вводились исследуемые растворы в дозе 1,5 мл. Первая группа – контроль, вторая группа получала настой из травы, третья – отвар из корневищ и корней, четвертая – спиртовый экстракт из корневищ и корней, а пятая – спиртовый экстракт из травы (табл. 45). Не менее, чем за 60 минут до тестирования животных помещали в тихое, слабо освещенное помещение. В этот период исключалась перегруппировка животных, кормление, взятие в руки и другие активные манипуляции.

Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных проводилась на тесте «Открытое поле», который представляет собой классическую модель исследования поведения, основанную на конфликте двух мотиваций - инстинктивной тенденции к исследованию нового окружения и тенденции минимизировать возможную опасность со стороны такового. Помещение животного в новую обстановку приводит к возникновению изменений в характере поведения [22].

Во время эксперимента животное помещали в центр «открытого поля» на 3 мин, затем регистрировались следующие параметры: горизонтальная активность или количество пересеченных квадратов - «П» («перемещение»);

исследовательская активность «ОИА» ($OIA = H + Cy + Bc$) - «Bc» - двигательную вертикальную активность («вставание»), «Cy» - стойка с упором, «H» - обследование отверстий, «Ц» - вход в центр; эмоциональность животного «Д» - число актов дефекаций и уринации.

Результаты теста «открытое поле», представленные в таблице 45, показали, что настой травы и отвар корневищ и корней кровохлебки лекарственной после курсового введения оказывают влияние на параметры индивидуального поведения мышей. Так, в группе животных, получавших настой травы кровохлебки лекарственной в 1,6, 3,8 и 2,1 раза повышалась двигательная (ДА), ориентировочно-исследовательская активности (ОИА), количество обследованных отверстий (Н) по сравнению с контролем. Также увеличивалось количество стоек с упором до 6,5, против 0 в контроле. У животных, которые получали отвар корневищ и корней кровохлебки лекарственной в 3,6, 5,1 и 2,8 раза увеличивалась двигательная (ДА) и ориентировочно-исследовательская активности (ОИА), количество обследованных отверстий (Н) по сравнению с контрольной группой. Под влиянием отвара, регистрировались стойки с упором, количество которых достигало 8.

При исследовании спиртовых извлечений из кровохлебки лекарственной было установлено, что извлечения из корневищ и корней более активно влияли на процессы двигательной активности животных. Так, увеличивалась двигательная (ДА), ориентировочно-исследовательская активности (ОИА), количество обследованных отверстий (Н) в 4,08, 6,2 и 3,3 раза по сравнению с контролем, а при влиянии извлечений из травы эти показатели были несколько ниже: в 2,2, 4,8 и 2,6 раза соответственно. Также увеличивалось количество стоек с упором до 10,4 у корневищ и корней и до 8,1 у травы.

Таким образом, извлечения из кровохлебки лекарственной при курсовом введении экспериментальным животным повышают их двигательную и ориентировочно-исследовательскую активности и проявляют

психостимулирующее действие. Однако, спиртовые извлечения в большей степени, чем водные, а учитывая морфологическую группу сырья, более выраженное действие отмечалось для корневищ и корней в отличие от травы кровохлебки.

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» поведение животных после курсового введения настоя травы и отвара корня кровохлебки лекарственной относительно контроля статистически значимо не отличалось, что указывает на отсутствие влияния на эмоциональную тревожность. Значит, настой травы и отвар корня кровохлебки лекарственной не обладают ни анксиогенной, ни анксиолитической активностью.

Таблица 45

Тест "Открытое поле" для изучения поведения животных в стрессогенных условиях

Группы	П(ДА)	Норка	Вертикаль ная стойка	¹⁶⁷ Стойка с упором	Центр	Грумминг	Дефекация	Уринация	Ориентировоч но-исследо- вательская активность
контроль	21	3	0	0	0	2	1	1	3
контроль	30	3	2	0	0	1	2	0	5
контроль	35	2	1	0	0	2	0	0	3
контроль	25	0	2	1	1	0	0	0	3
контроль	22	14	8	14	5	6	1	1	36
контроль	15	7	0	0	0	2	2	0	7
<i>Среднее значение</i>	23,5	3	1,5	0	0	2	1	0	4
настой	25	7	0	0	1	1	1	0	7
настой	37	9	2	6	2	1	2	0	17
настой	36	5	2	4	2	1	0	0	11
настой	44	5	5	14	1	6	2	0	24
настой	28	9	0	7	2	1	2	1	16
настой	62	6	0	8	2	2	1	1	14
<i>Среднее значение</i>	36,5	6,5	1	6,5	2	1	1,5	0	15
отвар	74	5	0	0	0	5	1	0	5
отвар	102	13	1	4	2	10	2	0	18
отвар	78	16	4	14	2	9	2	1	34
отвар	92	9	4	18	5	6	0	0	31
отвар	50	8	1	5	5	0	1	1	14
отвар	90	7	5	11	2	9	2	1	23
<i>Среднее значение</i>	84	8,5	2,5	8	2	7,5	1,5	0,5	20,5
спир.р-р корн.	102	8	6	10	7	11	5	3	18
спир.р-р корн.	78	10	3	4	2	6	2	5	20

спир.р-р корн.	92	9	8	14	5	12	4	1	36
спир.р-р корн.	50	7	2	18	5	15	5	4	18
спир.р-р корн.	90	15	4	5	6	8	4	2	28
спир.р-р корн.	104	12	1	11	2	12	2	1	31
<i>Среднее значение</i>	96	10,1	4	10,4	4,5	10,6	3,6	2,6	25,1
спир.р-р трава	64	5	4	14	2	9	0	1	14
спир.р-р трава	42	13	6	8	1	5	4	0	21
спир.р-р трава	55	12	3	12	2	12	1	3	33
спир.р-р трава	48	4	1	4	0	7	3	1	16
спир.р-р трава	32	8	2	3	3	2	2	0	20
спир.р-р трава	76	7	5	7	1	3	0	2	12
<i>Среднее значение</i>	51,8	8,0	2	8,1	1,5	6,0	1,6	1,2	19,3

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6:

1. Проведена сравнительная оценка противовоспалительной активности водных и спиртовых извлечений из сырья кровохлебки на скрининговой модели формалинового отека лапы у мышей. Установлено, что введение животным извлечений из травы кровохлебки лекарственной достоверно уменьшало отек лапок у мышей на 26,7% при применении водного раствора и на 33,3% при использовании спиртового экстракта из травы кровохлебки. При применении извлечений из корневищ и корней отек лапок уменьшался в меньшей степени: на 10% при использовании водного раствора и на 14,4% при применении спиртового экстракта.

2. Изучена антиоксидантная активность водных извлечений их травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной методом хемолуминисценции. Выявлена способность исследуемых образцов сырья кровохлебки лекарственной подавлять генерацию АФК и ПОЛ в модельных системах, что характеризует их антиоксидантные свойства, которые наиболее выражены при введении водных извлечений корневищ и корней кровохлебки лекарственной в модельные системы АФК и ПОЛ в концентрации 0,1 и 1,0 мг/мл.

3. Изучена сравнительная антимикробная активность разных видов сырья кровохлебки, а также водных и спиртовых извлечений. При анализе зон задержки роста микроорганизмов под влиянием извлечений из кровохлебки более высокие показатели отмечались при влиянии на культуры *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, меньшие значения наблюдались при влиянии на *Klebsiella pneumoniae* и *Candida albicans*. Установлено, что наиболее выраженную антимикробную активность проявили экстракты из корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отличие от травы, а при сравнении водных и спиртовых извлечений, преимущество принадлежит спиртовым экстрактам.

4. Изучено влияние кровохлебки лекарственной на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность животных и установлено,

что в сравнении с контролем извлечения из кровохлебки лекарственной при курсовом введении экспериментальным животным повышают их двигательную и ориентировочно-исследовательскую активности и проявляют психостимулирующее действие. Однако, спиртовые извлечения в большей степени, чем водные, а учитывая морфологическую группу сырья, более выраженное действие отмечалось для корневищ и корней в отличие от травы кровохлебки. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» поведение животных после курсового введения извлечений кровохлебки лекарственной относительно контроля статистически значимо не отличалось, что указывает на отсутствие влияния на эмоциональную тревожность, следовательно, настой травы и отвар корневищ и корней кровохлебки лекарственной не обладают ни анксиогенной, ни анксиолитической активностью.

5. Сравнительная оценка фармакологической активности травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной показала, что трава кровохлебки проявляет более выраженную противовоспалительную активность, психостимулирующее действие, а по выраженности антиоксидантной и антимикробной активности близка к действию корневищ и корней. Кроме того, трава кровохлебки содержит большое количество рутина, поэтому может являться потенциальным источником капилляроукрепляющих средств, что делает ее перспективной для дальнейшего более глубокого изучения и внедрения в медицину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований разработаны нормативные документы на «Кровохлебки корневища и корни», «Кровохлебки трава», а так же обоснованы перспективы использования нового вида сырья «Кровохлебки трава», содержащей богатый набор ценных биологически активных веществ, обладающих противовоспалительным, антиоксидантным, антибактериальным действием, оказывающих влияние на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность животных и за счет высокого содержания рутина являющейся потенциальным источником капилляроукрепляющих средств.

Итоги выполненного исследования

1. Проведены ресурсоведческие исследования кровохлебки лекарственной в некоторых районах Республики Башкортостан и определены ее запасы. Установлено, что объемы возможных ежегодных заготовок составляют для травы кровохлебки от 0,032 т до 0,843 т, а корневищ и корней - от 0,008 т до 0,172 т в пересчете на воздушно-сухую массу сырья, что является перспективным для организации заготовок на территории Республики Башкортостан.
2. В результате проведения макроскопического анализа сырья кровохлебки лекарственной выявлены характерные внешние признаки, позволяющие идентифицировать траву, корневища и корни кровохлебки лекарственной, изучены и выявлены характерные микродиагностически значимые признаки травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной, необходимые для определения подлинности сырья.
3. Изучен качественный состав биологически активных веществ травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной с помощью качественных реакций, хроматографических и спектральных методов исследования и установлены следующие группы БАВ: полисахариды, аминокислоты, сапонины, флавоноиды (флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванолы, в траве - антоцианы), кумарины, дубильные вещества, в подземных органах

хромоны. Методом ВЭЖХ подтверждено присутствие веществ фенольной природы. Выделены и идентифицированы фенольные соединения (рутин, лютеолин-7-глюкозид, кверцетин, лютеолин, катехин, гиперозид, галловая, кофейная, хлорогеновая, феруловая кислоты), структура которых подтверждена УФ-, ИК-спектрами. Флавоноиды лютеолин, лютеолин-7-глюкозид в траве, корневищах и корнях обнаружены впервые. Методом хроматомасс-спектрометрии изучен компонентный состав жирорастворимого комплекса сырья кровохлебки и установлено наличие 13 соединений в траве, среди которых высомолекулярные жирные кислоты и их производные (масляная, пальмитиновая, линолевая, стеариновая кислоты), β -ситостерол, фитол, соединение терпеновой природы – лимонен и 15 соединений в корневищах и корнях – миристиновая, пеларгоновая, пальмитиновая, олеиновая, стеариновая кислоты и β -ситостерол.

