

На правах рукописи

ШМЫГАРЕВА АННА АНАТОЛЬЕВНА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ
ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ
К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ ФАРМАКОПЕЙНЫХ РАСТЕНИЙ,
СОДЕРЖАЩИХ АНТРАГЛИКОЗИДЫ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Самара - 2017

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор

Куркин Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

Белоногова Валентина Дмитриевна, доктор фармацевтических наук, профессор; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники, заведующий кафедрой;

Ханина Миниса Абдуллаевна, доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Министерства образования Московской области, кафедра химии, заведующий кафедрой;

Латыпова Гузель Минулловна, доктор фармацевтических наук, доцент; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования Института дополнительного профессионального образования, профессор кафедры.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в __.00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2017/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время наметилась тенденция все более широкого применения лекарственных растительных средств (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов (ЛРП) как для лечения, так и для профилактики различных заболеваний. В медицинской практике Российской Федерации используется свыше 30 тысяч лекарственных средств, 40% которых производится из ЛРС, причем доля растительных препаратов, применяемых для лечения желудочно-кишечных заболеваний, составляет около 70% (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2016; Самылина И.А. и др., 2003; 2010). Одной из самых широко используемых групп лекарственных препаратов, применяемых в коррекции функциональных нарушений деятельности пищеварительной системы, являются слабительные средства, среди которых значительный удельный вес занимают ЛРП. Слабительные фармакологические свойства характерны для многих групп растительных веществ (полисахариды, жирные масла растительные), но наиболее ярко они выражены у растений, содержащих антраценпроизводные и их гликозиды (антрагликозиды).

Несмотря на многолетний опыт изучения лекарственных растений, содержащих антраценпроизводные, существуют нерешенные проблемы в области стандартизации сырья и препаратов. Во-первых, некоторые виды ЛРС и ЛРП до сих пор анализируются с использованием качественных реакций, во-вторых, имеются примеры (крушина ломкая, сенна александрийская), когда в разделе «Количественное определение» методические и методологические подходы к стандартизации не лишены недостатков. Так, неудачным представляется включение в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания (ФС.2.5.0021.15) двух методик, заимствованных из ГФ СССР XI издания (в пересчете на истизин) и Европейской фармакопеи (в пересчете на глюкофрангулин А). Вероятно, поэтому числовой показатель «сумма антрагликозидов» в отечественной и европейской фармакопеях значительно отличаются – 4,5 % и 7 % соответственно. Кроме того, в ФС.2.5.0038.15 «Сенны листья» включена без критической переработки методика, описанная из ГФ СССР XI издания, что не соответствует международному опыту: нижний предел содержания суммы антраценпроизводных гликозидов в пересчете на сеннозид В – не менее 2,5 % (Европейская фармакопея, 2014) и суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту не менее 1,35 % (ГФ РФ XIII издания, 2015). К моменту начала исследований в ФС на плоды жостера слабительного (ГФ СССР XI издания) в разделе «Качественные реакции» не использовалась ТСХ, а раздел «Количественное определение» отсутствовал. Следует отметить, что новые инструментальные возможности (ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ, ГЖХ, хромато-масс-спектрометрия и др.) создают перспективу проведения более глубоких структурных исследований антраценпроизводных, а также совершенствование методов стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих антраценпроизводные.

Актуальными представляются и анатомо-морфологические исследования видов сырья, содержащего антраценпроизводные, особенно в сравнительном отношении, с учетом новых требований к разделу «Микроскопические признаки» нормативной документации, предполагающих визуализацию диагностических признаков.

Исходя из данных Государственного реестра, список зарегистрированных на территории РФ лекарственных препаратов на основе ЛРС, содержащего антраценпроизводные, достаточно широк, хотя реальный ассортимент представлен лекарственным растительным сырьем, сборами и многокомпонентным препаратам. Несмотря на разнообразие в данной группе сырья лекарственных растений (крушина ломкая, жостер слабительный, щавель конский и др.),

произрастающих на территории РФ, на фармацевтическом рынке преобладают импортные лекарственные препараты, причем преимущественно на основе культивируемого за рубежом сырья сенны александрийской, культивируемой за рубежом. Данное обстоятельство свидетельствует об актуальности исследований, направленных на создание новых ЛРП на основе ЛРС, содержащего антрагликозиды. Успешное решение этой проблемы будет способствовать реализации Стратегии развития фармацевтической отрасли РФ до 2020 г.

