

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

На правах рукописи

ХИСЯМОВА ДИНАРА МИДХАТОВНА

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА
ЛАПЧАТКА (*POTENTILLA L.*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор В.А. КУРКИН

Самара - 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	7
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ И АНАЛИЗА СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	20
1.1. Род <i>Potentilla</i> L. как перспективный источник лекарственных растительных препаратов.....	20
1.1.1. Историческая справка.....	20
1.1.2. Характеристика таксона.....	21
1.1.2.1. Ботаническое описание.....	21
1.1.2.2. Ареал обитания, культивирование.....	25
1.1.3. Современные данные о химическом составе.....	27
1.1.4 Применение представителей рода <i>Potentilla</i> L. в медицине.....	33
1.2. Стандартизация сырья и лекарственных препаратов лапчатки.....	36
1.2.1. Качественные реакции.....	37
1.2.2 Количественное определение.....	38
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.....	40
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1. Объекты исследования.....	41
2.2. Методы исследования.....	43
2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа.....	43
2.2.2. Физические методы анализа.....	45
2.2.3. Химические методы анализа.....	45
2.2.4. Хроматографические методы анализа.....	47
2.2.5. Физико-химические методы анализа.....	48
2.2.6. Технологические методы.....	55

2.2.7.	Фармакологические методы анализа.....	58
2.2.8.	Микробиологические методы анализа.....	59
ГЛАВА 3	СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛРС НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА.....	60
3.1.	Корневища и корни лапчатки белой (<i>Potentilla alba</i> L.).....	61
3.2.	Корневища и корни лапчатки прямой (<i>Potentilla recta</i> L.)...	65
3.3.	Корневища и корни лапчатки серебристой (<i>Potentilla argentea</i> L.).....	72
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	77
ГЛАВА 4	ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА ЛАПЧАТКА.....	79
4.1.	Предварительное фитохимическое исследование некоторых представителей рода Лапчатка.....	80
4.1.1.	Качественный анализ сырья изучаемых растений рода Лапчатка.....	80
4.1.2.	Оценка количественного содержания некоторых групп БАС в подземных органах видов рода <i>Potentilla</i> L.....	83
4.2.	Выделение индивидуальных веществ из подземных органов лапчатки белой.....	88
4.2.1.	Исследование фракций, содержащих перспективные индивидуальные вещества, выделенные из корневищ и корней лапчатки белой.....	90
4.2.2.	Идентификация выделенных веществ и их характеристики.....	91
4.2.3.	Структурные особенности индивидуальных соединений, выделенных из подземных органов лапчатки белой.....	94
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	99

ГЛАВА 5	РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА.....	100
5.1.	Разработка методик качественного анализа сырья представителей рода Лапчатка.....	100
5.1.1.	Метод тонкослойной хроматографии.....	101
5.1.2.	Метод УФ-спектроскопии.....	103
5.2.	Разработка подходов к количественному анализу БАС в подземных органах представителей рода <i>Potentilla</i> L.....	104
5.3.	Числовые показатели для нового вида ЛРС «Лапчатки белой корневища и корни».....	110
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	111
ГЛАВА 6	ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК АНАЛИЗА ЛРП НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА.....	113
6.1.	Обоснование состава, способа получения и подходов к стандартизации настоек из подземных органов представителей рода Лапчатка.....	114
6.1.1.	Описание состава и способа получения настоек из изучаемого сырья лапчатки белой и лапчатки прямой.....	114
6.1.2.	Разработка методик стандартизации настоек из подземных органов представителей рода <i>Potentilla</i> L.....	114
6.1.2.1.	Числовые показатели настоек из корневищ и корней лапчатки белой и лапчатки прямой.....	115
6.1.2.2.	Подходы к качественному анализу полученных настоек...	115
6.1.2.3.	Оценка количественного содержания фенольных соединений в образцах настоек представителей рода Лапчатка.....	117

6.2.	Обоснование состава, способа получения и подходов к стандартизации сиропов из подземных органов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой.....	119
6.2.1.	Составы и способы получения сиропов из подземных органов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой.....	119
6.2.2.	Подходы к стандартизации сиропа лапчатки прямостоячей и сиропа лапчатки белой.....	120
6.2.2.1.	Числовые показатели полученных сиропов.....	121
6.2.2.2.	Подходы к качественному анализу сиропов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой.....	121
6.2.2.3.	Подходы к количественному анализу сиропа лапчатки прямостоячей и сиропа лапчатки белой.....	124
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.....		126
ГЛАВА 7 ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ И ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА.....		127
7.1.	Изучение острой токсичности водных и водно-спиртовых извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка.....	127
7.2.	Скрининговый анализ антибактериальной активности извлечений из подземных органов видов рода <i>Potentilla</i> L.	128
7.2.1.	Изучение антибактериальной активности водных извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка.....	128
7.2.2.	Изучение антибактериальной активности водно-спиртовых извлечений из подземных органов видов рода <i>Potentilla</i> L.....	132
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7.....		140

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	142
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	146
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	147
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	173
Приложение 1. Акты о внедрении результатов диссертационной работы	174
Приложение 2. Патент на изобретение «Сироп лапчатки белой».....	180
Приложение 3. Патент на изобретение «Сироп лапчатки прямоостоячей».....	181
Приложение 4. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Лапчатки белой корневища и корни».....	182

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время род Лапчатка (*Potentilla* L.) представляет большой интерес для фармацевтической науки и практики ввиду содержания широкого спектра биологически активных соединений (БАС), которые определяют разнообразие фармакологических свойств (вяжущее, антибактериальное, противовоспалительное, антитиреоидное действие). Некоторые представители рода Лапчатка давно используются в народной медицине, однако химический состав их изучен в недостаточной степени, что не позволяет доказательно трактовать фармакологические эффекты растительного сырья и позиционировать его как фармакопейное. Вместе с тем в рамках реализации программ «Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года» и «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года» разработка российских лекарственных препаратов (ЛП) является одним из приоритетных направлений. Так, к актуальным вопросам относится разработка препаратов на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС), обладающих определенными преимуществами в сравнении с препаратами синтетического происхождения: широкое терапевтическое действие, постепенное развитие эффекта, более низкий риск развития аллергий и др. (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2016; Самылина И.А. и др., 2003; 2010).

На настоящий момент единственным представителем рода *Potentilla* L. в Государственной фармакопее РФ XIII издания является лапчатка прямостоячая (*Potentilla erecta* L.). Однако интерес исследователей также вызывают и подземные органы лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) как перспективное сырье для получения лекарственных растительных препаратов (ЛРП), обладающих антитиреоидным действием. В силу недостаточного количества данных о химическом составе корневищ с корнями данного растения имеется ряд разночтений об основной биологически активной группе веществ. Целесообразно также проведение

скринингового исследования химического состава подземных органов и других представителей рода *Potentilla* L. ввиду филогенетического родства, так как для близкородственных видов зачастую характерно сходство вторичных метаболитов. Актуальным также является вопрос стандартизации сырья видов рода Лапчатка. Необходима разработка методов качественного и количественного анализа новых видов рода *Potentilla* L., отвечающих современным требованиям.

Помимо фитохимических аспектов остро стоит также вопрос диагностики сырья методом морфолого-анатомического анализа. Ввиду близости анатомического строения представители рода *Potentilla* сложно дифференцируются морфологически, что создает определенные проблемы в диагностике сырья и не исключает возможности попадания примесных видов в партию целевого лекарственного сырья. Таким образом, очевидна необходимость проведения сравнительного морфолого-анатомического исследования для выявления видовых диагностических признаков внутри рода Лапчатка.

Таким образом, актуальным является сравнительное фармакогностическое изучение различных представителей рода *Potentilla* L. с целью научного обоснования целесообразности использования в медицинской практике новых видов рода Лапчатка.

Степень разработанности темы. В настоящее время в зарубежные фармакопеи в качестве официального растения включена лапчатка прямостоячая (*Potentilla erecta* L.), для которой разработаны показатели качества и предложены методы стандартизации. В Китайской Народной Республике фармакопейным видом является *Potentilla chinensis* Ser. Другие представители рода не являются фармакопейными растениями, однако изучались рядом ученых, в частности, из Польши, Турции и др. (Bazylo A., 2013; Sohretoglu D. и др., 2011; Tomczyk M. и др., 2008; 2009; 2010).

На данный момент в Российской Федерации в ГФ XIII издания включена также только лапчатка прямостоячая. На предмет химического

состава, возможных методов стандартизации и фармакологических эффектов изучалась также лапчатка белая (Архипова Э.В. и др., 2011; 2012; 2014; Башилов А.В., 2009; Богачева Н.Г. и др., 2016; Водопьянова А.М., 2009; 2011; Косман В.М. и др., 2013; и др.). Подземные органы лапчатки серебристой малоизучены. В медицине применяется лишь трава растения – трава лапчатки серебристой была включена в Государственный реестр лекарственных средств в 2008 году. Лапчатка прямая ранее на территории Российской Федерации не изучалась.

Для целей стандартизации сырья лапчатки прямостоячей предлагаются следующие варианты определения подлинности сырья: оценка внешнего вида и микроскопических признаков, а также определение основных групп БАС двумя способами: методом ТСХ с использованием галловой кислоты в качестве вещества-свидетеля и качественной реакции с железа (III) аммония сульфатом. В разделе «Микроскопические признаки» отсутствует информация об анатомических признаках корней, содержание которых в сырье допускается до 1%. Следует отметить, что использование в качестве ЛРС именно корневищ лапчатки прямостоячей приводит к необходимости проведения дополнительной стадии подготовки сырья – отделение корней, хотя химический состав корней лапчатки прямостоячей, вероятно, мало отличается от такового у корневищ. Также предлагаемый метод тонкослойной хроматографии не позволяет полностью решить вопрос стандартизации сырья лапчатки прямостоячей, так как в качестве вещества сравнения используется галловая кислота, которая лежит в основе гидролизуемых дубильных веществ, тогда как в корневищах лапчатки прямостоячей преимущественно содержатся дубильные вещества конденсированной природы.

Для количественного анализа корневищ лапчатки прямостоячей предлагается метод перманганатометрии (в пересчете на танин). Данный метод не позволяет полностью решить вопрос количественного анализа сырья лапчатки прямостоячей, так как пересчет содержания дубильных

веществ производится на вещество гидролизуемой природы – танин, тогда как корневища *Potentilla erecta* L. содержат конденсированные дубильные вещества. Кроме того, следует отметить, что титриметрические методы уступают инструментальным методам в связи с большей трудоемкостью, значительными расходами реактивов и влиянием человеческого фактора на результаты анализа.

Следовательно, методы анализа сырья лапчатки прямостоячей требуют пересмотра и доработки для целей стандартизации новых видов ЛРС представителей рода Лапчатка.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью данной работы является сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода лапчатка, произрастающих на территории Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи.

1. Провести морфолого-анатомическое исследование подземных органов некоторых представителей рода Лапчатка: лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой.
2. Провести сравнительное фитохимическое исследование корневищ и корней лапчатки прямостоячей, лапчатки белой и лапчатки прямой.
3. Разработать методики качественного и количественного анализа сырья представителей рода *Potentilla* L.
4. Разработать показатели качества изучаемого сырья: корневищ с корнями лапчатки белой, корневищ с корнями лапчатки прямой.
5. Обосновать составы и технологию приготовления лекарственных препаратов на основе корневищ и корней разных представителей рода Лапчатка («Лапчатки белой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямостоячей сироп»; «Лапчатки белой сироп»).

6. Разработать методики качественного анализа и количественного определения БАС в лекарственных препаратах на основе подземных органов разных представителей рода *Potentilla* L. («Лапчатки белой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямостоячей сироп»; «Лапчатки белой сироп»).

7. Определить показатели качества разработанных лекарственных препаратов («Лапчатки белой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямостоячей сироп»; «Лапчатки белой сироп»).

8. Изучить острую токсичность и провести скрининговый анализ антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из изучаемых видов сырья

9. Разработать проект фармакопейной статьи (ФС) на новый вид лекарственного растительного сырья – «Лапчатки белой корневища и корни».

Научная новизна. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование подземных органов представителей рода Лапчатка позволило выявить диагностические признаки, характерные для каждого вида сырья, что позволяет объективно идентифицировать близкородственные виды. Основной отличительной характеристикой при сравнении морфолого-анатомии корней трех изученных представителей рода Лапчатка является особенность локализации ксилемной части. В корнях лапчатки белой ксилема сосредоточена в центре в виде характерного «солнышка». В корнях лапчатки прямой ксилема локализуется в виде трапецевидных и треугольных областей, причем в центре первичная ксилема визуализируется слабо. Ксилемная часть корня лапчатки серебристой представлена сплошными кольцами, в центре хорошо визуализируется первичная ксилема. При сравнении корневищ видов рода *Potentilla* L. определены следующие отличительные признаки – общий вид (корневища лапчатки белой и лапчатки прямой пучкового типа, в корневищах лапчатки серебристой пучки практически сливаются между собой), выраженность камбиальной зоны (в

корневищах лапчатки серебристой камбиальная зона хорошо визуализируется в отличие от корневищ лапчатки белой и лапчатки прямой), характер крахмальных включений (мелкие крахмальные зерна в корневищах лапчатки белой, крупные включения в корневищах лапчатки прямой, преимущественно неструктурированный крахмал в корневищах лапчатки серебристой.).

Впервые выделены из подземных органов лапчатки белой в виде индивидуальных соединений 3-О-β-D-глюкопиранозид катехина и 7-О-β-D-глюкопиранозид катехина. На основании полученных данных о химическом составе БАС корневищ и корней лапчатки белой, разработаны подходы к стандартизации нового вида ЛРС «Лапчатки белой корневища и корни», заключающиеся в использовании стандартного образца катехина в качественном и количественном анализе сырья. Впервые в РФ оценен химический состав подземных органов лапчатки прямой (*Potentilla recta* L.).

Обоснованы методики анализа сырья и лекарственных препаратов представителей рода *Potentilla* L., основанные на определении действующих веществ методом хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) и УФ-спектроскопии. ТСХ предлагается как метод определения подлинности сырья, в качестве стандартного образца предлагается использовать катехин – вещество из группы конденсированных дубильных веществ. Кроме того, впервые обосновано использование УФ-спектроскопии для определения подлинности сырья представителей рода Лапчатка в связи с характерным максимумом поглощения, который наблюдается при длине волны 282 ± 2 нм. Для оценки количественного содержания дубильных веществ в сырье предлагается метод прямой спектрофотометрии в пересчете на катехин, что позволяет учесть при анализе особенности химического состава подземных органов видов рода *Potentilla* L., а именно – присутствие преимущественно дубильных веществ конденсированной группы.

Изучение химического состава корневищ и корней лапчатки белой и лапчатки прямой, а также результаты микробиологического и

токсикологического исследования позволили обосновать целесообразность применения данных видов наряду с фармакопейным видом – лапчаткой прямостоячей.

Научно обоснован состав и способ получения лекарственных препаратов на основе подземных органов представителей рода Лапчатка – «Лапчатки белой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп».

Научная новизна диссертационных исследований подтверждается также патентами РФ №2603466 «Сироп лапчатки белой» (заявка №2015142298 от 05.10.2015 г., решение о выдаче патента 02.11.2016 г.) и №2605820 «Сироп лапчатки прямостоячей» (заявка №2015142297 от 05.10.2015 г., решение о выдаче патента 06.12.2016 г.).

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны методики для качественного и количественного анализа подземных органов представителей рода Лапчатка методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Предложено использование РСО катехина в качестве вещества-свидетеля в методе тонкослойной хроматографии, в качестве дополнительного метода качественного анализа предложена УФ-спектроскопия. Количественную оценку содержания дубильных веществ предлагается осуществлять методом прямой спектрофотометрии в пересчете на катехин.

Разработаны состав и способ получения лекарственных препаратов «Лапчатки белой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп». Установлены показатели качества данных препаратов, разработаны методики определения БАС в лекарственных формах, отвечающие принципам унификации, которые предъявляются к современным методам фармацевтического анализа (Самылина И.А. и др. 1994; 2006).

Разработаны показатели доброкачественности сырья лапчатки белой, в том числе числовые (содержание дубильных веществ не меньше 10%). Данные показатели включены в проект ФС на предлагаемый новый вид ЛРС.

Разработан проект ФС на новый вид ЛРС «Лапчатки белой корневища и корни».

Обосновано использование новых видов ЛРС и препаратов на его основе в медицинской практике.

Результаты диссертационных исследований используются в учебном и научном процессах на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре химии фармацевтического факультета, на кафедре фармацевтической технологии, на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также в рабочем процессе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» и в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы».

Методология и методы исследования. В основе методологии диссертационного исследования лежит изучение и систематизация литературных данных по фармакогностическому исследованию представителей рода *Potentilla* L., оценка актуальности темы и современной степени ее разработанности. Согласно поставленной цели и задачам был разработан план выполнения диссертационной работы, выбраны объекты и методы, применимые для исследования.

Объектами исследования являлись образцы сырья представителей рода Лапчатка, собранные на территории Самарской области, промышленные образцы сырья, выпускаемые на территории Российской Федерации, а также препараты, полученные из сырья представителей изучаемого рода. Диссертационное исследование осуществляли с применением методов микроскопии, хроматографии на тонком слое сорбента (ТСХ), УФ- и ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. Использовались также пробирочные и гистохимические реакции. Математическая обработка результатов

исследования осуществлялась с использованием программного обеспечения в соответствии с ГФ РФ XIII издания.

Связь задач исследования с планами научных работ.

Диссертационное исследование было выполнено согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (№ Гос. регистрации 01200900568 до 28.04.2015; с 28.04.2015 № Гос. регистрации 115042810034; наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты сравнительного морфолого-анатомического исследования различных видов рода *Potentilla* L.
2. Результаты фитохимического исследования подземных органов представителей рода *Potentilla* L.
3. Результаты исследований по разработке методик качественного и количественного анализа корневищ и корней представителей рода Лапчатка.
4. Результаты исследований по разработке технологии получения лекарственных растительных препаратов на основе сырья изучаемых видов лапчатки («Лапчатки белой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп»).
5. Результаты исследований по разработке методик их качественного и количественного анализа лекарственных препаратов на основе подземных органов лапчатки прямостоячей, лапчатки белой и лапчатки прямой.
6. Данные по разработке показателей качества лекарственных препаратов – «Лапчатки белой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямостоячей сироп», «Лапчатки белой сироп».

7. Результаты исследования острой токсичности и антимикробной активности водных извлечений из сырья представителей рода Лапчатка и некоторых разработанных препаратов на его основе.

Степень достоверности. Достоверность проведенного диссертационного исследования подтверждена экспериментальными данными, которые получены с помощью следующих методов: цифровая микроскопия, ТСХ, УФ- и ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия.

Апробация работы. Результаты исследования доложены на конференциях различного уровня: III научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (г. Москва, 2015); на конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения «Молодые ученые - медицине» (г. Самара, 2014; 2015; 2016); на 80-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины», посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне (г. Уфа, 2015); на I межвузовской студенческой научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2016), на XXI Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека» (г. Самара, 2016).

Публикации. Основные материалы диссертационного исследования опубликованы в 24 научных работах, из них 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки РФ, и 2 патента РФ.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в учебном и научном процессах Самарского государственного медицинского университета на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре химии фармацевтического факультета, на кафедре фармацевтической технологии, на кафедре управления и экономики фармации. Кроме того, полученные результаты используются в рабочем процессе в ГБУЗ «Центр

контроля качества лекарственных средств Самарской области» и в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы».

Личный вклад автора. Приведенные результаты исследования получены лично автором. Изучены морфологические и анатомо-гистологические особенности строения некоторых представителей рода *Potentilla* L., выявлены их диагностические признаки. Оценен химический состав некоторых видов рода Лапчатка, определена химическая структура индивидуальных соединений, выделенных из подземных органов лапчатки белой. Разработаны методики качественного и количественного анализа изучаемого сырья. Разработаны состав и технология получения препаратов – «Лапчатки белой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп». Для разработанных настоек и водных извлечений определена антимикробная активность и оценена острая токсичность. Для целей качественного и количественного анализа препаратов автором рекомендованы методы ТСХ и УФ-спектроскопии. Автором разработан проект ФС «Лапчатки белой корневища и корни».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Ключевые положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по следующим пунктам: 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 – «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье»; 6 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения,

идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, данные проиллюстрированы 45 рисунками и изложены в форме 24 таблиц. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов, использованных в ходе выполнения диссертационного исследования, 5 глав, описывающие результаты собственных исследований, заключение и список литературы, состоящий из 199 источников, в том числе 53 – на иностранных языках.

Введение отражает актуальность диссертационной работы, включает цель и задачи исследования, описывает научную новизну и практическую значимость проводимого исследования, излагает основные положения, которые выносятся на защиту, приводит сведения о публикациях и апробации работы.

Глава 1 включает обзор литературы отечественных и зарубежных авторов на предмет исследований представителей рода *Potentilla* L.: лапчатки прямостоячей, лапчатки белой, лапчатки прямой, лапчатки серебристой и лапчатки гусиной. В главе изложены имеющиеся сведения по химическому составу четырех представителей рода Лапчатка, а также описано применение данных растений в традиционной и народной медицине. Приведена информация о подходах к анализу сырья представителей рода Лапчатка, применяемых в Российской Федерации и других странах.

В главе 2 представлены объекты и использованные методы исследования. Изложены методики определения подлинности и количественного содержания БАС в подземных органах некоторых представителей рода Лапчатка, а также в препаратах на их основе.

В главе 3 приводятся результаты морфолого-анатомического анализа корневищ и корней лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой.

В главе 4 изложены результаты предварительных фитохимических исследований представителей рода Лапчатка, а также приведены результаты выделения индивидуальных БАС из подземной части лапчатки белой, информация об их структуре.

Глава 5 посвящена результатам по разработке методик качественного и количественного анализа сырья.

В главе 6 приводятся результаты исследований по обоснованию состава, технологии получения и методик анализа препаратов на основе подземных органов представителей рода Лапчатка.

В главе 7 описаны результаты изучения острой токсичности и антимикробной активности некоторых препаратов на основе подземных органов представителей рода *Potentilla* L.

Диссертация завершается заключением и списком литературы.

В приложениях представлены акты внедрения, патенты РФ №2605820 «Сироп лапчатки прямостоячей» и №2603466 «Сироп лапчатки белой», проект фармакопейной статьи «Лапчатки белой корневища и корни».

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ И АНАЛИЗА СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Род *Potentilla* L. как перспективный источник лекарственных растительных препаратов

1.1.1. Историческая справка

Латинское название рода – *Potentilla* – является уменьшительной формой от слова «*potential*» – сила, то есть растение сильнодействующее несмотря на небольшой размер. Русское название рода – Лапчатка – происходит от ботанической особенности представителей таксона: пальчатых листьев (тройчатых или пятерных) [70, 71, 89, 187].

Латинский видовой эпитет лапчатки серебристой – *argentea* – происходит от слова «серебро», «серебряный» и связан с характерным серебристо-войлочным опушением растения [12, 70, 71].

Латинский видовой эпитет лапчатки гусиной – *anserina* – происходит от слова «*anser*» – гусь. Для растения известно также название «гусятинная лапка» [12, 70, 75].

Латинский видовой эпитет лапчатки прямостоячей – *erecta* – происходит от слов «*erectus*» – выпрямленный и «*erigere*» – поднимать, ставить и предположительно дан из-за прямостоячих стеблей растения [12, 71, 89]. Эпитет «*tomentilla*» происходит от слова «*tormina*», что означает боль в животе, колики, в средние века – дизентерия. Данный эпитет присвоен лапчатке прямостоячей в связи с широким использованием по данным назначениям [12, 70, 71, 89]. Кроме того, лапчатку прямостоячую использовали и наружно – для полосканий, обработки ожогов, мокнущих экзем и других поражений кожных покровов [43].

1.1.2. Характеристика таксона

1.1.2.1. Ботаническое описание

Представители рода *Potentilla* L. широко гибридизируют и образуют переходные формы между собой и с видами других секций рода, иногда даже с видами других родов. Кроме того, для представителей рода Лапчатка характерны природный и погодный полиморфизм. Вышеуказанные факты свидетельствуют о сложности морфологической диагностики представителей изучаемого рода [75, 76, 135]. Для некоторых представителей рода *Potentilla* L. ранее были созданы методические указания, описывающие диагностические признаки растений [48].

Таблица 1 - Отличительные признаки некоторых видов лапчатки [82].

Диагностические признаки	<i>Potentilla erecta</i> L.	<i>Potentilla argentea</i> L.	<i>Potentilla anserina</i> L.	<i>Potentilla alba</i> L.
Подземные органы	Корневища неравномерно утолщенные, цилиндрические или клубневидные	Корень стержневой, в верхней части покрыт остатками листьев	Корень стержневой	Корневища неравномерно утолщенные, светлые на срезе
Опушение	Редкое	Густое, беловойлочное, на стеблях и с нижней стороны листьев	Густое, шелковистое - серебристое, с нижней стороны листьев	Густое, шелковистое - серебристое, прижатое
Листья	Сидячие, тройчатые, с 2 прилистниками, образуют на стебле «лапку».	Черешковые, 5-пальчатосложные.	Черешковые, непарно-прерывистоперистые с 4-10 парами листочков.	Черешковые, чешуевидные, в числе 1-2 с маленьким и

				яйцевидно-ланцетным и прилистниками.
--	--	--	--	--------------------------------------

Лапчатка прямостоячая (*Potentilla erecta* L.) – многолетнее травянистое растение высотой 10-20 см с горизонтальным, прямым цилиндрическим или изогнутым клубневидным многоглавым красновато-бурым корневищем с множеством придаточных нитевидных корней [9, 12, 42, 43, 50, 56, 74, 89, 95]. Стебель преимущественно один, тонкий, прямостоячий или восходящий, верху ветвистый, покрыт редкими волосками. Стеблевые листья сидячие, тройчатые, с 3-7-лопастными или крупнозубчатыми прилистниками, по жилкам прижатоволосистые, реже голые. Цветки на длинных тонких цветоножках, преимущественно одиночные, правильные, пазушные или верхушечные. Венчик четырехлепестный, золотисто-желтый. Плод – многоорешек. Лапчатка прямостоячая цветет с мая по сентябрь [9, 12, 42, 43, 50, 56, 74, 89, 95, 108, 131].

Лапчатка белая (*Potentilla alba* L.) – многолетнее травянистое растение высотой 10-25 см с толстым черно-бурым маловетвистым чешуйчатым корневищем, на срезе – светлым (рис. 1). Побеги, отходящие от верхушки корневищ, формируют прикорневую розетку [11, 55, 75, 76]. Прикорневые листья 5-пальчатые, снизу практически цельные, кверху с прижатыми зубцами, опушение с нижней стороны листа и по краю шелковистоволочное. Стебли тонкие, восходящие, преимущественно не превышающие прикорневые листья. Стеблевые листья тройчатые, снизу серебристо-шелковистые от прижатых прямых волосков. Цветки белые, правильные, собраны в редкие полузонттики. Плод – морщинистый орешек, при основании волосистые. Лапчатка белая цветет в мае-июне [11, 55, 75, 76, 133, 135].



Рисунок 1 – Лапчатка белая (*Potentilla alba* L.), семейство Розоцветные (*Rosaceae*). Фото автора.

Лапчатка прямая (*Potentilla recta* L.) – многолетнее травянистое растение с клубневидным корневищем с придаточными корнями (рис. 2). Прикорневых листьев чаще всего нет, цветоносный стебель выходит непосредственно из корневища [75, 76, 135]. Стебель высокий, грубый, толстый, прямостоячий. Листья состоят из 5-7 мелкозубчатых листочков. Стебель и листья покрыты волосками двух видов: длинными с бугорками и короткими железистыми между ними. Цветки желтые, собраны в щитковидные соцветия. Лепестки значительно крупнее чашелистиков. Плод – морщинистый орешек с крыловидным килем. Лапчатка прямая цветет в июне-июле [75, 76, 135].



Рисунок 2 – Лапчатка прямая (*Potentilla recta* L.), семейство Розоцветные (*Rosaceae*). Фото автора.

Лапчатка серебристая (*Potentilla argentea* L.) – многолетнее травянистое растение с деревянистым вертикальным корневищем, в верхней части корень покрытым остатками листьев [12, 56, 75, 76]. Стебли дуговидно изогнуты в нижней части, покрыты, белым или серым войлочным опушением с примесью простых волосков. Прикорневые и стеблевые листья пятерные (иногда с 6-7 листочками). В верхней части – с 2-5 зубцами, нижняя часть без зубцов. Листочки сверху голые, зеленые, снизу беловойлочные. Прилистники прикорневых листьев перепончатые, бурые, стеблевые – травянистые. Цветки не крупные, желтые, на длинных цветоножках, образуют щитковидно-метельчатое соцветие. Плод – слегка морщинистый орешек. Лапчатка серебристая цветет с июня по сентябрь [12, 56, 75, 76, 135].

Лапчатка гусиная (*Potentilla anserina* L.) – многолетнее травянистое растение с массивным корневищем [12, 75, 76, 82]. Стебли короткие, из пазух прикорневых листьев выходят длинные стелющиеся побеги, которые укореняются в узлах. Листья у лапчатки гусиной с прилистниками, по внешнему виду – прерывисто перисторассеченные с 4-10 парами листочков. Обычно листья покрыты серебристыми волосками с нижней стороны, иногда покрыты волосками и с верхней стороны листа. Светло-желтые пятичленные

цветки располагаются на длинных цветоножках. Плод у лапчатки гусиной – многоорешек [12, 75, 76, 82].

1.1.2.2. Ареал обитания, культивирование

Представители рода Лапчатка встречаются преимущественно в умеренных, арктических и альпийских зонах Северного полушария (рис. 3) [187].



Рисунок 3 – Ареал распространения рода *Potentilla* L. [187]

Изучаемые в рамках диссертационного исследования виды рода *Potentilla* L. произрастают в основном на территории центральной Европы, Италии, Швеции, России (преимущественно средняя полоса европейской части страны), Болгарии, Сербии, Черногории, Турции и других стран [75, 76, 177, 187]. Виды рода Лапчатка встречаются также на других материках: так, лапчатка прямая (*Potentilla recta* L.) является одним из агрессивных сорняков на территории Канады и Северной Америки [149, 153].

Лапчатка прямостоячая преимущественно произрастает в лесной и лесостепной зоне европейской части России, а также на Кавказе, на Урале и в прилегающих районах Западной Сибири [9, 12, 42, 43, 50, 56, 71, 74]. Распространена также на территории прилегающих к России стран – Беларуси, Украине и странах Прибалтики. Практически не встречается на

Дальнем Востоке, а также на территории Средней Азии и Восточной Сибири [9, 12, 42, 43, 50, 56, 71, 74, 95, 108, 131].

Основные места обитания данного вида – светлые леса (хвойные и смешанные), лесные поляны, опушки, вырубки, окраины болот, кустарниковые луга (суходольные или влажные и болотистые), пустоши, пастбища [12, 50, 74, 95, 108, 131]. Растение предпочитает кислые, бедные гумусом, увлажненные почвы, хорошо себя чувствует на торфяных болотах [9, 56, 71].

В качестве основных районов заготовки сырья лапчатки прямостоячей называют лесную зону средней полосы РФ, а также прилегающие страны – Беларусь, Украину, Литву [42, 43, 71].

Лапчатка белая произрастает на территории Средней Европы, в странах Балкан и отчасти в Южной Европе. *Potentilla alba* L. имеет ограниченный ареал на территории РФ [11, 55, 75, 76, 84, 133, 135]. В частности, растение встречается в центральных районах европейской части Российской Федерации (например, в таких областях, как Московская, Смоленская, Тульская, Воронежская, Самарская, Саратовская и других) и в Крыму, в связи с чем специалисты Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР) вводят ее в культуру [11, 55, 75, 76, 84, 133, 135]. Разрабатывается также метод биотехнологического получения сырья лапчатки белой [130].

Основные места обитания лапчатки белой – светлые лиственные леса и травянистые склоны преимущественно в черноземной полосе, к северу встречается реже. Растение предпочитает легкие песчаные почвы [55, 75, 76, 133].

Лапчатка прямая встречается в европейской части России в таких областях, как Калининградская, Московская, Ярославская, Ивановская, Смоленская, Воронежская, Пензенская, Самарская, Саратовская, Волгоградская и другие, а также произрастает на Кавказе, в Скандинавии, в Средней Европе, Польше, Турции и других странах [75, 76, 135, 177, 187].

Основные места обитания лапчатки прямой – луговые степи, заросли кустарников, пески и каменистые склоны, склоны в кустарниках и сухие леса (боры, дубравы) преимущественно в черноземной полосе, к северу встречается очень редко. Часто растет как сорное растение [75, 76, 135, 149].

Лапчатка серебристая произрастает в Восточной Европе, в европейской части России, на Кавказе, в Западной и Восточной Сибири [12, 71].

Основные места обитания – суходольные и лесные луга, поля, пастбища, склоны балок и речных долин, сухие лесные опушки и поляны, разреженные сосновые и смешанные леса, иногда как сорняк [12, 56, 71].

Лапчатка гусиная распространена в Восточной Европе, европейской части России, на Кавказе, в Сибири (ареал доходит вплоть до 64° с.ш.), на Дальнем Востоке, в Центральной Азии [12, 75, 76, 95, 138].

Растение предпочитает умеренно увлажненные, сырые открытые места. Основные места обитания – луга, болота, берега озер и рек, лесные поляны, пустыри и выгоны. Лапчатка гусиная также встречается вдоль дорог и у домов [12, 95, 138].

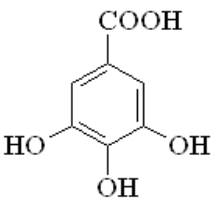
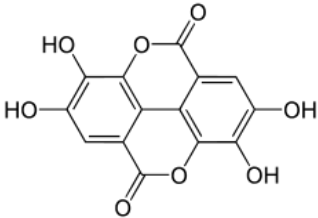
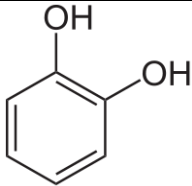
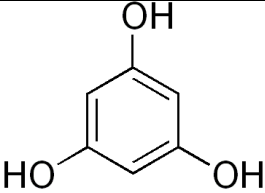
1.1.3. Современные данные о химическом составе

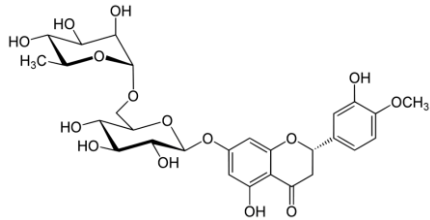
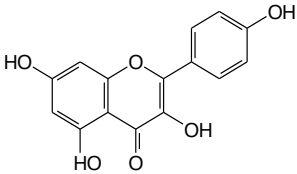
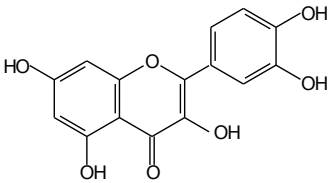
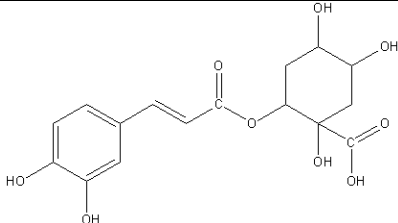
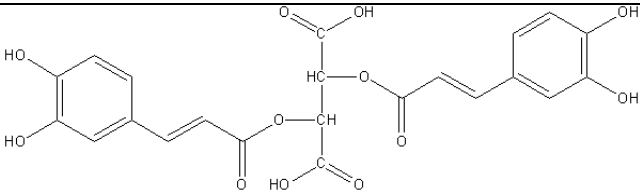
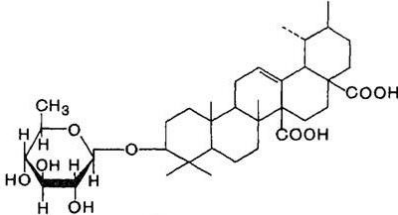
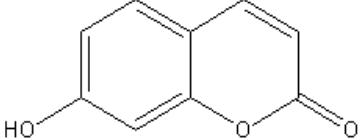
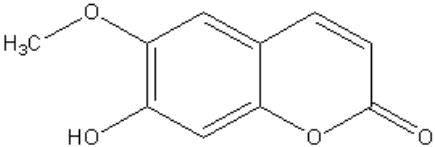
Подземные органы *лапчатки прямостоячей* содержат значительное количество дубильных веществ – до 30%, в основном, конденсированных [9, 12, 14, 23, 24, 42, 43, 50, 53, 65, 71, 74, 89, 102, 118, 131, 163, 184]. В свободном виде в сырье присутствуют галловая и эллаговая кислоты [14, 15, 71, 95, 184, 187].

Кроме того, в числе фенольных соединений в сырье присутствуют простые фенолы (пирокатехин, флороглюцин), флавоноиды (геспиридин, кемпферол, кверцетин, агримониин и др.), проантоцианидины и гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая кислота, цикориевая кислота и др.) [14, 15, 71, 166, 184, 187]. Дополнительно интерес представляют

тритерпеновые сапонины – торментозид (состоит из сапогенина торментола и 2 молекул глюкозы) и хиновая кислота (состоит из сапогенина хиновин и 1 молекулы хиновозы) [42, 43, 71, 74, 95, 131]. Также в подземных органах лапчатки прямостоячей содержатся полисахариды (до 26%, преобладающие моносахариды – глюкоза и арабиноза), флобафены, камеди, смолы [16, 42, 43, 71, 74, 89, 95, 131]. Отмечается также присутствие в сырье лапчатки прямостоячей кумарина, умбелиферона и скополетина, а также 31 минерального элемента [16, 54].

Таблица 2 – Химический состав подземных органов лапчатки прямостоячей [14-16, 42, 43, 54, 71, 74, 95, 131, 184, 187]

Название БАС	Структурная формула
Галловая кислота	
Эллаговая кислота	
Пирокатехин	
Флюроглюцин	

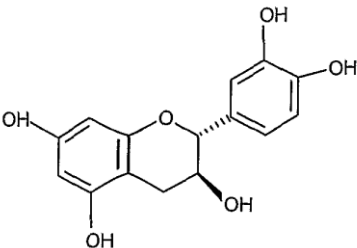
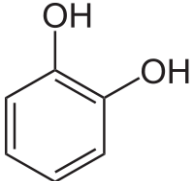
Гесперидин	
Кемпферол	
Кверцетин	
Хлорогеновая кислота	
Цикориевая кислота	
Хиновая кислота	
Умбелиферон	
Скополетин	

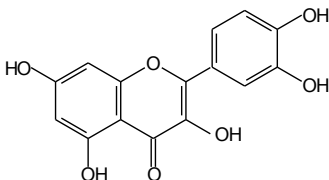
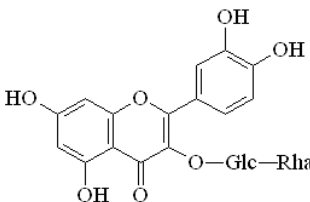
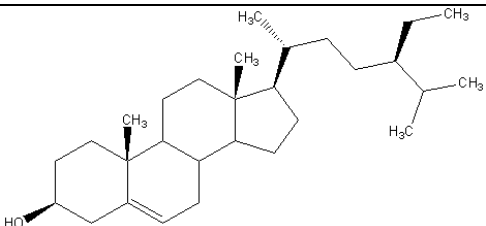
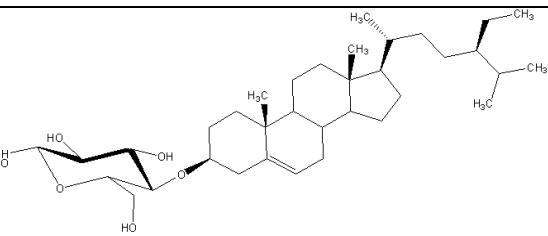
Надземная часть *лапчатки прямостоячей* также содержит дубильные вещества, также отмечается содержание флавоноидов (кемпферол,

кверцетин, изокверцитрин, нарциссин и др.), гидроксикоричных кислот (хлорогеновой, неохлорогеновой и др.), кумарины, флобафены, полисахариды, камедь, каротиноиды, β -ситостерина [14, 23, 24, 53, 54, 102, 115, 118, 131, 148, 184, 187, 189]. В траве лапчатки прямостоячей содержатся аминокислоты такие, как аргинин, глутаминовая кислота, глицин и другие [25]. Надземная часть растения содержит значительные количества витамина С (аскорбиновой кислоты), максимум содержания приходится на период полного цветения [14, 131, 184].