4. Определено количественное содержание различных групп биологически активных веществ и установлено, что в траве преобладают органические кислоты ($2,27 \pm 0,09\%$), аскорбиновая кислота ($0,521 \pm 0,02\%$), каротиноиды ($0,036 \pm 0,001\%$), кумарины ($0,326 \pm 0,014\%$), флавоноиды ($4,25 \pm 0,22\%$), аминокислоты (суммарное содержание $8,53 \pm 0,37\%$), а в корневищах и корнях – полисахариды ($5,18 \pm 0,24\%$), сапонины ($3,71 \pm 0,17\%$), оксикоричные кислоты ($1,91 \pm 0,08\%$), дубильные вещества в пересчете на кислоту галловую ($14,52 \pm 0,51\%$). Определен макро- и микроэлементный состав и установлено, что в траве в большем количестве накапливаются калий, натрий, фосфор, цинк, а в корневищах и корнях – кальций, железо, медь, марганец, йод.

5. Изучена сезонная динамика накопления основных групп биологически активных веществ в сырье кровохлебки лекарственной в разные фазы вегетации растения и установлено, что в траве наибольшее содержание суммы флавоноидов отмечается в фазу цветения, а дубильных веществ в корневищах и корнях в фазу плодоношения, следовательно, эти периоды вегетации растения являются оптимальными для заготовки сырья.

6. Разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов

и суммы дубильных веществ после их осаждения раствором желатина в траве, корневищах и корнях кровохлебки. Установлены нормы их содержания: в траве «содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин» - не менее 3,5 %, «содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую» - не менее 3,0 %; в корневищах и корнях - «содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид» - не менее 1,5 %, «содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую» - не менее 8,0%. Проведена их валидационная оценка, которая показала соответствие критериям правильность, прецизионность, линейность и специфичность.

7. Разработаны критерии подлинности и показатели качества сырья кровохлебки лекарственной и предложены нормы их содержания: *в траве* - влажность не более 13%; содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 3,5%; %; содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую не менее 3%; зола общая не более 10%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 2%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями 7 мм – не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%; *в корневищах и корнях*: влажность не более 13%; содержание дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую не менее 8%; содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид не менее 1,5%; зола общая не более 12%; зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 5%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями 5 мм – не более 10%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм – не более 10%; примеси корневищ и корней, почерневших или побуревших в изломе не более 10%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%. Определена микробиологическая чистота для сырья кровохлебки и проведен радиологический контроль.

8. Методами фармакологических исследований проведена сравнительная оценка биологической активности водных и спиртовых извлечений травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной и установлено, что трава кровохлебки лекарственной является перспективным растительным сырьем, так как проявляет более выраженную противовоспалительную активность, оказывает психостимулирующее действие, а по выраженности антиоксидантной и антибактериальной активности близка к действию корневищ и корней. Кроме того, трава кровохлебки содержит большое количество рутина, поэтому может являться потенциальным источником капилляроукрепляющих средств.

9. Разработаны проекты фармакопейных статей «Кровохлебки корневища и корни» и «Кровохлебки трава», которые приняты к рассмотрению в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения».

Рекомендации

Результаты диссертационного исследования по изучению не только корневищ и корней кровохлебки лекарственной, но и травы, способствует решению проблемы комплексной и безотходной переработки кровохлебки лекарственной в рамках ресурсосберегающих технологий. Разработанные проекты ФС «Кровохлебки корневища и корни» и «Кровохлебки трава» могут быть использованы в производственном процессе, в лабораториях, работающих в области анализа и стандартизации лекарственных средств растительного происхождения. Исследования ресурсов, химического состава и биологической активности кровохлебки лекарственной могут быть внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в поиске и разработке новых лекарственных средств растительного происхождения, расширения возможностей использования известных лекарственных растений с целью создания новых лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Абдуллина, С.Г. Применение гальваностатической кулонометрии для стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов: учебно-методическое пособие для студентов фармацевтического факультета / С.Г. Абдуллина, Р.Ш. Хазиев, Н.М. Агапова. - Казань: КГМУ, 2011. – 46 с.
2. Авцын, А.Н. Микроэлементы человека (этиология, классификация, органопатология) / А.Н. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш и др. - М.: Медицина, 1991. - 495 с.
3. Азовцев, Г.Р. Фенольные соединения кровохлебки. Фенольные соединения и их биологические функции / Г.Р. Азовцев, К.М.Джемухадзе // Москва, 1968. - С. 212 - 217.
4. Азовцев, Г.Р. Биологически активный комплекс кровохлебки и его фармакологические свойства / Г.Р. Азовцев , А.А. Зыков , Т.А.Кукушкина // Респ. конф. по медицинской ботанике. 1984. - 128с.
5. Азовцев, Г.Р. О действующих веществах кровохлебки лекарственной / Г.Р. Азовцев, А.А. Зыков, Т.А.Кукушкина // Лекарственные растения в традиционной и народной медицине. - Улан-Удэ, 1987. - С.5-6.
6. Азовцев, Г.Р. Полифенольный комплекс кровохлёбки лекарственной как антигипоксическое средство / Г.Р. Азовцев, А.А.Зыков, Т.А.Кукушкина // Тез.доклад Всесоюз.симпозиума по фенольным соединениям. - Таллин, - 1987. - С. 3- 4.
7. Арзамасцев, А.П. Валидация аналитических методов / А.П.Арзамасцев, Н.П.Садчикова, Ю.Я.Харитонов // Фармация. 2006. – Т. 54. - № 4. – С. 8-12.
8. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. - М., - 1983. – 340 с.
9. Ахрем, А.А. Тонкослойная хроматография / А.А.Ахрем, А.И.Кузнецова. – М.: Наука, 1964. – 153 с.
10. Баева, В.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие антраценпроизводные: учебно-методическое пособие / В.М.Баева. - М.: «Русский Врач», 2003.

11. Баева, В.М. Лечение растениями: основы фитотерапии: учеб.пособие / В.М.Баева. – М.: ООО «Издательство Астрель», 2004. – 202 с.
12. Бакланова, Т.А. Минеральные элементы в фитосырье и фитопрепаратах / Пособие для научно-исследовательской работы студентов. - Ярославль, 1999. – С.31.
13. Бандюкова, В.А. Распространение флавоноидов в некоторых семействах высших растений / В.А.Бандюкова // Раст. Ресурсы. - 1968. Том 4. - С. 97 - 109.
14. Беленький, Б.Г. Тонкослойная хроматография. В кн.: Успехи хроматографии. К 100-летию со дня рождения М.С. Цвета / Б.Г.Беленький : под общ. ред. К.В. Чмутова, К.И. Сакодынского. - М.: Наука, 1972. - С. 134 - 162.
15. Беляков, К.В. Методические подходы к определению биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье спектрофотометрическим методом. М., 2004. – 186 с.
16. Березовская, Т.П. Методы микроскопического анализа ботанических объектов: учеб.метод.пособие по ботанике / Т.П.Березовская, Н.В.Дошинская, Е.А.Серых. – Томск, 1978. – 113 с.
17. Ботанико – фармакогностический словарь / под.ред. К.Ф.Блиновой, Г.П.Яковлева. – М.: Высш.шк., 1990. - 272 с.
18. Боровикова, Н.А. Спектрофотометрическое количественное определение дубильных веществ в коре дуба, соплодиях ольхи и в водных извлечениях из данного сырья / Н.А.Боровикова, Н.Г.Селезнев, Д.М.Попов // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. – 2010. - № 11. – С. 19 - 23.
19. Бородин, Ю.И. Морфологическая оценка развития плода при введении кровохлебки лекарственной для коррекции маточно-плацентарного кровообращения / Ю.И.Бородин, В.В.Иванов, Н.В.Широкова, Н.А.Склянова, Ю.И. Склянов // Акушерство и гинекология.- 1992.- №2.-С.32-34.
20. Буданцев, А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Семейства

- Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae / А.Л.Буданцев // Товарищество научных изданий КМК. - 2009. -513с.
21. Бурмистров, А.Н. Медоносные растения и их пыльца / А.Н.Бурмистров, В.А.Никитина . - М.: Росагропромиздат, 1990. – 92с.
22. Буреш, Я. Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я.Буреш, О. Бурешова, Д.П.Хьюстон.- М. Высшая школа. - 1991.- С. 119 -122
23. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа: учеб.для химико-технол.спец.вузов / В.П.Васильев. – М.:Высш.шк. - 1989. – 384 с.
24. Васильева, А.П. Изучение динамики содержания дубильных веществ в отваре коры дуба при хранении / А.П.Васильева // Молодёжный инновационный вестник. - 2012. - № 1.- С. 199- 200.
25. Воронина, Т.А. Травы восточной медицины / Т.А.Воронина, А.В.Воронина. – М.: СПб.,1991. – 320 С.
26. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения: справочное пособие / А.Ф.Гаммерман, Г.Н.Кадаев, М.Д.Шупинская, А.А.Яценко-Хмелевский. - М. Высшая школа. - 1984.- С. 400.
27. Гаммерман, А. Ф. Заметка о тибетских лекарственных продуктах / А.Ф.Гаммерман, Б.В.Семичов // I Докл. АН СССР.- 1930. - С. 228 - 232.
28. Гаммерман, А. Ф. Словарь тибетско-латинско русских названий лекарственного растительного сырья, применяемого в тибетской медицине / А.Ф. Гаммерман, Б.В. Семичов . - Улан-Удэ, 1963. - 180 с.
29. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П.Георгиевский, Н.Ф.Комиссаренко, С.Е.Дмитрук. – Новосибирск :Наука, 1990. – 330 с.
30. Георгиевский, В.П. Применение хроматографии в тонком слое для идентификации и количественного определения биологически активных веществ растительного происхождения / В.П.Георгиевский. – М.:Наука, 1978. - 68 с.

31. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. - М.: Практика, 1998. – 459 с.
32. Головкин, Б.Н. Биологически активные вещества растительного происхождения : Справочник в 3- х томах / Б.Н.Головкин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И.Шретер. – М.: Наука, 2001. – 216 с.
33. Гомеопатическая фармация: введение и руководство. Сборник учебных пособий для системы послевузовского профессионального образования провизоров / под ред.И.А. Самылиной. - Издательство ФНКЭЦ ТМДЛ Росздрава, 2005. – 438 с.
34. Гончарова, Т.А. Энциклопедия лекарственных растений: (лечение травами) / Т.А.Гончарова. - М.: Изд. Дом «МСП», 1997. – 559 с.
35. Государственная Фармакопея СССР. - XI издание. – М.: Медицина, 1986. – 1078 с.
36. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1: Общие методы анализа. / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – Москва: Медицина, 1989. – 335 с.: ил.
37. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – Москва: Медицина, 1989. – 400 с.: ил.
38. Государственная фармакопея Российской Федерации: ГФ. Ч. 1. – 12 изд. – Москва: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008. – 704 с.
39. Государственная фармакопея Российской Федерации: XIII изд. – Москва: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2015. – 1294 с.: ил.
40. Государственная Фармакопея КНР (на китайском языке). – Пекин, 2000. - 668 с.
41. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И.Гринкевич, Л.Н. Сафронович .- М. (Высшая школа): 1983. С. 174 – 175.
42. Гринкевич, Н.И. Использование лекарственных средств растительного происхождения для коррекции микроэлементного обмена при различных заболеваниях / Н.И. Гринкевич, И.А. Баландина, С.В. Фирсова и др.//

Микроэлементы в биологии и их применение в сельском хозяйстве и медицине. Тез. док. Всесоюз. конф.- Самарканд, 1990. – С. 434-436.

43. Гринько, Е.Н. Обоснование выбора метода количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.Н.Гринько // Здоровье и образование в XXI веке: сб. науч. тез. и статей. Москва, 2010. - С. 172 - 173.

44. Гринько, Е.Н. Требования Российской и Европейской фармакопей к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.Н.Гринько // Фармация. - 2010. – С. 49-53.

45. Губанов, И.А. Определитель высших растений средней полосы европейской части СССР / И.А.Губанов, И.Л.Крылова, В.Л.Тихонова. –М.: «Мысль», 1976. – 360 с

46. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И.А. Губанов, К.В. Киселева , В.С.Новиков , В.Н.Тихомиров . – М.: Т-во научных изданий КМК, 2002. - 520 с.

47. Данилова, Н.А. Количественное определение дубильных веществ в корнях щавеля конского методом спектрофотометрии в сравнении с методом перманганатометрии / Н.А. Данилова, Д.М. Попов. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2004. - N2 – 32с.

48. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А.Долгова, Е.Я.Ладыгина. – М.: Медицина, 1977. – С. 215.

49. Долгова, А.А. Морфолого – анатомическое исследование лекарственного растительного сырья: практикум по фармакогнозии / А.А.Долгова, Е.Я.Ладыгина. – М.:Медицина, 1977. – 181 с.

50. Долотова, Е.С. Возрастная структура ценопопуляций *SANGUISORBA OFFICINALIS* L. (ROSACEAE) в условиях Вологодской области / Е.С.Долотова, Е.Ю.Бахтенко, В.И. Антонова // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. – 2012. - № 6-1. - С . 123 - 129.

51. Егорова, И.Н. Перспективы комплексного использования кровохлебки лекарственной / И.Н.Егорова // Новые достижения в создании лекарственных средств растительного происхождения: Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Л.Н. Березнеговской. Томск, 2006. – С. 117-118.
52. Ермакова, И.М. Кровохлебка лекарственная / И.М. Ермакова, Г.А.Зайцева // Биологическая флора Московской области. Выпуск 9. - М.: Изд-во МГУ, 1993. - С. 39 -71.
53. Ермаков, А.И. Определение суммарного содержания дубильных веществ. Методы биологического исследования растений: уч. пособие. / А.И.Ермаков, В.В.Арасимович. - Л.: Агропромиздат,1987. - 456 с.
54. Еленевский, А. Г. Ботаника высших, или наземных, растений / А.Г.Еленевский. – М.: Издательский центр «Академия», 2000. – 432с.
55. Животовский, Л.А. Онтогенетические состояния, эффективная плотность и классификация популяций растений / Л.А.Животовский // Экология.-2001. - №1. - С. 3-7.
56. Жизнь растений. Цветковые растения /под ред.Федоров А.А. – М.: Просвещение, 1980. – 430 с.
57. Жукова, Л.А. Динамика ценопопуляций луговых растений в естественных фитоценозах / Л.А.Жукова // Динамика ценопопуляций травянистых растений.- Киев: Наукова думка, 1987. - С. 9-19.
58. Завражнов, В.И. Лекарственные растения Центрального Черноземья / В.И. Завражнов, Р.И.Китаева, К.Ф.Хмелев. - Издательство ВГУ, 1975. - 24с.
59. Зенкевич, И.Г. Методы количественного хроматографического анализа лекарственных веществ. Пособие для фармацевтических работников / И.Г.Зенкевич, В.М.Косман. - С.Пб.: СПХФА, 1999. – 81 с.
60. Золотницкая, С.Я. Обследование некоторых лекарственных растений на протистоцидное действие / С.Я.Золотницкая, А.Г. Гаспарян // Известия Академии наук Армянской ССР. – 1951. - №5. - С 449-458.

61. Иванов, В.И. Лекарственные растения в народной медицине / В.И.Иванов. – М.: Военное издательство, 1992. – 442 с.
62. Интродукция растений природной флоры СССР. - М.: Наука, 1979.-431с.
63. Исламбеков, Ш.Ю. Растительные дубильные вещества / Ш.Ю.Исламбеков, С.М. Каримджанов, А.К.Мавлянов // Химия природных соединений. – 1990. - № 3.- С. 293—307.
64. Кемертелидзе, Э.П. Количественное определение танина / Э.П.Кемертелидзе, П.А. Явич, А.Г. Сарабунович // Фармация. – 1984. - № 4. - С. 34—37.
65. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: Справочник в 2-х томах / Под ред. д.х.н., проф. В.Г.Березкина. – М.: Мир, 1981. – 1139 с.
66. Киселева, Т.Л. «Краткая энциклопедия современной фитотерапии с основами гомеопатии» / Т.Л.Киселева, Ю.А. Смирнова, И.Л.Блинков, М.А. Дронова, Е.В. Цветаева // Изд-во: Проф. ассоц. натуротерапевтов. - 2010. – 570 с.
67. Киселев, В.Е. «Биологически активные соединения растений сибирской флоры» / В.Е.Кисилев. - "Наука", 1974. - С 94.
68. Ковалева, Н.Г. Лечение растениями. Очерки по фитотерапии / Н.Г.Ковалева. – М.:Медицина, 1971. – С.278.
69. Колесникова, В.Г. Лекарственные растения: мифы и реальность / В.Г.Колесникова, В.А.Марченко, Н.В.Сыровежко .– С.Пб.: СПХФА, 1998. – 261 с.
70. Комаров, В.Л. Сбор, сушка и разведение лекарственных растений в России: Справочник 3-е издание / В.Л.Комаров. – Петроград, 1917. - 258 с.
71. Коренская, И.М. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие антраценпроизводные простые фенолы, лигнаны, дубильные вещества: учебное пособие / И.М.Коренская, Н.П. Ивановская, И.Е.Измалкова. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. - 87 с.
72. Кравченко, А. В. Распространение и встречаемость сосудистых растений по флористическим районам Карелии / А.В.Кравченко, Е.П. Гнатюк, О.Л.

Кузнецов // Международная конференция "Биоразнообразие Европейского Севера: теоретические основы изучения, социально-правовые аспекты использования и охраны". - 2001. - С. 75.

73. Кузнецова, М.А. Сказания о лекарственных растениях / М.А.Кузнецова, А.С.Резникова. – М.: Высшая школа, 1992. – 272 с.

74. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов / В .А.Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУВПО «СамГМУ», 2004. – 1239 с.

75. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие / В.А.Куркин. - Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2009. – 963 с.

76. Куркин, В.А. Программа по фармакогнозии с основами фитотерапии (для студентов медицинских и фармацевтических вузов, врачей и фармацевтических работников). / В.А.Куркин. – М.: Самара, 2001. – 28 с.

77. Кучеров Е.В. Ресурсы и интродукция полезных растений в Башкирии / Е.В. Кучеров. - М.: Наука, 1979. - 262 с.

78. Кучеров, Е.В. Дикорастущие лекарственные растения Башкирии / Е.В.Кучеров, Д.Н. Лазарева, В.К. Десяткин. – Уфа: Башкирское книжное издательство, 1975. - 320 с.

79. Кучеров, Е.В. Полезные растения Южного Урала / Е.В.Кучеров, Г.К.Байков, И.Б.Гуфранова. – М.:Наука, 1976. – 264с.

80. Кучеров, Е.В. Лекарственные растения Башкирии: их использование и охрана / Е.В.Кучеров, Д.Н. Лазарева, В.К. Десяткин. - Уфа: Башк.кн.изд-во, 1989. – 105 с.

81. Кучеров, Е. В. Биология и экология основных видов полезных растений на Южном Урале / Е.В.Кучеров, А.А.Мулдашев, А.Х. Галеева и др. - М.: Наука, 1993. - 232 с.

82. Лекарственные растения Государственной Фармакопеи. Фармакогнозия. ч.1 / Под. ред. И.А. Самылиной, В.А.Северцева. - М.: «АНМИ», 2001. - 488 с.

83. Лекарственные растения Государственной фармакопеи. Фармакогнозия. ч.2 / Под. ред. И.А.Самылиной, В.А. Северцева. - М.: «АНМИ», 2003. - 534 с.

84. Лескова, Е.С. Биологические особенности крохобранки лекарственной / Е.С.Лескова // «Агробиология». - 1964. - N2(10).
85. Мамаев, С. А. Формы внутривидовой изменчивости древесных растений (на примере семейства Pinaceae на Урале). / С.А.Мамаев. - М.: Наука. - 1972. - 284 с.
86. Матвеев, Н.М. Биоэкологический анализ флоры и растительности (на примере степной и лесостепной зоны): учебное пособие / Н.М.Матвеев. - Самара: Изд-во Самарский университет, 2006. - С. 251.
87. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: практ.пособие. / М.Д.Машковский. - М.: Новая волна, 2000. – 608 с.
88. Минаева, В.Г. Лекарственные растения Сибири / В.Г.Минаева. – Изд-во: Наука, 1970. – 282 с.
89. Муллагулов Р.Т. Изучение антиоксидантной активности лекарственных трав методом хемилюминесценции в опытах *in vitro* / Р.Т. Муллагулов, В.Н. Козлов, Л.Ф. Пономарева // Вестник Волжского университета им. В.Н. Татищева. - 2012. - № 1. - С.231-234
90. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. - М.: Медицина, 2002. – 656 с.
91. Мухаметшина, В.С. О рациональном использовании лекарственных растений БАССР /В.С. Мухаметшина, С.С. Хайретдинов, К.А. Пупыкина // Сборник трудов молодых ученых БГМИ «Возрастные проблемы патологии». – Уфа, 1988. – С.28.
92. Нестерова, О.В. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие липидные комплексы и вещества различного биологического действия / О.В.Нестерова, С.В. Кондрашев, Н.В. Иващенко. - М.: «Русский врач», 2001. - 108 с.
93. Найдакова, Ц. А. Официальные растения как возможные источники новых лекарственных средств / Ц.А. Найдакова, С.М.Ваторова // Регуляция гомеостатических систем организма природными соединениями. - Улан-Удэ, 1989. - С. 114-130.

94. Орищенко, Н.Д. Эколого-биологические особенности кровохлебки лекарственной в связи с ее интродукцией в Западной Сибири: Автореф. дисс.канд. наук / 03.00.12. Н.Д.Орищенко – Новосибирск, 1980. - 36 с.
95. Орлов, В.И. Жидкостная хроматография: теоретические основы / В.И.Орлов, А.А.Аратсков. – Дзержинск, 1997. – 82 с.
96. Пастушенков, Л.В. Фармакотерапия с основами фитотерапии / Л.В.Пастушенков, Е.Е.Лесиовская.- СПб.: СПХФИ, 1995. – 250 с.
97. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения. Использование в народной медицине и быту / Л.В.Пастушенков, А.Л.Пастушенков, В.Л.Пастушенков. - СПб.: БХВ-Петербург, 2012. – 432 с.
98. Палов, М. Энциклопедия лекарственных растений / М.Палов. Пер. с немец. – М.: Мир, 1989. – 467 с.
99. Паланов, А.В. Кровохлебка лекарственная. Красная книга Вологодской области / А.В.Паланов. – ВГПУ.: изд-во «Русь», 2004. – Т.2. – 209 с.
100. Перельсон, М.Е. Спектры и строение кумаринов и хромонов. М.: Медицина, 1975. – 232 с.
101. Петухова, Л.Б. Онтогенез и жизненная форма кровохлебки лекарственной / Л.Б.Петухова // Флора и растительность южной тайги.- 1988. - С. 17-25.
102. Петухова, Л.Б. Анатомические особенности в онтогенезе *Sanguisorba officinalis* / Л.Б.Петухова // Экология и физиология растений. - 1975.- С. 49-52.
103. Попов, И.В. Разработка и стандартизация лекарственных форм кровохлебки лекарственной для лечения желудочно-кишечных заболеваний: Автореф. дис. на соиск. учен. степ. к.фарм.наук / 15.00.01. Попов Иван Викторович – Пятигорск, 2003 - 24 с.
104. Потанина, О.Г. Оценка доброкачественности лекарственного растительного сырья с учетом диагностически значимых признаков / О.Г.Потанина, И.А.Самылина // Фармация. - 2003. - №4. - С. 12-14.

105. Правила сбора и сушки лекарственных растений / под.ред. А.И.Шретера. – М.:Медицина, 1985. – 328 с.
106. Раменская, М.Л. Определитель высших растений Карелии / М.Л.Раменская. - Петрозаводск.: Государственное издательство Карельской АССР, 1960. - 485 с.
107. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. – М.: Товарищество науч.изд.КМК, 2009. – 512 с.
108. Рудаков, О.Б. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / О.Б.Рудаков, И.А.Востров, С.В.Федоров и др. // Воронеж: «Водолей»/ - 2004. - 528 с.
109. Рудакова, Ю.Г. Содержание дубильных веществ в спиртовом извлечении травы дубровника белого (*Teucrium polium* L.) и определение его антиоксидантной активности / Ю.Г.Рудакова, А.Б. Дмитриев, О.И. Попова // Хим. растит. сырья.- 2014.- № 1. - С. 203-208.
110. Рябинина, Е.И. Сравнение химико-аналитических методов определения танинов и антиоксидантной активности растительного сырья / Е.И.Рябинина // Аналитика и контроль. - 2001. - № 2. - С. 202—204.
111. Самылина, И.А. Фармакогнозия / И.А.Самылина, О.Г. Аносова, В.А. Ермакова, Н.В.Бобкова. - М.: «Геотар», 2007. – 188 с.
112. Самылина, И.А. Лекарственные растения. Государственной фармакопии / И.А.Самылина, В.А.Северцева. - М.: АНМИ, 2003. – 534 с.
113. Самылина И.А., Абоянц Р.К., Гринько Е.Н. Способ определения дубильных веществ в растительном сырье. – Патент РФ № 2439568, 2012
114. Сергиевская, Е.В. Систематика высших растений: практический курс / Е.В.Сергиевская. – СПб.: Издательство «Лань» , 1998. – 255 с.
115. Серошевский, В.Л. Якуты: Опыт этнографического исследования / В.Л.Серошевский . - М.:РОССПЭН, 1993. - 736 с.

116. Сокольский, И.Н. Фармакогнозия: Учебник/ И.Н.Сокольский, И.А. Самылина, Н.В.Беспалова. – М.: Медицина, 2003. – 480 с.
117. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия) / С.Я.Соколов, И.П.Замотаев. – М.:Металлургия, 1989. – 428 с.
118. Сур, С.В. Методы выделения, идентификации и определения терпеновых соединений / С.В. Сур // Хим.-фарм. журнал. – 1996. - № 5. – С.45 -50.
119. Струпан, Е.А. Анатомическое строение органов растения кровохлебки лекарственной и локализация в них дубильных веществ / Е.А.Струпан, О.А.Струпан, Н.Н.Типсина, А.Е.Туманова //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2010. - № 11. - С. 107-109.
120. Сущук, Н.А., Кисличенко В.С. Изучение органических кислот в почках и ветках смородины черной / Н.А.Сущук, В.С.Кисличенко // Материалы Всероссийской с международным участием научно-практической конференции «Традиции и инновации фармацевтической науки и практики».- Курск. – 2011. - С. 254-255.
121. Токин, Б. П. Фитонциды / Б.П.Токин. - М.: Издательство академии медицинских наук СССР, 1951. - 238 с.
122. Тринус, Ф.П. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ / Ф. П. Тринус, Б. М. Клебанов, В. И. Кондратюк. – М.: Минздрав СССР. - 1983. – 16 с.
123. Турова, А. Д. Лекарственные растения СССР и их применение / А.Д.Турова, Э.Н.Сапожникова. - М.: Медицина, 1983.- 184 с.
124. Телятьев, В. В. Лекарственные растения Восточной Сибири / В.В.Телятьев. - Иркутск: Вост.-Спб., 1969. - 383 с.
125. Уранов, А. А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функций и энергетических волновых процессов / А.А.Уранов // Биолог. Науки. – 1975. - № 2. - С. 7 - 34.

126. Фармакопея США, USP 29.Национальный формуляр: (пер.с англ.). – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2009. – 1720 с.
127. Фархутдинов, Р.Р. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминометре ХЛ-003 / Р.Р. Фархутдинов, С.И.Тевдорадзе // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения: Сборник докладов. Под ред. проф. Е.Б. Бурлаковой. - М.: Изд-во РУДН, 2005. - С. 147-154.
128. Федосеева, Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного, произрастающего на Алтае / Л.М.Федосеева // Химия растительного сырья. - 2005. - № 3. - С. 45 - 50.
129. Флора СССР. - М.:Изд-во АН СССР, 1954. – Т.2.– 720 с.
130. ФС 42-1082-76 «*Rhizomata et radices Sanguisorbae*».
131. ФСП 42-0330168301 «Трава донника лекарственного»
132. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
133. Ходарева, Е. С. Эколого-физиологическое исследование фенольного комплекса кровохлебки лекарственной (*Sanguisobra officinalis* L.): автореф.магистерской диссертации: 020400.68 / Елена Сергеевна Ходарева.- Вологда, 2013.- 4 с.
134. Хозяйнова, Н.В. Определение возрастных состояний кровохлебки лекарственной при заготовке сырья / Н.В.Хозяйнова, М.Пестова // Актуальные вопросы теоретической и клинической медицины. - 1985. - С. 160.
135. Хржановский, В.Г. Практикум по курсу общей ботаники : Учеб.пособие / В.Г.Хржановский, С.Ф.Пономаренко. – М.:Высш.школа, 1979. – 422 с.
136. Хроматография в тонких слоях / Под ред.Э.Шталя. – М.:Мир,1965. – 508 с.