Подземные органы *лапчатки белой* содержат дубильные вещества – до 17% (максимальное количество определяется в фазу цветения), отмечается наличие катехина, пирокатехина и (-)-эпикатехина, флавоноидов (в частности, кверцетина, рутина), фенолкарбоновых кислот, сапонинов, иридоидов, фитостериновых структур (β -ситостерина, даукостерина), аминокислот, полисахаридов [63, 66, 84, 121, 141, 143, 151, 172, 187]. *Potentilla alba* L. является концентратором микроэлементов – например, Si, Zn, Mn и др. [10, 20, 66, 83].

Таблица 3 – Химический состав подземных органов лапчатки белой [66, 84, 121, 143, 187]

Название БАС	Структурная формула
Катехин	
Пирокатехин	

Кверцетин	
Рутин	
β -ситостерин	
β -ситостерин- β -D- глюкопиранозид (даукостерин)	

Для надземной части *лапчатки белой* установлено наличие дубильных веществ, флавоноидов, антоцианов, хлорогеновой кислоты, фенолкарбоновых кислот, сапонинов, жирных кислот (насыщенных, моновенасыщенных и полиненасыщенных), аскорбиновой кислоты, а также минеральных элементов [1, 63, 84, 121, 141, 143].

Информации о химическом составе *лапчатки прямой* в литературе ограниченное количество. Подземные органы лапчатки прямой содержат дубильные вещества (агримониин и эллаговую кислоту), флавоноиды (кемпферол, рутин, цинарозид, тилирозид, производные апигенина) [63, 189, 192].

Для надземной части лапчатки прямой отмечается высокое содержание фенольных соединений – дубильных веществ, фенолкарбоновых кислот, проантоцианидинов и флавоноидов (гиперозид, изокверцитрин, лютеолин,

др.), также описывается высокое содержание аскорбиновой кислоты [63, 148, 149, 177, 183].

Подземные органы *лапчатки серебристой* изучены недостаточно широко – известно, что в корневищах и корнях лапчатки серебристой содержатся дубильные вещества (до 15%) и флавоноиды [23, 24, 71].

Надземная часть *Potentilla argentea* L. изучена более подробно, для нее описаны дубильные вещества (до 10%), флавоноиды (кверцетин, кемпферол, гиперозид, цинарозид, рутин и др.), фенилпропаноиды (хлорогеновая, кумаровая и феруловая кислоты и др.), проантоцианидины, аскорбиновая кислота, тритерпеноиды (торментол) и эфирное масло [12, 23, 24, 51, 52, 71, 95, 104, 105, 119, 120, 137, 148, 187, 188, 190]. Также в траве лапчатки серебристой выявлены тилирозид, метилбревифолинкарбоксилат, умбеллиферон, скополетин, полисахариды (доминирующий моносахарид – галактоза), каротиноиды и β -ситостерин [115, 120, 187].

Для подземных органов *лапчатки гусиной* установлено содержание дубильных веществ (до 25%), сапонинов, торментозида, ансеринозида, β -ситостерина, даукостерина, аминокислот, аскорбиновой кислоты [12, 23-25, 129, 187, 196, 197].

В надземной части *Potentilla anserina* L. отмечается содержание следующих БАС – дубильных веществ (до 7,2%), флавоноидов (кверцетин, кемпферол, изорамнетин, астрагалин, изофлавоны – генистеин и др.), гидроксикоричных кислот (хлорогеновая, неохлорогеновая, феруловая, кофейная кислоты и др.), витамина С, полисахаридов (преобладающие компоненты – глюкоза и арабиноза), тритерпеновых сапонинов, аминов, аминокислот (аргинин, глутаминовая кислота, серин и др.), жирных кислот, умбеллиферона и скополетина [12, 23-25, 50, 71, 115, 129, 137, 167, 171, 173, 187, 190, 195]. Из травы лапчатки гусиной выделена 2-пирон-4,6-дикарбоновая кислота, присутствие которой зарегистрировано и для других видов рода Лапчатка [193].

1.1.4. Применение представителей рода *Potentilla* L. в медицине

Лапчатка прямостоячая используется в традиционной медицине в качестве вяжущего противовоспалительного средства [12, 71, 108, 114, 131, 146]. Данный эффект обусловлен высоким содержанием дубильных веществ в сырье, которые создают биологическую пленку, защищающую воспаленные ткани от внешних воздействий. Извлечения из корневищ лапчатки прямостоячей применяются в виде полосканий при воспалительных заболеваниях полости рта, глотки и гортани за счет антимикробной активности, внутрь при патологиях органов желудочно-кишечного тракта (в том числе, в качестве желчегонного средства, воспалительных заболеваниях кишечника и др.), а также наружно как вяжущее и при воспалительных процессах кожных покровов [12, 71, 108, 114, 131, 146, 155, 156, 163, 165, 182, 191]. Имеются упоминания об использовании подземных органов лапчатки прямостоячей в составе чаев, применяемых при менометроррагиях [155]. Имеются данные о нормализации функции печени после применения отвара лапчатки прямостоячей при хроническом гепатите и на начальной стадии цирроза, а также об ускорении выздоровления в случае вирусного гепатита [3, 4, 146]. Имеются данные клинического исследования влияния извлечения из подземной части *Potentilla erecta* L. на продолжительность ротавирусной диареи у детей, по результатам которого установлено, что применение лапчатки прямостоячей значительно сокращает продолжительность диареи [179]. Извлечения из надземной и подземной части лапчатки прямостоячей обладают антибактериальной активностью [180, 190]. Упоминается ингибирующая активность лапчатки прямостоячей в отношении ангиотензин-превращающего фермента (АПФ-I) [158]. *In vitro* для лапчатки прямостоячей помимо перечисленных известны следующие эффекты: антисекреторный, антиоксидантный, противовирусный (в отношении вируса герпеса), индукция синтеза интерферона у мышей и повышение секреции инсулина [187].

Лапчатка белая широко применяется в качестве средства для коррекции гипо- и гиперфункции щитовидной железы, ликвидации диффузных изменений в органе и устранения сопутствующих токсических явлений в организме [10, 59, 63, 90, 117, 141, 145, 181]. В ходе эксперимента было установлено, что применение препаратов лапчатки белой (в частности, сухого экстракта лапчатки белой и препарата «Тиреотон») положительно влияет на тиреоидный статус при экспериментальном гипотиреозе, повышает уровень гормонов щитовидной железы и способствует уменьшению когнитивно-эмоциональных расстройств у экспериментальных животных [5-8]. На территории Украины применяется фитопрепарат «Альба» (экстракт корня лапчатки белой) для лечения патологий щитовидной железы при ее нормальной и повышенной функции [132]. В Республике Беларусь разрабатываются таблетки на основе травы лапчатки белой [143]. В литературных источниках упоминается то, что использование отвара лапчатки белой в Белорусском Полесье вместо чая позволило уменьшить количество случаев эндемического зоба после Чернобыльской катастрофы по сравнению с другими регионами [181]. Также отмечают вяжущее, антисептическое, ранозаживляющее, гемостатическое и антиоксидантное действие, упоминается об использовании водного извлечения из подземных органов лапчатки белой в качестве антиспастического и анальгетического средства [63, 84, 172]. В экспериментах на мышах было установлено, что сухой экстракт лапчатки белой обладает иммуномодулирующим действием [136]. Кроме того, лапчатка белая оказывает стимулирующее влияние на ЦНС, данное действие подтверждалось сокращением гексеналового сна у крыс [84].

На данный момент **лапчатка прямая** не применяется в официальной медицине. Подземная часть растения применяется как вяжущее, закрепляющее и гемостатическое средство, высоко ценится эфирное масло [63]. Кроме того, данное растение является перспективным антибактериальным агентом. Так, водное извлечение из надземной части

лапчатки прямой обладает антимикробной активностью в отношении грамположительной микрофлоры, подавляет рост *Helicobacter pylori*, а также ингибирует рост кариогенных штаммов стрептококков [182, 183, 190]. Для метанольного экстракта из надземной части лапчатки прямой выявлено ингибирующее действие на редуктазу альдозы, что предотвращает повреждения, вызванные диабетом [187]. Имеются данные о применении надземной части лапчатки прямой в ветеринарии как средство для стимуляции аппетита и противодиарейное у жвачных животных [164].

Трава **лапчатки серебристой** входит в состав сбора по прописи М.Н. Здренко, считающегося противоопухолевым средством [12, 26, 56, 71]. Кроме того, в народной медицине растение применяется как вяжущее, антимикробное, противовоспалительное, желчегонное и кровоостанавливающее средство при ряде патологий органов желудочно-кишечного тракта, заболеваниях печени (усиливает ее детоксикационную функцию), острых респираторных заболеваниях и кожных проявлениях [12, 56, 95, 120]. Антимикробная активность для данного растения (в том числе, в отношении кариогенных штаммов микроорганизмов) подтверждена рядом исследований [182, 190]. Для лапчатки серебристой отмечается также гипотензивное действие [51, 114]. *In vitro* была установлена цитотоксическая активность двух компонентов, выделенных из травы лапчатки серебристой в отношении клеток карциномы молочной железы человека [185].

В народной медицине подземную часть **лапчатки гусиной** используют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся воспалительным процессом, диареей, кровотечениями, также трава лапчатки гусиной применяется как анальгезирующее (при заболеваниях почек и печени, болях в суставах, ревматизме, болезненных менструациях), спазмолитическое (влияет на тонус и перистальтику кишечника), вяжущее, ранозаживляющее (при гнойных ранах и язвах, также применяют в виде полосканий при воспалительных заболеваниях полости рта) и диуретическое средство [12, 81, 94, 95, 129, 155, 156, 161, 165]. Для травы известно также

противосудорожное и успокаивающее действие [95, 129]. Упоминается ингибирующая активность лапчатки гусиной в отношении ангиотензин-превращающего фермента (АПФ-I) [158]. Отмечается также противогинготный эффект, что объясняется содержанием аскорбиновой кислоты в сырье [129]. В некоторых странах лапчатка гусиная считается компонентом функционального питания и вводится, например, в состав хлеба [159].

Лапчатка гусиная применяется у женщин при дисменорее, в предменопаузальный период и менопаузу [94, 155, 158, 165].

Отмечается также антибактериальный эффект водных извлечений из травы лапчатки гусиной в отношении грамположительных бактерий, подавляет рост *Helicobacter pylori* [182]. Эфирное извлечение оказывает слабое антибактериальное действие в отношении некоторых штаммов - *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* и др. [78].

В эксперименте на крысах установлено, что спиртовой экстракт лапчатки гусиной способен защитить ткани миокарда в условиях острой ишемии и реперфузионного повреждения [174]. *In vitro* для лапчатки гусиной были установлены следующие эффекты – противовирусный (в отношении вируса герпеса, вируса гепатита В), антиоксидантный, нейропротекторный и спазмолитический. *In vivo* на мышах была изучена антиоксидантная активность и иммуномодулирующее действие [154, 173, 175, 187, 198, 199].

1.2. Стандартизация сырья и лекарственных препаратов лапчатки

На сегодняшний день только корневища лапчатки прямостоячей (*Potentilla erecta* L.) в качестве официального лекарственного растительного сырья включены в следующие фармакопеи: Европейскую фармакопею, Немецкую фармакопею, Британскую фармакопею, Французскую фармакопею, а также в Государственную фармакопею РФ XIII издания [34, 62, 152]. Кроме того, ранее подземные органы лапчатки прямостоячей и

настойка лапчатки прямостоячей были включены в ГФ СССР VIII и IX издания [37, 38]. Также в СССР существовали стандарты, регламентирующие требования к сырью [39, 40], в частности, для корневищ лапчатки прямостоячей, предназначенных для использования в качестве лекарственно-технического и пищевого сырья [28] и в качестве лекарственного сырья [29].

Другие изучаемые виды (лапчатка белая, лапчатка прямая) не являются официальными на территории России и применяются только в народной медицине. Травя лапчатки серебристой включена в Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации 2008 года [62].

Для анализа имеющихся подходов к стандартизации сырья и препаратов лапчатки прямостоячей, а также предлагаемых методик анализа других видов рода *Potentilla* L. приведен данный фрагмент обзора литературы.

1.2.1. Качественные реакции

Для качественного анализа корневищ лапчатки прямостоячей ГФ РФ XIII издания предлагает два варианта: тонкослойную хроматографию с использованием стандартного образца галловой кислоты (обнаружение зон коричневого или сине-коричневого цвета), а также качественную реакцию с железом (III) аммония сульфатом – образование зелено-черного окрашивания, которое переходит в черно-синее [34]. Использование галловой кислоты в качестве стандарта, на наш взгляд, не позволяет в достаточной мере решить вопрос качественного анализа сырья лапчатки прямостоячей в связи с тем, что данное вещество лежит в основе гидролизуемых дубильных веществ, тогда как для корневищ *Potentilla erecta* L. характерно содержание дубильных веществ конденсированной природы.

Подход Европейской фармакопеи для анализа сырья лапчатки прямостоячей и настойки лапчатки прямостоячей предполагает метод

тонкослойной хроматографии с раствором катехина в качестве вещества-свидетеля – наблюдается красновато-коричневая зона на уровне стандартного образца катехина [152].

Для травы лапчатки белой предлагается метод тонкослойной хроматографии в системе растворителей бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) с использованием в качестве вещества сравнения рутина (обнаруживается флуоресцирующая зона желто-зеленого цвета на уровне стандартного образца рутина) [144].

Качественный анализ травы лапчатки серебристой предлагается осуществлять с использованием метода хроматографии в тонком слое сорбента в системе растворителей *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2), в ходе которого детектируются зоны адсорбции со значениями R_f , соответствующими рутину, кверцетину и цинарозиду [119, 120].

Рядом польских ученых (Bazyłko A., Tomczyk A., Flazinska A., Legas A.) предлагается использование высокоэффективной тонкослойной хроматографии для установления хроматографических характеристик фенольных соединений надземных частей некоторых представителей рода *Potentilla* L. [148].

1.2.2. Количественное определение

Для целей количественного определения дубильных веществ Государственная фармакопея РФ XIII издания предлагает два метода – титриметрический (перманганатометрия) и спектрофотометрический (в пересчете на пирогаллол) [32]. При этом фармакопейная статья «Лапчатки прямостоячей корневища» указывает метод 1 (перманганатометрия) для оценки количественного содержания дубильных веществ в сырье [34]. Следует отметить, что метод перманганатометрии обычно дает завышенные результаты в связи с тем, что в комплексе с дубильными веществами определяются другие окисляемые фенольные соединения [45, 47, 103].

Европейская фармакопея для анализа сырья и препаратов, содержащих дубильные вещества, предлагает спектрофотометрический метод в пересчете на пирогаллол [152]. Данный метод также обладает рядом недостатков. Во-первых, методика предполагает использование достаточно специфических и не всегда доступных реактивов – кожного порошка и фосфорномолибденового реактива. Кроме того, пирогаллол, в пересчете на который представляются результаты в данном методе, относится к группе гидролизуемых дубильных веществ, тогда как подземные органы лапчатки прямостоячей преимущественно содержат дубильные вещества конденсированной природы.

Количественное содержание флавоноидов в подземных и надземных органах представителей рода Лапчатка по литературным данным определяли методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин [63]. Для анализа травы и таблеток лапчатки белой по литературным данным также предлагается спектрофотометрический метод определения суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) [143, 144]. Для оценки количественного содержания БАС в траве лапчатки серебристой предлагается метод дифференциальной спектрофотометрии для определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на цинарозид [119, 120].

Кроме спектрометрических методов предлагаются и другие аппаратные методы. Так, польскими учеными был разработан метод денситометрии для количественного определения флавоноидов в надземных органах некоторых видов рода Лапчатка [186]. Для количественного анализа ряда представителей рода *Potentilla* L. предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [160, 171].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. В ходе анализа литературных данных были выявлены перспективные с точки зрения применения в медицинской практике и создания новых лекарственных препаратов представители рода Лапчатка – лапчатка белая и лапчатка прямая.
2. Для изучаемых видов имеется достаточная сырьевая база на территории Российской Федерации и отмечается определенный спектр фармакологической активности, который обусловлен химическим составом сырья: дубильные вещества, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты и др.
3. Методики, применяемые для оценки качества сырья «Корневища лапчатки прямостоячей», не лишены недостатков, что объясняет необходимость исследования с целью разработки более селективных методик для новых видов рода *Potentilla* L.
4. В Российской Федерации отсутствует нормативная документация на данные виды ЛРС, что делает невозможным их применение в официальной медицинской практике. Разработка нормативной документации создает предпосылки для создания новых импортзамещающих лекарственных средств, а также для решения вопроса комплексной переработки такого сорного растения, как лапчатка прямая.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами диссертационного исследования являлись образцы сырья – корневищ с корнями лапчатки белой (*Potentilla alba* L.), корневищ с корнями лапчатки прямой (*Potentilla recta* L.) и корневищ с корнями лапчатки серебристой (*Potentilla argentea* L.), заготовленные в период с 2013 по 2016 гг., а также промышленные образцы сырья изучаемого рода – корневищ лапчатки прямостоячей (*Potentilla erecta* L.) и корни лапчатки белой.

Образцы изученного ЛРС:

- корневища и корни лапчатки белой, заготовленные на участке Средне-волжского филиала ФГБНУ ВИЛАР в 2012-2015 гг.;
- корневища и корни лапчатки прямой, собранные в Ботаническом саду г. Самара в 2013-2015 гг.;
- корневища и корни лапчатки серебристой, заготовленные в Алексеевском и Красноярском районах Самарской области в 2013-2014 гг.;
- корневища лапчатки прямостоячей, производитель «Красногорсклексредства», «Лекрасэт»;
- корни лапчатки белой, производитель «Хорст», «Лекарсэт».

В рамках диссертационной изучались следующие лекарственные препараты и субстанции:

1. Настойка корневищ лапчатки прямостоячей

Состав: Корневищ лапчатки прямостоячей 200,0 г

Спирта этилового 70% до получения 1 л настойки

2. Настойка корневищ лапчатки прямостоячей

Состав: Корневищ лапчатки прямостоячей 200,0 г

Спирта этилового 40% до получения 1 л настойки

3. Настойка корневищ и корней лапчатки белой

Состав: Корневищ и корней лапчатки белой 200,0 г

Спирта этилового 70% до получения 1 л настойки

4. Настойка корневищ и корней лапчатки белой

Состав: Корневищ и корней лапчатки белой 200,0 г

Спирта этилового 40% до получения 1 л настойки

5. Настойка корневищ и корней лапчатки прямой

Состав: Корневищ и корней лапчатки прямой 200,0 г

Спирта этилового 70% до получения 1 л настойки

6. Настойка корневищ и корней лапчатки прямой

Состав: Корневищ и корней лапчатки прямой 200,0 г

Спирта этилового 40% до получения 1 л настойки

7. Отвар корневищ лапчатки прямостоячей

Состав: Корневищ лапчатки прямостоячей 100,0 г

Воды очищенной до получения 1 л отвара

8. Отвар корневищ и корней лапчатки белой

Состав: Корневищ и корней лапчатки белой 100,0 г

Воды очищенной до получения 1 л отвара

9. Отвар корневищ и корней лапчатки прямой

Состав: Корневищ и корней лапчатки прямой 100,0 г

Воды очищенной до получения 1 л отвара

10. Сироп корневищ лапчатки прямостоячей на основе сорбита

Состав: Сиропа сорбитного 64% 95,0 г

Настойки корневищ
лапчатки прямостоячей
на 40% спирте этиловом 5,0 г

11. Сироп корневищ и корней лапчатки белой на основе сорбита

Состав: Сорбита 62,0 г

Отвара из корневищ и корней
лапчатки белой 1:5 38,0 г

12. Сорбит пищевой — порошок белого цвета без запаха.

Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде [30, 32, 60, 61].

13. Индивидуальные вещества: катехин, галловая кислота, рутин, цинарозид, β -ситостерин, 3-О- β -D-глюкопиранозид катехина, 7-О- β -D-глюкопиранозид катехина, даукостерин, торментоловая кислота.

В ходе диссертационного исследования была использована приборная база, перечисленная ниже:

1. Весы аналитические марки «Mettler Toledo XS 204»; весы Мора ВА-4М; весы для сыпучих материалов технические ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20; весы электронные марки САРТО ГОСМ ЛВ 210-А.
2. Спектрометр модели «Bruker AM-300».
3. Масс-спектрометр модели «Kratos MS-30».
4. Спектрофотометр модели «Specord 40» (Analytik Jena).
5. Спектрофотометр модели «СФ-2000» (ОКБ Спектр).
6. Ареометры общего назначения ИСП.АІ.
7. Термостат суховоздушный «ТС-1/80».
8. Пластинки хроматографические «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ». И «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ».
9. Системы для хроматографирования (смеси растворителей в различных соотношениях: бутиловый спирт-ледяная уксусная кислота-вода, хлороформ-этанол-вода, хлороформ-этанол).
10. Микроскопы цифровые «Motic» DM-111 и «Motic» DM-39C-N9GO-A.
11. Набор сит с различными диаметрами отверстий.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа

В рамках диссертационной работы исследовались свежие и высушенные подземные органы лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой. Сушка сырья осуществлялась естественным путём без дополнительного нагрева. Пробоподготовку высушенных подземных органов осуществляли в соответствии с требованиями Государственных фармакопей

СССР XI издания и РФ XIII издания для корней, корневищ, клубней, луковиц, клубнелуковиц [33, 35, 100, 101, 107]. Свежее сырье для анализа фиксировалось в смеси следующего состава: спирт этиловый, глицерин и вода в соотношении 1:1:1.

Морфолого-анатомический анализ сырья осуществляли по общей фармакопейной методике на корни, корневища, клубни, луковицы, клубнелуковицы ГФ СССР XI издания и ГФ РФ XIII издания [33, 35, 100, 101]. Образцы сырья рассматривали невооруженным глазом и с использованием лупы (x10).

Размеры исследуемых объектов определяли, используя линейки и программное обеспечение цифрового микроскопа. Цвет объектов оценивали при дневном освещении визуально; запах – при разламывании фрагментов сырья; вкус – пробуя водное извлечение измельченного сырья.

Микроскопировали в проходящем свете на белом поле, используя микроскопы марки Motic: модели DM-111 и DM-39C-N9GO-A.

Гистохимические реакции проводили по описанным ниже методикам [33, 35, 49, 87, 100, 101].

1. Гистохимическая реакция для обнаружения кутинизированной поверхности эпидермы. На микропрепарат капали раствор Судан III, накрывали предметным стеклом и микроскопировали. Кутинизированные оболочки клеток эпидермиса окрашивались в розовый цвет [33, 35, 49, 71].

Приготовление раствора Судан III. 0,3 г Судана III растворяли в 100 мл спирта этилового 70%, нагревали до закипания, кипятили 3-5 минут, охлаждали, фильтровали и доводили объем до метки спиртом этиловым 70% [33]. В ГФ СССР XI издания приведена следующая методика: 0,01 г Судана III растворяли в 5 мл спирта этилового 95% и прибавляли 5 мл глицерина ректифицированного [35].

2. Гистохимическая реакция для обнаружения одревесневших оболочек клеток. На микропрепарат капали раствор сернокислого анилина, накрывали покровным стеклом и микроскопировали. Одревесневшие и

лигнифицированные оболочки клеток окрашивались в желтый цвет [35, 49, 71].

Приготовление раствора сернокислого анилина. 2,0 г сернокислого анилина растворяли в смеси 4 мл ледяной уксусной кислоты и 194 мл спирта этилового 50% [71].

3. Гистохимическая реакция для обнаружения крахмалоносных клеток. На микропрепарат капали раствор Люголя, накрывали предметным стеклом и микроскопировали. Крахмальные включения окрашивались в сине-фиолетовый цвет [33, 35, 49].

Приготовление раствора Люголя. 1 г йода и 2 г калия йодида растворяли в 17 мл воды, хорошо перемешивали [33]. В ГФ СССР XI издания приведена следующая методика: 0,5 г йода и 1 г йодида калия растворяли в небольшом количестве воды и разбавляли водой до 100 мл. Перед применением данный раствор разводили водой в соотношении 1:4 [35].

2.2.2. Физические методы анализа

В соответствии с методикой ГФ РФ XII и XIII издания оценивали плотность полученных настоек и сиропов, используя набор ареометров общего назначения [31, 33].

Показатель преломления изучаемых сиропов определяли с использованием рефрактометра RL-3 в соответствии с методикой ГФ РФ XII издания [31].

Величину pH сиропов оценивали с использованием pH-метра «MP-225» в соответствии с методикой ГФ РФ XII и XIII издания [31, 33].

2.2.3. Химические методы анализа

В ходе предварительного анализа химического состава сырья были проведены пробирочные реакции на основные группы биологически активных соединений:

Реакции осаждения с растворами желатина, алкалоидов и солей тяжелых металлов использовались для доказательства наличия дубильных веществ в сырье. В результате реакций образовывались осадки или муть [71].

Реакция с раствором железоммониевых квасцов использовалась для обнаружения в изучаемом сырье гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ [71].

Реакция с раствором железа (III) хлорида позволяет выявлять соединения, имеющие незанятые фенольные ОН-группы. После добавления 1% раствора железа (III) хлорида спиртового наблюдается коричневое окрашивание (если присутствуют 3-ОН-группы), зеленое окрашивание (присутствие ОН-группа в положении 5) или синее окрашивание (присутствуют 3¹,4¹,5¹-ОН-группы) [71].

Цианидиновая реакция (проба Shinoda) применялась для выявления флавоноидов в изучаемых извлечениях. К 1-2 мл извлечений добавляли 5 капель соляной кислоты концентрированной и 5-10 мг цинка, что приводило к образованию красно-малиновой окраски [67, 71].

Цианидиновая реакция с модификацией по Брианту является следующим этапом цианидиновой реакции, описанной выше. Раствор, полученный в ходе первой реакции, разводили водой очищенной (1:1) и прибавляли *n*-бутанол. Присутствие агликонов флавоноидов обнаруживается в случае перехода красно-малинового окрашивания в органический слой. Присутствие гликозидов обнаруживается по распределению окраски в нижнем неорганическом слое [71].

Реакция с алюминия (III) хлоридом использовалась для обнаружения флавоноидов. К 1-2 мл исследуемого извлечения прибавляли 1-2 мл 3% раствора алюминия (III) хлорида спиртового. В случае присутствия флавоноидов появляется желтое окрашивание, а также желто-зеленая флуоресценция при $\lambda = 366$ нм [71].

Реакция щелочным раствором диазобензолсульфокислоты используется для обнаружения свободных ароматических ОН-группы в

соединениях. К 1-2 мл извлечения прибавляли 1-2 капли раствора диазобензолсульфокислоты (ДСК). Наблюдалось окрашивание раствора в желтоватый цвет [71].

Реакция Сальковского позволяет обнаружить сапонины и стерины. Сухой остаток растирают с небольшим количеством хлороформа и прибавляют серную кислоту концентрированную. При этом проявляется окраска, цвет которой варьирует от желтой до красной [67, 71].

Реакция Либермана-Бурхарда позволяет обнаружить стероидный цикл. К 1-2 мг вещества добавляют 1 мл смеси концентрированной серной кислоты и уксусного ангидрида (50:1). Окраска от красно-фиолетовой до синей свидетельствует о стериновой природе вещества [18, 67, 71].

2.2.4. Хроматографические методы анализа

1. Тонкослойная хроматография (ТСХ) [32, 71, 111, 139]

Метод хроматографии в тонком слое сорбента использовался для изучения извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка, а также в ходе колоночной хроматографии.

Использовались следующие хроматографические пластинки: «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». До проведения хроматографического исследования удаляли влагу из сорбента, предварительно помещая пластинки в термостат при температуре 100-105°C.

В ходе исследования апробировались следующие системы растворителей: бутиловый спирт – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2), хлороформ – спирт этиловый 96% в различных соотношениях, хлороформ – спирт этиловый 96% - вода (26:16:3).

Образцы наносили капилляром на обозначенную линию старта на пластинке, после этого пластинку погружали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами системы растворителей в течение 24 часов. Хроматографирование осуществляли восходящим способом. Анализ считали завершенным, когда фронт растворителя достигал 7-8 см.

После извлечения из системы хроматограммы высушивали и оценивали визуально при дневном свете. Дополнительно пластинки просматривали в УФ-свете при 254 и 366 нм, затем обрабатывали щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, раствором хлорида железа (III), 20% раствором серной кислотой.

2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография [71, 111]

Указанным методом был изучен химический состав водно-спиртового извлечения из корневищ и корней лапчатки белой. Для проведения колоночной хроматографии использовался сорбент – силикагель КСКГ измельченный (фракция 0,04-0,10 мм, ГОСТ 3956-76, производитель: Sorbis Group). Применялись следующие элюенты: хлороформ, спирт этиловый 96%, смеси спирта этилового и хлороформа в различных соотношениях и вода очищенная.

Для дальнейшей очистки фракций, полученных в ходе колоночной хроматографии и содержащих отдельные БАС подземной части лапчатки белой, использовались следующие сорбенты: силикагель указанной марки, полиамид для колоночной хроматографии (производитель Woelm Pharma, Германия) и сефадекс (марка LH-20).

2.2.5. Физико-химические методы анализа

1. Спектрофотометрия [32, 71-73]

Спектрофотометрический метод применялся для определения содержания соединений фенольной и стеринавой природы в извлечениях из подземных органов представителей рода *Potentilla* L., а также для оценки содержания БАС в препаратах на их основе. Также метод спектрофотометрии был использован для анализа индивидуальных веществ, выделенных из подземной части лапчатки белой. Анализ проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) и спектрофотометре «СФ-2000» (ОКБ Спектр) при длинах волн в диапазоне 190-600 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Результаты спектрофотометрического определения обрабатывали, используя программу «WinAspect Excel».

Предварительное фитохимическое исследование сырья осуществляли с использованием методик, описанных ниже.

Методика определения суммы дубильных веществ в пересчете на танин (метод I) [33].

Около 2 г (точная навеска) измельченного лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 30 минут при периодическом перемешивании. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 250 мл так, чтобы частицы сырья/препарата не попали в колбу, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 25,0 мл полученного водного извлечения помещают в коническую колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании калия перманганата раствором 0,02 М до золотисто-желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт: в коническую колбу вместимостью 1000 мл помещают 525 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании калия перманганата раствором 0,02 М до золотисто-желтого окрашивания.

1 мл калия перманганата раствора 0,02 М соответствует 0,004157 г дубильных веществ в пересчете на танин.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \times 0,004157 \times 250 \times 100 \times 100}{a \times 25 \times (100 - W)},$$

где V – объем калия перманганата раствора 0,02 М, израсходованного на титрование водного извлечения, мл; V_1 – объем калия перманганата раствора 0,02 М, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл калия перманганата раствора 0,02 М (в пересчете на танин), г; a – навеска сырья или лекарственного растительного препарата, г; W – влажность лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, %; 250 – общий объем водного извлечения, мл; 25 – объем водного извлечения, взятого для титрования, мл [33].

Примечание. Приготовление раствора индигосульфокислоты. 1 г индигокармина растворяют в 25 мл серной кислоты концентрированной, затем прибавляют дополнительно 25 мл серной кислоты концентрированной и разбавляют водой до 1000 мл, осторожно вливая полученный раствор в воду, в мерной колбе вместимостью 1000 мл, перемешивают [33].

Методика определения дубильных веществ в пересчете на танин (прямая спектрофотометрия) [80, 103].

Около 0,8 г (точная навеска) измельченного до размера частиц 2 мм сырья заливали 100 мл воды и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут с последующим 30-минутным отстаиванием при комнатной температуре. Полученное извлечение фильтровали через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 100 мл, доводили водой до метки.

5 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки спиртом этиловым 70%, 2,5 мл полученного разведения помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70%. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны от 274,5 до 277,5 нм (в зависимости от исходного растительного сырья) относительно спирта этилового 70%. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца танина.

Примечание. Приготовление раствора стандартного образца танина. Около 0,0025 г (точная навеска) стандартного образца танина, высушенного до постоянной массы при температуре 100-105°C, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки спиртом этиловым 70%, 2,5 мл полученного разведения помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 70%.

Суммарное содержание дубильных веществ в пересчете на воздушно-сухое сырье (X_4 , %) определяли по формуле:

$$X = \frac{D_x \times M_{cm} \times 2000}{D_{cm} \times M_x},$$

где M_{cm} – масса танина, г; M_x – масса сырья, г; D_{cm} – оптическая плотность раствора СО танина; D_x – оптическая плотность исследуемого раствора.

Методика определения дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту (прямая спектрофотометрия) [98].

Около 2,0 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят 30 минут с обратным холодильником при периодическом перемешивании. Охлаждают до комнатной температуры, доводят водой до 250 мл, процеживают через вату так, чтобы частицы сырья не попали в водное извлечение. Первые 50 мл фильтрата отбрасывают.

1 мл водного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой до метки (раствор 1). Измеряют оптическую плотность раствора 1 при длине волны 277 нм. В качестве сравнения используют воду.

30 мл водного извлечения помещают в мерную емкость вместимостью 50 мл, добавляют 7 мл реактива осаждения (1% раствор коллагена в 1% уксусной кислоте), взбалтывают 60 минут, отстаивают, фильтруют. 1 мл полученного фильтрата переносят в колбу вместимостью 50 мл, доводят водой до метки (раствор 2). Измеряют оптическую плотность раствора 2 при длине волны 277 нм. В качестве сравнения используют воду.

Суммарное содержание дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту определяется как содержание дубильных веществ в растворе 1.

$$X_a = \frac{D_1 \times 250 \times 50 \times 100}{m_{нав} \times V_a \times 508 \times (100 - W)},$$

где X_a – содержание суммы дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту, %; D_1 – оптическая плотность раствора 1; $m_{нав}$ – масса навески сырья, г; V_a – объем аликвотной пробы, мл; 250 – общий объем извлечения, мл; 50 – объем колбы, мл; 508 – удельный показатель поглощения галловой кислоты (оптическая плотность 1% раствора галловой кислоты 1 мг/мл); W – влажность сырья, %.

Содержание дубильных веществ, осаждаемых раствором осаждения, в пересчете на галловую кислоту определяется как разница между содержанием дубильных веществ в растворах 1 и 2.

$$X = \frac{(D_1 - D_2) \times 250 \times 50 \times 100}{m_{нав} \times V_a \times 508 \times (100 - W)},$$

где X – содержание осаждаемых дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту, %; D_1 – оптическая плотность раствора 1; D_2 – оптическая плотность раствора 2; $m_{нав}$ – масса навески сырья, г; V_a – объем аликвотной пробы, мл; 250 – общий объем извлечения, мл; 50 – объем колбы, мл; 508 – удельный показатель поглощения галловой кислоты (оптическая плотность 1% раствора галловой кислоты 1 мг/мл); W – влажность сырья, %.

Методика определения дубильных веществ в пересчете на катехин (прямая спектрофотометрия) [91, 106].

Около 1,0000 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой вместимостью 200 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 50%. Колбу закрывают, взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г, затем присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания растворителя. Колбу с извлечением охлаждают до комнатной температуры,

закрывают пробкой, взвешивают и доводят массу колбы до первоначальной спиртом этиловым 50%, перемешивают. Извлечение фильтруют через складчатый бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

0,5 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 10 мл спирта этилового 50% подкисленного, перемешивают и объем раствора доводят до метки тем же растворителем (раствор А). Оптическую плотность раствора А измеряют на спектрофотометре при длине волны 279 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 50% подкисленный.

Содержание суммы полифенольных соединений в пересчете на (±)-катехин (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{144 \times m \times 0,5 \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – навеска сырья в граммах; 144 – удельный показатель поглощения (±)-катехина при 279 нм в спирте этиловом 50% подкисленном; W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Методика определения стеринов в сырье [22, 88, 92, 96].

Около 1 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящего сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, добавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем закрывают той же пробкой, остужают до комнатной температуры. После чего колбу снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 1 мл полученного извлечения помещают в градуированную пробирку на 10 мл, добавляют по каплям 4 мл серной

кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане при температуре 70°C в течение 1 часа (термостатирование). Затем содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и объем раствора доводят концентрированной серной кислотой до метки (раствор А).

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 310 нм (для β -ситостерина).

Приготовление раствора β -ситостерина. Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца β -ситостерина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл концентрированной серной кислоты, нагревают в водяной бане при температуре 70°C в течение 1 часа, охлаждают, доводят объем раствора до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят до метки концентрированной серной кислотой и перемешивают.

Измерение оптической плотности проводят сразу после приготовления раствора при аналитической длине волны 310 нм.

Содержание суммы стеринов в сырье в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье проводят по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 4 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times (100 - W)} ,$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора стандартного образца; m – точная навеска сырья, г; m₀ – точная навеска β -ситостерина, г; W – влажность сырья, %.

2. ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия.

Масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра «Kratos MS-30». Масс-спектрометрия основана на измерении массы ионов, идентификация которых осуществляется по положению линии на фотопластинке, которое фиксируют, измеряя расстояние между линиями с известной массой и анализируемой линией [18, 32].

ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C спектры получали на приборе «Bruker AM 300» (300 МГц). Присутствие в структуре молекулы определенных группировок определяют по табличным значениям или по данным предварительной калибровки. Число ядер устанавливают по площади пиков [18, 32].

2.2.6. Технологические методы анализа

Настойки из подземных органов представителей рода *Potentilla* L. получали с использованием методов модифицированной дробной мацерации и перколяции. Извлечения получали на 40% и 70% спирте этиловом в соотношении «сырье-извлечение» 1:5 [33, 97, 112, 134].