137. Хроматография: Практическое применение метода: в 2-х ч.: пер.с англ. / под ред. Э.Хефтмана. – М.:Мир,1986. – 422 с.
138. Шматков Д.А. Определение суммы фенолкарбоновых кислот в корнях лопуха большого (*Arctium lappa* L.) / Д.А. Шматков, Д.М. Попов // Фармация на современном этапе – проблемы и достижения: Научные труды, Т. XXXIX, Ч. 2. – М., 2000. – С. 174 - 178.
139. Чиков, П. С. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / П.С.Чиков. –М.: Картография, 1983. - с. 340.
140. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М.Шаршунова, В.Шварц, Ч.Михалец. – М.:Мир, 1980. – 422 с.
141. Шеметков, М.Ф. Советы пчеловоду / М.Ф.Шеметков, В.И.Головнев, М.М.Кочевой. - М.: Ураджай, 1991. – 399 с.
142. Энциклопедия лекарственных растений. Пер. с немец. / И.А.Губанова. – М.: Мир, 1998. – 476 с.
143. Andrew, Chevallier. The Encyclopedia of Medicinal Plants / Chevallier Andrew, 1996. – 336 p.
144. British Herbal Compendium: A Handbook of Scientific Information on Widely Used Plant Drugs/ Peter R. Bradley. - British Herbal Medicine Association, 1992. – 409 p.
145. British Herbal Pharmacopoeia. - Vol. 1.- - Bournemouth, 1990.
146. British Pharmacopoeia.- Vol. 1-2.- London, 1993.
147. Duke, J.A. Medicinal Plants of China / J.A. Duke, E.S. Ayensu // Reference Pubns. - 1985.
148. European Pharmacopoeia. - 2004. - Vol. 6, No. 20.4.
149. Hachiya, A. Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using CCR5-expressing HeLa/CD4(+) cell clone 1-10 (MAGIC-5) / A.Hachiya ,S. Aizawa-Matsuoka, M.Tanaka M, et al. // Antimicrob Agents Chemother. - 2001. – P. 495 - 501.

150. Hachiya, A. The inhibitory effect of an extract of *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet-B-induced pigmentation via the suppression of endothelin-converting enzyme-1 / A.Hachiya, A.Kobayashi, A.Ohuchi, T.Kitahara, Y.Takema // *Biol.Pharm.Bull.* - 2001. - Vol.24. - N 6. - P.688 - 692.
151. Huang, H.B. Clinical application of antitumor Chinese medicine / H.B.Huang, K.X.Li , T.Liu, C.Q. Zeng, J.Lin, M.Qiu // *Guangdong Science and Technology Press.* - 2008.
152. Janovska, D. Screening for antimicrobial activity of some medicinal plants species of traditional Chinese medicine / D.Janovska, K.Kubikova,L.Kokoska // *Czech J. Food Sci.* - 2003. – P. 107 – 110 .
153. Kaneta, M. Identification of flavone in nineteen *Rosaceae* species / M.Kaneta, H.Hikichi, S.Endo, N.Sugiyama // *Agric.Biol.Chem.* – 1979. - Vol. 43. – N 3. - P.657 - 658.
154. Kim, T.G. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalia chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L.against hepatitis B virus / T.G.Kim, S.Y.Kang, K.K.Jung, J.H.Kang, E.Lee, H.M.Han, S.H.Kim // *Phytotherapy research.* – 2001. - Vol. 15. - N 8. - P. 718 - 720.
155. Kokoska, L. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity / L.Kokoska, Z.Polesny, V.Rada, A.Nepovim, T.Vanek // *J.Ethnopharmacol.* - 2002. - Vol. 82. – N 1.- P.51 - 53.
156. Kokoska, E.R. H. pylori and the gastroduodenal mucosa / E.R. Kokoska, G.L. Kauffmann // *Surgery.* - 2001. - Vol. 130.- № 1 .- P.13 - 16.
157. Konishi, K. Inhibitory effect of sanguin H-11 on chemotaxis of neutrophil / K.Konishi, M.Urada, I.Adachi, T.Tanaka. // *Biol.Pharm.Bull.* - Vol. 23. - N 2. - 2000. - P.213 - 218.
158. Liu, X. Cytotoxic triterpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis* / X.Liu, B.Shi,B. Yu // *Pharmaceutical Society of Korea.* – 2014. - Volume 38. – P.984 - 990.

159. Liu, X. Triterpenoids from *Sanguisorba officinalis* / X.Liu, Y.Cui, G.Yu, B.Yu // *Phytochemistry*. – 2005. - Vol. 66. - N14. - P.1671 - 1679.
160. Mabry, T.J. The Systematic Identification of Flavonoids / T.J.Mabry, K.R.Markham, M.B.Thomas. Springer Verlag: Berlin – Heidelberg - New York, 1970. - 354 p.
161. Nordborg, G. Studies in *Sanguisorba officinalis* L. / G. Nordborg // *Bot.Notis*. – 1963. - Vol. 116. - № 2.- P.267-288.
162. Tetenyi, P. Infra Specific chemical taxa of medicinal plants. Budapest: Academiai Kiado, 1970. – 225 p.
163. Tsukahara, K. Inhibitory effect of an *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet-B-induced phoyodamage of rat skin / K.Tsukahara, S.Moriwaki, T.Fujimura, Y.Takema // *Biol.Pharm.Bull.* – 2001. - Vol.24. - N9. - P.998-1003.
164. U.S.Pharmacopeia. The official Compendia of Standards. – The USP 30 NF 25. – Official May 1, 2007.
165. Wagner, H. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas / H.Wagner, S.Bladt // Springer - Verlag, Berlin – Heidelberg - New-York. - 1995. - 384 p.
166. Wagner, H. Pharmazeutische Biologie / H.Wagner. Stuttgart - New York, 1993. - 522 p.
167. Zhang, L. Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the roots of *Sanguisorba officinalis* / L.Zhang, S.R. Koyyalamudi, S.C. Jeong, N.Reddy, P.Smith, R. Ananthan, T.Longvah // *International journal of biological macromolecules*. - 2012. - 51(5):1057. - P.62.

ПРИЛОЖЕНИЯ

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны «Фармакогностическое изучение кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L) и перспективы ее использования в медицине», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в работу испытательной лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы»

Комиссия в составе заведующей испытательной лабораторией Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы» Айсиной Г.Р., провизора-аналитика Служаевой З.П. составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны внедрены в работу испытательной лаборатории ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы». Разработанные методики качественного и количественного анализа травы, корневищ и корней кровохлебки лекарственной апробированы в работе предприятия. В основе разработанных методик лежит унифицированный подход к анализу лекарственного растительного сырья: качественный анализ с использованием хроматографических проб методом ТСХ и количественное определение суммы флавоноидов в траве кровохлебки методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин и дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной методом спектрофотометрии после осаждения дубильных веществ раствором желатина. Методики являются нетрудоемкими, экспрессными, легко воспроизводимыми и статистически достоверными.

Внедрение результатов диссертационного исследования Казеевой А.Р. будет способствовать оптимизации анализа лекарственного растительного сырья кровохлебки лекарственной и разработки дополнений и изменений существующей нормативной документации на корневища и корни кровохлебки лекарственной.

Зав. испытательной лабораторией ГБУЗ
«Центр лекарственного обеспечения
Департамента здравоохранения города Москвы»

Айсина Гульнара Ренатовна

Провизор-аналитик ГБУЗ
«Центр лекарственного обеспечения
Департамента здравоохранения города Москвы»

Служаева Зоя Прокофьевна





УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»

А.А. Сухарева

2016 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны «Фармакогностическое изучение кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L) и перспективы ее использования в медицине», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в работу лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»

Комиссия в составе: председатель - и.о. директора Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» Сухарева А.А.

Члены комиссии: провизор-аналитик Дианова И.С., провизор-аналитик Ерхова Е.И. составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны внедрены в работу ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств». Разработанные методики качественного и количественного анализа корневищ и корней, травы кровохлебки лекарственной апробированы в работе предприятия. В основе разработанных методик лежит унифицированный подход к анализу лекарственного растительного сырья: качественный анализ с использованием хроматографических проб методом ТСХ и количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве кровохлебки методом дифференциальной спектрофотометрии и дубильных веществ в корневищах и корнях кровохлебки лекарственной методом спектрофотометрии после осаждения дубильных веществ раствором желатина. Методики являются нетрудоемкими, экспрессными, легко воспроизводимыми и статистически достоверными.

Внедрение результатов диссертационного исследования Казеевой А.Р. будет способствовать оптимизации анализа лекарственного растительного сырья кровохлебки лекарственной и разработки дополнений и изменений существующей нормативной документации на корневища и корни кровохлебки лекарственной.

И.О. директора ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»

А.А. Сухарева

Провизор-аналитик ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»

И.С. Дианова

Провизор-аналитик ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»

Е.И. Ерхова

450106, г.Уфа, ул. Батырская, 39 в.

УТВЕРЖДАЮ
 Ректор ФГБОУ ВО БГМУ
 Минздрава России, профессор
 Павлов В.Н.
 2016 г.



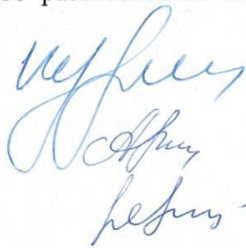
АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны
 «Фармакогностическое изучение кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis*
 L) и перспективы ее использования в медицине», представленной на соискание
 ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 –
 фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры
 фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии Федерального
 государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования
 «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства
 здравоохранения Российской Федерации

Комиссия в составе: председатель - заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом
 ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н., профессор Кудашкина Н.В.

члены комиссии: профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ
 фитотерапии, д.фарм.н Афанасьева Ю.Г., доцент кафедры фармакогнозии с курсом
 ботаники и основ фитотерапии, к.фарм.н. Файзуллина Р.Р. составили настоящий акт о
 том, что результаты диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны
 «Фармакогностическое изучение кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L) и
 перспективы ее использования в медицине» внедрены в учебный и научно-
 исследовательский процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ
 фитотерапии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
 образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства
 здравоохранения Российской Федерации (450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3) и применяются
 на практических занятиях у студентов 3 и 4 курсов фармацевтического факультета при
 изучении вопросов качественного и количественного анализа лекарственного
 растительного сырья, содержащего дубильные вещества, флавоноиды и при разработке
 методов стандартизации лекарственного растительного сырья и средств растительного
 происхождения.

Председатель комиссии



Н.В. Кудашкина

Члены комиссии:

Ю.Г. Афанасьева

Р.Р. Файзуллина

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны «Фармакогностическое изучение кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L) и перспективы ее использования в медицине», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Комиссия в составе: председатель - заведующий кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, д.фарм.н., профессор Халиуллин Ф.А.

члены комиссии: профессор кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, д.фарм.н Клен Е.Э., доцент кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, к.фарм.н. Шарипов И.М. составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Казеевой Алины Рамилевны «Фармакогностическое изучение кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis* L) и перспективы ее использования в медицине» внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3) и применяются при изучении вопросов качественного и количественного анализа лекарственных препаратов, содержащих растительные компоненты производные флавоноидов и дубильные вещества, на практических занятиях у студентов 3 и 4 курса фармацевтического факультета.

Председатель комиссии

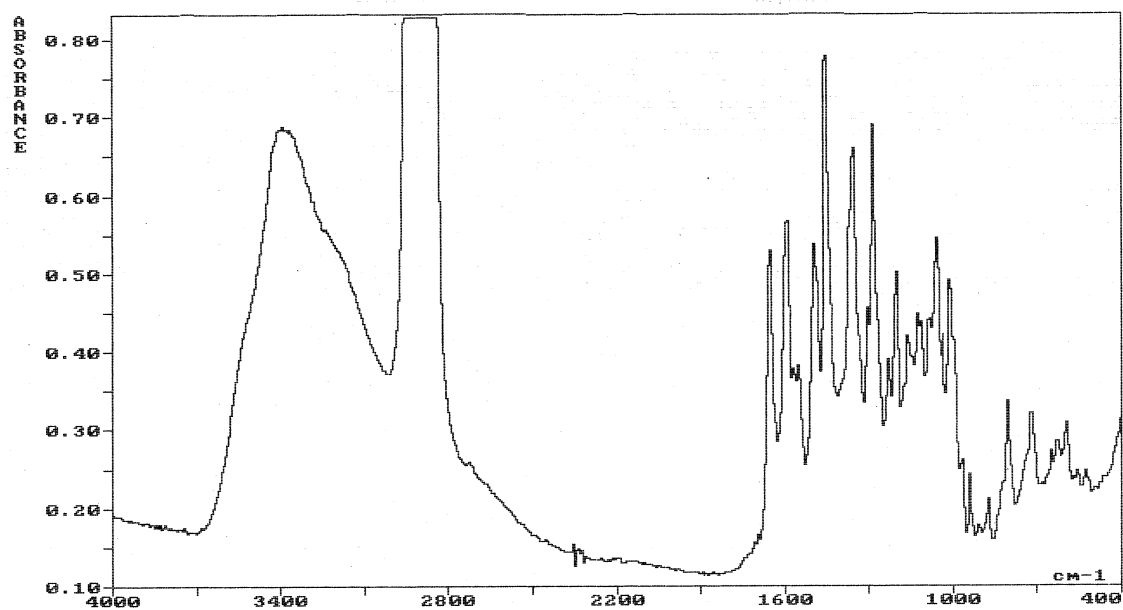
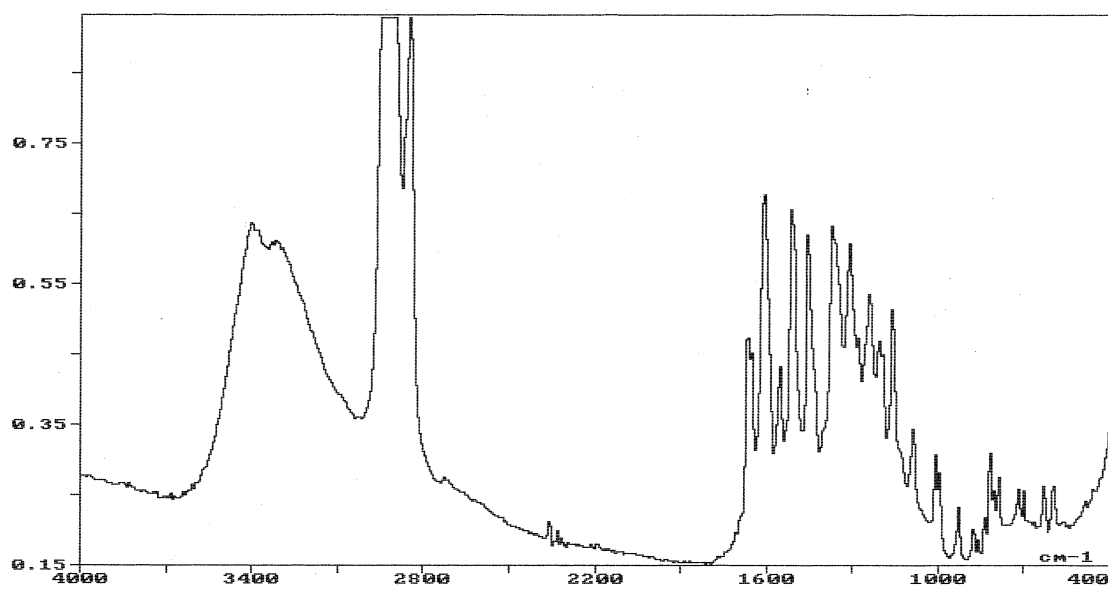
Ф.А. Халиуллин

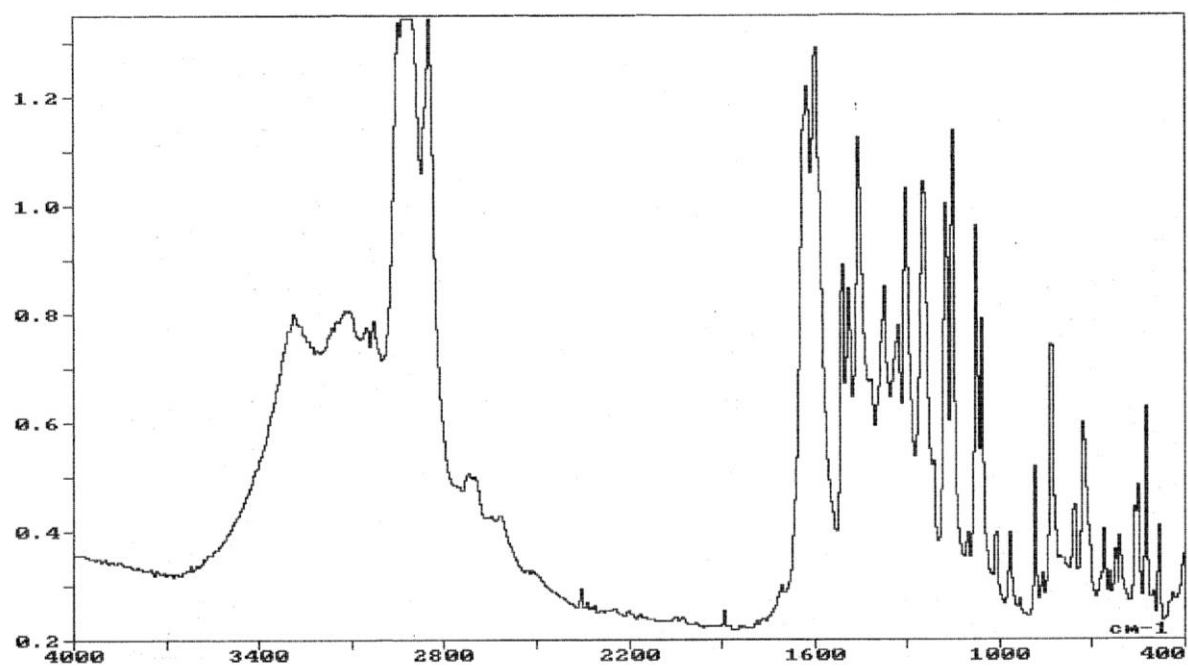
Члены комиссии:

Е.Э. Клен

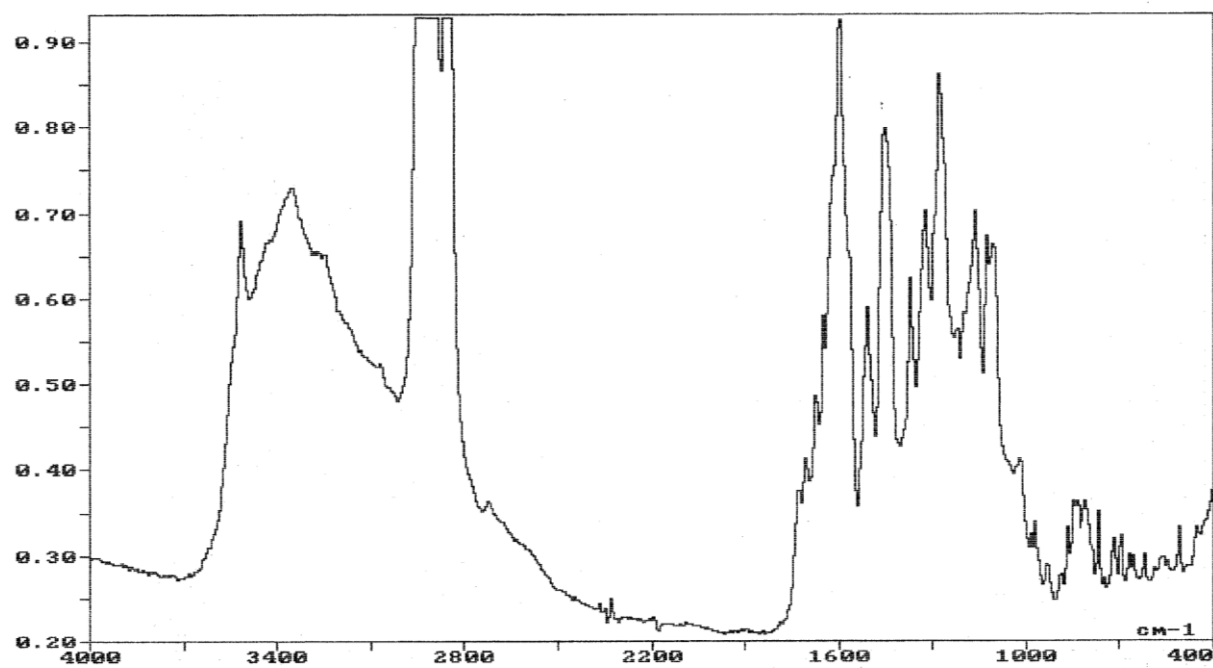
И.М. Шарипов

450008, г.Уфа, ул.Ленина, 3

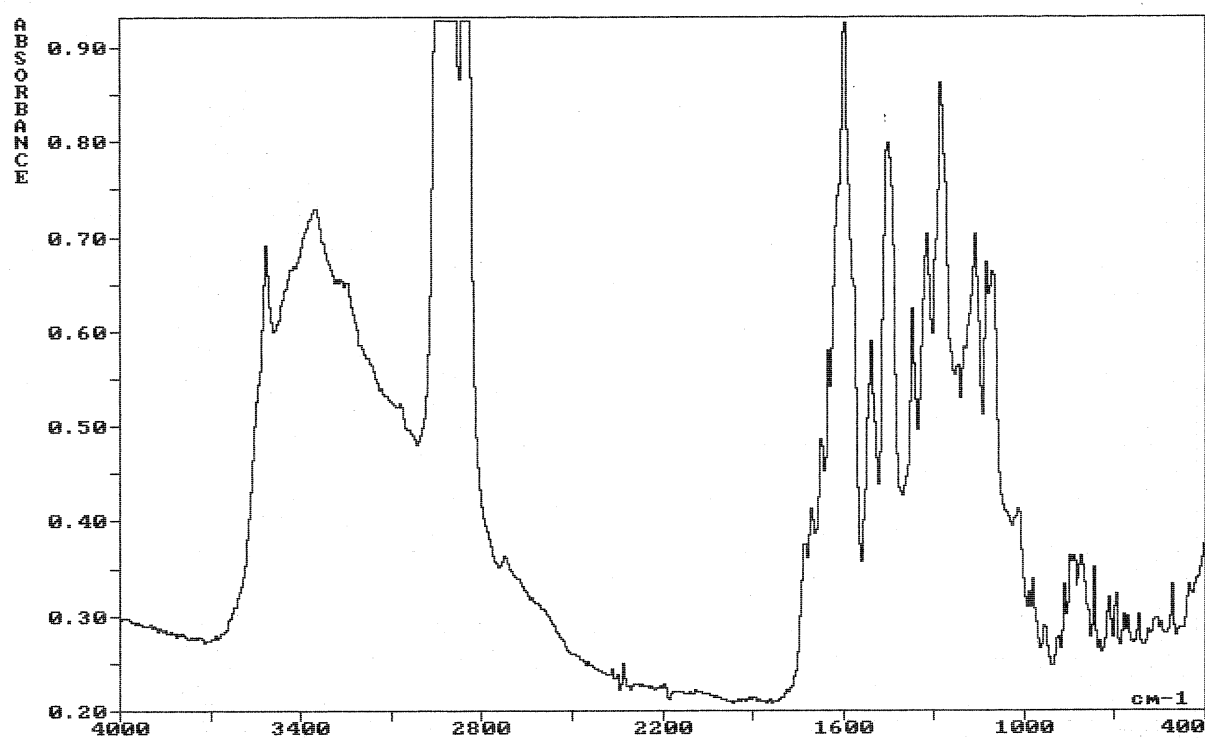
ИК-спектры выделенных из кровохлебки веществ*ИК-спектр выделенного из кровохлебки рутина**ИК-спектр выделенного из кровохлебки кверцетина*



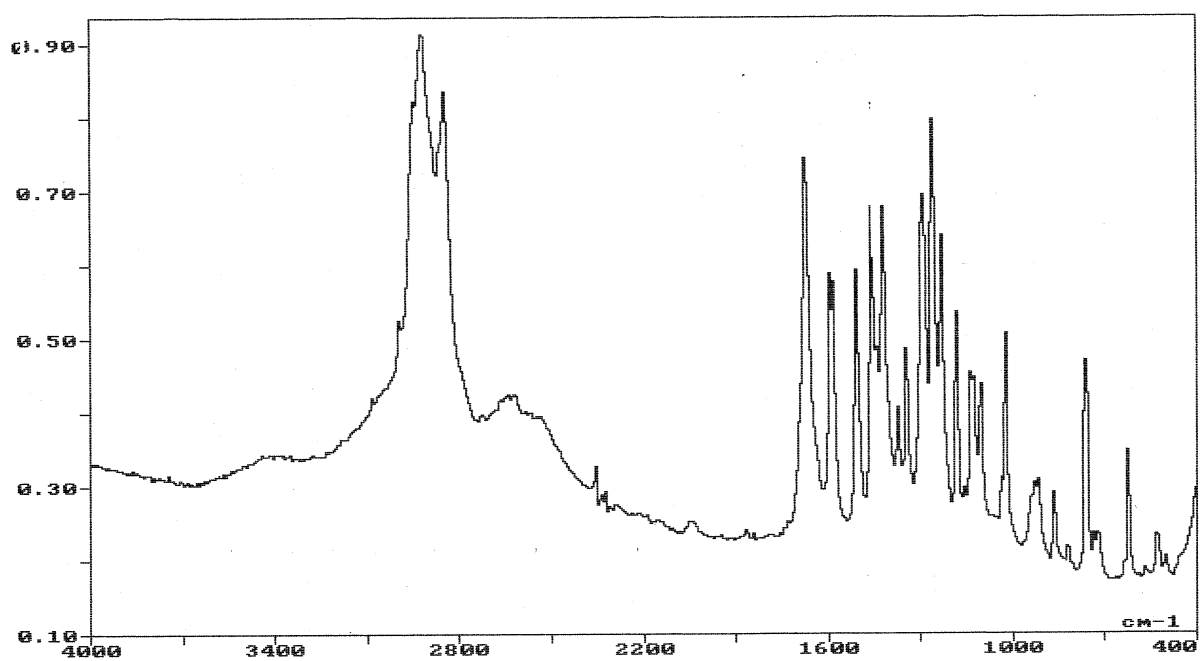
ИК-спектр выделенного из кровохлебки лютеолин – 7-глюкозида



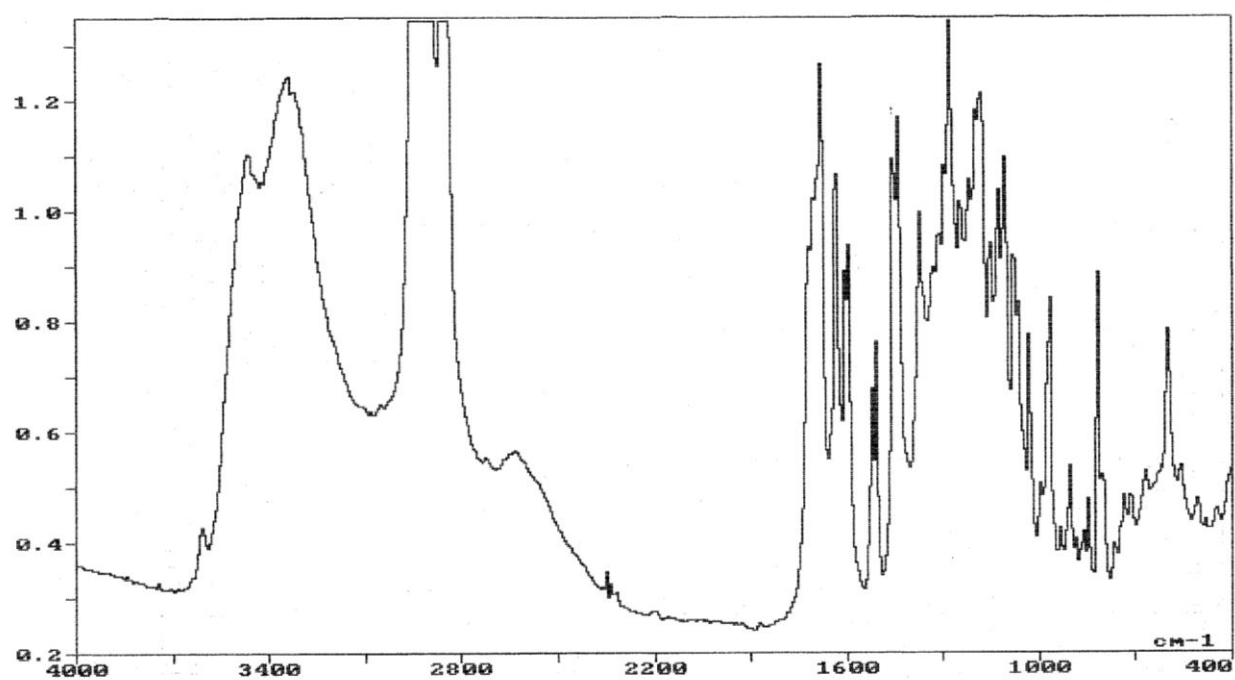
ИК-спектр выделенного из кровохлебки гиперозида



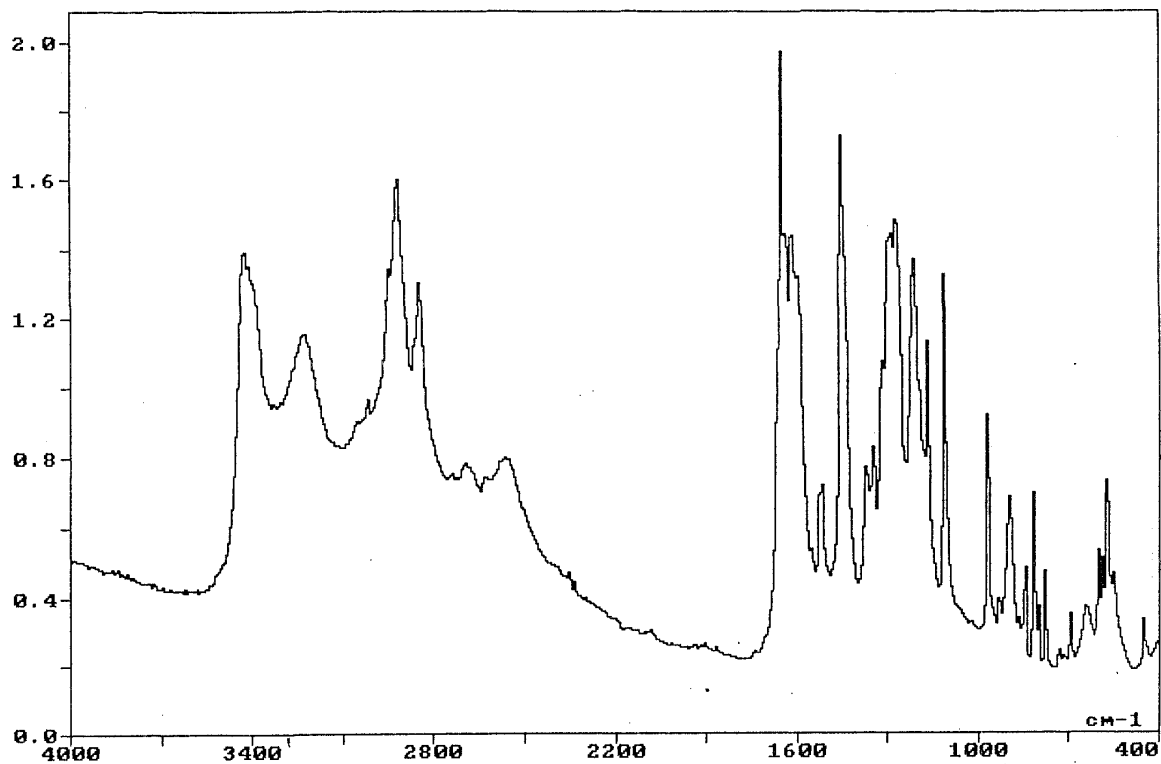
ИК-спектр выделенного из кровохлебки лютеолина