Получение настойки из подземных органов лапчатки методом модифицированной дробной мацерации [97, 112]:

День 1. В три термостойкие колбы загружали по 1 части корневищ и корней лапчатки, измельченных до размера частиц 3 мм. В колбу 1 добавляли 8 объемов спирта соответствующей концентрации в колбу 2 – 3 объема экстрагента соответствующей концентрации для намачивания. Колбы закрывали, оставляли на 24 часа.

День 2. Полученное извлечение из колбы 1 переливали в колбу 2. После этого в первую колбу наливали 5 объемов спирта этилового 40% или 70%. В колбу 3 добавляли 3 объема экстрагента соответствующей концентрации на намачивание. Колбы закрывали, оставляли на 24 часа.

День 3. Извлечение из колбы 2 переливали в колбу 3, извлечение из колбы 1 – во вторую. В колбу 1 заливали 5 объемов 40% или 70% этилового спирта. Колбы закрывали, оставляли на 24 часа.

День 4. Продукт из колбы 3 собирали в приемник, а затем в эту же колбу переносили извлечение из колбы 2. Содержимое колбы 1 тридцать минут нагревали на кипящей водяной бане, после чего охлаждали и переносили полученное извлечение в колбу 2. Колбы 2 и 3 закрывали и оставляли на 24 часа. Колбу 1 разгружали.

День 5. Продукт из колбы 3 собирали в приемник. Содержимое колбы 2 тридцать минут нагревали на кипящей водяной бане, после чего охлаждали и переносили полученное извлечение в колбу 3. Третью колбу укупоривали и оставляли на 24 часа. Колбу 2 разгружали.

День 6. Извлечение из колбы 3 тридцать минут нагревали на кипящей водяной бане, после чего охлаждали и переносили полученный продукт в приемник. Разгружали колбу 3.

Готовое извлечение перемешивали и выдерживали при температуре не выше 10°C 48 часов. Затем выпавший осадок отфильтровывали, готовый продукт фасовали во флаконы темного стекла. Оформляли этикетку для флаконов.

Получение настойки из подземных органов лапчатки методом перколяции [33, 85, 134]:

Из 210,0 г корневищ и корней лапчатки было получено 1050 мл настойки. Извлечение получали по описанной ниже схеме.

День 1. 210,0 г корневищ и корней лапчатки, измельченных до размера частиц 3 мм, заливали 630 мл спирта этилового 40% или 70% для намачивания и набухания сырья. Оставляли на 24 часа.

День 2. В перколятор загружали набухшее сырье и до «зеркала» заливали спиртом этиловым необходимой концентрации. Перколировали спиртом этиловым 40% или 70%. Скорость перколяции составляла около 1/24 перколятора/час. При этом в перколятор непрерывно с той же скоростью подавали чистый экстрагент. Перколировали до получения 5 объемов настойки из 1 весовой части сырья. Отработанное сырье из перколятора разгружали.

Извлечение выдерживали для отстаивания при температуре 8-10°C в течение 48 часов. Готовый продукт фильтровали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Приготовление отвара из подземных органов представителей рода Лапчатка [33]:

Измельченное растительное сырье помещали в инфундирку, заранее нагретую на водяной бане в течение 15 минут, заливали водой очищенной комнатной температуры в количестве с учетом коэффициента водопоглощения для корней и корневищ, закрывали крышкой и настаивали на кипящей водяной бане. После снятия с водяной бани отвар процеживали без стадии охлаждения для того, чтобы избежать осаждения дубильных веществ.

Вкусовой сорбитный сироп лапчатки прямостоячей получали по классической методике [33, 61, 85].

Приготовление базового сорбитного сиропа [61, 85, 134]:

Сорбит помещали в термостойкую колбу и добавляли небольшое количество воды. Затем добавляли оставшееся количество воды до соотношения сорбит-вода 64:36 и нагревали до 60-70°C, перемешивая до растворения сорбита. Затем сироп доводили до кипения, убирали образующуюся пену, после чего еще раз доводили до кипения. В случае, если образование пены после этого не наблюдалось, горячий сироп фильтровали и разливали в сухие стерильные флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Полученный сорбитный сироп использовали для получения лекарственного препарата – сиропа лапчатки прямостоячей путем введения в него при перемешивании настойки лапчатки прямостоячей [33, 60, 85, 134].

Лапчатки прямостоячей сироп представляет собой опалесцирующую жидкость красноватого цвета с приятными органолептическими характеристиками.

Сорбитный сироп лапчатки белой получали по методике, приведенной ниже.

Приготовление сиропа лапчатки белой [33, 85, 134, 140]:

Получали отвар из корневищ и корней лапчатки белой в соотношении «сырье–извлечение» 1:5. Фильтровали и при необходимости доводили полученный объем до требуемого объема извлечения.

Полученное извлечение использовали вместо воды очищенной для получения сиропов по стандартной технологии. Сорбит смачивали небольшим количеством водного извлечения, затем добавляли оставшееся извлечение и растворяли при нагревании. После приготовления вкусового сиропа его охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и фасовали в стерильные сухие флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Полученный сироп представляет собой опалесцирующую жидкость светло-оранжевого цвета с приятными органолептическими характеристиками.

2.2.7. Фармакологические методы анализа

В рамках диссертационной работы проводилось исследование острой токсичности водных и водно-спиртовых извлечений из корневищ лапчатки прямостоячей и корневищ и корней лапчатки белой и лапчатки прямой [77]. Эксперимент проводился на кафедре фармакологии им. ЗДН РФ проф. А.А. Лебедева Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ). Исследования осуществлялись в ходе 2 серий опытов на 80 белых беспородных крысах обоего пола массой 200-220 г, находившихся в условиях вивария на стандартном рационе при свободном доступе к воде.

В серии исследований с водными извлечениями первая группа животных (водный контроль) получала однократно внутрижелудочно 3% водную нагрузку (в объеме 30 мл/кг), вторая группа – отвар лапчатки прямостоячей (1:10), третья группа – отвар лапчатки белой (1:10), а четвертая группа – отвар лапчатки прямой (1:10). Все препараты вводились в дозе 30 мл/кг. Во второй серии экспериментов, с водно-спиртовыми извлечениями, первая группа животных (водно-спиртовый контроль) получала однократно внутрижелудочно 40% этанол, вторая группа – настойку лапчатки прямостоячей (на 40% этаноле), третья группа – настойку лапчатки белой (на 40% этаноле), а четвертая группа – настойку лапчатки прямой (на 40% этаноле). Водно-спиртовые извлечения вводились в дозе 7,5 мл/кг веса

животного на фоне 3% водной нагрузки при помощи специального внутрижелудочного зонда [99].

В первый день животные находились под непрерывным наблюдением, общая длительность одного эксперимента составила 14 дней.

2.2.8. Микробиологические методы анализа

В рамках работы проводился скрининговый анализ антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений (на 40% и 70% этиловом спирте) из корневищ лапчатки прямостоячей, корневищ и корней лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой. В качестве контроля использовались экстрагенты – вода очищенная, спирт этиловый 40% и спирт этиловый 70%. Определение минимальной ингибирующей концентрации осуществляли с использованием метода двойных серийных разведений в бульоне (микрометод) в соответствии с МУ 4.2.1890-04. Учет результатов осуществляли визуально, сравнивая рост микроорганизма в присутствии препарата с ростом культуры в ячейке без него. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма [93].

В качестве тестовых культур для определения антимикробной активности образцов настоек были использованы следующие микроорганизмы: *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 27853), *Staphylococcus aureus* (штамм 25923), *Escherihia coli* (штамм 25922), *Bacillus cereus* (клинические штаммы), *Candida albicans* (клинические штаммы).

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛРС НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА

Морфологическая диагностика некоторых представителей рода Лапчатка (*Potentilla* L.) достаточно сложна, что связано, от части, с влиянием экологических факторов среды, а также с внутривидовой изменчивостью дикорастущих травянистых форм [17, 79, 142]. В связи с этим наиболее перспективным направлением диагностики может являться поиск видовых анатомических различий.

Вопрос анатомии и гистологии представителей рода *Potentilla* L. в том числе в плане диагностики видов изучался ранее отечественными учеными [17, 68, 123, 124, 178]. Основная часть работ посвящена анатомии надземной части видов рода лапчатка, в частности анатомии листьев и петиолярным признакам лапчатки [68]. Также рядом авторов (Сизова О.Ю. 200; Степанова А.В. 2004, 2005, 2007) были изучены закономерности вторичной ксилемы многолетних побегов травянистых растений на примере рода *Potentilla* L., выявлены некоторые закономерности в частности тенденцию к паренхимизации ксилемы путем образования широких лучей, составленных клетками с тонкими нелигнифицированными оболочками и изменением строения трахеальных элементов древесины [123, 124, 178].

Изучались ранее и корневища представителей рода *Potentilla* L. [86, 123, 124]. По данным Степановой А.В. целесообразно рассматривать 5 типов корневищ в роде *Potentilla* L. Кроме того, Степановой А.В. была выявлена связь типов анатомического строения корневищ с моделями побегообразования лапчаток [123, 124].

Характеристики анатомического строения корней представителей подкласса *Rosidae* были описаны ранее [128], однако для рода *Potentilla* L. выявленные диагностические признаки недостаточны, в связи с чем возникает необходимость подробного изучения анатомических особенностей представителей указанного таксона. Микроскопические признаки

фармакопейного вида – лапчатки прямостоячей – были подробно изучены ранее. Основные диагностические признаки описаны в Государственной фармакопее XIII издания [13, 34, 38, 71, 111, 111, 113].

Нами проведен морфолого-анатомический анализ свежих и высушенных корневищ с корнями лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой.

3.1. Корневища и корни лапчатки белой (*Potentilla alba* L.)

Морфолого-анатомическому анализу подвергались свежие и высушенные корневища с корнями лапчатки белой, собранные в пос. Антоновка Самарской области в 2013-2015 году (рис. 4). Ранее рядом авторов изучались диагностические признаки подземных органов лапчатки белой, данное исследование было проведено для подтверждения выявленных признаков [11, 55, 86, 122, 133].

Макроскопический анализ показал, что излом корневища и корней лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) бело-розоватого или бежевого цвета. Вкус слегка вяжущий, запах слабый.



Рисунок 4 – Фрагменты подземных органов лапчатки белой

Микроскопический анализ поперечного среза **корня лапчатки белой** выявил следующие признаки: на поперечном срезе корень растения имеет вторичное строение. Для пробкового слоя характерна суберенизация и

сильная пигментация. Клетки пробки окрашены, бурого цвета. Внутренние слои пробки не суберинизированы.

Коровая часть корня хорошо визуализируется. Паренхима ее представлена тангентально уплощенными клетками, в которых наблюдаются крахмальные зерна и друзы кальция оксалата (рис. 5).

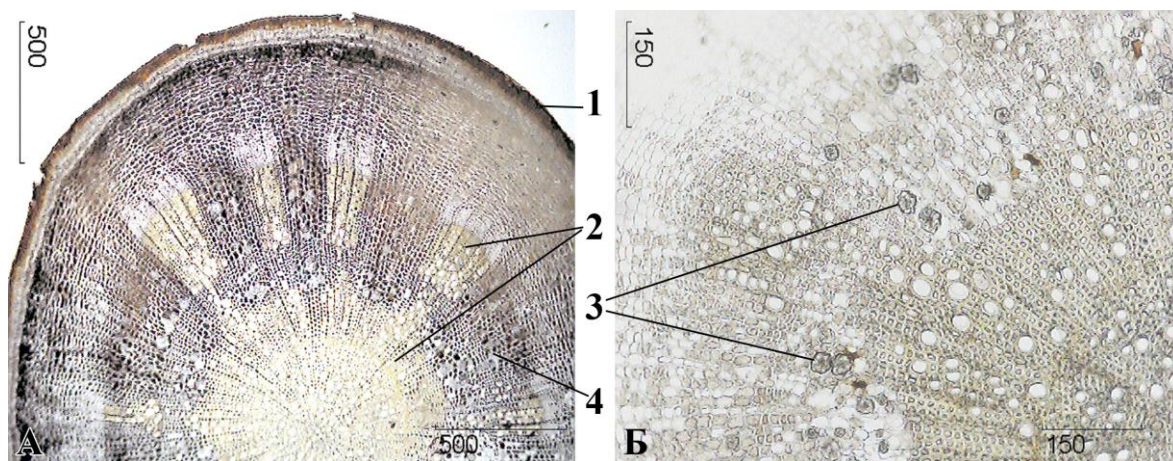


Рисунок 5 – Корень лапчатки белой. Поперечный срез

А – обработка раствором Люголя (x40); Б – нативный срез (x100)

Обозначения: 1 - пробка; 2 - ксилема; 3 – друзы оксалата кальция;

4 – крахмалоносная паренхима корня

Ксилема и флоэма центрального цилиндра ярко выражены. Годичные кольца ксилемы обнаруживаются после окраски микропрепаратов сернокислым анилином (рис. 6). При этом наблюдается характерная неоднородная лигнификация ксилемной паренхимы.

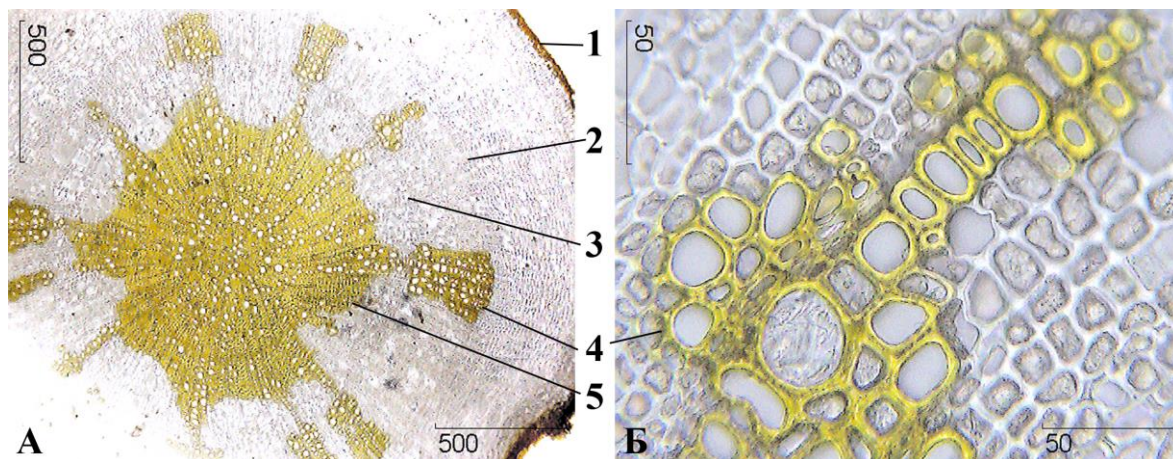


Рисунок 6 – Корень лапчатки белой. Окраска сернокислым анилином

А – поперечный срез (х40); Б – поперечный срез (х400)

Обозначения: 1 - пробка; 2 - флоэма; 3 – паренхима корня;

4 – проводящие элементы вторичной ксилемы

Микроскопический анализ **корневища лапчатки белой** показал, что на поперечном срезе корневище лапчатки округлое, имеет пучковый тип строения. С поверхности корневище покрыто многорядной пробкой. Камбиальная зона визуализируется слабо. Ксилемная часть заметно преобладает над флоэмной. Сердцевина корневища значительна по объему и представлена крупными паренхимными клетками основной ткани, часть из них пигментирована, некоторые клетки содержат друзы оксалата кальция (рис. 7).

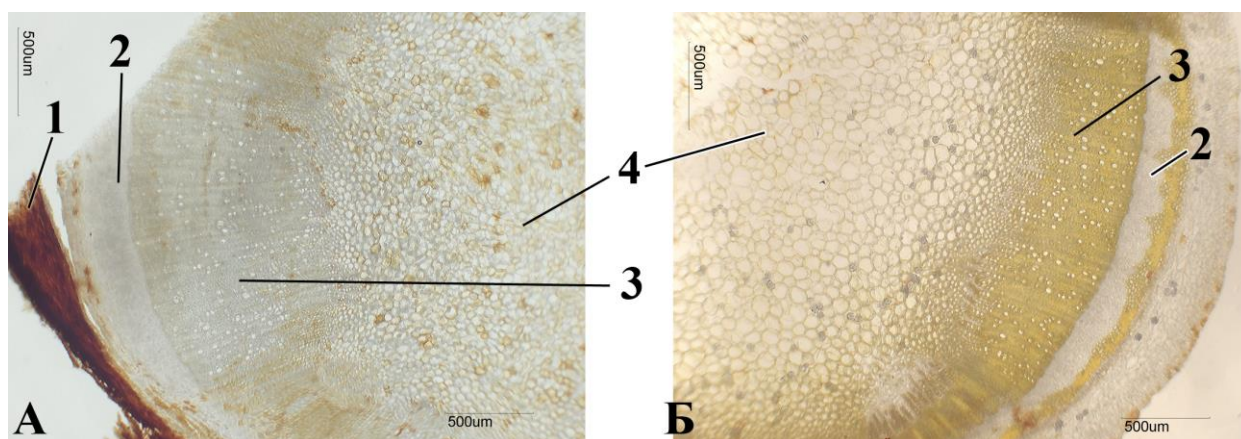


Рисунок 7 – Корневище лапчатки белой. Поперечный срез (х40).

А – общий вид до окраски; Б – окраска раствором сернокислого анилина.

Обозначения: 1 - пробка; 2 - флоэма; 3 – ксилема; 4 – сердцевина корневища.

После обработки микропрепаратов раствором Судан III в зоне первичной коры выявляются клетки с суберинезированными стенками. На поперечных срезах корневища в сердцевине наблюдаются крупные кристаллы оксалата кальция диаметром вплоть до 50-60 мкм (рис. 8).

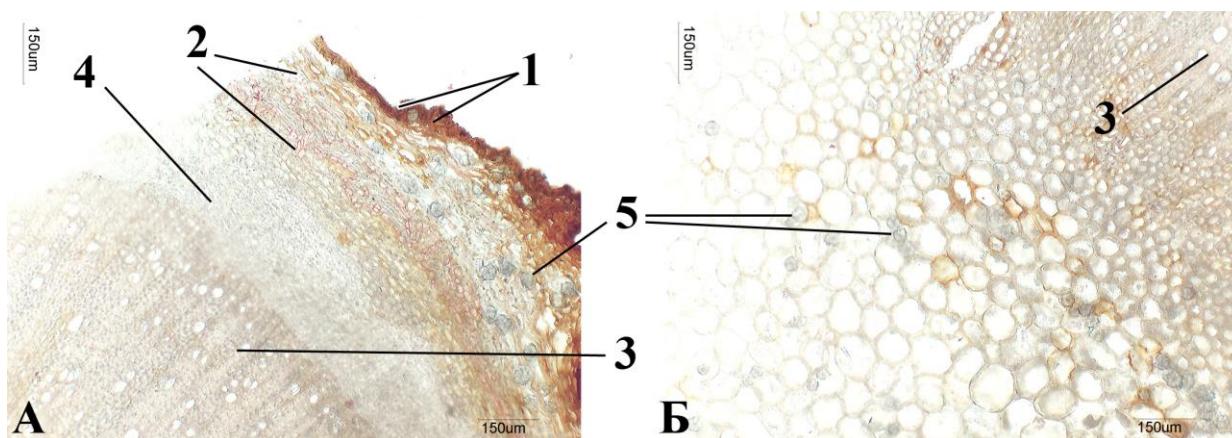


Рисунок 8 – Корневище лапчатки белой. Обработка раствором Судан (III).

А – поперечный срез (x40); Б – поперечный срез (x100).

Обозначения: 1 - пробка; 2 – коровая часть; 3 – ксилема; 4 – флоэма; 5 – друзы оксалата кальция

При обработке корневища раствором Люголя в паренхимных тканях обнаруживаются крахмалоносные клетки, значительная часть которых сосредоточена в паренхиме сердцевин. Крахмальные зерна мелкие (рис. 9)

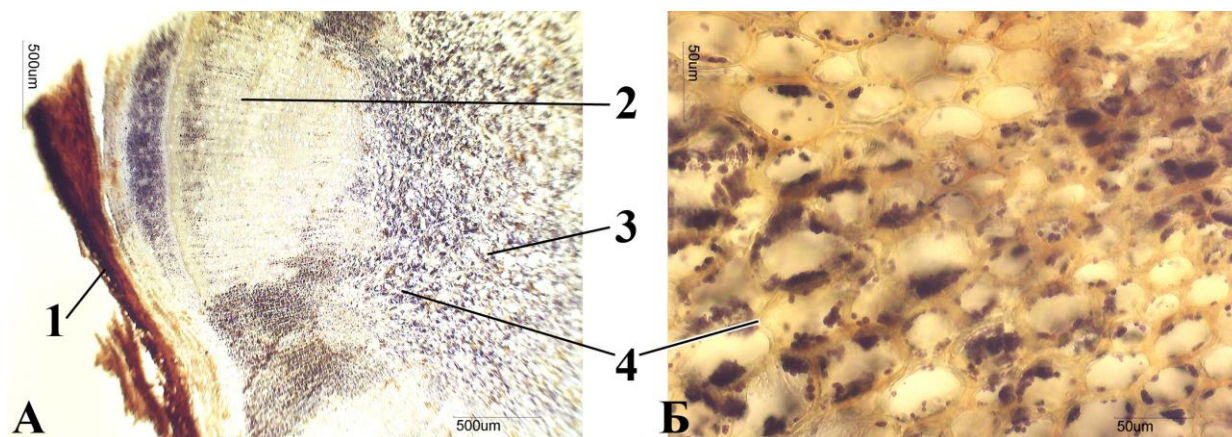


Рисунок 9 – Корневище лапчатки белой. Обработка раствором Люголя.

А – поперечный срез (x40); Б – поперечный срез (x400).

Обозначения: 1 - пробка; 2 – ксилема; 3 – сердцевина корневища; 4 – крахмальные зерна.

3.2. Корневища и корни лапчатки прямой (*Potentilla recta* L.)

Морфолого-анатомическому анализу подвергались свежие и высушенные корневища с корнями лапчатки прямой (*Potentilla recta* L.) собранные в Ботаническом саду г. Самара в 2013-2015 году (рис. 10).



Рисунок 10 – Фрагмент подземных органов лапчатки прямой

Макроскопический анализ показал, что на изломе корневища и корни лапчатки прямой коричневатого или красновато-коричневого цвета. Вкус слегка вяжущий, запах слабый.

При микроскопическом исследовании выявлено, что *корень лапчатки прямой* имеет вторичное строение. Около трети в структуре поперечного среза корня занимают покровная и коровая части (рис. 11).

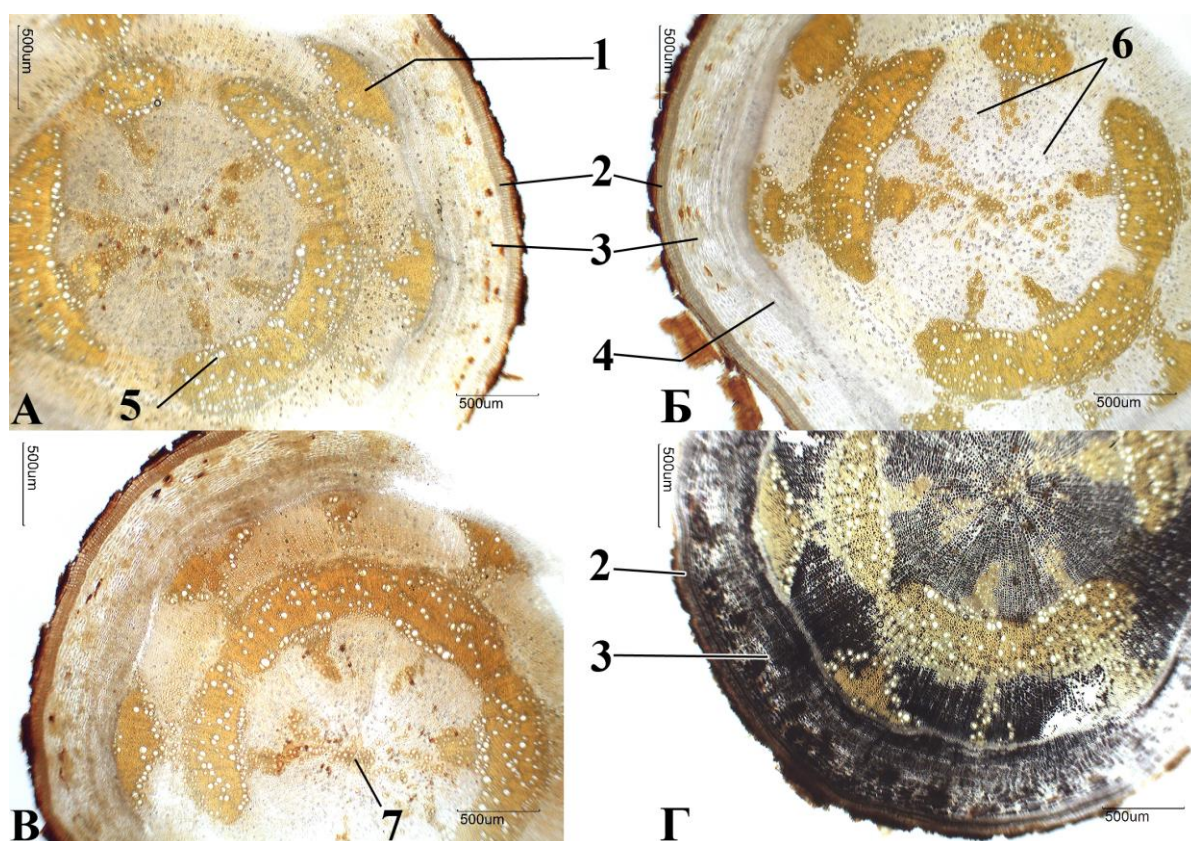


Рисунок 11 – Корень лапчатки прямой. Поперечный срез (x40).

А – общий вид до окраски, Б – окраска серноокислым анилином, В – окраска раствором Судан III, Г – окраска раствором Люголя.

Обозначения: 1 – ксилема; 2 – пробка; 3 – коровая часть; 4 – флоэма; 5 – проводящие элементы ксилемы; 6 – паренхима сердцевинных лучей; 7 – первичная ксилема.

Покровная ткань представлена пробкой, толщина ее составляет от 30 до 50 мкм. Клетки пробкового слоя прямоугольные, после окрашивания микропрепарата раствором Судан III выявляются ряды клеток с суберинезированными стенками, которые чередуются с рядами не суберинизированных клеток (рис. 12).

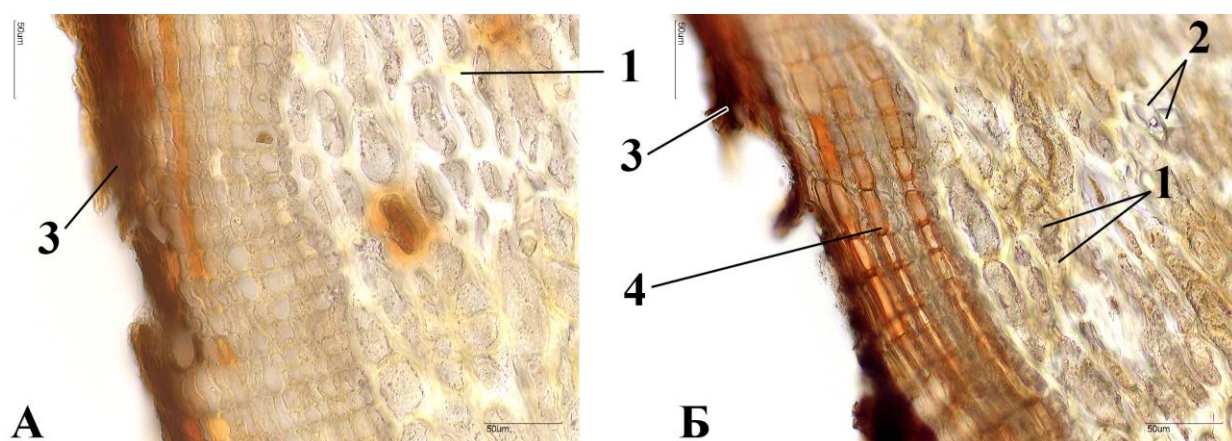


Рисунок 12 – Корень лапчатки прямой. Поперечный срез (x400)

А – общий вид до окраски, Б – окраска раствором Судан III

Обозначения: 1 – паренхима коры; 2 – кристаллы оксалата кальция; 3 – пробка; 4 – внутренние слои пробки.

Коровая часть корня представлена основной тканью, сложенной паренхимными тангентально уплощенными клетками с большими межклетниками. Клетки содержат значительное количество крахмала, который обнаруживается после обработки срезов раствором Люголя. В паренхиме коры встречаются небольшие пигментированные участки или отдельные клетки, заполненные желтовато-коричневым пигментом (рис. 13).

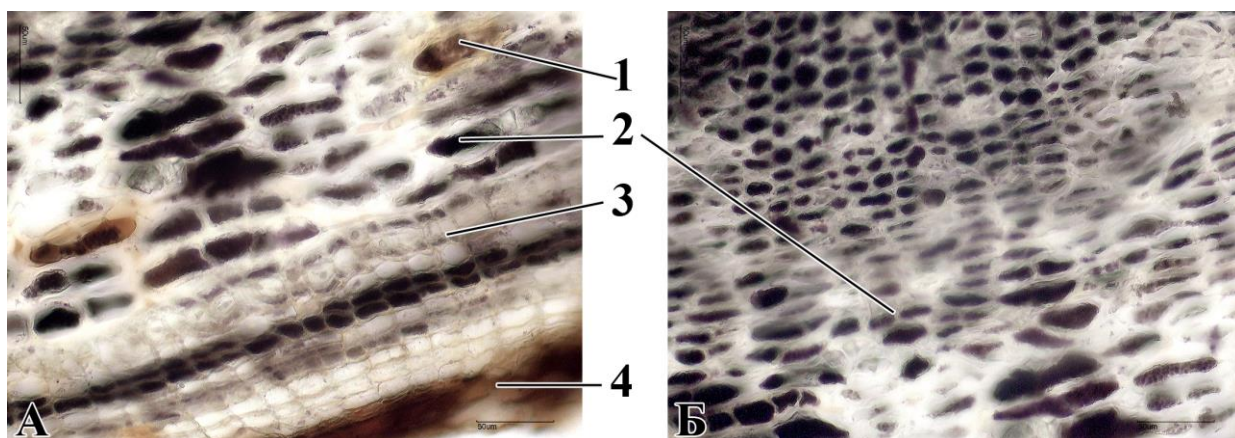


Рисунок 13 – Корень лапчатки прямой. Окраска раствором Люголя.

Поперечный срез (x400)

А – пробковая и коровая часть, Б – клетки паренхимы корня

Обозначения: 1 – пигментированная клетка; 2 – клетка, содержащая

крахмал; 3 – паренхима коры; 4 – пробка.

Проводящая система корня представлена тканями хорошо выраженных ксилемы и флоэмы. Камбиальная зона визуализируется слабо (рис. 14).

Вторичная ксилема корня сгруппирована в виде конусов, которые верхушками направлены к центру корня, при этом сосуды ксилемы в основном локализованы неравномерно, чаще по периферии (рис. 14).

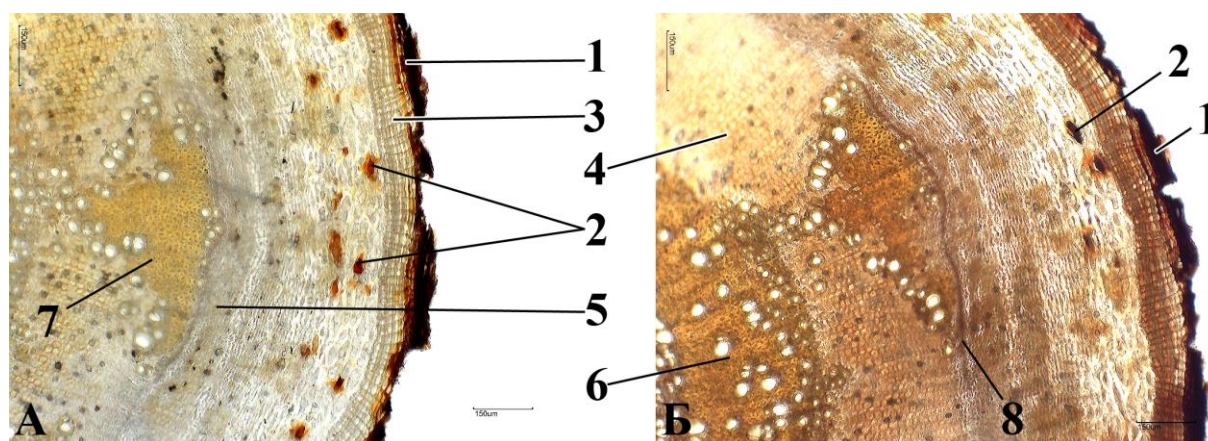


Рисунок 14 – Корень лапчатки прямой. Поперечный срез (x100)

А – общий вид до окраски, Б – окраска раствором Судан III

Обозначения: 1 – пробка; 2 – пигментированные клетки; 3 – паренхима коры; 4 – паренхима корня; 5 – флоэма; 6 – сосуд ксилемы; 7 – ксилема; 8 – годичное кольцо.

Ксилема первого года жизни неоднородна. Ближе к центру ксилема разделена радиальными лучами основной ткани и далее представлена несколькими иногда сливающимися группами сосудов и паратрахеальных элементов. Между сегментами ксилемы располагается паренхима вторичных радиальных лучей. По форме участки древесной паренхимы трапецевидные или прямоугольные. Клетки основной ткани содержат крахмал и значительное количество кристаллов оксалата кальция. Склерифицированный характер клеточных оболочек выявляется после окраски микропрепаратов раствором сернокислого анилина, а клетки,

содержащие крахмал – после обработки срезов раствором Люголя (рис. 15, 16).

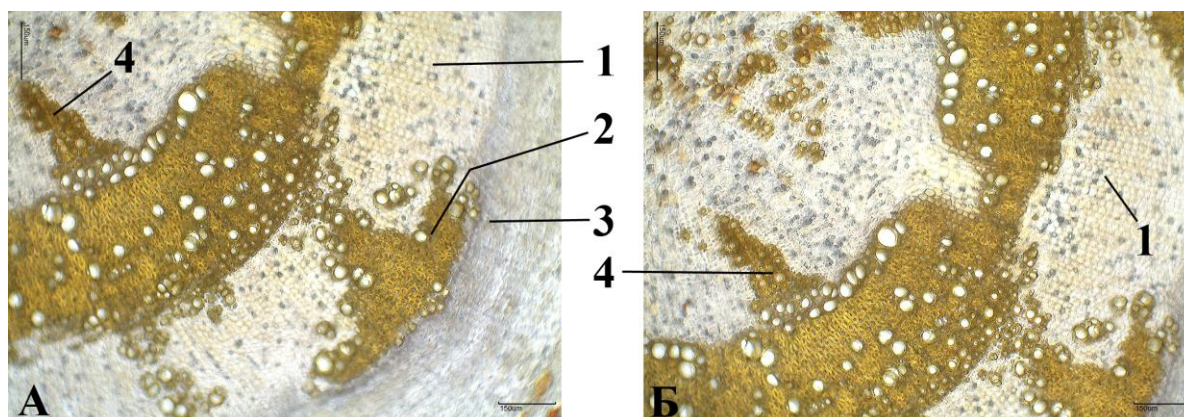


Рисунок 15 – Корень лапчатки прямой. Поперечный срез (x100). Окраска раствором сернокислого анилина

А – фрагмент проводящей системы корня, Б – фрагмент ксилемы корня
Обозначения: 1 – паренхима корня, содержащая друзы оксалата кальция; 2 – проводящий элемент ксилемы; 3 – флоэма; 4 – ксилема

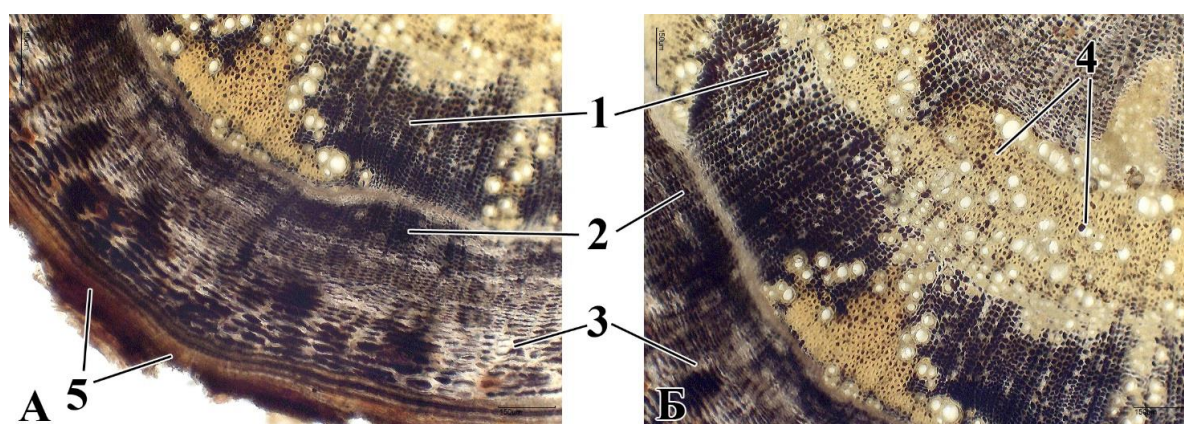


Рисунок 16 – Корень лапчатки прямой. Окраска раствором Люголя.

Поперечный срез (x100)

А – фрагмент пробковой части корня, Б – фрагмент проводящей системы
Обозначения: 1 – паренхимы сердцевинных лучей; 2 – флоэма; 3 – паренхимы коры; 4 – ксилема; 5 – перидерма.

Первичная ксилема в центре корня лапчатки прямой выявляется в виде небольших групп клеток, с прилегающими к ним лучами основной ткани.

Рядом со склерифицированными сосудами первичной ксилемы наблюдаются клетки, содержащие пигмент темно-коричневого цвета (рис. 17).

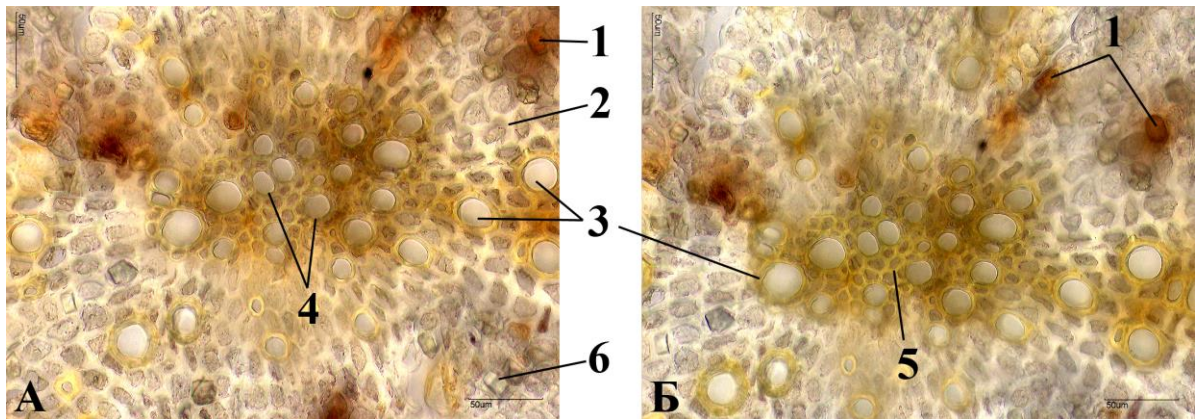


Рисунок 17 – Корень лапчатки прямой. Поперечный срез (x400)

А – общий вид микропрепарата до окраски; Б – окраска раствором сернокислого анилина

Обозначения: 1 – пигментированные клетки; 2 – паренхима сердцевины; 3 – проводящие элементы вторичной ксилемы; 4 – проводящие элементы первичной ксилемы; 5 – первичная ксилема; 6 – кристаллы оксалата кальция.

Анализ микропрепаратов поперечных срезов **корневищ лапчатки прямой** показал, что корневище на поперечном срезе округлое. пучкового типа строения. Покровная ткань представлена пробкой, которая в процессе приготовления микропрепаратов легко отходит. Камбиальная зона практически не просматривается, ксилемная и флоэмная часть выражены в одинаковой степени (рис. 18).

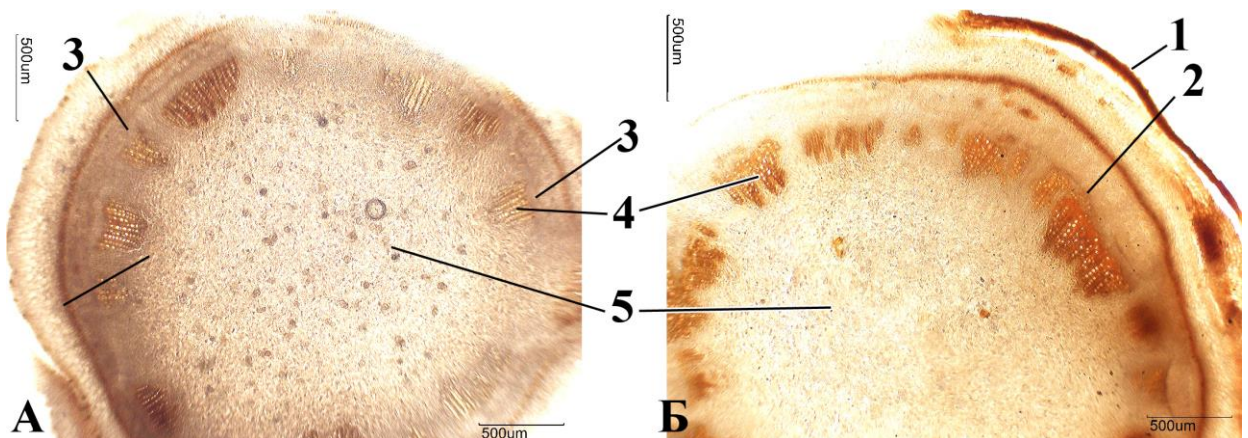


Рисунок 18 – Корневище лапчатки прямой. Поперечный срез (x40).

А – общий вид корневища до окраски; Б – окраска суданом (III)

Обозначения: 1 – покровная ткань; 2 – зона камбия; 3 – флоэма; 4 – ксилема; 5 – сердцевина

После окраски препаратов сернокислым анилином на срезах выявляются зоны склерефицированных клеток, в частности, в ксилеме и коровой части (рис. 19).

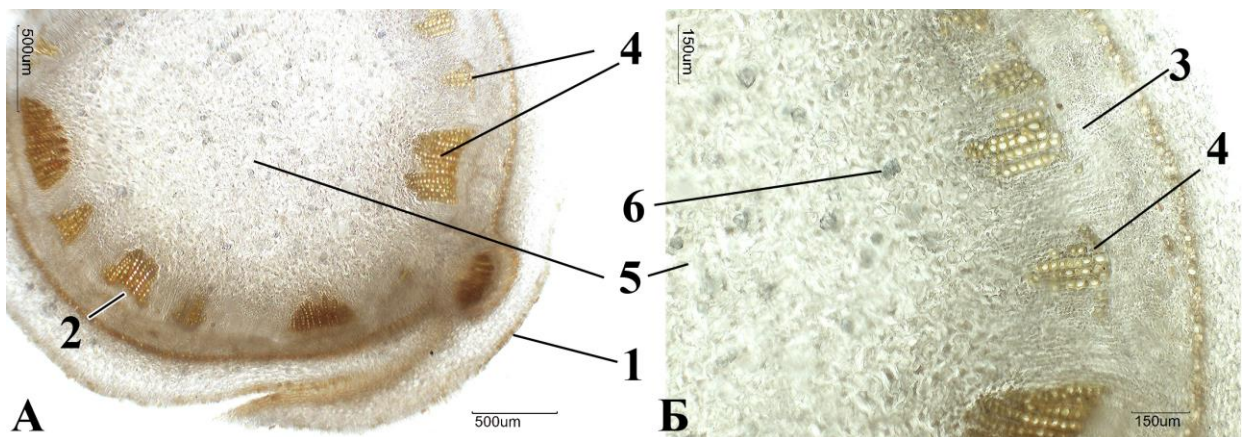


Рисунок 19 – Корневище лапчатки прямой. Обработка раствором сернокислого анилина.

А – поперечный срез (x40); Б – поперечный срез (x100)

Обозначения: 1 – покровная ткань; 2 – зона камбия; 3 – флоэма; 4 – ткани ксилемы; 5 – сердцевина; 6 – друзы оксалата кальция.

Окраска микропрепаратов корневища лапчатки прямой раствором Люголя позволяет выявить ткани, содержащие крахмал. Крахмальные зерна по большей части крупные, их размер достигает 50-60 мкм (рис. 20).

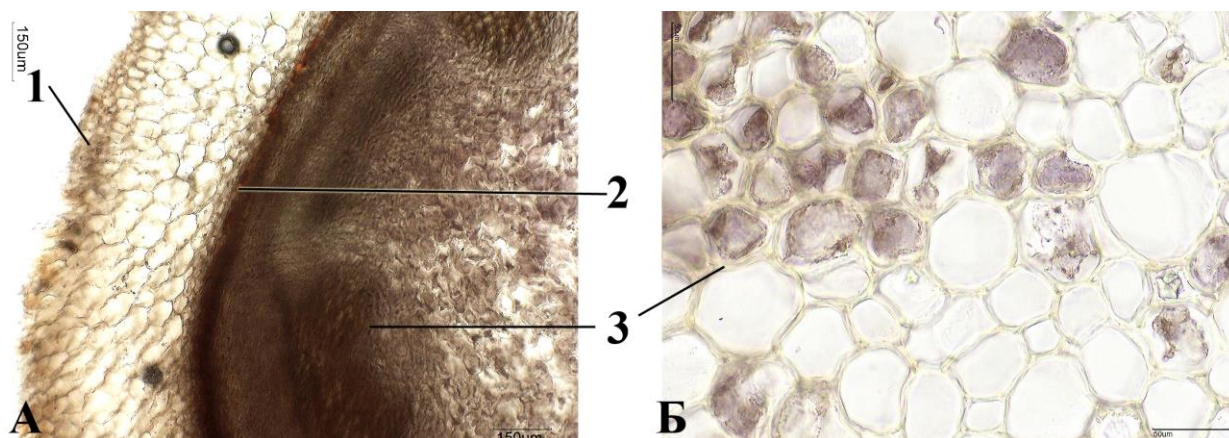


Рисунок 20 – Корневище лапчатки прямой. Обработка раствором Люголя.

А – поперечный срез (x100); Б – поперечный срез (x400)

Обозначения: 1 – покровная ткань; 2 – зона камбия; 3 – крахмальные зерна.

3.3. Корневища и корни лапчатки серебристой (*Potentilla argentea* L.)

Морфолого-анатомическому анализу подвергались свежие и высушенные корневища с корнями лапчатки серебристой, заготовленные в Самарской области в 2015 году (рис. 21).

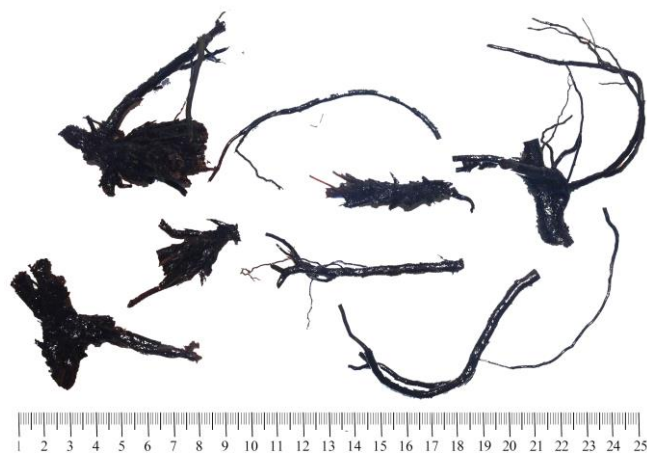


Рисунок 21 – Фрагмент подземных органов лапчатки серебристой

Макроскопический анализ показал, что на изломе корневища и корни лапчатки серебристой бежевого цвета. Вкус слегка вяжущий, запах слабый.

При микроскопическом анализе **корня лапчатки серебристой** выявлено, что он имеет вторичное строение. Общее очертание поперечного среза корня округлое (рис. 22).

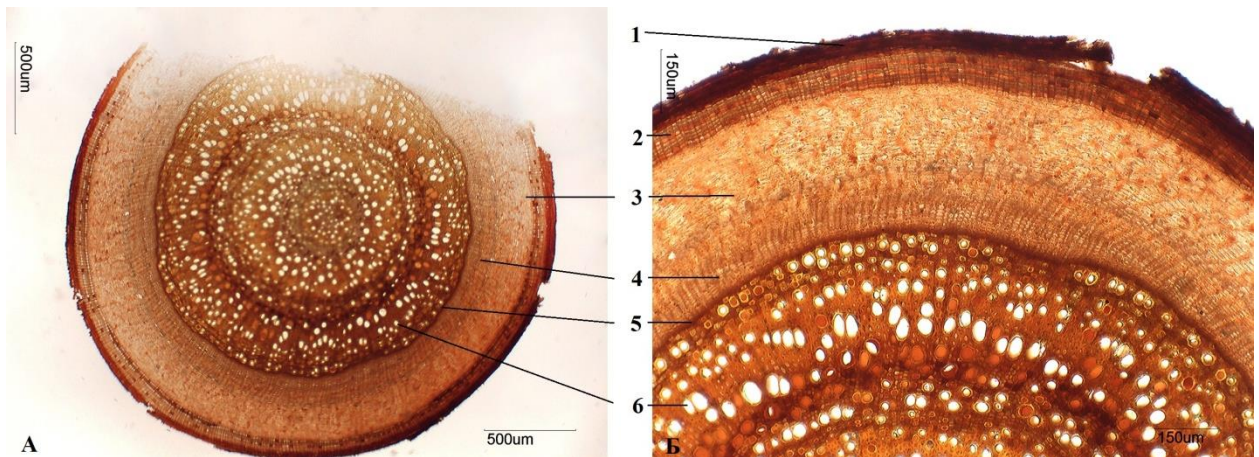


Рисунок 22 – Корень лапчатки серебристой. Поперечный срез.

А – общий вид до окраски (x40); Б – обработка реактивом Судан III (x100).

Обозначения: 1 – наружные слои пробки; 2 – внутренние слои перидермы; 3 – ткани вторичной коры; 4 – флоэма; 5 – зона камбия; 6 – сосуды ксилемы

Покровная ткань представлена пробкой, состоящей из клеток прямоугольной формы с равно-утолщенными стенками. При обработке среза раствором Судан III обнаруживается, что в пробке чередуются слои суберинезированных и несуберинезированных клеток (рис. 22, 23).

Под пробкой визуализируется пробковый камбий, глубже залегает слой основной ткани, паренхима коры. Клетки коры тангентально уплощены и имеют утолщенные волнообразные стенки. Клетки коры содержат большое количество неструктурированного крахмала, что обнаруживается раствором Люголя. Механические ткани в коровой части не выражены (рис. 23).

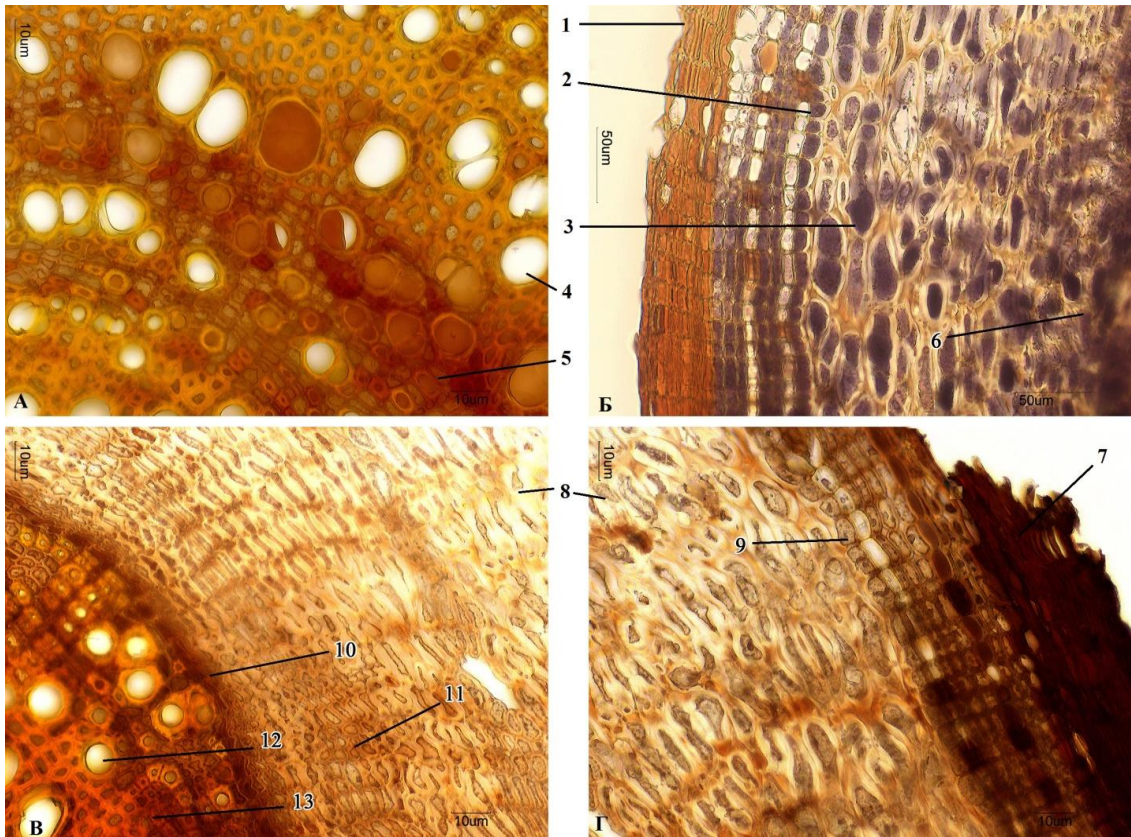


Рисунок 23 – Корень лапчатки серебристой. Поперечный срез.

А – окраска ксилемы сернокислым анилином (x400); Б – окраска коры раствором Люголя (x400); В – окраска ксилемы сернокислым анилином (x400); Г – обработка коры реактивом Судан III (x400).

Обозначения: 1 – пробка; 2 – пробковый камбий; 3 – основная паренхима коры; 4 – сосуды ксилемы; 5 – склеренхима; 6 – проводящий слой флоэмы; 7 – пробка; 8 – непроводящий слой флоэмы; 9 – пробковый камбий; 10 – камбий; 11 – проводящий слой флоэмы; 12 – сосуды ксилемы; 13 – склеренхима ксилемы.

Проводящая система корня непучкового типа. Камбиальная зона достаточно выражена, представлена слоями тонкостенных клеток с бурым протопластом (рис. 23).

Первичная ксилема диархного типа (рис. 22). Вторичная ксилема корня содержит годовичные кольца и сложена сосудами, которые укреплены волокнами либриформа и одревесневшей паратрахеальной паренхимой (рис. 24).

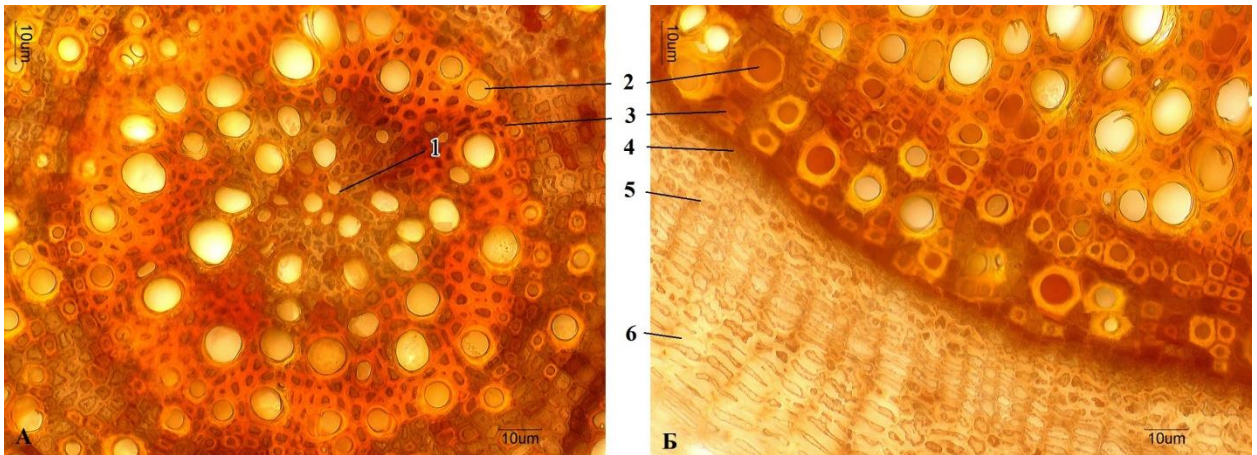


Рисунок 24 – Корень лапчатки серебристой. Поперечный срез.

А – окраска ксилемы сернокислым анилином (x400); Б – окраска сернокислым анилином (x400).

Обозначения: 1 – первичная ксилема; 2 – вторичная ксилема; 3 – склеренхима; 4 – камбий; 5 – проводящий слой флоэмы; 6 – непроводящий слой флоэмы.

Корневище лапчатки серебристой на поперечном срезе округлое. Снаружи покрыто эпидермой, состоящей из овальных клеток с целлюлозными утолщенными клеточными стенками (рис. 25).

Корневище армировано двумя-тремя слоями клеток уголково-пластинчатой колленхимы с редкими межклетниками, в клетках изредка встречаются кристаллы оксалата кальция. Паренхима коры состоит из овальных, тангентально уплощенных клеток с тонкими стенками, содержащими неструктурированный крахмал (рис. 25).

Центральный цилиндр корневища переходного типа. Флоэмная часть состоит из мелких клеток с протопластами, окрашенными в темный цвет. Снаружи флоэма армирована многослойными волокнами перциклической склеренхимы. Камбиальная зона слабо выражена (рис. 25).

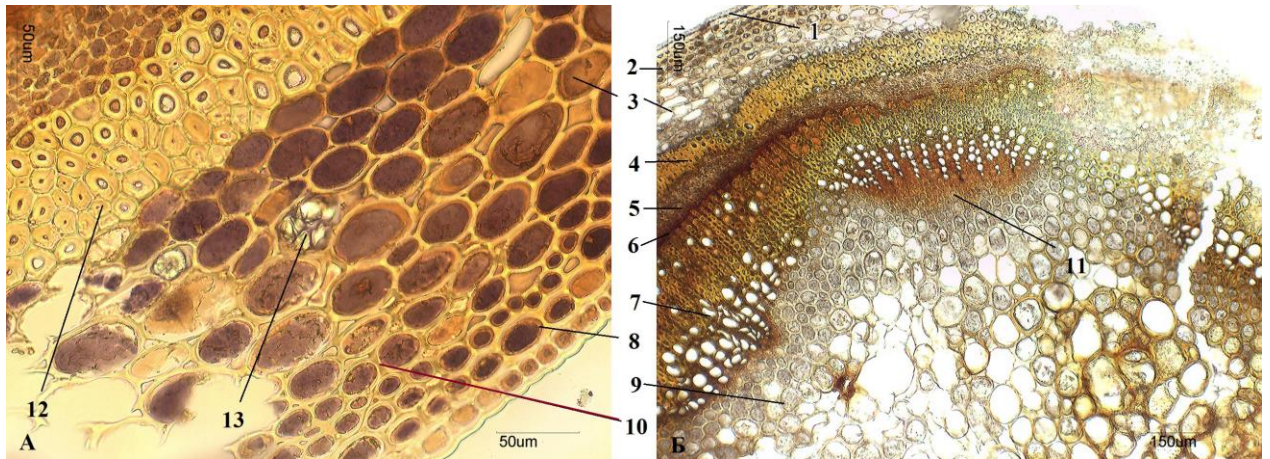


Рисунок 25 – Корневище лапчатки серебристой. Поперечный срез.

А – окраска коры раствором Люголя (x400); Б – окраска серноокислым анилином (x100).

Обозначения: 1 – эпидермис; 2 – склеренхима; 3 – основная паренхима коры; 4 – склеренхима коры; 5 – флоэма; 6 – камбий; 7 – сосуды ксилемы; 8 – колленхима; 9 – основная паренхима сердцевины; 10 – содержащие крахмалы; 11 – первичная ксилема; 12 – склеренхима коры; 13 – друзы.

Сосуды ксилемы образуют открытые проводящие пучки коллатерального типа. Перимедулярная зона хорошо визуализируется и представлена мелкими сосудами первичной ксилемы, вокруг которых сконцентрирована древесная паренхима (рис. 25).

Сердцевина корневища крупноклеточная. В клетках паренхимы встречаются кристаллы оксалата кальция звездчатой формы различных размеров, а также содержится аморфный крахмал, который обнаруживается после обработки микропрепаратов раствором Люголя (рис. 26).

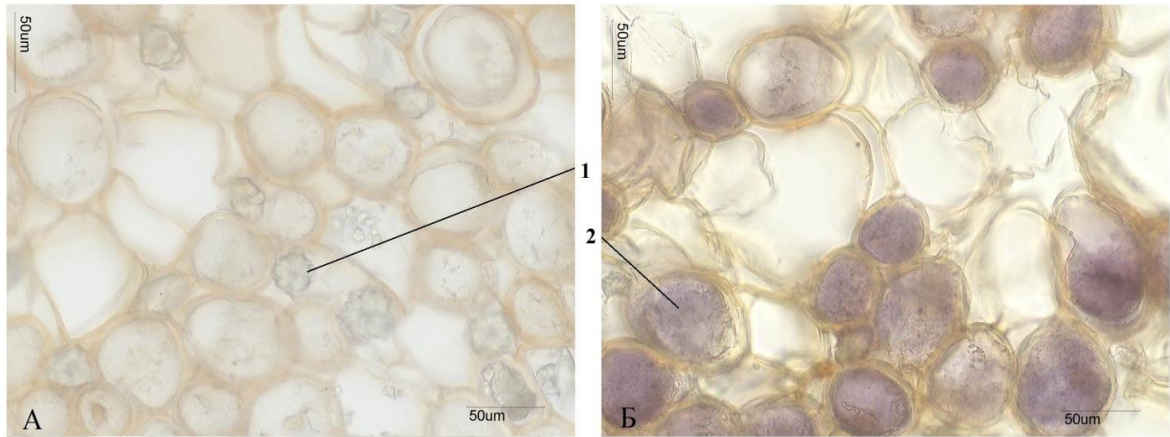


Рисунок 26 – Корневище лапчатки серебристой. Поперечный срез.

А – окраска сернокислым анилином; Б – окраска реактивом Люголя (х400).

Обозначения: 1 – кристалл оксалата кальция; 2 – аморфный крахмал.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

В результаты проведенных морфолого-анатомических исследований подземных органов некоторых представителей рода Лапчатка были сделаны следующие выводы:

1. У изученных представителей рода *Potentilla* L. сырье морфологически сложно дифференцируется; цвет подземных органов на изломе варьирует от бежевого до красновато-коричневого, запах слабый, вкус вяжущий. Таким образом, макроскопического анализа недостаточно для диагностики различных видов рода Лапчатка.

2. Результаты настоящего исследования морфолого-анатомии подземных органов лапчатки белой подтверждают данные литературы о диагностических признаках данного сырья, кроме того впервые изучены анатомо-морфологические признаки корневищ и корней лапчатки прямой (как нового перспективного вида ЛРС) и лапчатки серебристой (как возможного примесного вида).

3. Выявлены некоторые отличительные анатомо-морфологические признаки подземных органов лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой, которые могут служить для целей диагностики изученных

видов. При сравнении двухлетних корней лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой выявлена основная отличительная характеристика – особенность локализации ксилемы. Так, в корне лапчатки белой ксилема сосредоточена в центре в виде характерного «солнышка». В корнях лапчатки прямой ксилема локализуется в виде трапецевидных и треугольных областей, причем в центре первичная ксилема визуализируется слабо. Ксилемная часть корня лапчатки серебристой представлена сплошными кольцами, в центре хорошо визуализируется первичная ксилема

4. Для корневищ изученных растений отмечаются следующие отличительные особенности: для корневищ лапчатки белой и лапчатки прямой отмечается пучковый тип строения (визуально пучки в корневищах *Potentilla alba* L. значительно крупнее таковых в корневищах *Potentilla recta* L.), при этом корневище лапчатки серебристой ближе к переходному типу – пучки практически сливаются между собой. Камбиальная зона в корневищах лапчатки прямой и лапчатки белой визуализируется слабо (в корневищах *Potentilla recta* L. на некоторых участках практически не просматривается), при этом в корневищах лапчатки серебристой камбий визуализируется хорошо. Для лапчатки белой характерно наличие мелких крахмальных зерен, тогда как в корневищах лапчатки прямой крахмальные включения крупные. В корневищах *Potentilla argentea* L. в основном содержится неструктурированный крахмал.

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА ЛАПЧАТКА

Единственным видом рода *Potentilla* L., включенным в ГФ РФ XIII издания, является лапчатка прямостоячая [34]. При этом ряд представителей – например, лапчатка белая и лапчатка серебристая применяются в народной медицине, а лапчатка прямая не изучалась на территории Российской Федерации. Использование данных видов в официальной медицинской практике невозможно в силу отсутствия нормативной документации. Для разработки НД необходимы фитохимические исследования сырья представителей рода *Potentilla* L.

Для всех видов представителей рода Лапчатка отмечается высокое содержание дубильных веществ и других фенольных соединений [9, 14, 23, 24, 42, 43, 50, 71, 74, 89, 121, 131, 137, 143, 177, 184, 187, 192]. Для некоторых видов отмечается содержание тритерпеновых сапонинов, фитостеринов, полисахаридов, значительного количества микроэлементов и других БАС [16, 20, 42, 43, 54, 66, 71, 74, 83, 95, 121, 131, 143, 187]. На наш взгляд, фармакологическое действие подземных органов лапчаток и препаратов на их основе – антибактериальное и противовоспалительное в основном обусловлено наличием в сырье фенольных соединений, в частности, дубильных веществ и флавоноидов, также интерес представляют соединения стерина природы. Указанные группы БАС анализировались при скрининговом исследовании химического состава сырья представителей рода Лапчатка.

Фитохимическому исследованию подвергались подземные органы лапчатки прямой и лапчатки белой, как видов, представляющих наибольший интерес в рамках данного исследования. Из подземных органов наиболее перспективного, на наш взгляд, вида – лапчатки белой – были выделены индивидуальные соединения. Принимая во внимание особенности химического состава, был разработан проект ФС на новый вид ЛРС «Лапчатки белой корневища и корни»,

4.1. Предварительное фитохимическое исследование некоторых представителей рода Лапчатка

Биологически активные соединения, содержащиеся в корневищах лапчатки прямостоячей (*Potentilla erecta* L.), достаточно хорошо изучены [14-16, 23, 24, 42, 43, 50, 53, 54, 71, 74, 89, 95, 102, 118, 131, 184, 187], тогда как данных о химическом составе подземных органов ее близкородственных видов недостаточно. В частности, большой интерес у российских ученых вызывает *Potentilla alba* L., как потенциальный источник антитиреоидных средств, в связи с чем БАС лапчатки белой активно изучаются [5-8, 10, 84, 90, 145]. При этом на сегодняшний день нет единого мнения о конкретных соединениях, доминирующих в сырье лапчатки белой и, вероятно, вносящих вклад в фармакологическое действие. Лапчатка прямая (*Potentilla recta* L.) ранее на территории Российской Федерации не изучалась.

В ходе предварительного фитохимического исследования проведены хроматографическое и спектрофотометрическое исследование сырья.

4.1.1. Качественный анализ сырья изучаемых растений рода Лапчатка

Для подтверждения присутствия дубильных веществ в изучаемом сырье использовали химические реакции и метод хроматографии в тонком слое сорбента. Предварительный анализ сырья позволил выявить, что наиболее оптимальной системой растворителей для разделения БАС исследуемых видов лапчаток является система *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2).

Водные и водно-спиртовые извлечения из подземных органов изучаемых видов *Potentilla* L. разделяли в хроматографической системе бутиловый спирт-ледяная уксусная кислота-вода (в соотношении растворителей 4:1:2). Дубильные вещества детектировали в УФ свете при длине волны 254 нм в виде темных пятен на уровне раствора сравнения (катехин), а также после обработки хроматографических пластинок растворами хлорида железа (III). Дубильные вещества проявлялись в виде

зеленоватых пятен на уровне стандартного образца катехина (при этом галловая кислота, нанесенная на хроматографическую пластинку, проявлялась в виде сине-фиолетового пятна с R_f немного меньше, чем у катехина). Для извлечений из подземных органов лапчатки белой на пластинках отмечалось также характерное пятно, также проявляющееся зеленоватым цветом после обработки раствором хлорида железа (III), с R_f около 0,5 (рис. 27). Для лапчатки прямостоячей и лапчатки прямой указанное вещество не отмечалось.

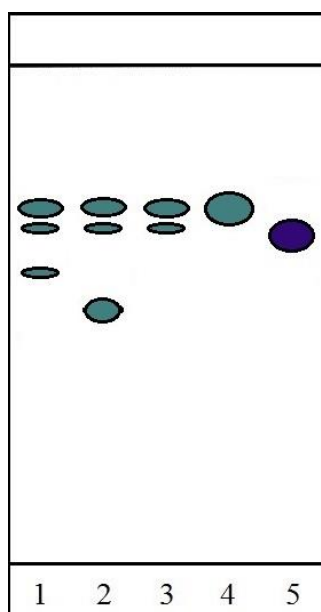


Рисунок 27 – Схема хроматограммы извлечений из подземных органов видов рода Лапчатка в системе растворителей *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) после обработки раствором хлорида железа (III)

Обозначения: 1 – лапчатка прямостоячая; 2 – лапчатка белая; 3 – лапчатка прямая; 4 – катехин; 5 – галловая кислота.

Дополнительно для выявления флавоноидных структур хроматографически изучались извлечения на спиртах различных концентраций – 40%, 70% и 95%. Оптимальными экстрагентами были признаны спирт этиловый 40% и спирт этиловый 70%. В качестве растворов сравнения использовались стандартные образцы флавоноидов – рутина и цинарозида.

Флавоноидные структуры обнаруживали после обработки хроматограмм раствором диазобензолсульфокислоты в виде желто-оранжевых пятен с неявными очертаниями, нередко со «шлейфом» – в том числе на уровне со стандартными образцами рутина и цинарозида (рис. 28). Следует отметить, что при визуальной оценке хроматограмм наиболее явно обнаруживались пятна на уровне стандартного образца цинарозида. Кроме того, отмечались пятна с R_f около 0,77, что соответствует катехину.

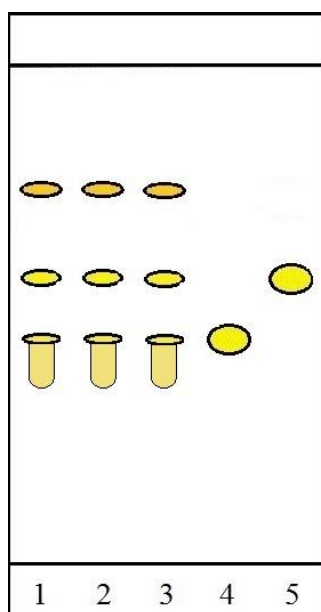


Рисунок 28 – Схема хроматограммы водно-спиртовых извлечений из подземных органов видов рода Лапчатка в системе растворителей н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) после обработки раствором ДСК.
Обозначения: 1 – лапчатка прямостоячая; 2 – лапчатка белая; 3 – лапчатка прямая; 4 – рутин; 5 – цинарозид

Присутствие веществ стериновой природы (сапонинов, фитостеринов) оценивали для извлечений на 95% этиловом спирте и хлороформе из подземных органов изучаемого сырья. Целевые соединения обнаруживали после обработки пластин 20% раствором серной кислоты и нагревания при 100 °С (15 минут) в виде розоватых пятен на уровне стандартного образца β -ситостерина с R_f около 0,8 (рис. 29). Для всех видов отмечались пятна с

меньшими значениями R_f , которые также проявлялись раствором серной кислоты.

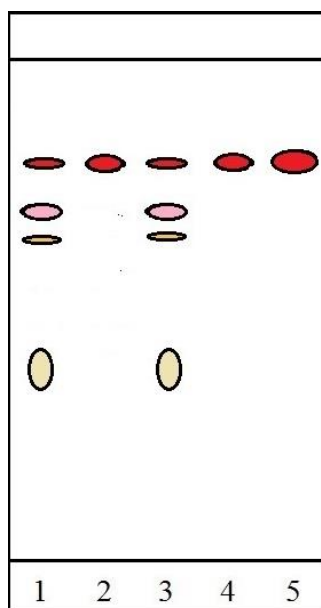


Рисунок 29 – Схема хроматограммы извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка в системе растворителей *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) после обработки 20% серной кислотой
 Обозначения: 1 – извлечение из корневищ с корнями лапчатки белой на 95% спирте этиловом; 2 – хлороформное извлечение из корневищ с корнями лапчатки белой; 3 – извлечение из корневищ с корнями лапчатки прямой на 95% спирте этиловом; 4 – хлороформное извлечение из корневищ с корнями лапчатки прямой; 5 – β -ситостерин.

4.1.2. Оценка количественного содержания некоторых групп БАС в подземных органах видов рода *Potentilla* L.

Основной группой БАС в сырье представителей рода Лапчатка являются дубильные вещества. На сегодняшний день разработан целый ряд методов количественного анализа дубильных веществ, однако единого подхода к анализу данной группы биологически активных соединений не существует [2, 33, 44, 45, 47, 57, 80, 91, 103, 106, 109]. Для скринингового анализа содержания дубильных веществ в подземных органах представителей рода Лапчатка были выбраны следующие методы:

перманганатометрия [33, 109], спектрофотометрия в пересчете на танин [80, 103], спектрофотометрия с использованием осадительного реактива [57, 98] и спектрофотометрия в пересчете на катехин [91, 106]. Использование различных методов обусловлено отсутствием единого принятого подхода к анализу сырья, содержащего дубильные вещества [45, 57, 109]. В связи с этим в рамках предварительного фитохимического анализа оценивались результаты, полученные различными методами.

На рисунке 30 представлен общий вид кривых водных извлечений из подземных органов лапчатки прямостоячей, лапчатки белой и лапчатки прямой, полученные в ходе количественной оценки содержания суммы дубильных веществ методом прямой спектрофотометрии с использованием реактива осаждения (1% раствор желатина в 1% уксусной кислоте) [98]. Общий вид кривых поглощения, полученных при использовании методов спектрофотометрии в пересчете на танин и катехин, соответствует таковому, полученному при анализе флавоноидного состава сырья (рис. 31).

Для извлечений из подземных органов всех изучаемых представителей рода Лапчатка отмечается присутствие характерного максимума при длине волны 282 ± 2 нм.

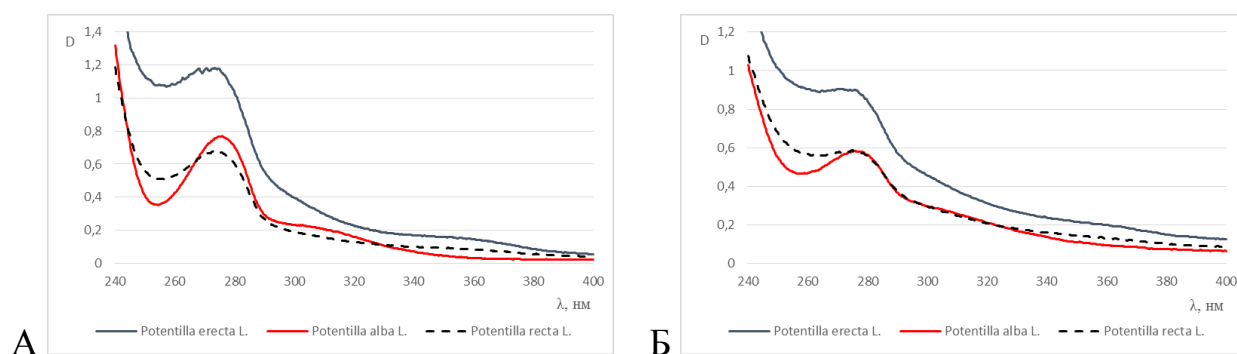


Рисунок 30 – Общий вид кривых поглощения водных извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка до прибавления реактива осаждения (А) и после добавления реактива осаждения (Б) [98].

Результаты количественной оценки содержания дубильных веществ в сырье различными методами представлены в таблице 4. Исследованию

подвергались промышленные образцы сырья лапчатки прямостоячей и лапчатки белой, а также образцы подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой, заготовленные на территории Самарской области в 2014-2016 гг.

Таблица 4 – Количественное содержание дубильных веществ в подземных органах представителей рода Лапчатка

Изучаемый вид	Содержание дубильных веществ				
	Перманганометрия [33, 109]	Спектрофотометрия в пересчете на танин [80, 103]	Спектрофотометрия в пересчете на галловую кислоту [98]		Спектрофотометрия в пересчете на катехин [91, 106]
			Суммы дубильных веществ	Осаждаемых дубильных веществ	
Лапчатка прямостоячая	20,31±0,51%	7,86±0,29%	7,16±0,27%	3,21±0,20%	27,32±0,54%
Лапчатка белая	9,86±0,38%	4,67±0,21%	4,97±0,22%	1,36±0,18%	13,32±0,45%
Лапчатка прямая	7,32±0,28%	2,31±0,19%	4,17±0,21%	0,48±0,14%	13,39±0,35%

На наш взгляд, полученные результаты сопоставляются с данными о химическом составе сырья: максимальный результат для всех трех видов рода Лапчатка отмечается в случае использования спектрофотометрического метода с пересчетом на катехин. Другие методы предполагают пересчет на дубильные вещества гидролизуемой группы (танин, галловая кислота), в связи с чем являются недостаточно специфичными для стандартизации изучаемого сырья.