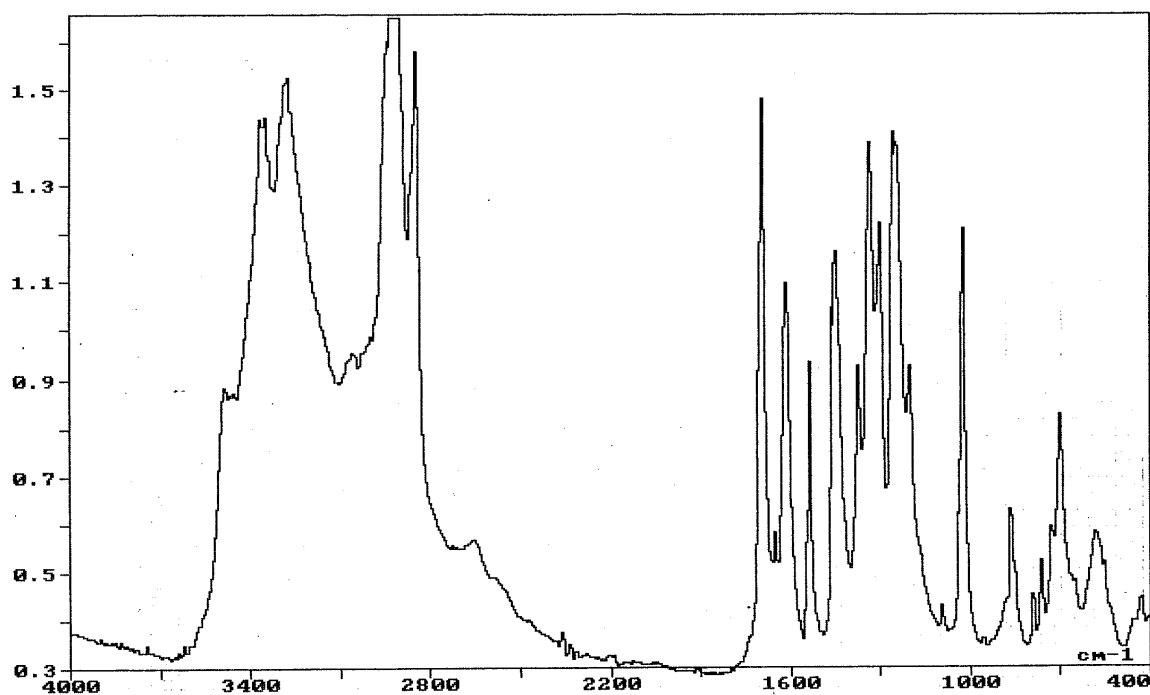
ИК-спектр выделенного из кровохлебки катехина



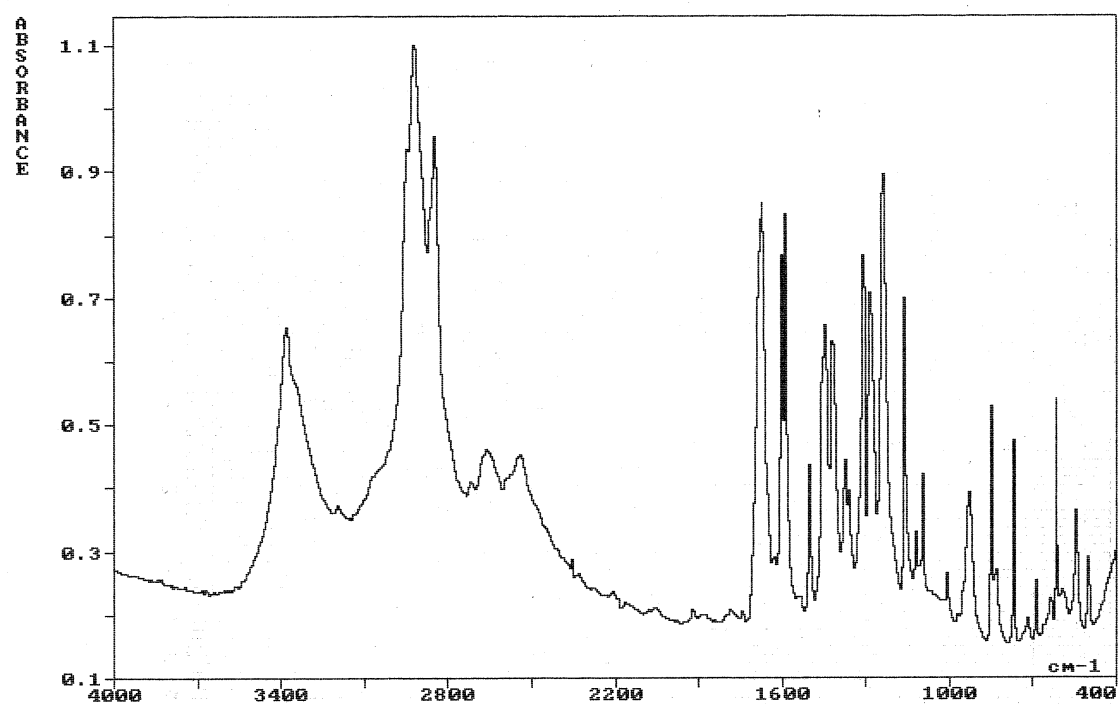
ИК-спектр выделенной из кровохлебки хлорогеновой кислоты



ИК-спектр выделенной из кровохлебки кофейной кислоты



ИК-спектр выделенной из кровохлебки галловой кислоты



ИК-спектр выделенной из кровохлебки феруловой кислоты

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минздрав России)

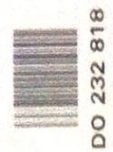
федеральное
государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
(ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России)

127051 Москва, Петровский бульвар д. 8, стр. 2
Тел. (495) 234-6106, 625-4342, факс 625-4350

№ 3273
09 МАР 2016
На № _____ от _____

Ректору ГБОУ ВПО БГМУЗ МЗ РФ
д.мед.н., профессору Павлову В.Н.

450000, г.Уфа, ул.Ленина,3



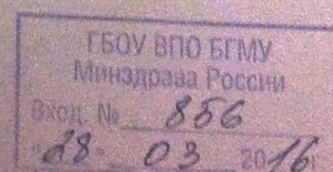
Уважаемый Валентин Николаевич!

Сообщаю Вам, что проект ФС «Кровохлебки корневища и корни» составленный ГБОУ ВПО БГМУЗ МЗ РФ профессором кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии д.фарм.н. Пупыкиной К.А и аспирантом кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии Казеевой А.Р., принят к рассмотрению.

С уважением,
Генеральный директор

Ю.В. Олефир

Исполнитель: Саканян Е.И. (495)-214-61-01



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Кровохлебки корневища и корни

ФС 42-

Rhizomata et radices Sangisorbae

Взамен ФС 42-1082-76

Срок введения установлен

«___»_____20__ года

Срок действия до

«___»_____20__ года

Требования фармакопейной статьи распространяются на собранные осенью, очищенные от остатков надземных частей, отмытые от земли и высушенные корневища и корни дикорастущего, многолетнего травянистого растения кровохлебки лекарственной – *Sangisorba officinalis* L., сем. розоцветных – *Rosaceae*.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Кровохлебки трава

ФС 42-

Herbae Sangisorbae

Срок введения установлен

«___»_____20__ года

Срок действия до

«___»_____20__ года

Требования фармакопейной статьи распространяются на собранную в фазу цветения и высушенную траву дикорастущего, многолетнего травянистого растения кровохлебки лекарственной – *Sangisorba officinalis* L., сем. розоцветных – *Rosaceae*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОА – антиоксидантная активность
АФК – активные формы кислорода
БАВ – биологически активные вещества
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России
ФГБУ РАН «Институт органической химии УНЦ РАН» - Федеральное государственное бюджетное учреждение Российской академии наук «Институт органической химии уфимского научного центра Российской академии наук»
БХ – бумажная хроматография
ВАК – Высшая Аттестационная Комиссия
ВФС – временная фармакопейная статья
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГБУЗ «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы» - испытательная лаборатория Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы»
ГБУЗ РБ «Лекконтроль» - Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республики Башкортостан «Лекконтроль»
ГОСТ – Государственный отраслевой стандарт
ГСО – Государственный стандартный образец
ГФ – Государственная фармакопея
ИК – инфракрасный
ЛРС – лекарственное растительное сырье
ЛП – лекарственный препарат
ЛУК – ледяная уксусная кислота
МК – муравьиная кислота
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РСО – рабочий стандартный образец
РФ – Российская Федерация
ТСХ – тонкослойная хроматография
УФ – ультрафиолетовый
ФКК – фенолкарбоновые кислоты
ФС – фармакопейная статья
ФСП – фармакопейная статья предприятия
ЦНИЛ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России – Центральная научно-исследовательская лаборатория Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России