Дополнительно оценивалось содержание флавоноидов в изучаемом сырье с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид (см. главу 5) предварительно для двух вариантов извлечений – на этиловом спирте 40% и этиловом спирте 70% (рис. 31). Следует отметить, что при добавлении спиртового раствора алюминия (III) хлорида к водно-спиртовым извлечениям из подземных органов лапчатки прямостоячей и лапчатки прямой наблюдается батохромный сдвиг (рис. 31, А-Б, Д-Е). Для водно-спиртовых извлечений из корневищ с корнями лапчатки белой батохромный сдвиг практически незаметен (рис. 31, В-Г).

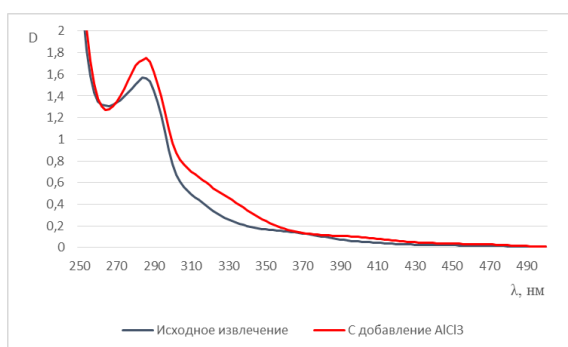
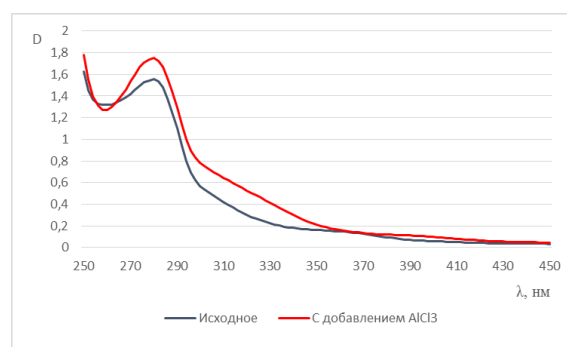
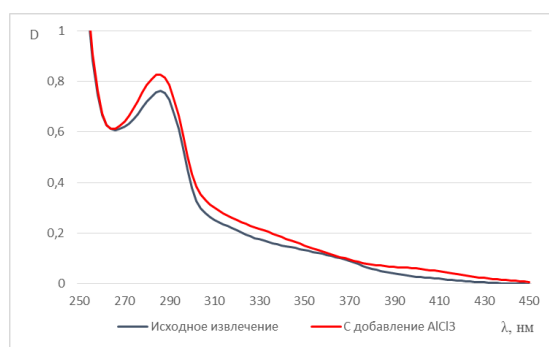
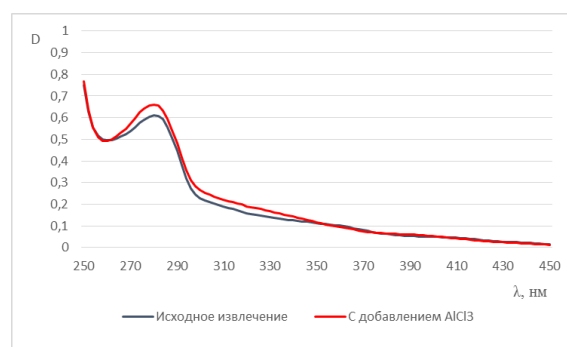
А**Б****В****Г****Д****Е**

Рисунок 31 – Электронные спектры поглощения извлечений на 40% и 70% этиловом спирте из подземных органов представителей рода Лапчатка

А – лапчатка прямостоячая (40% этиловый спирт); Б – лапчатка прямостоячая (70% этиловый спирт); В – лапчатка белая (40% этиловый спирт); Г – лапчатка белая (70% этиловый спирт); Д – лапчатка прямая (40% этиловый спирт); Е – лапчатка прямая (70% этиловый спирт).

Результаты расчета количественного содержания флавоноидов приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Содержание флавоноидов в подземных органах видов рода Лапчатка

Изучаемый вид	Содержание флавоноидов (в пересчете на цинарозид)	
	Экстрагент – 40% этиловый спирт	Экстрагент – 70% этиловый спирт
Лапчатка прямостоячая	0,31±0,03%	0,29±0,02%
Лапчатка белая	0,04±0,006%	0,03±0,004%
Лапчатка прямая	0,23±0,02%	0,19±0,01%

Для лапчатки белой и лапчатки прямой дополнительно был проведен спектрофотометрический анализ стеринового комплекса БАС. Максимум поглощения полученного раствора наблюдается в электронном спектре при длине волны 308-310 нм, что характерно для данной группы веществ (рис. 32). Определено количественное содержание стериновых соединений в пересчете на стандарт. Содержание составило около 3,4 % для лапчатки белой и около 4,2% для лапчатки прямой.

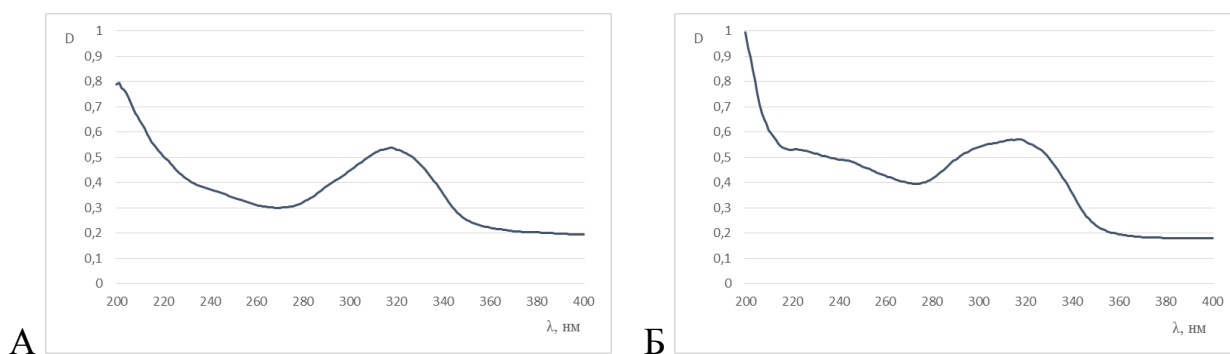


Рисунок 32 – Электронные спектры поглощения хлороформных извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка

А – лапчатка белая; Б – лапчатка прямая

4.2. Выделение индивидуальных веществ из подземных органов лапчатки белой

Выделение индивидуальных веществ из подземных органов лапчатки белой осуществляли методом колоночной хроматографии. Исследованию подвергалась настойка лапчатки белой 1:5, которая была получена методом модифицированной дробной мацерации на 70% этиловом спирте (см. главу 2). Из 150 г сырья было получено 750 мл настойки.

Предварительно настойку упаривали на роторной вакуумной установке в 5 раз. Полученный продукт наносили на сорбент – силикагель L 40/100 (КСКГ измельченный, фр. 0,04 – 0,10 мм ГОСТ 39 56-76 Sorbis Group 05.2012). Для пробы понадобилась навеска сорбента в 60,0 г, что составило 40% от взятой массы сырья (150 г). Полученную пробу высушивали.

Высушенную пробу, состоящую из сухого экстракта и силикагеля, наносили на слой сорбента диаметров около 8 см и высотой около 6 см, сформированный в виде взвеси в хлороформе (сорбент – силикагель). Элюирование осуществляли хлороформом и смесями хлороформ-этанол и этанол-вода в различных соотношениях. Схема элюирования представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Схема элюирования

№ фракции	Хлороформ	Спирт	Объем
1-5	100%	0%	500 мл
6-10	97%	3%	500 мл
11-15	95%	5%	1000 мл
16-20	93%	7%	1000 мл
21-25	90%	10%	1000 мл
26-30	85%	15%	500 мл
31-35	80%	20%	500 мл
36-40	70%	30%	500 мл
41-45	60%	40%	500 мл
46-50	50%	50%	500 мл
51-55	40%	60%	500 мл
56-60	30%	70%	500 мл
61-65	Вода	96%	500 мл
66-68	100%	0%	500 мл

Фракции собирали в промаркированные колбы и упаривали на роторной вакуумной установке до объема 8-10 мл. Концентрированные фракции переносили в пенициллиновые флаконы и подвергали дальнейшему изучению.

Ход элюирования оценивали визуально по интенсивности окраски раствора, а также с применением хроматографии в тонком слое сорбента. Использовались хроматографические пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», на которые капилляром наносились упаренные фракции. Для оценки хода элюирования использовались следующие системы растворителей: хлороформ – спирт этиловый 96% – вода (в соотношении растворителей 26:16:3) и бутиловый спирт–уксусная кислота–вода (в соотношении растворителей 4:1:2). Хроматографические

пластины детектировали в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм, а также после обработки раствором ДСК и ФМК. Объектом-свидетелем служила настойка лапчатки белой 1:5 на 70% этиловом спирте, а также РСО катехина и β -ситостерина.

4.2.1. Исследование фракций, содержащих перспективные индивидуальные вещества, выделенные из корневищ и корней лапчатки белой

Анализ хроматографических пластин позволил выявить фракции, содержащие перспективные индивидуальные вещества, в том числе доминирующие в сырье.

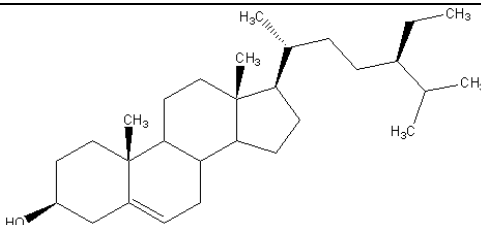
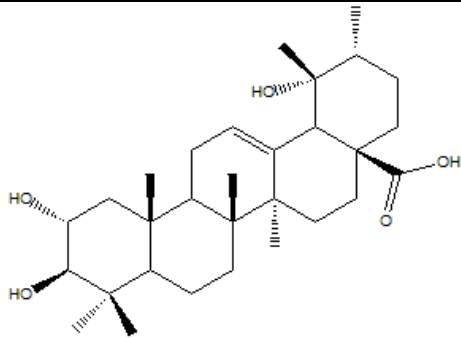
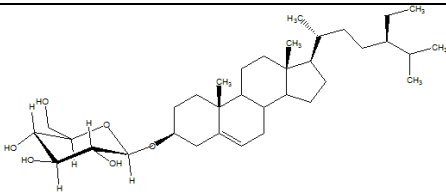
Фракции (элюент – смесь хлороформа и спирта этилового, 95:5), содержащие соединения **1** и **2**, были объединены, выпавший осадок был отделен. Фракции (элюент – смесь хлороформа и спирта этилового, 90:10), содержащие вещество **3**, были объединены, выпавший осадок был отделен. Фракции (элюент – смесь хлороформа и спирта этилового, 50:50), содержащие соединения **4**, **5** и **6**, промывались ацетоном, отделенные маточники подвергались очистке на сефадексе (элюирование смесью хлороформа и спирта этилового в соотношении 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 и 96% спиртом этиловым). Доминирующее соединение **4** было получено после элюирования смесью хлороформа и спирта этилового в соотношении 70:30 и 60:40. Доминирующее соединение **5** было получено после элюирования 96% этиловым спиртом. Дальнейшую очистку вещества **5** осуществляли на силикагеле (элюирование смесью хлороформа и спирта этилового в соотношении 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 и 96% спиртом этиловым). При этом было получено очищенное соединение **5** (элюент – смесь хлороформа и спирта этилового, 70:30).

4.2.2. Идентификация выделенных веществ и их характеристики

После пробоподготовки индивидуальные вещества были выделены из фракций №12, 21-22, 49-50. Выделенные соединения анализировали методами ТСХ, спектроскопии, масс-спектропии и ЯМР.

Физико-химические и спектральные характеристики веществ, выделенных из подземных органов лапчатки белой представлены в табл. 7.

Таблица 7 – Характеристики веществ, выделенных из корневищ и корней лапчатки белой

№ п/п	Название соединения	Химическая формула	Характеристики
1	β-ситостерин $C_{29}H_{50}O$		Белое кристаллическое вещество состава с т. пл. 136-138 °С (этиловый спирт).
2	Торментоловая кислота $C_{30}H_{48}O_5$		Белое кристаллическое вещество, т. пл. 270-273 °С (смесь хлороформа и гексана).
3	3-O-β-D- глюкопиранозид β- ситостерина (даукостерин)		Белое кристаллическое вещество состава с т. пл.

	$C_{35}H_{60}O_6$		312-315 °C (смесь хлороформа и этилового спирта).
4	3-O-β-D- глюкопиранозид катехина $C_{21}H_{24}O_{11}$		Белое кристаллическо е вещество с розоватым оттенком состава, т. пл. 181-184 °C (смесь хлороформа и ацетона). $\lambda_{\max}$ EtOH 281 нм.
5	7-O-β-D- глюкопиранозид катехина $C_{21}H_{24}O_{11}$		Светло-желтое аморфное вещество. $\lambda_{\max}$ EtOH 281 нм.
6	Катехин (3,5,7,3',4'- пентагидроксифлаван) $C_{15}H_{14}O_6$		Белое кристаллическо е вещество, т. пл. 146-148 °C (водный спирт). $\lambda_{\max}$ EtOH 281 нм.

β-ситостерин. Белое кристаллическое вещество состава $C_{29}H_{50}O$ с т.пл. 136-138 °С (этиловый спирт). Масс-спектр (EI-MS, 180 °С, m/z, %): 414 (100).

1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ, м.д., J/Гц): 5,32 (1H, м, H-6), 3,45 (1H, м, H-3), 1,08 (3H, с, CH_3 -19), 0,85 (6H, с, 2 CH_3), 0,82 (6H, с, 2 CH_3), 0,65 (3H, с, CH_3), 1,2-2,8 (30H, м).

Торментоловая кислота. Белое кристаллическое вещество состава $C_{30}H_{48}O_5$, т. пл. 270-273 °С (смесь хлороформа и гексана). 1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ, м.д., J/Гц): 5,18 (1H, уш.с., H-12), 4,83 (1H, уш.с., 19-OH), 4,00 (1H, м, H-2), 3,72 (1H, д, 9 Гц, H-3), 3,15 (1H, с, H-18), 1,30 (3H, с, CH_3 -27), 1,25 (9H, с, 3 CH_3 -23, 29, 30), 1,05 (3H, с, CH_3 -24), 0,85 и 0,80 (6H, с, 2 CH_3 -25, 26).

3-О-β-D-глюкопиранозид β-ситостерина (даукостерин). Белое кристаллическое вещество состава $C_{35}H_{60}O_6$ с т.пл. 312-315 °С (смесь хлороформа и этилового спирта). Масс-спектр (EI-MS, 180 °С, m/z, %): M^+ агликона 414 (100). 1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ, м.д., J/Гц): 5,33 (1H, м, H-6), 4,23 (1H, д, 7 Гц, H-1¹ глюкозы), 3,45 (1H, м, H-3), 0,92 (3H, с, CH_3), 0,82 (6H, с, 2 CH_3), 0,80 (6H, с, 2 CH_3), 0,65 (3H, с, CH_3), 1,2-2,8 (30H, м), 3,1-4,8 6H, м, 6H глюкозы).

3-О-β-D-глюкопиранозид катехина (3,5,7,3,4-пентагидроксифлаван). Белое кристаллическое вещество с розоватым оттенком состава $C_{21}H_{24}O_{11}$ с т.пл. 181-184 °С (смесь хлороформа и ацетона). λ_{max} EtOH 281 нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): 475 $[M + Na]^+$.

1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ, м.д., J/Гц): 9,40 и 8,85 (синглеты 4-х ароматических OH), 6,71 (1H, д, 2,5 Гц, H-2¹), 6,69 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,60 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 6,10 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,00 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 4,71 (д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкозы), 4,56 (1H, д, 8 Гц, H-2_{ax}), 3,87 (1H, м, H-3_{ax}), 2,65 (1H, дд, 6 и 16 Гц, H-4), 2,40 (1H, дд, 8 и 16 Гц, H-4), 3,1-4,9 (м, 6H глюкозы).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , δ_{C} , м.д.): 27,51 (C-4), 76,89 (C-3), 81,04 (C-2), 94,64 (C-6), 96,21 (C-8), 100,51 (C-10), 115,11(C-2¹), 114,41(C-5¹), 118,29 (C-6¹), 130,41 (C-1¹), 144,86 (C-3¹ и C-4¹), 156,06 (C-7), 155,19 (C-5), 156,78 (C-9), 76,59 (C-5), углеродные атомы при углеводных протонах (60,65-73,18).

7-О-β-D-глюкопиранозид катехина. Светло-желтое аморфное вещество состава $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$. λ_{max} EtOH 281 нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °C, m/z): 453 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

^1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 8,90 и 8,78 (синглеты 3-х ароматических OH), 6,96 (1H, д, 2,5 Гц, H-2¹), 6,90 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,80 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 5,92 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 5,78 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,28 (д, 6 Гц, H-1¹¹ глюкозы), 4,95 (1H, д, 6 Гц, 3-OH), 4,30 (1H, д, 8 Гц, H-2ax), 3,80 (1H, м, H-3ax), 2,82 (1H, дд, 6 и 16 Гц, H-4), 2,30 (1H, дд, 8 и 16 Гц, H-4), 3,1-4,9 (м, 6H глюкозы).

Катехин (3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлаван). Белое кристаллическое вещество состава $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ с т. пл. 146-148 °C (водный спирт). λ_{max} EtOH 281 нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °C, m/z): 313 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

^1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 9,15 (1H, с, 5-OH), 8,93 (1H, с, 7-OH), 8,04 (1H, с, 4¹-OH), 8,00 (1H, с, 3¹-OH), 6,75 (1H, д, 2,5 Гц, H-2¹), 6,68 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,59 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 5,90 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 5,70 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 4,93 (1H, д, 6 Гц, 3-OH), 4,49 (1H, д, 8 Гц, H-2ax), 3,82 (1H, м, H-3ax), 2,68 (1H, дд, 6 и 16 Гц, H-4), 2,36 (1H, дд, 8 и 16 Гц, H-4).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , δ_{C} , м.д.): 27,91 (C-4), 66,14 (C-3), 81,04 (C-2 и C-5), 93,86 (C-6), 95,13 (C-8), 99,08 (C-10), 115,10 (C-2¹), 114,56 (C-5¹), 118,45 (C-6¹), 130,62 (C-1¹), 144,87 (C-3¹ и C-4¹), 156,39 (C-7), 156,20 (C-5), 156,49 (C-9),

4.2.3. Структурные особенности индивидуальных соединений, выделенных из подземных органов лапчатки белой

Идентификацию выделенных флавоноидов, стеринов и сапонинов осуществляли с использованием УФ-, ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии,

масс-спектрометрии, а также различных химических превращений (химический и ферментативный гидролиз).

Исследование химического строения стеринов показало, что они представлены β -ситостерином и его глюкозидом – даукостерином (рис. 33) [150, 176]. Наличие глюкозы в молекуле даукостерина подтверждается сигналом аномерного протона в ЯМР-спектре при 4,23 м.д. (^1H , д, 7 Гц, $\text{H}-1^1$ глюкозы), а также результатами кислотного и ферментативного гидролиза.

Наряду с известными для корневищ лапчатки белой стеринами впервые из сырья данного растения выделено вещество сапониновой природы, идентифицированное нами как торментоловая кислота [150, 176]. В ^1H -ЯМР-спектре торментоловой кислоты обнаруживается характерный сигнал протона при С-12: 5,18 м.д. (^1H , уш.с., $\text{H}-12$), а также трехпротонные синглетные сигналы семи метильных групп. Наличие карбоксильной группы в молекуле торментоловой кислоты подтверждается данными ^{13}C -ЯМР-спектроскопии: сигнал при 178,48 м.д.

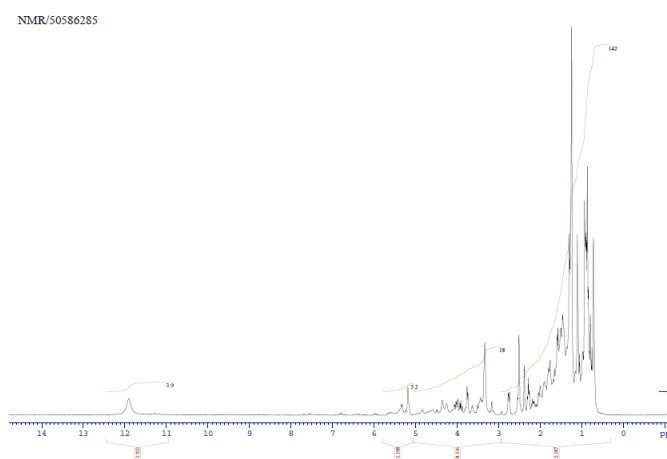


Рисунок 33 – ^1H -ЯМР спектр смеси β -ситостерина и торментоловой кислоты, выделенных из подземных органов лапчатки белой.

В основе выделенных флавоноидных гликозидов лежит агликон катехин – 3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлаван, в ^1H -ЯМР-спектре которых (на примере катехина) присутствуют характерные сигналы протонов $\text{H}-2^1$ (^1H , д, 2,5 Гц,

Н-5¹ (1Н, д, 9 Гц), Н-6¹ (1Н, дд, 2,5 и 9 Гц), Н-8 (1Н, д, 2,5 Гц) и Н-6 (1Н, д, 2,5 Гц), 6,75 м.д., 6,68 м.д., 6,59 м.д., 5,90 м.д. и 5,70 м.д. соответственно (рис. 34). Кроме того, в ¹Н-ЯМР-спектрах катехина и его гликозидов присутствуют сигналы протонов при С-2 (1Н, д, 8 Гц, Н-2ах), С-3 (1Н, м, Н-3ах), С-4 (1Н, дд, 6 и 16 Гц) и С-4 (1Н, дд, 8 и 16 Гц) при 4,49 м.д., 3,82 м.д., 2,68 м.д. и 2,36 м.д. соответственно. Следует также отметить, что ¹Н-ЯМР-спектрах гликозидов катехина присутствуют сигналы аномерных протонов глюкозы, отнесенной на основании сравнения со спектральными характеристиками известных катехиновых гликозидов в одном случае к 3-ОН-группе, в другом – к 7-ОН-группе (рис. 35). Данный вывод подтверждается тем фактом, что в случае 3-О-гликозида дублетный сигнал аномерного протона глюкозы с константой спин-спинового взаимодействия находится в ¹Н-ЯМР-спектре при 4,71 м.д. (д, 7 Гц, Н-1¹¹ глюкозы), тогда как в случае 7-О-гликозида – в более слабом поле: при 5,28 м.д. (д, 6 Гц, Н-1¹¹ глюкозы).

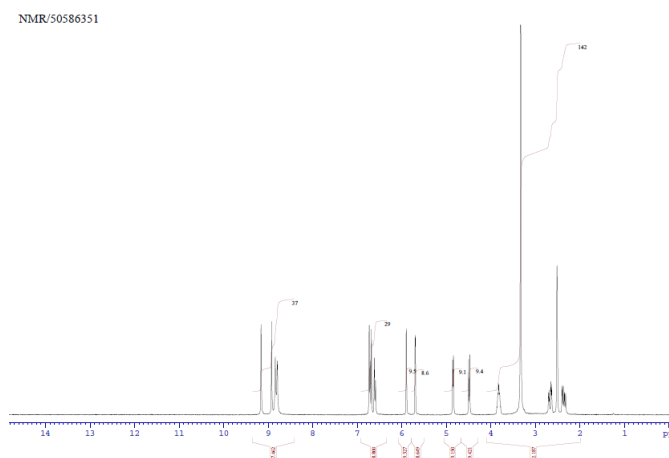


Рисунок 34 –¹H-ЯМР спектр катехина, выделенного из подземных органов лапчатки белой.

Кроме того, строение катехина и его 3-О-глюкозида подтверждается данными ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, которые соответствуют спектральным характеристикам, приведенным в литературе, а также наличием в масс-спектрах обоих глюкозидов молекулярного пика иона с m/z 475 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (рис. 35, 36) [127, 146, 162, 168-170, 194].

Следовательно, выделенные флавоноиды представляют собой катехин (3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлаван) и впервые выделенные из корневищ лапчатки белой 3-О-β-D-глюкопиранозид катехина и 7-О-β-D-глюкопиранозид катехина.

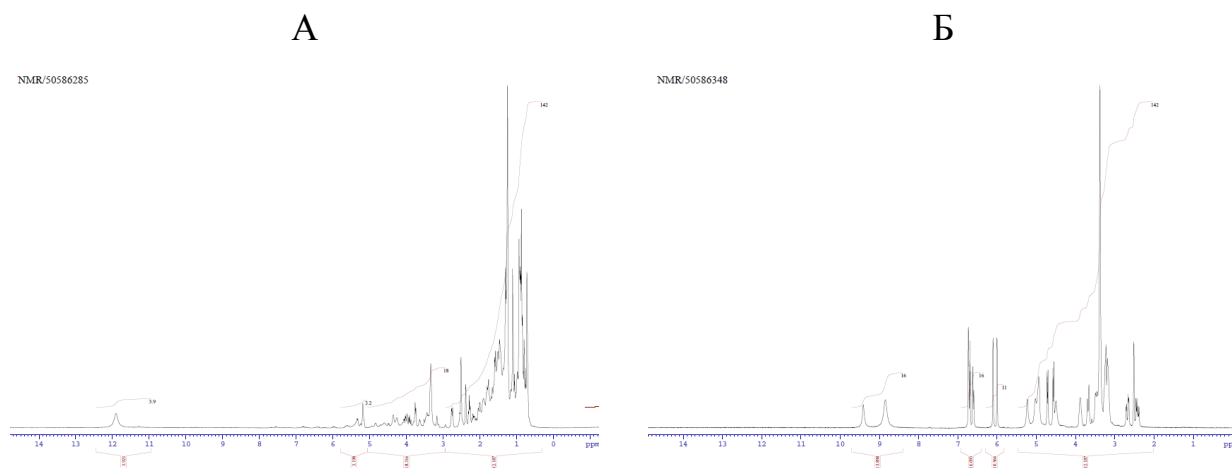


Рисунок 35 – ¹³C–ЯМР спектр (А) и ¹H–ЯМР спектр (Б) 3-О-β-D-глюкопиранозид катехина, выделенного из подземных органов лапчатки ¹H–ЯМР спектр белой.

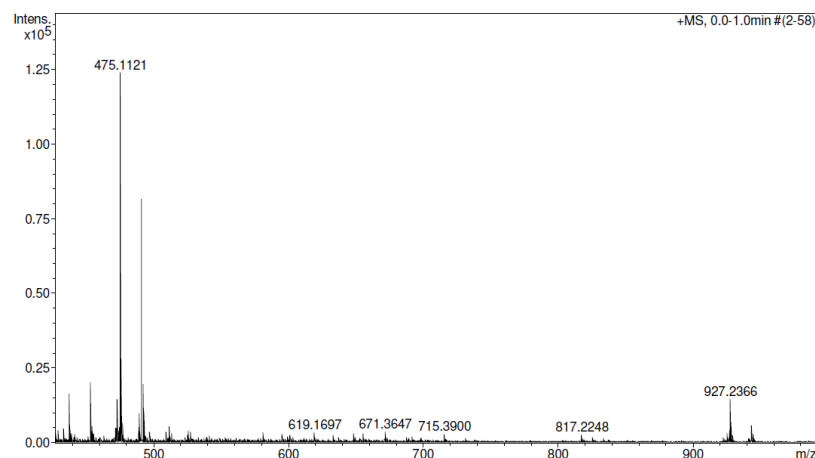


Рисунок 36 –Масс-спектр 3-О-β-D-глюкопиранозид катехина, выделенного из подземных органов лапчатки белой.

Таким образом, в ходе исследования химического состава подземной части лапчатки белой методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии впервые выделены и идентифицированы глюкопиранозиды

катехина – 3-О-β-D-глюкопиранозид катехина и 7-О-β-D-глюкопиранозид катехина, а также известные для данного растения вещества – катехин, β-ситостерин, даукостерин и торментоловая кислота. Данное исследование осуществлялось с использованием методов тонкослойной хроматографии, УФ-, ¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

В результаты проведенных фитохимических исследований подземных органов некоторых представителей рода Лапчатка были сделаны следующие выводы:

1. По результатам предварительного фитохимического анализа подземных органов представителей рода *Potentilla* L. выявлено присутствие фенольных соединений (в частности, дубильных веществ и флавоноидов), а также веществ стериновой природы.

2. Проведена сравнительная оценка содержания дубильных веществ в сырье трех видов рода Лапчатка с использованием различных методов. Выявлено, что среди использованных аппаратных методов наиболее оптимальные результаты позволяет получить метод прямой спектрофотометрии в пересчете на катехин.

3. Дополнительно оценено количественное содержание флавоноидов и веществ стериновой природы в подземных органах представителей рода Лапчатка. Содержание флавоноидов для корневищ лапчатки прямостоячей составляет около 0,3%, для подземных органов лапчатки белой – около 0,04%, для подземных органов лапчатки прямой – около 0,2%. Количественное содержание веществ стериновой природы составило около 3,4% для подземных органов лапчатки белой и около 4,2% для подземных органов лапчатки прямой.

4. Из подземных органов лапчатки белой впервые в Российской Федерации выделены и идентифицированы глюкозиды катехина. Определено, что 3-О-β-D-глюкопиранозид катехина и 7-О-β-D-глюкопиранозид катехина являются доминирующими веществами корневищ и корней лапчатки белой, что подтверждается результатами хроматографического и спектрального анализа. Кроме того, из подземной части лапчатки белой выделены катехин, β-ситостерин, даукостерин и торментоловая кислота.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА

Проведенное фитохимическое исследование представителей рода Лапчатка позволило выявить группы БАС, на которые целесообразно опираться при анализе сырья. Для возможности использования новых видов сырья (корневища с корнями лапчатки белой и корневища с корнями лапчатки прямой) в медицинской практике необходима разработка методик его качественного и количественного анализа для включения в проект нормативной документации.

5.1. Разработка методик качественного анализа сырья представителей рода Лапчатка

Раздел «Качественные реакции» или согласно ГФ РФ XIII издания «Определение основных групп биологически активных веществ» является одним из ключевых разделов НД, регламентирующей качество растительного сырья и ЛРП. Так, для лапчатки прямостоячей ГФ РФ XIII предлагает два варианта качественного анализа сырья: тонкослойная хроматография с использованием стандартного образца галловой кислоты и качественная реакция с железа (III) аммония сульфатом [34]. Европейская фармакопея предлагает метод тонкослойной хроматографии с раствором катехина в качестве раствора сравнения [152].

На наш взгляд, для ЛРС, содержащего преимущественно дубильные вещества конденсированной природы, более целесообразным является использование в качестве раствора сравнения также вещества конденсированной природы – катехина.

При разработке подходов к стандартизации нефармакопейных видов рода *Potentilla* L. были учтены результаты исследований компонентного состава сырья. Нами предлагаются следующие методы для качественного анализа подземных органов представителей рода Лапчатка: хроматография в

тонком слое сорбента (стандартный образец – катехин), а также метод спектроскопии с последующим анализом полученных максимумов поглощения.

5.1.1. Метод тонкослойной хроматографии

Исследованию подвергались корневища с корнями лапчатки белой и корневища с корнями лапчатки прямой, заготовленные в фазу цветения в 2014-2016 гг. на территории Самарской области.

1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 3 мм, переносили в термостойкую колбу на 100 мл и прибавляли 50 мл спирта этилового 40%. Взвешивали. Колбу с подсоединенным обратным холодильником нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Затем колбу остужали, взвешивали и при необходимости доводили массу до первоначального значения путем добавления экстрагента. Полученное извлечение фильтровали во флакон темного стекла.

Извлечение наносили на предварительно активированные хроматографические пластинки. На линию старта пластинки микропипеткой наносили 0,02 мл полученного водно-спиртового извлечения из корневищ с корнями лапчатки белой (или лапчатки прямой). В качестве вещества-свидетеля наносили спиртовой раствор РСО катехина. Для разделения использовали систему растворителей *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2). Пластинку помещали в хроматографическую камеру, которая предварительно была насыщена парами растворителей в течение 24 часов. Хроматографировали восходящим способом до прохождения фронтом растворителя около 7-8 см, после чего пластинку доставали и высушивали.

Затем хроматограммы оценивали визуально при дневном свете, а также просматривали в УФ-свете при длинах волн 366 нм и 254 нм. Дополнительно пластинки обрабатывали спиртовым раствором хлорида железа (III). Схема хроматограммы представлена на рисунке 37.

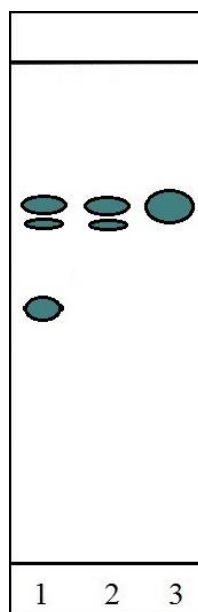


Рисунок 37 – Схема хроматограммы водно-спиртовых извлечений из корневищ с корнями лапчатки белой и лапчатки прямой. Система *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2). Обработка спиртовым раствором хлорида железа (III).

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из корневищ с корнями лапчатки белой; 2 – водно-спиртовое извлечение из корневищ с корнями лапчатки прямой; 3 – РСО катехина.

На полученной хроматограмме для лапчатки белой обнаруживаются зоны двух доминирующих веществ с R_f около 0,5 и R_f около 0,77. Проведенные фитохимические исследования подземных органов лапчатки белой позволили сделать вывод о том, что обнаруженными доминирующими веществами в сырье являются 3-О- β -D-глюкопиранозид катехина и 7-О- β -D-глюкопиранозид катехина (см. главу 4). Из веществ-свидетелей наиболее близким ко второму веществу значением подвижности обладает РСО катехина с R_f около 0,77.

Указанная методика была включена нами в проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Лапчатки белой корневища с корнями» (приложение 4).

На полученной хроматограмме для лапчатки прямой обнаруживается зона доминирующего вещества с R_f около 0,77. По детектированию после обработки раствором хлорида железа (III) можно сделать вывод, что данное вещество имеет фенольную структуру и предположительно является производным катехина, так как его подвижность соответствует таковой у катехина.

Разработанная методика качественного анализа корневищ с корнями лапчатки прямой методом тонкослойной хроматографии может быть включена в проект НД на сырье.

5.1.2. Метод УФ-спектроскопии

Для проведения спектроскопического анализа применяли извлечение, полученное по следующей методике: 1,0 г измельченного сырья (точная навеска), проходящего через сито с диаметром отверстий 3 мм, корневищ с корнями лапчатки белой (или лапчатки прямой) помещали в термостойкую колбу на 100 мл и прибавляли 50 мл экстрагента (спирта этилового 40%). Взвешивали. Колбу с подсоединенным обратным холодильником нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Затем колбу остужали, взвешивали, при необходимости доводили массу до первоначального значения путем добавления экстрагента. Готовое извлечение фильтровали во флакон темного стекла (раствор А).

2 мл раствора А переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 40%. Оптическую плотность полученного раствора Б оценивали на фоне 40% этилового спирта.

Полученный спектр лапчатки белой имеет максимум при длине волны 282 ± 2 нм, а также небольшое «плечо» около 320-330 нм (рис. 34). Характеристики кривой поглощения электронного спектра водно-спиртового извлечения из корневищ с корнями лапчатки белой определяют два доминирующих вещества, которые визуальным детектируются при ТСХ-анализе. Это подтверждается результатами спектральных исследований

данных веществ, выделенных в чистом виде в ходе колоночной хроматографии (см. главу 4).

Полученный спектр лапчатки прямой имеет максимум около 282 нм, а также протянутое «плечо» от 330 до 370 нм. (рис. 38).

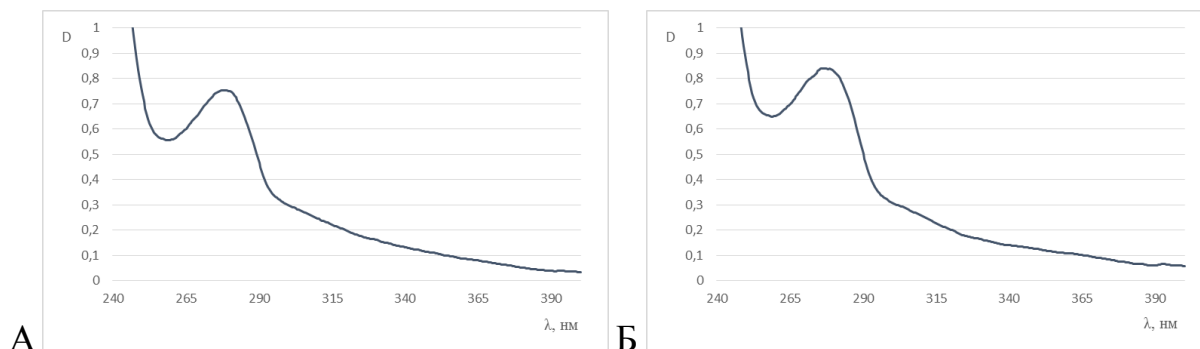


Рисунок 38 – Общий вид кривой поглощения водно-спиртовых извлечений из корневищ с корнями лапчатки белой (А) и корневищ с корнями лапчатки прямой (Б).

Спектроскопический анализ позволил подтвердить результаты анализа методом тонкослойной хроматографии. Разработанная методика спектроскопического анализа корневищ с корнями лапчатки белой была включена в проект ФС «Лапчатки белой корневища с корнями».

Разработанная методика спектроскопического анализа корневищ с корнями лапчатки прямой может быть включена в проект НД на сырье.

5.2. Разработка подходов к количественному анализу БАС в подземных органах представителей рода *Potentilla* L.

В рамках исследования оценивались образцы корневищ и корней лапчатки белой и лапчатки прямой, заготовленные на территории Самарской области в 2014-2016 гг.

Учитывая особенности химического состава подземных органов представителей рода Лапчатка, выявленные по результатам литературного обзора, в качестве метода количественного определения целесообразно использование метода, позволяющего производить пересчет на вещество

конденсированной группы – катехин. Кроме того, характер кривых поглощения водно-спиртовых извлечений из изучаемого сырья близок к таковому у раствора РСО катехина (рис. 38, рис. 39).

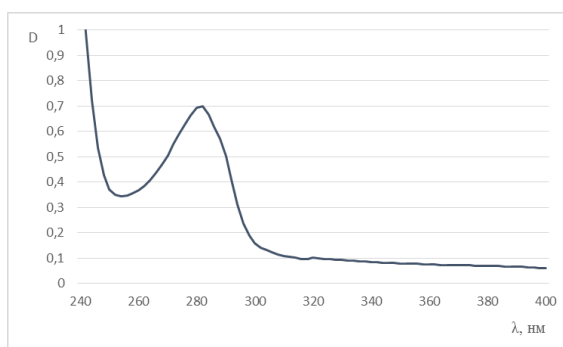


Рисунок 39 – УФ-спектр раствора РСО катехина.

Известные для некоторых видов растений методики количественного определения дубильных веществ в пересчете на катехин требуют доработки для возможности применения в анализе сырья представителей рода *Potentilla* L., а также для возможного упрощения текста методики [91, 106]. Так, нами предлагается использование 40% этилового спирта вместо 50% этилового спирта подкисленного, который применяется в оригинальной методике. Это связано с тем, что в ходе эксперимента было установлено, что количественное содержание дубильных веществ в зависимости от используемого растворителя варьирует незначительно. В ходе данного эксперимента нами были изучены следующие варианты: 40% спирт этиловый, 40% спирт этиловый подкисленный, 50% этиловый спирт и 50% спирт этиловый подкисленный.

Для расчетов был использован удельный показатель поглощения катехина $E_{1\text{см}}^{1\%} = 144$, использовавшийся ранее и подтвержденный в ходе настоящего исследования [91, 106].

Методика определения суммы дубильных веществ в корневищах и корнях лапчатки белой и лапчатки прямой (прямая спектрофотометрия).

Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья, проходящего через сито с диаметром отверстий 3 мм, переносят в термостойкую колбу с притертой

пробкой. В колбу к сырью прибавляют 50 мл 40% спирта этилового, колбу закрывают пробкой и взвешивают (погрешность $\pm 0,01$ г). К колбе подсоединяют обратный холодильник и, засекая 1 час с момента закипания экстрагента, нагревают на кипящей водяной бане. После этого содержимое колбы охлаждают, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 40% спиртом этиловым. Готовое извлечение фильтруют через бумажный фильтр, при этом первые 10 мл фильтрата отбрасывают (раствор А).

1 мл раствора А переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят объем раствора до метки 40% этиловым спиртом. Оптическую плотность измеряют при аналитической длине волны 282 нм.

Содержание дубильных веществ в пересчете на катехин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times 50 \times 50 \times 100}{144 \times m \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора А; 144 – удельный показатель поглощения катехина; m – масса сырья, г (точная навеска); W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы дубильных веществ в подземных органах лапчатки белой и лапчатки прямой методом прямой спектрофотометрии приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы дубильных веществ в подземных органах лапчатки белой и лапчатки прямой

ЛРС	N	F	$\bar{X}$	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta \bar{X}$	E, %
Корневища и корни	5	4	12,68	0,07196	0,268	95	2,78	$\pm 0,134$	$\pm 1,06$

лапчатки белой									
Корневища и корни лапчатки прямой	5	4	13,39	0,1232	0,351	95	2,78	$\pm 0,157$	$\pm 1,17$

Таким образом, предлагаемая методика количественного определения дубильных веществ отвечает параметрам валидации и может быть использована для оценки доброкачественности сырья «Лапчатки белой корневища и корни» и «Лапчатки прямой корневища и корни». Анализ корневищ и корней лапчатки белой, заготовленных на территории Самарской области, выявил, что среднее содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин составляет 12,68%. По результатам оценки содержания целевых БАС в корневищах и корнях лапчатки прямой установлено, что содержание дубильных веществ в пересчете на катехин в среднем составляет 13,39%. Полученные результаты позволили рекомендовать минимальное содержание дубильных веществ в корневищах и корнях лапчатки белой и в подземных органах лапчатки прямой в пересчете на катехин, которое должно составлять не менее 10%.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по следующим показателям: линейность, прецизионность, правильность. Линейность методики оценивали для серии растворов катехина (с концентрациями в диапазоне 0,02928 до 0,1171 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99997. Для установления прецизионности определяли содержание для пяти параллельных измерений. Правильность методики оценивали методом добавок путем добавления раствора катехина с известной концентрацией к исследуемому раствору. Открываемость находилась в пределах от 98% до 102%.

Дополнительно для оценки качества сырья лапчатки белой и лапчатки прямой нами предлагается оценка количественного содержания флавоноидов в сырье по разработанной методике дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид.

Методика определения суммы флавоноидов в корневищах и корнях лапчатки белой и лапчатки прямой в пересчете на цинарозид (дифференциальная спектрофотометрия).

Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья, проходящего через сито с диаметром отверстий 3 мм, переносят в термостойкую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл и добавляют 50 мл спирта этилового 40%. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. После чего колбу с подсоединенным обратным холодильником нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания экстрагента. Затем содержимое колбы остужают, взвешивают и доводят массу 40% спиртом этиловым до первоначальной. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, при этом первые 10 мл фильтрата отбрасывают (раствор А).

2 мл полученного раствора А переносят в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 4 мл 3% спиртового раствора алюминия (III) хлорида и доводят до метки спиртом этиловым 96%. Через 30 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 400 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведенного до метки 96% спиртом этиловым в мерной колбе на 25 мл.

В пересчете на цинарозид содержание суммы флавоноидов в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times 50 \times 25 \times 100}{323 \times m \times 1 \times 2 \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 323 – удельный показатель поглощения комплекса цинарозида с алюминия (III) хлоридом при $\lambda=400$ нм.

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в подземных органах лапчатки белой и лапчатки прямой методом дифференциальной спектрофотометрии указаны в таблице 9.

Таблица 9 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в подземных органах лапчатки белой и лапчатки прямой

ЛРС	N	F	$\bar{X}$	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
Корневища и корни лапчатки белой	5	4	0,04	0,0000232	0,004817	95	2,78	$\pm 0,002$	$\pm 5,10$
Корневища и корни лапчатки прямой	5	4	0,23	0,000136	0,001167	95	2,78	$\pm 0,006$	$\pm 2,29$

Следовательно, предложенная методика количественного определения флавоноидов отвечает параметрам валидации и может быть использована для оценки доброкачественности сырья «Лапчатки белой корневища и корни» и «Лапчатки прямой корневища и корни». Полученные результаты позволили рекомендовать минимальное содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид в корневищах и корнях лапчатки белой – не менее 0,03%, в подземных органах лапчатки прямой в пересчете на цинарозид – не менее 0,2%.

5.3. Числовые показатели для нового вида ЛРС «Лапчатки белой корневища и корни»

Для присвоения ЛРС статуса фармакопейного помимо методик качественного и количественного анализа необходимо обоснование числовых показателей для сырья [62, 33, 35]. Для корневищ и корней лапчатки белой нами разработаны числовые показатели, которые были включены в проект ФС на новый вид ЛРС.

Для цельного сырья рекомендуются следующие числовые показатели: содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин не менее 10%; влажность не более 12%; золы общей не более 5%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5%; кусочков листьев и стеблей не более 1%; органической примеси не более 0,5%; минеральной примеси не более 1%.

Для измельченного сырья рекомендуются следующие числовые показатели: содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин не менее 10%; влажность не более 12%; золы общей не более 5%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 5%; кусочков листьев и стеблей не более 1%; органической примеси не более 0,5%; минеральной примеси не более 1%.

Для порошка рекомендуются следующие числовые показатели: содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин не менее 10%; влажность не более 12%; золы общей не более 5%; золы, нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, не более 3%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 5%; минеральной примеси не более 1%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработана методика качественного анализа корневищ с корнями лапчатки белой и лапчатки прямой методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) с использованием стандартного образца катехина.

2. Определены характеристики кривой поглощения водно-спиртового извлечения из подземных органов лапчатки белой: максимум при длине волны 282 ± 2 нм и «плечо» в диапазоне 320-330 нм.

3. Определены характеристики УФ-спектра водно-спиртового извлечения из корневищ и с корнями лапчатки прямой: максимум при длине волны 282 ± 2 нм и протянутое «плечо» в диапазоне 330-370 нм. При добавлении раствора алюминия (III) хлорида спиртового фиксируется батохромный сдвиг.

4. С использованием разработанной методики прямого спектрофотометрического определения рассчитано суммарное содержание дубильных веществ в пересчете на катехин. Для сырья лапчатки белой, заготовленного на территории Самарской области, данный показатель варьирует от 12,4% до 14,2%. Полученные данные позволили рекомендовать нижний предел содержания дубильных веществ в доброкачественном сырье – не менее 10%.

5. По разработанной методике определено содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в подземных органах лапчатки прямой – от 11,8% до 13,8%. Показатель доброкачественности сырья «дубильных веществ в пересчете на катехин не менее 10%» может быть включен в проект нормативной документации на сырье.

6. Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в изучаемом сырье с использованием метода дифференциальной спектрофотометрии позволили рекомендовать нижний предел содержания флавоноидов для корневищ и корней лапчатки белой – не менее 0,03%, для корневищ и корней лапчатки прямой – не менее 0,2%.

7. Предложенные методики качественного и количественного анализа и числовые показатели для подземных органов лапчатки белой включены в проект ФС на новый предлагаемый вид ЛРС – «Лапчатки белой корневища и корни».

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК АНАЛИЗА ЛРП НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА

Основной группой биологически активных соединений в подземных органах представителей рода Лапчатка являются дубильные вещества конденсированной природы (катехины). Присутствием данной группы БАС объясняется антимикробное и противовоспалительное действие изучаемого сырья [12, 71, 84, 111, 114, 131, 146, 182, 183].

На сегодняшний день род *Potentilla* L. в Российской Федерации представлен лишь одним официальным видом – лапчаткой прямостоячей, которая применяется в качестве отвара [34, 41]. Ранее в качестве официального препарата использовалась также настойка лапчатки прямостоячей [37, 38]. На наш взгляд, целесообразным является создание новых лекарственных растительных препаратов на основе перспективных видов рода *Potentilla* L. – лапчатки белой и лапчатки прямой, а также расширение ассортимента препаратов на основе фармакопейного вида – лапчатки прямостоячей.

Принимая во внимание фармакологическое действие основной группы БАС, актуальным направлением является создание антибактериальных ЛРП на основе лапчатки и лапчатки прямой в виде настоек, которые могут применяться как самостоятельные ЛС, так и как компоненты других лекарственных форм [33, 69, 85, 134]. По результатам проведенного микробиологического анализа было установлено, что более выраженное антимикробное действие характерно для настоек, приготовленных на основе 40% этилового спирта (см. главу 7). В связи с этим настойки на основе спирта указанной концентрации предлагаются нами в качестве лекарственных препаратов.

Кроме того, интерес представляет лекарственная форма – сироп, которая широко используется в педиатрической практике [41, 58, 60, 61, 85, 125].

6.1. Обоснование состава, способа получения и подходов к стандартизации настоек из подземных органов представителей рода Лапчатка

Настойки – это жидкая ЛФ, которая представляет собой водно-спиртовые извлечения из ЛРС или сырья животного происхождения [33]. В рамках данной работы предложены настойки на 40% этиловом спирте из подземных органов представителей рода *Potentilla* L. – лапчатки белой и лапчатки прямой, которые могут быть использованы в качестве антибактериальных ЛРП.

6.1.1. Описание состава и способа получения настоек из изучаемого сырья лапчатки белой и лапчатки прямой

Настойки лапчатки белой и лапчатки прямой получали на основе спирта этилового 40% методом перколяции (см. главу 2). Настойки готовили в соотношении «сырье-извлечение» 1:5 в силу отсутствия сильнодействующих веществ в изучаемом сырье.

Полученные настойки представляют собой прозрачные или опалесцирующие жидкости красновато-коричневого цвета со специфическим запахом и горьковатым вкусом.

6.1.2. Разработка методик стандартизации настоек из подземных органов представителей рода *Potentilla* L.

Согласно требованиям ОФС для настоек регламентируются следующие показатели качества: плотность, содержание спирта, метанол и 2-пропанол, сухой остаток, тяжелые металлы и содержание действующих веществ [33, 36].

6.1.2.1. Числовые показатели настоек из корневищ и корней лапчатки белой и лапчатки прямой

Для настоек определяли следующие показатели: плотность, сухой остаток и тяжелые металлы [32, 33, 36]. Результаты количественного определения БАС в настойках приведены в п. 6.1.2.3.

Плотность настоек определяли и вычисляли по методике, указанной в Государственной фармакопее РФ XIII издания (том 2) [33]. Показатель «сухой остаток» оценивали по методике, описанной в ГФ СССР XI издания (вып. 2) и ГФ РФ XIII издания (том 2) [33, 36]. Испытания на тяжелые металлы осуществляли также по методике согласно ГФ СССР XI издания (вып. 2) и ГФ РФ XIII издания (том 2) [33, 36].

Таблица 10 – Числовые показатели образцов настоек лапчатки белой и лапчатки прямой

Показатель	Значение для настойки лапчатки белой (40% этиловый спирт)	Значение для настойки лапчатки прямой (40% этиловый спирт)
Плотность (г/см ³)	0,925±0,005	0,946±0,005
Сухой остаток	0,8-0,9%	0,8-0,9%
Тяжелые металлы	Не более 0,001%	Не более 0,001%

6.1.2.2. Подходы к качественному анализу полученных настоек

На сегодняшний день актуальным вопросом является преемственность стандартизации ЛРП в ряду сырье – субстанция – препарат [110, 111]. Таким образом, методики, используемые для стандартизации лекарственного растительного сырья, следует адаптировать для анализа препаратов на его основе.

Качественный анализ настоек, полученных на основе подземных органов лапчатки белой и подземных органов лапчатки прямой на 40%

этиловом спирте, осуществляли методом тонкослойной хроматографии в условиях, подобранных для изучаемого сырья.

На предварительно активированную хроматографическую пластинку наносили образцы настоек, полученных из корневищ с корнями лапчатки белой и корневищ с корнями лапчатки прямой на 40% спирте этиловом. В качестве вещества-свидетеля использовали РСО катехина, дополнительно наносили также извлечения из подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой. Для разделения использовали систему *n*-бутанол – уксусная кислота – вода в соотношении растворителей 4:1:2.

После прохождения фронтом растворителя около 7-8 см пластинку доставали из камеры и высушивали. Хроматограмму визуально оценивали при дневном свете, а также в УФ-свете при длинах волн 366 нм и 254 нм. Дополнительно пластинку обрабатывали пластинки щелочным раствором спиртовым раствором хлорида железа (III).

На хроматограмме настоек подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой обнаруживались зоны с R_f около 0,77, характерные для извлечений из исследуемого сырья и соответствующие по подвижности РСО катехина. Для настойки лапчатки белой выявлялась также характерная зона второго доминирующего вещества с $R_f=0,5$. Аналогичная зона характерна и для извлечения из корневищ с корнями лапчатки белой.

В качестве второго метода для определения подлинности сырья была предложена УФ-спектроскопия. Для образцов настоек были получены электронные спектры поглощения по следующей методике.

2 мл изучаемой настойки из корневищ с корнями лапчатки белой (или лапчатки прямой) помещали в мерную колбу на 50 мл и доводили до метки 40% этиловым спиртом (раствора А). 1 мл раствора А переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили объем до метки спиртом этиловым 40% (раствор Б). Электронный спектр полученного раствора Б снимали на фоне 40% спирта этилового. Полученные кривые поглощения настоек лапчатки белой и

лапчатки прямой соответствуют таковым у извлечений из подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой (рис. 40).

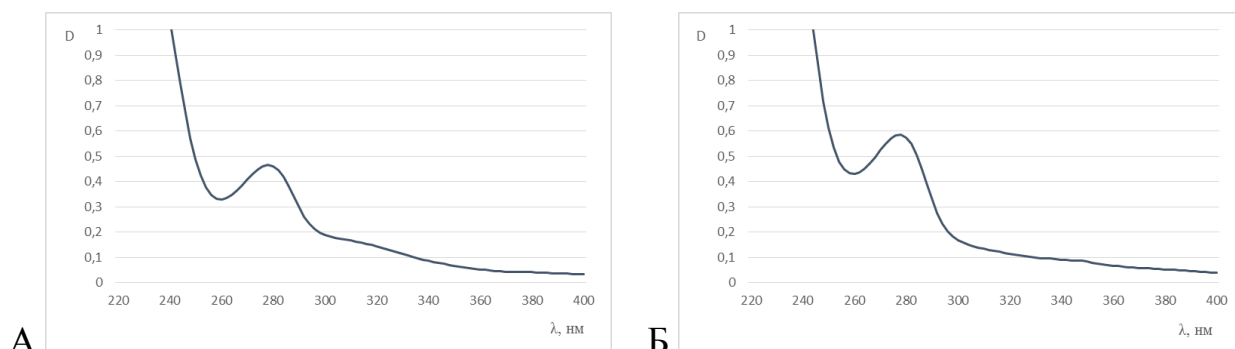


Рисунок 40 – Кривые поглощения образцов настойки из подземных органов лапчатки белой на 40% этиловом спирте (А) и настойки из подземных органов лапчатки прямой на 40% этиловом спирте (Б).

Для УФ-спектров настоек лапчатки белой отмечается наличие максимума при длине волны 282 ± 2 нм, а также «плеча» в диапазоне 310-320 нм (рис. 40, А). На кривых поглощения настойки лапчатки прямой также имеется максимум при 282 ± 2 нм и протянутое «плечо» в диапазоне 310-340 нм (рис. 40, Б).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода УФ-спектроскопии для целей стандартизации сырья изучаемых представителей рода Лапчатка.

6.1.2.3. Оценка количественного содержания фенольных соединений в образцах настоек представителей рода Лапчатка

Количественное определение суммарного содержания дубильных веществ в настойках осуществляли методом прямой спектрофотометрии с пересчетом на катехин. Методика, описанная ранее для сырья (см. главу 5), была адаптирована для ЛФ – настойки.

Методика определения суммы дубильных веществ в настойках лапчатки белой и лапчатки прямой (прямая спектрофотометрия).

2 мл настойки лапчатки белой или лапчатки прямой, полученные на спирте этиловом 40%, переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят 40% этиловым спиртом до метки (раствор А). 1 мл полученного раствора А переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем до метки 40% спиртом этиловым (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют в кювете с толщиной слоя 10 мм на фоне спирта этилового 40%.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в 1 мл настойки в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times 50 \times 25}{144 \times 2 \times 1},$$

где D – оптическая плотность раствора Б при 282 нм; 144 – удельный показатель поглощения катехина.

Результаты количественной оценки содержания дубильных веществ в настойках лапчатки белой и лапчатки прямой представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы дубильных веществ в настойках на основе подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой

ЛРП	N	f	$\bar{X}$	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
Настойка лапчатки белой	5	4	2,05	0,00307	0,05541	95	2,78	$\pm 0,025$	$\pm 1,21$
Настойка лапчатки прямой	5	4	2,51	0,00402	0,0634	95	2,78	$\pm 0,032$	$\pm 1,26$

Результаты статистической обработки результатов количественного определения дубильных веществ в настойках лапчатки белой и лапчатки прямой указывают на то, что с доверительной вероятностью 95% ошибка

определения (единичного) достигает соответственно не более $\pm 1,21\%$ и $\pm 1,26\%$ при использовании метода прямой спектрофотометрии в пересчете на катехин.

Таким образом, в соответствии с полученными результатами суммарное содержание дубильных веществ в пересчете на катехин в настойке из корневищ с корнями лапчатки белой на 40% этиловом спирте должно составлять не менее 2,0%. Содержание дубильных веществ в пересчете на катехин в настойке из корневищ с корнями лапчатки прямой на 40% этиловом спирте должно составлять не менее 2,5%.

6.2. Обоснование состава, способа получения и подходов к стандартизации сиропов из подземных органов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой

В рамках данной работы были разработаны препараты «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп» – сорбитные сиропы, содержащие в качестве действующих компонентов извлечения из подземной части представителей рода *Potentilla* L. Предполагается использование данных препаратов в качестве антибактериальных средств. При этом препарат «Лапчатки прямостоячей сироп» позволит расширить ассортимент препаратов на основе официального сырья – корневищ лапчатки прямостоячей.

6.2.1. Составы и способы получения сиропов из подземных органов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой

Согласно определению, приведенному в ГФ РФ XIII издания, сиропы – это жидкая ЛФ для приема внутрь, обычно представляющая собой концентрированный раствор различных сахаров, содержащий действующие и вспомогательные вещества [33]. Использование данной лекарственной формы позволяет решить вопрос коррекции вкусовых характеристик препарата, что является преимуществом при использовании в

педиатрической практике [58, 60, 61, 85, 116, 125]. Кроме того, возможно применение сиропов у пациентов, страдающих сахарным диабетом, в случае использования сорбита или фруктозы в качестве основы [60, 61, 125].

Существует два варианта технологии приготовления лекарственных сиропов на основе ЛРС: путем растворения сахара в извлечениях из сырья и путем добавления к готовому сахарному сиропу настоек, экстрактов и др. [19, 33, 36, 85, 87, 125, 134].

Сироп на основе фармакопейного сырья (корневища лапчатки прямостоячей – *Potentilla erecta* L.) готовился путем добавления настойки лапчатки прямостоячей на 40% этиловом спирте к готовому сорбитному сиропу в количестве, составляющем 5% от массы сиропа. Сироп на основе лапчатки белой готовился путем растворения сорбита в водном извлечении из корней и корневищ лапчатки белой (отвар был приготовлен в соотношении 1:5). Выбор технологии сиропов обусловлен результатами микробиологических исследований водных и водно-спиртовых извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка – наибольшая активность для извлечений из подземных органов лапчатки прямостоячей характерна для настойки на 40% этиловом спирте, для извлечений из корневищ и корней лапчатки белой – для отвара (см. главу 7).

6.2.2. Подходы к стандартизации сиропа лапчатки прямостоячей и сиропа лапчатки белой

С целью сохранения преемственности в вопросах стандартизации в ряду ЛРС – субстанция – препарат методики, разработанные для анализа сырья и настоек представителей рода Лапчатка, были адаптированы для стандартизации сиропов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой [110].

6.2.2.1. Числовые показатели полученных сиропов

Государственная фармакопея РФ XIII издания устанавливает для сиропов следующие показатели как маркеры качества препарата: органолептические свойства, плотность и pH [33] (табл. 12).

Таблица 12 – Числовые показатели сиропов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой

Показатель	Препарат «Лапчатки прямостоячей сироп»	Препарат «Лапчатки белой сироп»
Плотность (г/см ³)	1,18±0,005	1,24±0,005
pH	5,0±0,1	5,1±0,1

6.2.2.2. Подходы к качественному анализу сиропов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой

Для качественного анализа разработанных сиропов использовали метод хроматографии в тонком слое сорбента. Для анализа использовали предварительно активированные хроматографические пластинки. До нанесения на пластинку образцов сиропов осуществляли пробоподготовку, которая была разработана ранее для сиропов, содержащих в качестве действующих веществ гидроксикоричные кислоты [19]. Для этого 5 мл сиропа переносили в делительную воронку, добавляли 1 каплю ледяной уксусной кислоты. После этого перемешивали, прибавляли 5 мл ацетона и экстрагировали десять минут. Затем органический слой количественно отделяли и упаривали. Полученный сухой остаток растворяли в 0,5 мл 96% спирта этилового. 0,05 мл полученного раствора микропипеткой наносили на линию старта пластинки, в качестве вещества-свидетеля использовали РСО катехина. Хроматографирование осуществляли восходящим способом в системе растворителей *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2). После прохождения фронтом растворителя 7-8 см пластинку доставали из

камеры и высушивали. Хроматограмму визуально оценивали при дневном свете, а также в УФ-свете при длинах волн 366 нм и 254 нм. Дополнительно пластинку обрабатывали щелочным раствором спиртовым раствором хлорида железа (III) (рис. 41).

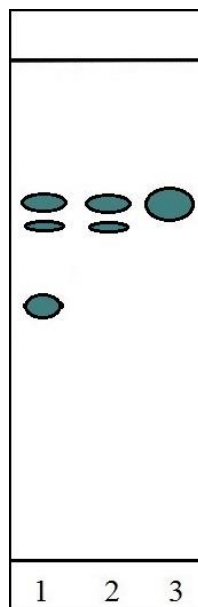


Рисунок 41 – Схема хроматограммы сиропов из корневищ с корнями лапчатки белой и лапчатки прямостоячей. Система *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2). Обработка спиртовым раствором хлорида железа (III). Обозначения: 1 – сироп из корневищ с корнями лапчатки белой; 2 – сироп из корневищ с корнями лапчатки прямостоячей; 3 – РСО катехина.

Во всех изучаемых образцах – и в сиропе лапчатки прямостоячей, и в сиропе лапчатки белой – обнаруживается доминирующая зона с $R_f=0,77$ на уровне РСО катехина. Для сиропа лапчатки белой отмечается также зона с $R_f=0,5$, присутствующая также в сырье и настойках лапчатки белой.

Таким образом, можно сделать вывод, что пробоподготовка, разработанная для сиропов, содержащих гидроксикоричные кислоты [19], применима и для сиропов, приготовленных на основе сырья представителей рода Лапчатка.

Дополнительно определяли спектральный профиль полученных сиропов по следующим методикам. 5 мл сиропа из корневищ лапчатки

прямостоячей помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили водой очищенной до метки (раствор А). 2 мл полученного раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки 40% этиловым спиртом (раствор Б).

5 мл сиропа из корневищ и корней лапчатки белой помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили водой очищенной до метки (раствор А). 1 мл полученного раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки 40% этиловым спиртом (раствор Б).

УФ-спектр полученных растворов Б фиксировали на сканирующем спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) на фоне 40% этилового спирта.

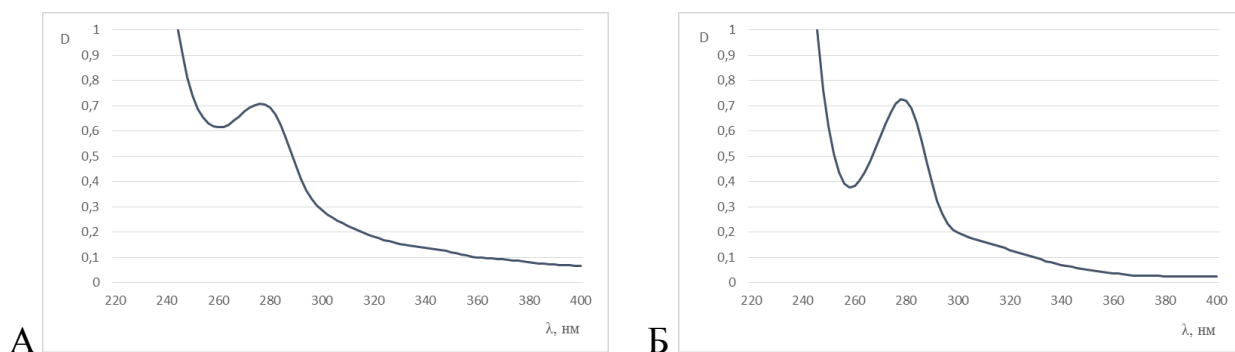


Рисунок 42 – Общий вид УФ-спектров образцов сиропа из подземных органов лапчатки прямостоячей (А) и сиропа из подземных органов лапчатки белой (Б).

Кривые поглощения сиропов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой имеют максимум при 282 ± 2 нм (рис. 42). УФ-спектр поглощения сиропа из корневищ лапчатки прямостоячей визуально соответствует ранее полученному спектру из сырья (см. главу 4). Для сиропа лапчатки белой отмечается также наличие «плеча» в диапазоне 310-320 нм (рис. 42, Б). Полученные спектральные характеристики сиропа лапчатки прямостоячей сопоставимы с результатами фитохимического исследования сырья (см. главу 4), а результаты УФ-спектроскопии сиропа из корневищ с корнями

лапчатки белой соответствуют таковым для исходного сырья и настойки лапчатки белой.

Таким образом, УФ-спектроскопический метод оценки подлинности сырья соответствует требованию преимущества в ряду лекарственных растительное сырье – субстанция – препарат и может быть использован для анализа полученных лекарственных препаратов – «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп».

6.2.2.3. Подходы к количественному анализу сиропа лапчатки прямостоячей и сиропа лапчатки белой

Количественное определение суммарного содержания дубильных веществ осуществляли методом прямой спектрофотометрии с пересчетом на катехин с использованием методики, адаптированной для данной ЛФ.

Методика определения суммы дубильных веществ в сиропах лапчатки прямостоячей и лапчатки белой (прямая спектрофотометрия).

5 мл 5% сиропа из корневищ лапчатки прямостоячей помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят водой очищенной до метки (раствор А). 2 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 40% этиловым спиртом (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора Б измеряют в кювете с толщиной слоя 10 мм на фоне 40% спирта этилового.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в 1 мл сиропа лапчатки прямостоячей в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 25}{144 \times 5 \times 2},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора Б при 282 нм; 144 – удельный показатель поглощения катехина.

5 мл сиропа из корневищ и корней лапчатки белой, приготовленного на основе водного извлечения 1:5, помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят водой очищенной до метки (раствор А). 1 мл полученного раствора

А переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 40% этиловым спиртом (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора Б измеряют в кювете с толщиной слоя 10 мм на фоне 40% спирта этилового.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин в 1 мл сиропа лапчатки белой в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 25}{144 \times 5 \times 1},$$

где D – оптическая плотность раствора Б при 282 нм; 144 – удельный показатель поглощения катехина.

Результаты количественной оценки содержания дубильных веществ в сиропе лапчатки прямостоячей и сиропе лапчатки белой представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы дубильных веществ в сиропах на основе подземных органов лапчатки прямостоячей и лапчатки белой

ЛРП	N	F	$\bar{X}$	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta \bar{X}$	E, %
Лапчатки прямостоячей сироп	5	4	0,30	0,00057	0,02387	95	2,78	$\pm 0,012$	$\pm 3,95$
Лапчатки белой сироп	5	4	0,60	0,00232	0,04817	95	2,78	$\pm 0,022$	$\pm 3,57$

Таким образом, в соответствии с полученными результатами суммарное содержание дубильных веществ в 5% сиропе из корневищ лапчатки прямостоячей должно составлять не менее 0,2%. Содержание дубильных веществ в сиропе из корневищ с корнями лапчатки белой должно составлять не менее 0,5%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Обоснованы составы настоек корневищ с корнями лапчатки белой и корневищ с корнями лапчатки прямой и разработаны методики качественного и количественного анализа полученных настоек.

2. Рекомендуемое содержание дубильных веществ в пересчете на катехин в настойке лапчатки белой должно составлять не менее 2,0%. Рекомендуемый предел содержания дубильных веществ в пересчете на катехин для настойки лапчатки прямой составляет – не менее 2,5%.

3. Обоснованы способ получения и составы сиропа корневищ лапчатки прямостоячей и сиропа корневищ с корнями лапчатки белой. Разработаны методики качественного и количественного анализа полученных сиропов.

4. Рекомендуемое содержание дубильных веществ в пересчете на катехин в препарате «Лапчатки прямостоячей сироп» должно составлять не менее 0,2%. Рекомендуемое суммарное содержание дубильных веществ в пересчете на катехин в препарате «Лапчатки белой сироп» должно составлять не менее 0,5%.

ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ И ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛАПЧАТКА

7.1. Изучение острой токсичности водных и водно-спиртовых извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка

Расширение ассортимента лекарственного растительного сырья – актуальная задача современной фармакогнозии. Для введения новых официальных видов рода *Potentilla* L. целесообразно изучение их токсичности по сравнению с фармакопейным видом – лапчаткой прямостоячей. Исследованию подверглись водные и водно-спиртовые (на 40% этиловом спирте) извлечения из подземных органов лапчатки прямостоячей, лапчатки белой и лапчатки прямой. Исследование проводилось по методике, описанной в главе 2 «Объекты и методы исследования».

В ходе исследования острой токсичности извлечений из подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой летальных исходов зафиксировано не было, как и в случае с фармакопейным видом – лапчаткой прямостоячей. За все время наблюдения отклонений в поведении, массе тела, внешнем виде контрольных и опытных животных не отмечалось. На протяжении всего эксперимента вес животных из опытных групп не имел достоверных отличий от веса животных из контрольных групп. Однократное внутрижелудочное введение водных извлечений в дозе 30 мл/кг не привело к гибели животных. Однократное внутрижелудочное введение водно-спиртовых извлечений в дозе 7,5 мл/кг на фоне 3% водной нагрузки также не привело к гибели животных.

Таким образом, установлено и подтверждено, что исследуемые образцы извлечений из подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой относятся к IV классу токсичности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76, как и извлечения из корневищ лапчатки прямостоячей [21, 27].

7.2. Скрининговый анализ антимикробной активности извлечений из подземных органов видов рода *Potentilla* L.

Согласно литературным данным извлечения из корневищ и корней представителей рода Лапчатка обладают антимикробной и противовоспалительной активностью, что связывают с высоким содержанием фенольных соединений в сырье. Исследованию подвергались водные и водно-спиртовые (на 40% и 70% этиловом спирте) извлечения из подземных органов трех представителей рода *Potentilla* L. – лапчатки прямостоячей, лапчатки белой и лапчатки прямой. Анализ антимикробной активности осуществляли согласно методике, указанной в главе 2.

7.2.1. Изучение антимикробной активности водных извлечений из подземных органов представителей рода Лапчатка

В серии экспериментов с водными извлечениями препаратом сравнения являлась вода очищенная, не обладающая антимикробным действием.

Проведенный анализ позволил установить, что отвар из подземных органов лапчатки прямостоячей (фармакопейный вид) не проявляет антибактериального эффекта в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Bacillus cereus*. При этом следует отметить, что водное извлечение из корневищ *Potentilla erecta* L. оказывает антимикробное действие в отношении *Staphylococcus aureus* вплоть до разведения в 32 раза и *Candida albicans* – в 8 раз. При дальнейшем разведении препарата начинается рост изучаемых микроорганизмов (табл. 14).

Таблица 14 – Результаты исследования антимикробной активности водного извлечения из корневищ лапчатки прямостоячей (1:10)

Изучаемый штамм	Номер разведения по порядку											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Для отвара из корневищ и корней лапчатки прямой наблюдалась антимикробную активность в отношении всех тестируемых штаммов, кроме кишечной палочки. Исследование позволило установить, что водное извлечение из подземных органов *Potentilla recta* L. проявляет активность в отношении штамма *Candida albicans* при разведении в 2 раза, штамма *Pseudomonas aeruginosa* – при разведении в 2 и 4 раза и штамма *Bacillus cereus* – при разведении в 2, 4 и 8 раз (табл. 3). Максимальная ингибирующая активность отвара лапчатки прямой отмечалась в случае штамма *Staphylococcus aureus* (антибактериальная активность сохранялась вплоть до разведения в 16 раз). Дальнейшее разведение приводило к росту изучаемых штаммов (табл. 16).

Таблица 16 – Результаты исследования антимикробной активности водного извлечения из корневищ и корней лапчатки прямой (1:10)

Изучаемый штамм	Номер разведения по порядку											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

При рассмотрении противомикробной активности изученных водных извлечений в сравнительном аспекте выявлено, что отвар лапчатки белой обладает самым широким спектром антимикробного действия. Только для водного извлечения из корневищ и корней лапчатки белой отмечается ингибирующая активность в отношении *Escherichia coli*. Также для *Potentilla alba* L. выявлена наибольшая антибактериальная активность в отношении

штамма *Bacillus cereus*. Отвар лапчатки прямой проявляет антибактериальную активность в отношении всех изученных штаммов, кроме штамма *Escherichia coli*. Для водного извлечения из корневищ лапчатки прямостоячей отмечается самый узкий спектр действия: антимикробная активность только относительно *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* (рис. 43).

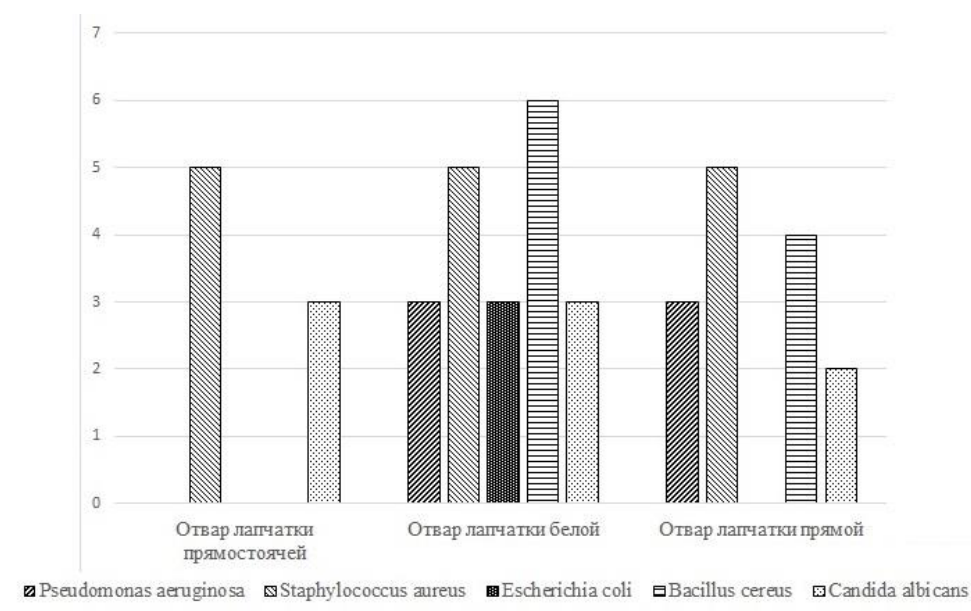


Рисунок 43 – Сравнительная диаграмма антимикробной активности отваров из подземных органов представителей рода Лапчатка (по оси ординат – порядковый номер разведения)

Таким образом, для отваров из подземных органов представителей рода *Potentilla* L. *in vitro* выявлена антимикробная активность в отношении пяти патогенных штаммов микроорганизмов. Анализ позволил установить, что самым широким спектром антибактериальной активности среди водных извлечений обладает отвар лапчатки белой. При этом для сырья фармакопейного вида – *Potentilla erecta* L. характерно антибактериальное действие только в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Водное извлечение из корневищ и корней *Potentilla recta* L. подавляет рост всех тестируемых микроорганизмов, кроме штамма

Таблица 18 – Результаты исследования антимикробной активности 70% этилового спирта

Изучаемый штамм	Номер разведения по порядку											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Анализ позволил установить, что настойка лапчатки прямостоячей на 40% этиловом спирте оказывает антибактериальное действие относительно всех тестируемых штаммов. При этом ее антимикробное действие в отношении штамма *Escherichia coli* не отличается от такового у спирта этилового 40% (табл. 17, табл. 19). В отношении остальных изучаемых штаммов активность при дальнейшем разведении сохраняется и превышает таковую у спирта этилового соответствующей концентрации. С разведения №5 отмечался рост всех изучаемых штаммов (табл. 19).

Настойка из корневищ лапчатки прямостоячей, полученная на 70% этиловом спирте, подавляет рост только двух штаммов: *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Противогрибковая активность извлечения не отличается от таковой у спирта этилового в концентрации 70% (табл. 18, табл. 20). Антибактериальная активность в отношении штамма *Staphylococcus aureus* сохраняется до разведения в 2 и 4 раза, данный результат в три раза превышает активность спирта этилового 70% (табл. 18, табл. 20).

Таблица 19 – Результаты исследования антимикробной активности настойки корневищ лапчатки прямостоячей (40% этиловый спирт)

Изучаемый штамм	Номер разведения по порядку											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 20 – Результаты исследования антимикробной активности настойки корневищ лапчатки прямостоячей (70% этиловый спирт)

Изучаемый штамм	Номер разведения по порядку											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Микробиологический анализ водно-спиртовых извлечений из корневищ и корней лапчатки белой позволил установить, что активность настойки лапчатки белой, полученной на 40% этиловом спирте, превосходит активность спирта этилового 40% лишь в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus cereus* (табл. 17, табл. 21). При этом настойка *Potentilla*

[illegible][illegible]

<i>Candida albicans</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Анализ настойки *Potentilla recta* L. на 40% этиловом спирте позволил установить высокую антибактериальную активность препарата в отношении всех изучаемых штаммов, кроме *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 23). При этом выявленный эффект значительно превышает таковой у спирта этилового 40% (табл. 17).

Анализ настойки лапчатки прямой на 70% этиловом спирте позволил выявить, что указанный препарат подавляет рост *Staphylococcus aureus* при разведении в 2 и 4 раза (табл. 24). Данный результат в три раза превышает активность спирта этилового 70% (табл. 18). Антимикробная активность в отношении штаммов *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* не превышает таковую у спирта этилового 70% (табл. 18, табл. 24). В отношении штамма *Bacillus cereus* активность настойки лапчатки прямой не отмечено (табл. 24).

Таблица 23 – Результаты исследования антимикробной активности настойки корневищ и корней лапчатки прямой (40% этиловый спирт)

Изучаемый штамм	Номер разведения по порядку											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+

Таблица 24 – Результаты исследования антимикробной активности настойки корневищ и корней лапчатки прямой (70% этиловый спирт)

Изучаемый штамм	Номер разведения по порядку											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таким образом, для настоек из подземных органов представителей рода Лапчатка выявлена антимикробная активность *in vitro*. Следует отметить, что настойки *Potentilla erecta* L. и *Potentilla alba* L., полученные на основе 40% этилового спирта, подавляют рост всех тестируемых микроорганизмов при различных разведениях. При этом активность настойки лапчатки прямостоячей превышает активность препарата сравнения (40% этилового спирта) в отношении всех изучаемых штаммов, кроме *Escherichia coli*. Антибактериальный эффект настойки из корневищ и корней лапчатки белой превосходит по активности спирт этиловый 40% только в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus cereus*. Настойка *Potentilla recta* L. на 40% этиловом спирте не проявляет эффекта в отношении штамма *Pseudomonas aeruginosa*, но относительно других изучаемых штаммов антибактериальная активность указанной настойки превышает активность как препарата сравнения, так и настоек других видов (рис. 44).

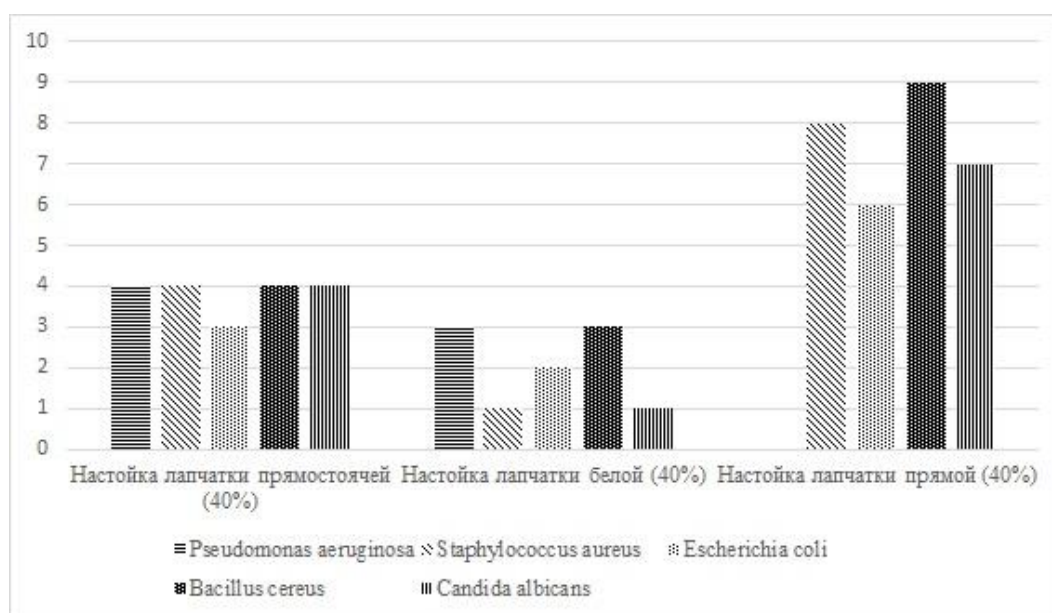


Рисунок 44 – Сравнительная диаграмма антимикробной активности настоек на 40% этиловом спирте из подземных органов представителей рода Лапчатка (по оси ординат – порядковый номер разведения)

По результатам анализа установлено, что настойки из подземных органов видов рода *Potentilla*, полученные на основе 70% этилового спирта, не проявляют антимикробного действия в отношении ряда тестируемых штаммов. При этом активность изучаемых настоек превосходит таковую препарата сравнения только в отношении штамма *Staphylococcus aureus* (рис. 45).

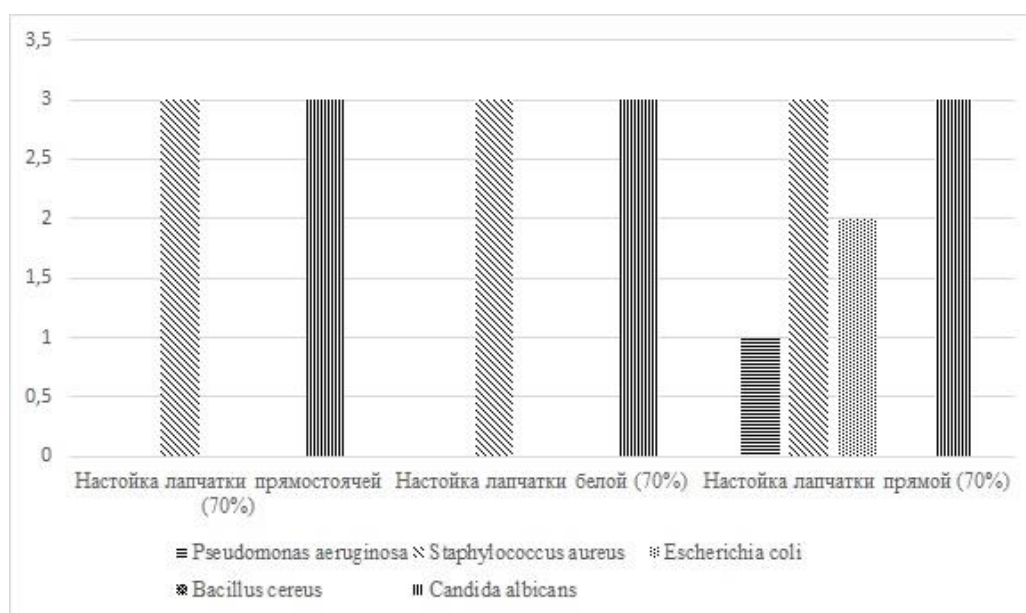


Рисунок 45 – Сравнительная диаграмма антимикробной активности настоек на 70% этиловом спирте из подземных органов представителей рода Лапчатка (по оси ординат – порядковый номер разведения)

На наш взгляд, обнаруженная антимикробная активность водно-спиртовых извлечений из сырья представителей рода Лапчатка может объясняться высоким содержанием в сырье фенольных соединений, более полно извлекаемых этиловым спиртом в концентрации 40%, в связи с чем извлечения на основе 70% этанола проявляют меньшую активность.

Следует отметить, что для лапчатки прямостоячей и лапчатки прямой зафиксирована более высокая активность водно-спиртового извлечения на 40% этиловом спирте, тогда как для лапчатки белой отмечается более выраженная противомикробная активность отвара.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7

По результатам фармакологических и микробиологических исследований извлечений из подземных органов некоторых представителей рода Лапчатка можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что водные и водно-спиртовые извлечения из корневищ и корней лапчатки белой, лапчатки прямой и корневищ лапчатки прямостоячей, относятся к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

2. Для отваров из подземных органов видов рода *Potentilla* L. наиболее широкий спектр антимикробной активности установлен для лапчатки белой. Водное извлечение из корневищ и корней лапчатки прямой обладает противомикробным действием относительно всех изучаемых штаммов, кроме *Escherichia coli*. Водное извлечение из подземных органов фармакопейного вида *Potentilla erecta* L. активно только в отношении двух изучаемых штаммов – *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

3. Для настоек лапчатки прямостоячей, лапчатки белой и лапчатки прямой, полученных на 40% этиловом спирте, установлено антимикробное действие в отношении всех изучаемых микроорганизмов. При этом активность настойки лапчатки прямостоячей превышает таковую у препарата сравнения в отношении всех тестируемых микроорганизмов, кроме штамма *Escherichia coli*. Противомикробное действие настойки лапчатки белой на 40% этиловом спирте превосходит таковую у препарата сравнения лишь в отношении микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus cereus*. Антимикробная активность настойки лапчатки прямой на 40% этиловом спирте превосходит таковую как у препарата сравнения, так и у настоек двух других видов рода Лапчатка в отношении четырех изучаемых штаммов: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*.

4. Установлено, что противомикробная активность настоек на 70% этиловом спирте из подземных органов каждого из трех изученных представителей рода *Potentilla* L. превышает таковую у препарата сравнения (этиловый спирт 70%) лишь относительно штамма *Staphylococcus aureus*.

Относительно других изучаемых штаммов противомикробная активность либо не выявлена, либо уступает таковой у спирта этилового 70%.

5. Результаты микробиологического исследования свидетельствуют о целесообразности применения в медицинской практике новых видов лекарственного растительного сырья – подземных органов представителей рода Лапчатка в качестве источника антимикробных ЛРП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Лапчатка (*Potentilla* L.) позволило сделать следующие **общие выводы:**

1. Макроскопический анализ подземных органов лапчатки, белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой позволил установить, что морфологических признаков недостаточно для диагностики данных видов рода Лапчатка. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование трех представителей рода *Potentilla* L. позволило выявить признаки, на которые следует обращать внимание при диагностике данных видов: особенность локализации ксилемы в корнях лапчатки белой, лапчатки прямой и лапчатки серебристой; тип строения корневища, степень визуализации камбиальной зоны и характер крахмальных включений.

2. Проведено предварительное сравнительное фитохимическое исследование трех представителей рода Лапчатка: лапчатки прямостоячей, лапчатки белой и лапчатки прямой. Выявлено наличие дубильных веществ, флавоноидов и стеринных соединений в сырье. Из корневищ с корнями лапчатки белой с использованием хроматографических, спектральных и химических методов впервые выделены в индивидуальном виде и идентифицированы 3-О-β-D-глюкопиранозид катехина и 7-О-β-D-глюкопиранозид катехина, а также катехин, β-ситостерин, даукостерин и торментоловая кислота.

3. Разработана методика качественного анализа сырья лапчатки белой и лапчатки прямой методом тонкослойной хроматографии с использованием катехина в качестве стандартного образца. Для оценки подлинности корневищ с корнями лапчатки белой и корневищ с корнями лапчатки прямой может также использоваться УФ-спектроскопия. Кривая поглощения водно-спиртового извлечения из корневищ с корнями лапчатки белой имеет максимум при 282 ± 2 нм, а также «плечо» в диапазоне 310-320 нм. Спектр поглощения водно-спиртового извлечения из корневищ с

корнями лапчатки прямой имеет аналогичный максимум при 282 ± 2 нм, а также протянутое «плечо» в диапазоне 330-370 нм.

4. Обоснована целесообразность использования РСО катехина для количественного анализа подземных органов лапчатки белой и лапчатки прямой методом прямой спектрофотометрии в пересчете на катехин при аналитической длине волны 282 нм и определены показатели качества изучаемого сырья. Содержание дубильных веществ в доброкачественном сырье лапчатки белой должно составлять не менее 10%. Содержание дубильных веществ в доброкачественном сырье лапчатки прямой должно составлять не менее 10%.

5. Предложена методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в подземных органах лапчатки белой и лапчатки прямой методом дифференциальной спектрофотометрии. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в доброкачественном сырье лапчатки белой должно составлять не менее 0,03%. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в доброкачественном сырье лапчатки прямой должно составлять не менее 0,2%.

6. Обоснованы состав и технология получения лекарственных препаратов на основе корневищ и корней некоторых представителей рода Лапчатка – «Лапчатки белой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка»; «Лапчатки прямостоячей сироп»; «Лапчатки белой сироп».

7. Разработаны и апробированы методики качественного и количественного анализа лекарственных препаратов на основе подземных органов разных представителей рода *Potentilla* L. – «Лапчатки белой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп».

8. Определены показатели качества разработанных лекарственных препаратов – «Лапчатки белой корневищ и корней настойка», «Лапчатки

прямой корневищ и корней настойка», «Лапчатки прямостоячей сироп» и «Лапчатки белой сироп». Определено, что содержание дубильных веществ в разработанных препаратах должно быть не менее 2,0% для настойки лапчатки белой и не менее 2,5% для настойки лапчатки прямой. Для сиропов установлены следующие показатели: не менее 0,2% дубильных веществ в пересчете на катехин для сиропа из корневищ лапчатки прямостоячей и не менее 0,5% дубильных веществ в пересчете на катехин для сиропа из корневищ с корнями лапчатки белой.

9. По результатам изучения острой токсичности извлечений из исследуемого сырья подтверждено, что водные и водно-спиртовые извлечения относятся к IV классу токсичности (малоопасные вещества). По результатам микробиологического исследования отваров из подземных органов представителей рода Лапчатка выявлено, что наиболее широким спектром активности обладает извлечение из сырья лапчатки белой (подавляет рост всех изученных штаммов). Наибольшую антимикробную активность из водно-спиртовых извлечений на 40% этиловом спирте проявляет настойка из корневищ с корнями лапчатки прямой, которая не оказывает антибактериальное действие в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, однако в отношении других изучаемых штаммов ее активность превышает другие изученные настойки и препарат сравнения – спирт этиловый 40%. Настойки на 70% этиловом спирте не проявляют активность в отношении ряда изучаемых штаммов микроорганизмов, антимикробная активность данных настоек превосходит таковую спирта этилового 70% только в отношении штамма *Staphylococcus aureus*.

10. В соответствии с результатами фармакогностических исследований разработан проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья – «Лапчатки белой корневища и корни».

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья,

содержащего дубильные вещества и флавоноиды, и могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии в том числе с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих дубильные вещества и флавоноиды, а также разработки актуальных методик анализа и подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов. Кроме того, перспективным является исследование надземной части представителей рода *Potentilla* L., как возможного перспективного вида лекарственного растительного сырья.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активные соединения

ГФ – Государственная Фармакопея

ДСК – диазобензолсульфокислота

НД – нормативная документация

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

ОФС – общая фармакопейная статья

РСО – рабочий стандартный образец

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

ФС – фармакопейная статья

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкафарова, Э.Р. Исследование жирных кислот травы лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) / Э.Р. Абдулкафарова, А.М. Ковалева, Т.В. Ильина // GISAP. Medical science, pharmacology. – 2013. – С.66-67.
2. Абдуллина, С.Г. Кулонометрическое определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / С.Г. Абдуллина, Н.М. Агапова, Г.К. Зиятдинова, Р.Ш. Хазиев, С.А. Сидуллина, Г.К. Будников // Фармация. – 2010. – № 4. – С. 13-15.
3. Андрукович, А.И. О лечении хронических гепатитов и циррозов печени отваром дикорастущей лапчатки прямостоячей / А.И. Андрукович // Ученые записки кафедры медподготовки. – 1969. – Сбор. 45. – Вып. 1. – С. 2-9.
4. Андрукович, А.И. О применении отвара лапчатки прямостоячей для лечения гепатитов и циррозов печени / А.И. Андрукович // Материалы 1-го съезда терапевтов Тюменской области. – 1970. – С. 48-50.
5. Архипова, Э.В. Влияние экстракта *Potentilla alba* L. и комплексного средства «Тиреотон» на течение экспериментального гипотиреоза: автореф. ...канд. мед. наук: 14.03.06 / Архипова Эржена Владимировна. – Улан-Удэ, 2012. – 21 с.
6. Архипова, Э.В. Влияние экстракта лапчатки белой и «Тиреотона» на функциональное состояние центральной нервной системы у крыс / Э.В. Архипова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 1(177). – Часть 2. – С. 113-115.
7. Архипова, Э.В. Влияние экстракта сухого лапчатки белой на течение экспериментального гипотиреоза / Э.В. Архипова, А.М. Водопьянова, В.К. Колхир // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 1(177). – Часть 2. – С. 116-118.

8. Архипова, Э.В. Тиреотропные свойства *Potentilla alba* L. / Э.В. Архипова, Л.Н. Шантанова, А.Г. Мондодоев // Вестник Бурятского государственного университета. – 2014. – №12. – С. 118-122.
9. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений / под ред. П.С. Чикова. – М.: Картография, 1983. – 340 с.
10. Башилов, А.В. *Potentilla alba* L. – эффективное средство при тиреотоксикозе / А.В. Башилов // Вестник ВГМУ. – 2009. – Том 8. – № 3. – С. 1-9.
11. Богачева, Н.Г. Фармакогностическое изучение корневищ и корней лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) / Н.Г. Богачева, А.И. Мешков, Е.А. Коняева, О.Г. Алентьева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 1. – С. 28-32.
12. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений / под ред. Г.П. Яковлева. – 3-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 759 с.
13. Бубенчикова, В.Н. Изучение анатомического строения корневищ лапчатки прямостоячей / В.Н. Бубенчикова, Л.И. Прокошева, Ю.А. Сухомлинов // Фармация. – 2005. – № 4. – С. 14-16.
14. Бубенчикова, В.Н. Изучение состава фенольных соединений лапчатки прямостоячей методом ВЭЖХ / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Сухомлинов // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 2. – С. 160-161.
15. Бубенчикова, В.Н. Изучение состава фенольных соединений некоторых растений рода козлобородник и рода лапчатка методом ВЭЖХ / В.Н. Бубенчикова, С.А. Прохорова, Ю.А. Сухомлинов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т.12. – Вып. 1. – С. 85-88.
16. Бубенчикова, В.Н. Полисахаридный и минеральный состав корневищ лапчатки прямостоячей / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Сухомлинов //

Сорбционные и хроматографические процессы. – 2006. – Т. 6. – Вып. 1. – С. 165-167.

17. Варлыгина, Т.И. Динамика численности возрастных спектров и продуктивности ценопопуляций лапчатки прямостоячей/*Potentilla erecta* (L.) Raeusch.: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.05 / Варлыгина Татьяна Ивановна. – Москва, 1983. – 195 с.
18. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Книга 2: Физико-химические метода анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец.- 5-е изд., стереотип. / В.П. Васильев. – М.: Дрофа, 2005. – 383 с.
19. Вельмьяйкина, Е.И. Фармакогностическое исследование эхинацеи пурпурной как источника иммуномодулирующих средств: дисс. ...канд. фарм. наук: 14.04.02 / Екатерина Ивановна Вельмьяйкина. – Самара, 2013. – 147 с.
20. Водопьянова, А.М. Лапчатка белая как перспективное средство для лечения заболеваний щитовидной железы / А.М. Водопьянова, Э.В. Архипова, Л.Н. Шантанова, С.М. Николаев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 1(177). – Часть 2. – С. 131-134.
21. Водопьянова, А.М. Определение острой токсичности *Potentilla alba* L. / А.М. Водопьянова, Э.В. Архипова, Э.А. Алексеева, Л.Н. Шантанова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – № 2(66). – С. 234-235.
22. Генкина, Г.Л. Спектрофотометрия гликозидов олеаноловой кислоты и хедерагенина в концентрированной серной кислоте / Г.Л. Генкина, Л.Г. Мжельская, Т.Т. Шакирова, Н.К. Абубакирова // Химия природных соединений. – 1977. – №2. – С. 220-227.
23. Гончаров, Н.Ф. Содержание дубильных веществ в подземных органах и траве некоторых видов рода лапчатка / Н.Ф. Гончаров, В.В. Беликов // Материалы V Всероссийского съезда фармацевтов. Тезисы докладов. – 1987. – С. 394-395.

24. Гончаров, Н.Ф. Фармакогностическое исследование лапчатки серебристой, лапчатки гусиной, лапчатки прямостоячей: автореф. дис. ... канд.фарм.наук: 15.00.02 / Гончаров Николай Федорович. – Курск, 1990. – 18 с.
25. Гончаров, Н.Ф. Фармакогностическое исследование лапчатки серебристой, лапчатки гусиной, лапчатки прямостоячей: дис. ... канд.фарм.наук: 15.00.02 / Гончаров Николай Федорович. – Курск, 1990. – 155 с.
26. Горчакова, Н.К. Фармакогностическое изучение измельченного сырья – травы лапчатки серебристой и корней окопника жесткого / Н.К. Горчакова, М.В. Кашникова, Н.В. Бобкова // Современные проблемы фармацевтической науки и практики. Научные труды. – 1999. – Том XXXVIII. – Часть II. – С.194-197.
27. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
28. ГОСТ 6716-53. Лапчатка (дубровка, калган дикий) – корневища.
29. ГОСТ 6716-71. Корневище лапчатки (дикого калгана, дубровки, узика).
30. ГОСТ Р 53904 – 2010. Добавки пищевые. Подсластители пищевых продуктов. Термины и определения. – Введ. 01.07.11. – М.: Стандартинформ, 2011. – 14 с.
31. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е издание. Ч.1. / Москва: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
32. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.1 / М., 2015. – 1470 с.
33. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.2 / М., 2015. – 1004 с.
34. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.3 / М., 2015. – 1294 с.

35. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
36. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
37. Государственная фармакопея СССР. 8-е издание / МЗ СССР. – М.: Медгиз, 1952. – 822 с.
38. Государственная фармакопея СССР. 9-е издание/ МЗ СССР. – М.: Медгиз, 1961. – 912 с.
39. Государственные стандарты СССР. Лекарственное растительное сырье. – М.: Издательство стандартов, 1980. – 296 с.
40. Государственные стандарты СССР. Лекарственно-техническое сырье. – М.: Издательство стандартов, 1959. – 296 с.
41. Государственный реестр лекарственных средств. Т.1: офиц. изд. (по состоянию на 1 апреля 2008 г.) (VIII ежегод. периодич. изд.) / Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и соц. развития; Науч. центр экспертизы средств мед. применения. - М.: Медицина, 2008. – 1300 с.
42. Гринкевич, Н.И. Фармакогнозия. Атлас / Н.И. Гринкевич, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1989. – 512 с.
43. Гринкевич, Н.И. Лекарственные растения: справочное пособие / Н.И. Гринкевич, И.А. Баландин, В.А. Ермакова, Е.Б. Зорин, Е.Я. Ладыгина, И.А. Самылина, И.Н. Сокольский. – М.: Высшая школа, 1992. – 398 с.
44. Гринько, Е.Н. Обоснование выбора метода количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.Н. Гринько // Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI Веке». – 2010. – №2. – С. 172-173.
45. Гринько, Е.Н. Требования Российской и Европейской фармакопей к методикам определения содержания дубильных веществ в

- лекарственном растительном сырье / Е.Н. Гринько // Фармация. – 2010. – №5. – С. 49-53.
46. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: Покрывосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов. – М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. – С.496.
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. – №2. – С. 179-182.
48. Диагностические признаки растений рода Лапчатка и Пятилистник. Методические указания // Министерство здравоохранения РФ. – М.: 1997 г. – 15 с.
49. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1977. – 275 с.
50. Землинский, С.Е. Лекарственные растения СССР / С.Е. Землинский. – М.: Гос.изд-во мед.лит-ры, 1958. – 610 с.
51. Зозуля, Р.Н. К вопросу фармакогностического и фармакологического изучения лапчатки серебристой / Р.Н. Зозуля, Л.В. Селенина, И.М. Миненко // Синтез, анализ и биологические испытания лекарственных средств. Материалы конференции. – 1966.– С. 43-44
52. Зозуля, Р.Н. Сравнительное исследование сухих экстрактов трех видов лапчатки / Р.Н. Зозуля, Л.В. Селенина // Исследования лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения. Материалы межвузовской научной конференции. – 1975. – С. 124-125.
53. Иванова, Г.А. Динамика накопления действующих веществ в лапчатке прямостоячей, произрастающей в Свердловской области / Г.А. Иванова, О.Н. Кузнецова, Е.С. Васфилова // Ресурсы и рациональное

использование лекарственных растений. Сборник научных трудов. – 1991. – С. 25-28.

54. Иванова, Г.А. Химическая характеристика лапчатки прямостоячей, произрастающей в естественных условиях обитания и в интродукции на среднем и южном Урале: автореф. дис. ... канд.фарм.наук: 15.00.02 / Иванова Галина Анатольевна. – Пермь, 1996. – 16 с.
55. Ивановская, Н.П. Изучение анатомического строения корневищ лапчатки белой / Н.П. Ивановская, О.А. Колосова, И.Е. Измалкова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 44-46.
56. Ивашин, Д.С. Лекарственные растения Украины / Д.С. Ивашин, З.Ф. Котина, И.З. Рыбачук, В.С. Иванов, Л.Т. Бутенко. – Киев: Изд-во Урожай, 1975. – 360 с.
57. Казеева, А.Р. Обоснование выбора методики количественного определения дубильных веществ в кровохлебке лекарственной / А.Р. Казеева, К.А. Пупыкина, Т.Д. Даргаева, О.Б. Николаева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 3. – С. 3-7.
58. Кашникова, М.В. Фармакогностическое изучение некоторых видов сырья, используемых в гомеопатии / М.В. Кашникова, Е.В. Яковлева, Е.М. Пшичкина // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: Сборник научных трудов. Т.38. Ч.II – Москва, 1999. – С. 224-226.
59. Кваченюк, А.Н. Использование фитотерапии при лечении заболеваний щитовидной железы / А.Н. Кваченюк, Е.Л. Кваченюк // Врачебное дело. – 2012. – №3-4. – С. 1-4.

60. Ким, М.Е. Сиропы с фитопрепаратами: номенклатура, разработка, особенности состава, технологии (обзор) / М.Е. Ким, Т.А. Олейникова, С.Б. Евсеева // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2015. – №2-2. – С. 21-26.
61. Ким, М.Е. Сиропы: состав, технология, современное состояние исследований (обзор литературы) / М.Е. Ким, Э.Ф. Степанова, С.Б. Евсеева // Фармация и фармакология. – 2014. - №3. – С. 7-14.
62. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
63. Китаева, М.В. Сравнительная характеристика видов *Potentilla* L. – *Potentilla alba* L., *Potentilla recta* L., *Potentilla rupestris* L. – в качестве продуцентов получения биологически активных веществ вторичного происхождения в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси / М.В. Китаева, А.А. Кот, Е.В. Спиридович // Бюллетень Брянского отделения РБО. – 2014. – № 1(3). – С. 67-70.
64. Ковалева, А.М. Фенольные соединения лапчатки белой / А.М. Ковалева, Е.Р. Абдулкафарова // Химия природных соединений. – 2011. №2. – С. 262-263.
65. Кольо, И.Р. О дубильных кислотах корневищ змеевика (*Polygonum bistorta* L.) и завязника стоячего (*Potentilla tormentilla* Sibth.): дис. ... магистр фармации/ Кольо Иван Романович. – Санкт-Петербург, 1884. – 41 с.
66. Косман, В.М. Накопление биологически активных веществ в подземных частях лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) в зависимости от срока культивирования / В.М. Косман, Н.М. Фаустова, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков, В.Г. Макаров // Химия растительного сырья. – 2013. – № 2. – С.139-146.

67. Кузнецов, П.В. Именные (цветные) реакции в фармацевтическом и химико-токсикологическом функциональном анализе: учебное пособие / П.В. Кузнецов. – Кемерово: АИ «Кузбассвуиздат», 2016. – 167 с.
68. Курбатский, В.И. Род *Potentilla* L. в горах Южной Сибири: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.05/ Курбатский Владимир Иванович. - Томск, 1984. – 266 с.
69. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Фундаментальные исследования. – 2014. – №11. – С. 366-371.
70. Куркин, В.А. Иллюстрированный словарь терминов и понятий в фармакогнозии: Учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов, врачей и фармацевтических работников / В.А. Куркин, В.Ф. Новодранова, Т.В. Куркина. – Москва; Самара: ГП «Перспектива», СамГМУ, 2002. – 188 с.
71. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с.
72. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография/ А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
73. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды: автореф. ...докт. фарм. наук: 14.04.02 / Куркина Анна Владимировна. – Самара, 2013. – 48 с.
74. Курочкин, Е.И. Лекарственные растения Среднего Поволжья / Е.И. Курочкин. – Куйбышев: Кн. изд-во, 1984. – 240 с.

75. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е издание / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
76. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы Европейской части СССР / П.Ф. Маевский. – Л.: Издательство Колос, 1964. – 880 с.
77. Макаренко, Н.В. Исследование острой токсичности и диуретической активности металлопроизводных гуминовых, фульвовых и гумусовых кислот / Н.В. Макаренко, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев, Д.А. Андриянов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17. – № 5-3. – С. 925-929.
78. Макаренко, Н.Г. Антимикробная активность представителей р. *Potentilla* L. юго-восточного Алтая в связи с их систематикой и экологией / Н.Г. Макаренко, В.М. Чайка // Растительные ресурсы. – 1974. – Том X. – Вып. 2. – С. 180-187.
79. Макарова, О.А. Влияние влажности почвы на анатомическую структуру корневищ черноголовки обыкновенной и вероники дубравной / О.А. Макарова // Взаимодействие между компонентами экологических систем. – Казань, 1985. – С. 82-94
80. Мальцева, А.А. Количественное определение дубильных веществ в траве горца почечуйного / А.А. Мальцева, А.С. Чистякова, А.А., Сорокина А.А. и др. // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2013. – №2. – С.203-205.
81. Матвеев, А.Ю. Противовоспалительные свойства сухих экстрактов лапчатковидных растений / А.Ю. Матвеев, Л.А. Сибилева, Т.П. Прищеп, В.М. Тринь // Бюллетень сибирского отделения Академии медицинских наук СССР. – 1990. – №1. – С.77-79.

82. Мелик-Гусейнов, В.В. Атлас растений. Растения в народной медицине России и сопредельных государств / В.В. Мелик-Гусейнов. – Пятигорск: СНЕГ, 2011. – 607 с.
83. Мелик-Гусейнов, В.В. Идентификация фенольных соединений в подземных органах лапчатки белой, интродуцированной на Северном Кавказе / В.В. Мелик-Гусейнов, Ф.К. Тхамокова // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – 2012. – № 1. – С. 49-52.
84. Мешков, А.И. Выделение и идентификация фитостеринов из корней и корневищ лапчатки белой / А.И. Мешков, В.И. Шейченко, В.А. Стихин, Т.А. Сокольская // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2009. – № 2. – С. 36-37.
85. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учебное пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
86. Михайловская, И.С. Анатомическая структура корневища *P. alba* L. в онтогенезе / И.С. Михайловская, Т.Л. Федотова // Бюлл. МОИП. Отд. биол. – 1976. – Т.81. – Вып.2 – С.99-108.
87. Мичник, Л.А. Разработка технологии сиропа отхаркивающего действия на основе полисахаридов семян льна / Л.А. Мичник, О.В. Мичник, Е.В. Краснощекова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: научные труды, Вып. 60. – Пятигорск, 2005. – С. 126 – 127.
88. Муравьев, И.А. Спектрофотометрический метод количественного определения урсоловой кислоты / И.А. Муравьев, В.В. Шатило, В.Ф. Семенченко // Химия природных соединений. – 1972. – №6. – С. 738-740.

89. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
90. Назарова, Е.А. Перспективы создания ЛС на основе растительного сырья, обладающего тиреотропным действием // Е.А. Назарова, Ю.М. Тертичная, А.А. Совина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – №5. – С. 56-57.
91. Ненелева, Е.В. Разработка и валидация методики количественного определения полифенольных соединений в коричнике китайском / Е.В. Ненелева, О.В. Евдокимова // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ), фармацевтические науки. – 2015. – № 8(17). – С. 58-60.
92. Оганесян, Э.Т. О механизме реакции тритерпеноидов с серной кислотой / Э.Т. Оганесян // Химия природных соединений. – 1980. – №5. – С. 647-651.
93. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. Т.6. – № 4. – С. 306-359.
94. Охапкин, М.Б. Терапия препаратом природного происхождения женщин с первичной дисменореей / М.Б. Охапкин, Е.И. Ауце // Медицинский альманах. – 2010. – № 4. – С.188-189.
95. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: Использование в народной медицине и быту / Л.В. Пастушенков, А.Л. Пастушенков, В.Л. Пастушенков. – Л.: Лениздат, 1990. – 384 с.
96. Патент РФ на изобретение № 2599014 «Способ количественного определения стероидов в корневищах с корнями крапивы двудомной» / Куркин В.А., Балагозян Э.А., Правдивцева О.Е. – G01N33/98, G01N21/31. – Бюл. № 28 от 10.10.2016.

97. Патент 2134584 Российская Федерация, МКИ7 А61К35/78. Способ получения иммуномодулирующего препарата «Настойка эхинацеи пурпурной» / Куркин В.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель СамГМУ. – Бюл. №23 от 20.08.99.
98. Патент 2439568 Рос. Федерация №2010141622/15. Способ определения дубильных веществ в растительном сырье / Самылина И.А. [и др.]; заявл. 12.10.2010; опубл. 10.01.2012 // Бюл. №1: 7 с.
99. Патент на ПМ 115651 Рос. Федерация №2011138631/13. Устройство для введения водной нагрузки лабораторным животным / Зайцева Е.Н. [и др.]; заявл. 20.09.11; опубл. 10.05.12 // Изобретения. Полезные модели. – 2012; 13: 2 с.
100. Потанина, О.Г. Совершенствование стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм из него на основе микроскопического метода исследования: дисс. ...д.фармац.наук: 15.00.02/ Потанина Ольга Георгиевна. – М., 2004. – 424 с.
101. Производственная практика по стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов: Учеб. пособие для студентов фармацев. вузов / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева и др. – Самара: Офорт, 2007. – 126 с.
102. Пужене, Г. Динамика содержания дубильных веществ лапчатки прямостоячей (*Potentilla silvestris* Necker) / Г. Пужене // Материалы XVIII научной конференции преподавателей Каунасского медицинского института. – Каунас, 1968. – С. 288-289.
103. Разарёнова, К.Н. Сравнительная оценка содержания дубильных веществ в некоторых видах рода *Geranium* L. флоры Северо-Запада/ К.Н. Разарёнова, Е.В. Жохова // Химия растительного сырья. – 2011. – №4. – С. 187-192.

104. Романтеева, Ю.В. Исследование сырья лапчатки серебристой, произрастающей в Саратовской области / Ю.В. Романтеева, Е.А. Игонина // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2014. – Том 4. – № 5. – С. 785.
105. Романтеева, Ю.В. Фитохимический анализ травы лапчатки серебристой *Potentilla argentea* L., произрастающей в п. Чардым Саратовской области / Ю.В. Романтеева, Н.А. Дурнова // Бюллетень Ботанического сада Саратовского госуниверситета. – 2015. – Вып.13. – С. 74-78.
106. Сайбель, О.Л. Разработка методики количественного определения суммы полифенольных соединений в подземных органах сабельника болотного / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, Л.Н. Зайко // Вестник Бурятского государственного университета. – 2008. – №12. – С. 17-21.
107. Саканян, Е.И. Вопросы стандартизации свежего лекарственного растительного сырья / Е.И. Саканян, И.В. Сакаева, Н.П. Рукавицына, М.Н. Лякина, Н.П. Антонова, Н.А. Постоюк // Фармация. – 2015. – №7. – С. 46-48.
108. Самылина, И.А. Атлас лекарственных растений и сырья. Учебное пособие по фармакогнозии / И.А. Самылина, А.А. Сорокина. – М.: Авторская Академия; Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 318 с.
109. Самылина, И.А. Исследования по разработке фармакопейного метода определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / И.А. Самылина, Н.П. Антонова, И.П. Рудакова // Фармация. – 2009. – №6. – С. 3-6.
110. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. – 2004. – №2. – С. 39-41.

111. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т.2. – С. 364.
112. Сатдарова, Ф.Ш. Исследование по стандартизации и созданию лекарственных средств на основе плодов и семян лимонника китайского (*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.): дисс. ...канд. фарм. наук: 15.00.02 / Сатдарова Фарида Шамилевна. – Самара, 2009. – 175 с.
113. Селенина, Л.В. Локализация дубильных веществ в различных органах лапчатки прямостоящей (*Potentilla erecta* (L) Hampe) / Л.В. Селенина // Труды Ленинградского химико-фармацевтического института Министерства здравоохранения РСФСР «Вопросы фармакогнозии». – 1960. – Т. XII. – С. 267-273.
114. Селенина, Л.В. Фитохимическое и биологическое изучение некоторых видов рода *Potentilla* L. / Л.В. Селенина, Р.Н. Зозуля, И.И. Чемесова // Тезисы докладов Всесоюзной научной конференции «Результаты и перспективы работ по изысканию новых лекарственных средств в Ленинградском химико-фармацевтическом институте». – 1979. – С. 108.
115. Семина, С.В. Влияние водорастворимых полисахаридов растений рода лапчатка семейства розоцветные на физиологическое состояние животных: дис. ... канд.биол.наук: 03.00.13 / Семина Светлана Вячеславовна. – Рязань, 2002. – 110 с.
116. Синева, Т.Д. Разработка технологии и стандартизация качества сиропа сорбита как дисперсионной среды лекарственных препаратов для детей / Т.Д. Синева, Т.С. Потехина, И.Г. Витенберг // Химико-фармацевтический журнал. – Т. 41. – №12. – 2007. – С. 26-29.
117. Сиротина, И.В. Извлечение экстрактивных веществ из надземной и подземной частей лапчатки белой (*Potentilla alba* L) / И.В. Сиротина,

- Н.Г. Базарнова // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2013. – С. 172-174.
118. Скарджюкене, Л. Некоторые данные о лапчатках, наиболее распространенных в Литовской ССР / Л. Скарджюкене, Г. Пужене // Материалы XVII объединенной научной конференции Каунасского медицинского института. – 1967. – С.242-243.
 119. Складревская, Н.В. Определение суммарного содержания флавоноидов в надземной части *Potentilla argentea* (Rosaceae) спектрофотометрическим методом / Н.В. Складревская, К.В. Попов // Растительные ресурсы. – 2013. – Вып. 2. – С. 287-291.
 120. Складревская, Н.В. Стандартизация травы лапчатки серебристой / Н.В. Складревская, К.В. Попов // Фармация. – 2013. – №5. – С. 12-14.
 121. Слука, Е.Т. Сравнительное фитохимическое изучение некоторых видов лапчатки, произрастающих во Львовской области / Е.Т. Слука, М.А. Дачишин // Тезисы докладов III съезда фармацевтов Украинской ССР. – 1979. – С. 253-254.
 122. Слука, О.Т. Мікроскопічна діагностика перстачу білого / О.Т. Слука, Т.В. Кужелюк, М.О. Стадницька // Фармацевтичний журнал. – 1985. – №5. – С. 60-62.
 123. Степанова, А.В. Закономерности строения вторичной ксилемы многолетних побегов травянистых растений на примере рода *Potentilla* L.: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.05 / Степанова Анна Валентиновна. - Санкт-Петербург, 2004. – 132 с.
 124. Степанова, А.В. Разнообразие анатомического строения корневищ в роде *Potentilla* (Rosaceae) / А.В. Степанова // Ботанический журнал. – 2005. – Т.90. – №9. – С. 1378-1388.

125. Струпан, Е.А. Разработка технологии и ассортимента кондитерских изделий и отделочных полуфабрикатов для диетического и лечебно-профилактического питания с использованием функциональных ингредиентов дикорастущего сырья: дис. ...канд. тех. наук: 05.18.15 / Струпан Екатерина Анатольевна. – СПб., 2002. – 169 с.
126. Тарасенко, Л.В. Новые подходы к эколого-просветительской деятельности в учебно-образовательном процессе на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ / Л.В. Тарасенко, А.В. Куркина // Теория и практика эколого-просветительской деятельности в природоохранных и образовательных учреждениях Российской федерации: Материалы II Всероссийской научно-практической конференции. – Тамбов, 2009. – С. 55-58.
127. Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдраилова, Е.Н. Музафарова. – Пущино: Synchronobook, 2013. – 310 с.
128. Таршис, Л. Г. Анатомия подземных органов высших сосудистых растений/ Л.Г. Таршис. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 224 с.
129. Телятьев, В.В. Целебные клады / В.В. Телятьев. – Иркутск: Восточно-Сибирское книжное издательство, 1991. – 400 с.
130. Тихомирова, Л.И. Способ получения лекарственного растительного сырья лапчатки белой (*Potentilla alba* L.) в условиях гидропоники / Л.И. Тихомирова, Н.Г. Базарнова, Т.Н. Ильичёва, А.В. Сысоева // Химия растительного сырья. – 2016. – №3. – С. 59-66.
131. Турова, А.Д. Лекарственные растения СССР и их применение. 3-е изд., перераб. и доп. / А.Д. Турова, Э.Н. Сапожникова. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.

132. Турчанинова, Л.И. Опыт применения фитопрепарата Альба в терапии патологии щитовидной железы у детей и подростков / Л.И. Турчанинова // Врачебное дело. – 2014. – №10. – С. 1-4
133. Тхамокова, Ф.К. Морфолого-анатомическое исследование подземных органов лапчатки белой, интродуцированной на Северном Кавказе / Ф.К. Тхамокова, В.В. Мелик-Гусейнов, Ф.К. Серебряная // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб.науч.тр. – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 126-128.
134. Фармацевтическая технология. Руководство к лабораторным занятиям: учеб. пособие / В.А. Быков, Н.Б. Демина, С.А. Скатков, М.Н. Анурова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 304 с.
135. Флора Восточной Европы. Том 10 / Отв.ред. Н.Н. Цвелев. – СПб.: Мир и семья; Издательство СПХФА, 2001. – 670 с.
136. Хобракова, В.Б. Влияние сухого экстракта лапчатки белой на состояние клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа / В.Б. Хобракова, Э.В. Архипова, А.М. Водопьянова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – N 1(177). – Часть 2. – С. 195-197.
137. Чайка, В.М. Лапчатки Юго-Восточного Алтая – перспективные лекарственные растения / В.М. Чайка, В.Г. Минаева // Успехи изучения лекарственных растений Сибири. Материалы межвузовской научной конференции. – 1973. – С. 82.
138. Черепнин, В.Л. Пищевые растения Сибири / В.Л. Черепнин. – Новосибирск: Наука, 1987. – 192 с.
139. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – М.: Мир, 1980. – Т. 1,2. – С. 20.
140. Шаталова, Т.А. Разработка технологии и изучение биологического действия отхаркивающего сиропа / Т.А. Шаталова, А.Ю. Айрапетова,

- Л.П. Мыкоц, Е.О. Сергеева, Н.С. Ляхова, Е.Г. Доркина, Х.Н. Гюльбякова, С.Г. Тираспольская // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №4. – С. 1-12.
141. Шериева (Тхамокова) Ф.К. Фармакогностическое изучение лапчатки белой – *Potentilla alba* L., интродуцированной на Северном Кавказе: дис. ... канд.фарм.наук: 14.04.02 / Шериева (Тхамокова) Фатима Кушбиевна. – Волгоград, 2015. – 121 с.
 142. Шилова, И.Н. Эколого-морфологическая характеристика видов рода *Potentilla* L. лесостепного Зауралья: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05/ Шилова Ирина Николаевна. – Санкт-Петербург, 1998. – 188 с.
 143. Шимко, О.М. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве и таблетках лапчатки белой / О.М. Шимко, О.М. Хишова // Вестник фармации. – 2011. – № 1(51). – С. 26-33.
 144. Шимко, О.М. Оценка качества травы лапчатки белой / О.М. Шимко, О.М. Хишова // Вестник фармации. – 2010. – № 1(47). – С. 17-23.
 145. Шимко, О.М. Поиск новых видов сырья лапчатки / О.М. Шимко, О.М. Хишова, Л.В. Кухарева // Вестник фармации. – 2008. – № 4(42). – С. 1-3.
 146. Ярыгин, В.А. К вопросу о лечении вирусного гепатита отваром лапчатки / В.А. Ярыгин // Актуальные вопросы кишечных инфекций. Сборник работ. – Кустанай, 1976. – С. 170-171.
 147. Amel, B. Phytochemical analysis, antioxidant activity and hypotensive effect of Algerian Azarole (*Crataegus azarolus* L.) leaves extracts / B. Amel, K. Seddik, A. Shtaywy, D. Saliha, A. Z. Mussa, B. Assia, D. Saliha, B. Abderahmane, A. Smain // Research Journal of Pharmacetical, Biological and Chemical Science. – 2014. – N. 5(2). – P. 286-305.

148. Bazylko, A. Chemical fingerprint of *Potentilla* species by using HPTLC method / A. Bazylko, M. Tomczyk, A. Flazinska, A. Legas // Journal of Planar Chromatography. – 2011. – Vol.24. – N.5. – P. 441-444.
149. Bazylko, A. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta* and its main ellagitannin, agrimoniin / A. Bazylko, J.P. Piwowarski, A. Filipek, J. Bonarewicz, M. Tomczyk // Journal of Ethnopharmacology. – 2013. – N. 149. – P. 222-227.
150. Chaturvedula, V.S.P. Isolation and structure elucidation of two triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* / V.S.P. Chaturvedula, I. Prakash // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2013. – Vol.1. – N.6. – P. 49-53.
151. Dorman, D. HJ. Antioxidant and pro-oxidant evaluation of a *Potentilla alba* L. rhizome extract / D. HJ. Dorman, A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, R. Hiltunen // Chemistry&Biodiversity. – 2011. – Vol.8. – N.7. – P. 1344-1356.
152. European Pharmacopeia / European Directorate for the quality of medicines and healthcare. – 6-th edition, Supplement 6.5. – Council of Europe, Strasbourg, 2008.
153. Frost, Rachel A. Sulfur Cinquefoil (*Potentilla recta*) response to defoliation on foothill rangeland / R.A. Frost, J.C. Mosley // Invasive Plant Science and Management. – 2012. – Vol. 5. – N.4. – P. 408-416.
154. Goetz, P. Actualites en phytotherapie / P. Goetz // Phytotherapie. – 2011. – N.9. – P. 53-55.
155. Goetz, P. Les meilleures tisanes therapeutiques de differentes pharmacopees / P. Goetz // Phytotherapie. – 2012. – N.10. – P. 251-256.
156. Goetz, P. Phytotherapie on ophtalmologie / P. Goetz // Phytotherapie. – 2006. – N.3. – P. 145-147.
157. Goetz, P. Traitement non hormonal des troubles de la premenopause et de la menopause / P. Goetz // Phytotherapie. – 2014. – N.12. – P. 33-36.

158. Ivanov, S.A. Screening of Russian medicinal and edible plant extracts for angiotensin I-converting enzyme (ACE I) inhibitory activity / S.A. Ivanov, S.A. Garbuz, I.L. Malfanov, L.R. Ptitsyn // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2013. – Vol.39. – N.7. – P. 743-749.
159. Ji, Y. Quality of bread containing *Potentilla anserina* L. cultivated in China / Y. Ji, J. Gang, W. Hu // Italian Journal of Food Science. – 2013. – Vol.25. – N.2. – P. 189-195.
160. Joaowiak, A. Simultaneous HPLC determination of pomolic, ursolic and euscaphic/tormentic acids in roots and rhizomes of various *Potentilla* species / A. Joaowiak, G. Joaowiak, M. Waksmundzka-Hajnos // Acta Chromatographica. – 2014. – Vol.26. – N.1. – P. 97-110.
161. Khan, S.M. Medicinal flora and ethnoecological knowledge in the Naran Valley, Western Himalaya, Pakistan / S.M. Khan, S. Page, H. Ahmad, H. Shaheen, Z. Ullah, M. Ahmad, D.M. Harper // Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. – 2013. – Vol.9. – N.4. – P. 1-13.
162. Kidd, P.M. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the sylimarin, curcumin, green tea and grape seed extracts / P.M. Kidd // Alternative Medicine Review. – 2009. – Vol.14. – N.3. – P. 226-246.
163. Kisgeci, J. Lekovite i aromaticne biljke / J. Kisgeci. – Beograd: Srpska knjizevna zadruza, 2008. – 402 p.
164. Lans, C. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada / C. Lans, N. Turner, T. Khan, G. Brauer, W. Boepple // Journal of ethnobiology and ethnomedicine. – 2007. – Vol. 3 – N.1. – P.1-22
165. Leporatti, M.L. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy / M.L. Leporatti, S. Ivancheva // Journal of Ethnopharmacology. – 2003. – N.87. – P. 123-142.
166. Mari, A. Integrated mass spectrometry approach to profile proanthocyanidins occurring in food supplements: Analysis of *Potentilla*

- erecta* L. rhizomes / A. Mari, D. Eletto, C. Pizza, P. Montoro, S. Piacente // Food Chemistry. – 2013. – N.141. – P. 4171-4178.
167. Mari, A. Phytochemical composition of *Potentilla anserina* L. analyzed by an integrative GC-MS and LC-MS metabolomics platform / A. Mari, D. Lyon, L. Fragner, P. Montoro, S. Piacente, S. Wienkoop, V. Egelhofer, W. Weckwerth // Metabolomics. – 2013. – N.9. – P. 599-607.
 168. Mirabel, M. Towards high resolution ^1H NMR spectra of tannin colloidal aggregates / M. Mirabel, Y. Glories, I. Pianet, E.J. Dufourc // J. Chim. Phys. – 1999. – N.96. – P. 1629-1634.
 169. Nakayama, T. Interaction of Tea catechins with phospholipids – roles in their tastes and biological activities / T. Nakayama, T. Ishii, Y. Uekusa, K. Kato, S. Kumazawa // Journal of Food and Drug Analysis. – 2012. – Vol.20. – Suppl.1. – P. 305-308.
 170. Nkobole, N. K. Antidiabetic activity of pentacyclic triterpenes and flavonoids isolated from stem bark of *Terminalia sericea* Burch.Ex DC / Thesis submitted for the degree of Master of Science. – 2009.
 171. Olennikov, D.N. Phenolic profile of *Potentilla anserina* L. (*Rosaceae*) herb of Siberian origin and development of a rapid method for simultaneous determination of major phenolics in *P. anserina* pharmaceutical products by microcolumn RP-HPLC-UV / D.N. Olennikov, N.I. Kashchenko, N.K. Chirikova, S.S. Kuz'Mina // Molecules. – 2015. – Vol.20. – N.1. – P. 224-248.
 172. Oszmianski, J. Antioxidant tannins from *Rosaceae* plant roots / J. Oszmianski, A. Wojdylo, E. Lamer-Zarawska, K. Swiader // Food Chemistry. – 2007. – N.100. – P.579-583.
 173. Patra, A.K. Dietary Phytochemicals and microbes / A.K. Patra. – Springer Science&Business Media, 2012. – 400 p.

174. Qin, X. Study on protective effect of alcohol extract of *Potentilla anserina* against acute myocardial ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis in rats / X. Qin, Q. Lv, X. Zhang, F. Chen, L. Li, Y. Zhang // *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. – 2012. – Vol. 37. – N.9. – P. 1279-1284.
175. Qin, X. Underlying mechanism of protection from hypoxic injury seen with n-butanol extract of *Potentilla anserina* L. in hippocampal neurons / X. Qin, L. Li, Q. Lv, B. Yu, S. Yang, T. He, Y. Zhang // *Neural Regeneration Research*. – 2012. – Vol.7. – N.33. – P. 2576-2582.
176. Rashed, K. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Alnus rugosa* L. aerial parts and identification of the bioactive components / K. Rashed, A. Ciric, J. Glamoclija, R.C. Calhelha, I.C.F.R. Ferreira, M. Sokovic // *Industrial Crops and Products*. – 2014. – N.59. – P. 189-196.
177. Sohretoglu, D. Polyphenols from *Potentilla recta* / D. Sohretoglu, H. Kirmizibekmez // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2011. – N.39. – P. 132-134.
178. Stepanova, A. Comparative wood anatomy of perennial shoots of *Potentilla* (*Rosaceae*) / A. Stepanova, E.S. Chavchavadze, S. Jansen // *IAWA Journal*. – 2007. – Vol.28. – N.4. – P.405-421.
179. Subbotina, M.D. Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla tormentilla*) on rotavirus diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled trial / M.D. Subbotina, V.N. Timchenko, M.M. Vorobyov, Y.S. Konunova, Y.S. Aleksandrovih, S. Shushunov // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2003. – Vol.22. – N.8. – P. 706-711.
180. Synowiec, A. Antimicrobial effect of an aqueous extract of *Potentilla erecta* rhizome / A. Synowiec, M. Gniewosz, K. Baczek, J.L. Przybyl // *Herba polonica*. – 2014. – Vol.60. – N.2. – P. 18-28.
181. Tikhomirova, L.I. An effective way to carry out mass *in vitro* propagation of *Potentilla alba* L. / L.I. Tikhomirova, A.A. Kechaykin, A.I. Shmakov, O.V.

- Alexandrova // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – Vol.6. – N.1. – P. 433-444.
182. Tomczyk, M. Antimicrobial activity of *Potentilla* species / M. Tomczyk, K. Leszczynska, P. Jakoniuk // Fitoterapia. – 2008. – Vol.79. – N.7-8. – P. 592-594.
183. Tomczyk, M. In vitro anticariogenic effects of aerial parts of *Potentilla recta* and its phytochemical profile / M. Tomczyk, A. Wiater, M. Pleszczynska // Phytotherapy Research. – 2011. – N.25. – P.343-350.
184. Tomczyk, M. Determination of polyphenolics in extracts of *Potentilla* species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method / M. Tomczyk, A. Bazyłko, A. Staszewska // Phytochem Anal. – 2010. – Vol. 21. – N.2. – P.174-179.
185. Tomczyk, M. Human DNA topoisomerase inhibitors from *Potentilla argentea* and their cytotoxic effect against MCF-7 / M. Tomczyk, D. Drozdowska, A. Bielawska, K. Bielawski, J. Gudej // Pharmazie. – 2008. – N.63. – P. 389-393.
186. Tomczyk, M. Method development and validation for optimized separation of quercetin derivatives in selected *Potentilla* species using high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method / M. Tomczyk, A. Bazyłko, J. Bonarewicz // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2012. – N.61 (Suppl. C). – P. 265-270.
187. Tomczyk, M. *Potentilla* – A review of its phytochemical and pharmacological profile / M. Tomczyk, K.P. Latte // Journal of Ethnopharmacology. – 2009. – N.122. – P. 184-204.
188. Tomczyk, M. Secondary metabolites from *Potentilla argentea* / M. Tomczyk // Biochemical systematics and ecology. – 2006. – N.34. – P. 770-773.

189. Tomczyk, M. Secondary metabolites from *Potentilla recta* L. and *Drymocallis rupestris* (L.) Sojak (syn. *Potentilla rupestris* L.) (*Rosaceae*) / M. Tomczyk // Biochemical systematics and ecology. – 2011. – N.39. – P.893-896.
190. Tomczyk, M. Variation in total polyphenolic contents of aerial parts of *Potentilla* species and their anticariogenic activity / M. Tomczyk, M. Pleszczynska, A. Wiater // Molecules. – 2010. – N.15. – P. 4639-4651.
191. Triantafyllidi, A. Herbal and plant therapy in patients with inflammatory bowel disease / A. Triantafyllidi, T. Xanthos, A. Papalois, J.K. Triantafillidis // Annals of Gastroenterology. – 2015. – Vol. 28. – N.2. – P.210-220.
192. Watkins, F.M. Investigation of antimicrobials from native British plants used in 10th century Anglo-Saxon wound healing formulations / Thesis submitted for PhD Degree. – 2013.
193. Wilkes, S. Isolation, characterization, and systematic significance of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid in *Rosaceae* / S. Wilkes, H. Glasl // Phytochemistry. – 2001. – Vol. 58. – N.3. – P. 441-449.
194. Wu, D. Comprehensive solvent system for counter – current chromatographic separation of natural antioxidant flavonoids from traditional Chinese medicines / D. Wu, S. Wu // Journal of Medical Research and Development. – 2013. – Vol.2. – Iss.1. – P.1-14.
195. Xia, L. Determination of free fatty acids in Tibet folk medicine *Potentilla anserina* L. using a new labeling reagent by LC with fluorescence detection and identification with online atmospheric chemical ionization-MS identification / L. Xia, C. Song, Z. Sun, G. Li, Y. Suo, J. You // Chromatographia. – 2010. – N.71. – P. 623-631.
196. Xia, L. The determination of amino acids composition of the traditional food *Potentilla anserina* L. root by high-performance liquid chromatography via fluorescent detection and mass spectrometry / L. Xia, J. You // International

Journal of Food Science & Technology. – 2011. – Vol.46. – N.6. – P. 1164-1170.

197. Zhang, T. Quantification of total vitamin C in *Potentilla anserina* L. root / T. Zhang, L. Li, Y. Cui // Oxidation Communications. – 2013. – Vol.36. – N.1. – P. 94-101.
198. Zhao, B. Selenylation modification can enhance antioxidant activity of *Potentilla anserina* L. polysaccharide / B. Zhao, J. Zhang, J. Yao, S. Song, Z. Yin, Q. Gao // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – N.58. – P. 320-328.
199. Zhao, Y.-L. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserina* L. / Y.-L. Zhao, G.-M. Cai, X. Hong, L.-M. Shan, X.-H. Xiao // Phytomedicine. – 2008. – N.15. – P. 253-258.

ПРИЛОЖЕНИЯ

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

Заслуженный работник высшей школы РФ,

д.м.н., профессор Ю.В. ЩУКИН

«10»

2017 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Хисямовой Динары Мидхатовны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Лапчатка (*Potentilla* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

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

Члены комиссии:

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

И.Ф. ШАТАЛАЕВ

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

А.В. ВОРОНИН

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

С.Х. ШАРИПОВА

«Утверждаю»

Проректор по учебно-воспитательной и социальной
работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

Заслуженный работник высшей школы РФ.

д.м.н., профессор Ю.В. ЩУКИН

«10» сентября 2017 г.



AKT

о внедрении результатов диссертационной работы Хисьямовой Динары Мидхатовны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Лапчатка (*Potentilla* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д.фарм.н., профессора В.А. Куркина, профессора, д.фарм.н. Е.В. Авдеевой, доцента, д.фарм.н. О.Е. Правдивцевой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Хисьямовой Д.М., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на основе представителей рода Лапчатка, содержащих фенольные соединения, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют разработке методик диагностики и определению качества сырья представителей рода Лапчатки и препаратов на его основе.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н., профессор

В.А. КУРКИН

Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм .н.

Е.В. АВДЕЕВА

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н.

О.Е. ПРАВДИВЦЕВА

«Утверждаю»

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

«10»

2017 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Хисямовой Динары Мидхатовны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Лапчатка (*Potentilla L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии: зав. кафедрой фармацевтической технологии, д.фарм.н., профессора С.В. Первушкина, доцента, к.фарм.н. Л.Д. Климовой, старшего преподавателя, к.фарм.н. О.В. Бер подтверждает использование материалов диссертационного исследования Хисямовой Д.М., посвященного изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и препаратов на основе представителей рода Лапчатка, содержащих фенольные соединения, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по созданию и производству лекарственных препаратов на основе фенольных соединений. Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья и лекарственных препаратов являются методической и методологической основой.

Члены комиссии:

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

 С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.

 Л.Д. КЛИМОВА

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

 О.В. БЕР

«Утверждаю»

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

«10»

2017 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Хисямовой Динары Мидхатовны «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Лапчатка (*Potentilla L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, доцента, к.фарм.н. И.К. Петрухиной, доцента, д.фарм.н. Е.П. Гладуновой, доцента, к.фарм.н. Е.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Хисямовой Д.М., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе представителей рода Лапчатка, содержащих фенольные соединения, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами, а также в научно-исследовательской работе в области фармакоэкономических исследований антимикробных и противовоспалительных лекарственных препаратов. Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе представителей рода Лапчатка и создания конкурентоспособных антимикробных и противовоспалительных лекарственных средств, в том числе импортозамещающих препаратов.

Члены комиссии:

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

И.К. ПЕТРУХИНА

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

Е.П. ГЛАДУНОВА

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

Е.Л. АБДУЛМАНОВА

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

«Утверждаю»

Начальник центра ГБУЗ

«Центр контроля качества

лекарственных средств

Самарской области»

Е.А. КАЛАБУХОВА

2016 г.

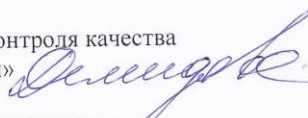
АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Хисямовой Динары Мидхатовны «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Лапчатка (*Potentilla L.*)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» заместителя начальника центра Демидовой Г.А., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Мироновой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Хисямовой Д.М., посвященного фармакогностическому изучению представителей рода Лапчатка при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на их основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы предприятия. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и УФ-спектроскопии. Методики определения подлинности сырья и препаратов представителей рода Лапчатка, а также методики определения содержания биологически активных веществ воспроизводимы и удобны в работе. Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Хисямовой Д.М. будут способствовать повышению объективности стандартизации представителей рода Лапчатка, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

Заместитель руководителя ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

 Г.А. ДЕМИДОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

 Г.И. ВЛАСОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

 Е.Е. МИРОНОВА

«Утверждаю»

Генеральный директор
ЗАО «Самаралектравы»
Н.Д. ЛУЖНОВ
«2» марта 2016 г.

АКТ

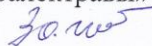
о внедрении результатов диссертационной работы Хисямовой Динары Мидхатовны «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Лапчатка (*Potentilla* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загарянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Хисямовой Д.М., посвященного изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья представителей рода Лапчатка.

Разработанные методики качественного и количественного анализа сырья представителей рода Лапчатка апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе представителей рода Лапчатка.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»

 А.Н. ЗАГАРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»

 А.В. НИКИТЕНКОВ

446554, Самарская обл., Сергиевский район, с. Антоновка, ул. Полевая, д. 19А

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2603466

СИРОП ЛАПЧАТКИ БЕЛОЙ

Патентообладатель(ли): *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015142298

Приоритет изобретения **05 октября 2015 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **02 ноября 2016 г.**

Срок действия патента истекает **05 октября 2035 г.**



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2605820

СИРОП ЛАПЧАТКИ ПРЯМОСТОЯЧЕЙ

Патентообладатель(ли): *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015142297

Приоритет изобретения **05 октября 2015 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **06 декабря 2016 г.**

Срок действия патента истекает **05 октября 2035 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивашин



ПРИЛОЖЕНИЕ 4

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

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

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«___» _____ 20__ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Лапчатки белой
корневища и корни

ФС.2.5. ...
Вводится впервые

Potentillae albae rhizomata et radices

Срок введения установлен
с «___» _____ 20__ г.

до «___» _____ 20__ г.

Собранные в фазу цветения, отмытые от земли и высушенные корни и
корневища культивируемого многолетнего травянистого растения лапчатки
белой – *Potentilla alba* L., сем. Розоцветных — *Rosaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

Спецификация
лекарственного растительного сырья
«Лапчатки белой корневища и корни»

Показатели	Используемый метод	Нормируемое значение
1	2	3
Внешние признаки	Просмотр невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х) или под микроскопом (8х, 16х, 20х, 40х).	Соответствие морфологическим признакам.
Микроскопия	Просмотр под микроскопом с увеличением (не менее 40х).	Соответствие анатомическим признакам.
Качественные реакции	1. Качественная реакция 2. УФ-спектр 3. ТСХ-анализ	1. Реакция с раствором железа (III) хлорида: зеленоватое окрашивание. 2. Соответствует приведенному рисунку. 3. ТСХ: наличие пятна 3-О-β-D-глюкопиранозида катехина с R _f около 0,5 и пятна 7-О-β-D-глюкопиранозида катехина, близкого к R _f стандартного образца катехина.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье изучается невооруженным глазом, с помощью лупы (х10) или под микроскопом (8х, 16х, 20х, 40х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIII).

Цельное сырье. Цельные или разрезанные на куски корневища и корни. Корневища прямые или слегка изогнутые, шириной до 3-4 см, твердые, поверхность морщинистая, излом ровный или зернистый. Корни тонкие, разной длины и толщины, цилиндрические.

Цвет корневищ с поверхности темно-коричневый, на изломе – бежевые иногда с розоватым оттенком, часто заметны фрагменты коричневого цвета.

Корни снаружи коричневатого цвета, на изломе – желтовато-бежевые. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вязущий.

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет от светло-бежевого с розоватым оттенком до желто-коричневатого. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вязущий.

Порошок. Смесь кусочков корневищ и корней неопределенной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Цвет от светло-бежевого с розоватым оттенком до желтоватого с вкраплениями более темных частиц наружной поверхности корневищ и корней. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вязущий.

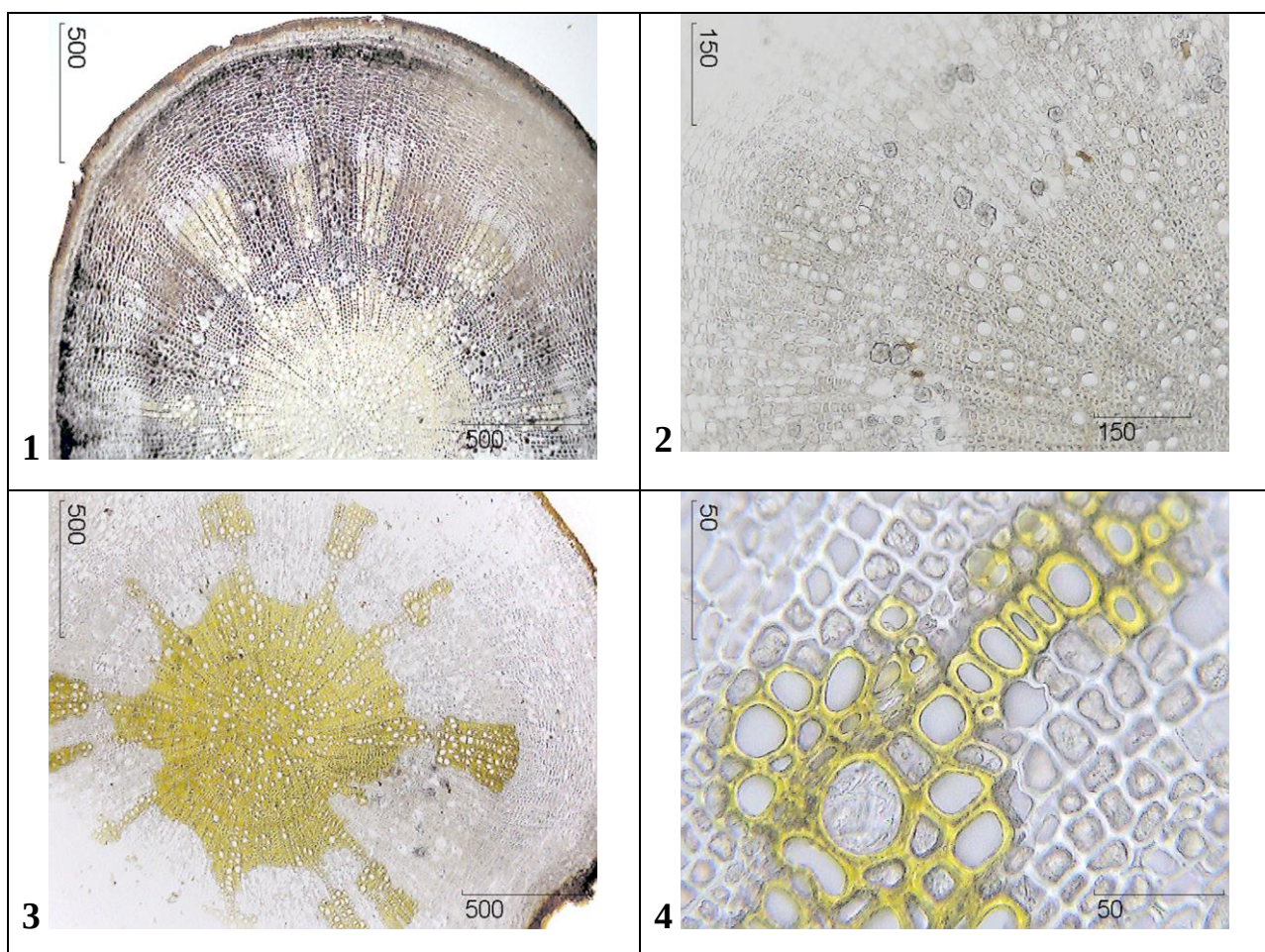
Микроскопические признаки. Сырье исследуется с помощью микроскопа (40×, 100×, 400×) в соответствии с разделом «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ XIII).

Цельное сырье. При рассмотрении поперечного среза корня должно быть видно его вторичное строение. Покровная ткань – пробка, для которой характерна суберенизация и сильная пигментация (клетки окрашены в бурый цвет). Внутренние слои пробки не суберинизированы. Коровая часть корня хорошо визуализируется. Паренхима ее представлена тангентально уплощенными клетками, в которых наблюдаются крахмальные зерна и друзы кальция оксалата. Ксилема и флоэма центрального цилиндра ярко выражены. Годичные кольца ксилемы обнаруживаются после окраски микропрепаратов серноокислым анилином. При этом наблюдается характерная неоднородная лигнификация ксилемной паренхимы.

При рассмотрении поперечного среза корневища должно быть видно его пучковое строение. С поверхности корневище покрыто многорядной пробкой. Камбиальная зона визуализируется слабо. Ксилемная часть заметно преобладает над флоэмной. Сердцевина корневища значительна по объему и

представлена крупными паренхимными клетками основной ткани, часть из них пигментирована, некоторые клетки содержат друзы оксалата кальция. При обработке корневища раствором Люголя в паренхимных тканях обнаруживаются крахмалоносные клетки, значительная часть которых сосредоточена в паренхиме сердцевины.

Измельченное сырье, порошок. При рассмотрении препаратов измельченного сырья и порошка должны быть видны фрагменты пробки бурого цвета, фрагменты паренхимы коры корня, представленной тангентально уплощенными клетками, фрагменты паренхимы с крупными друзами оксалата кальция (до 50-60 мкм) и мелкими крахмальными зернами, фрагменты сосудов ксилемы с неоднородной лигнификацией ее паренхимы, фрагменты первичной коры корневища, представленные клетками с суберенизированными стенками.



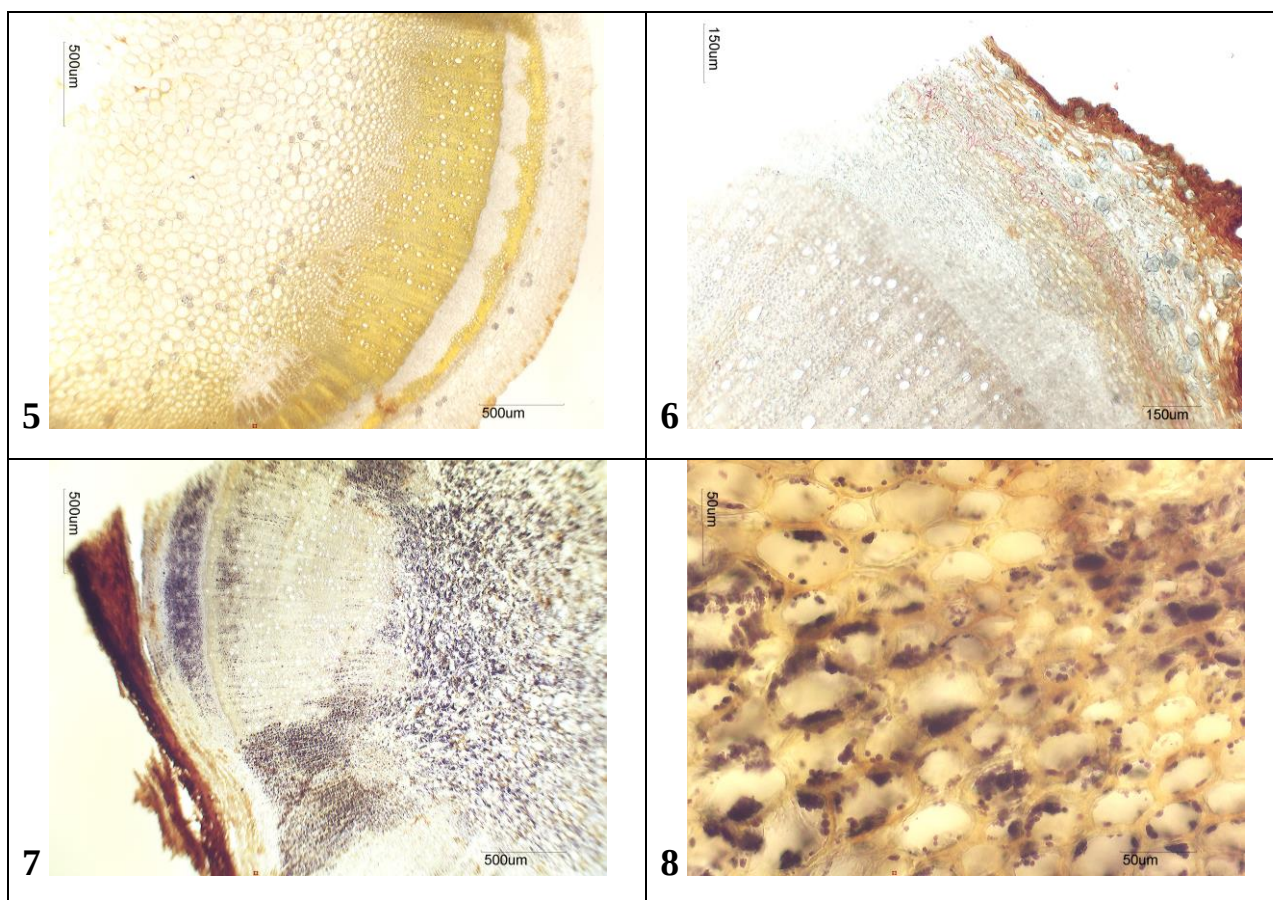


Рисунок 1 – Лапчатки белой корневища и корни

1 – поперечный срез корня, обработка раствором Люголя (x40); 2 – фрагмент нативного поперечного среза корня (x100); 3 – поперечный срез корня, обработка сернокислым анилином (x40); 4 – фрагмент проводящего элемента корня, обработка сернокислым анилином (x100); 5 – поперечный срез корневища, обработка сернокислым анилином (x40); 6 – поперечный срез корневища, обработка раствором Судан (III) (x40); 7 – поперечный срез корневища, обработка раствором Люголя (x40); 8 – фрагмент паренхимы корня с крахмальными зернами, обработка раствором Люголя (x400).

Определение основных групп биологически активных веществ

1. К 2 мл полученного извлечения (см. раздел «Количественное определение») прибавляют 5-6 капель раствора железа (III) хлорида, должно наблюдаться зеленовато-коричневое окрашивание (дубильные вещества).

2. УФ-спектроскопия

УФ-спектр раствора А (см. раздел «Количественное определение») имеет максимум поглощения при длине волны 282 ± 2 нм (катехин и его производные), а также «плечо» в диапазоне 320-330 нм (рис. 2).

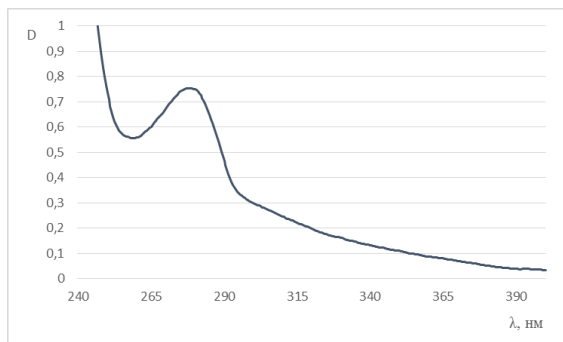


Рисунок 2 – УФ-спектр водно-спиртового извлечения из корневищ и корней лапчатки белой.

3. Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) катехина. Около 0,02 г (точная навеска) катехина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 15-20 мл спирта этилового 96% (при необходимости нагревают на водяной бане). Доводят спиртом этиловым 96% до метки и перемешивают.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» предварительно активируют в сушильном шкафу при температуре 100-105°C (1 час). На линию старта пластинки микропипеткой наносят 0,02 мл водно-спиртового извлечения (см. раздел «Количественное определение») в виде точки. В качестве раствора сравнения рядом на пластинку в виде точки наносят 0,01 мл спиртового раствора СО катехина и 0,01 мл раствора 3-О-β-Д-глюкопиранозид катехина. Пластинку помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами смеси растворителей *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2). Хроматографируют восходящим способом.

После того, как фронт растворителя проходит около 8 см, пластинку достают из камеры, высушивают и просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм. При этом на хроматограмме обнаруживается темное пятно с величиной R_f около 0,5 (3-О-β-D-глюкопиранозид катехина) и величиной R_f около 0,77 (7-О-β-D-глюкопиранозид катехина, обладающий близким значением подвижности с катехином). Затем хроматограмму проявляют спиртовым раствором железа (III) хлорида и высушивают. Пятна приобретают зеленовато-коричневое окрашивание. Допускается обнаружение других окрашенных зон.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 12%.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3%.

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

Посторонние примеси

Кусочков листьев и стеблей. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1%.

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5%.

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ XIII, том 2).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ XIII, том 2).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ XIII, том 2).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ XIII, том 1).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* дубильных веществ в пересчете на катехин – не менее 10%.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 3 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в коническую колбу с притертой пробкой на 100 мл. К сырью добавляют 50 мл 40% спирта этилового, колбу закрывают пробкой и взвешивают (погрешность $\pm 0,01$ г). К колбе присоединяют дефлегматор и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания экстрагента. После этого колбу закрывают той же пробкой, содержимое колбы охлаждают, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 40% спиртом этиловым. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу на 50 мл и доводят объем раствора до метки 40% этиловым спиртом. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при аналитической длине волны 282 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм на фоне 40% спирта этилового.

Содержание суммы дубильных веществ в пересчете на катехин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \times 50 \times 50 \times 100}{144 \times m \times (100 - W)};$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора А;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %;

144 – удельный показатель поглощения катехина.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ XIII, том 1).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ XIII, том 1).