Степень разработанности проблемы. Несмотря на достаточно высокую степень изученности химического состава сырья сенны (кассии) александрийской (*Senna alexandrina* Mill.), кассии узколистной (*Cassia angustifolia* Vahl.), крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.), жостера слабительного (*Rhamnus cathartica* L.), щавеля конского (*Rumex confertus* Willd.) и других растений (Куркин и др., 2015; Самылина И.А. и др., 2010; Muzychkina R.A., 1998), противоречивой остается информация относительно трактовки доминирующих компонентов. Так, в некоторых работах отмечается, что доминирующими веществами являются сеннозиды А, В, С и D (Dave H., Ledwani L., 2012), в других работах - кемпферол-3-О-гентиобиозид (Demirezer L.O., 2011), а в отдельных литературных источниках – реин (Upadhyay A. et al., 2011). Вероятно, именно это является причиной отсутствия единых подходов к стандартизации листьев кассии, а в существующих подходах к анализу не в полной мере используется все разнообразие химического состава сырья кассии (Dave H., Ledwani L., 2012; Demirezer L.O., 2011; Sakulpanich A., Gritsanapan W., 2009). Это касается и другого лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, а именно: коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, корней щавеля конского. В рамках Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания (2015) по некоторым видам ЛРС уже реализованы возможности ТСХ, однако не во всех случаях (например, в ФС на кору крушины ломкой) используются стандартные образцы веществ, содержащихся в конкретном ЛРС и имеющих диагностическое значение.

Особого внимания заслуживает проблема количественного определения содержания антраценпроизводных в ЛРС и ЛРП, поскольку используемые методики громоздки, многостадийны, недостаточно специфичны, предполагают использование легко летучего и огнеопасного растворителя – диэтилового эфира, а также расчета содержания антраценпроизводных на основе построения калибровочного графика (растворы кобальта хлорида, хризофановой кислоты) (ГФ СССР XI издания, ГФ РФ XIII издания, Европейская фармакопея, Британская фармакопея и др.).

Обращает на себя внимание и то, что результаты систематических структурных исследований антрахинонов с использованием ЯМР-спектроскопии появились сравнительно недавно и нередко носят противоречивый характер (Liu R. et al., 2004; Muzychkina R.A., 1998), а в случае некоторых антраценпроизводных они отсутствуют.

Принимая во внимание, что в ассортименте слабительных лекарственных растительных средств, представленных на фармацевтическом рынке РФ, преобладают зарубежные средства, актуальным является создание импортозамещающих препаратов слабительного действия, особенно такой лекарственной формы, как сироп, представленный лишь одним отечественным препаратов «Крушины сироп».

Таким образом, являются актуальными исследования, направленные на решение проблемы совершенствования стандартизации ЛРС и ЛРП, а также научного обоснования состава и технологии лекарственных препаратов, применяемых в форме сиропа.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является сравнительное фармакогностическое исследование фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные, направленное на разработку новых методических и методологических подходов к стандартизации ЛРС и созданию на основе некоторых видов сырья ЛРП слабительного действия.

Для решения поставленных целей необходимо решить следующие задачи:

1. Обобщить и систематизировать литературные данные по изучению химического состава, вопросов стандартизации ЛРС и ЛРП, а также фармакологических свойств и применения лекарственных препаратов фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные.

2. Провести сравнительное морфолого-анатомическое изучение сырья фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные.

3. Провести сравнительное исследование химического состава коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, листьев и плодов сенны александрийской, корней марены красильной, а также лекарственных препаратов на основе данных видов сырья.

4. Разработать методики качественного ТСХ-анализа ЛРС, содержащего антраценпроизводные, с использованием стандартных образцов антрагликозидов (раздел «Подлинность» проектов фармакопейных статей).

5. Научно обосновать показатели качества, а также методические и методологические подходы к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих антраценпроизводные.

6. Разработать методики количественного определения суммы антраценпроизводных в ЛРС «Сенны листья», «Сенны плоды», «Марены красильной корни».

7. Научно обосновать состав и технологию получения лекарственных растительных препаратов «Сенны сироп», «Крушины сироп», «Жостера слабительного сироп», «Марены красильной сироп».

8. Разработать показатели качества, а также методики качественного и количественного анализа лекарственных препаратов, содержащих антраценпроизводные.

9. Провести сравнительное исследование слабительного действия лекарственных субстанций на основе сырья крушины ломкой, жостера слабительного и сенны александрийской.

10. На основе результатов фармакогностических исследований разработать нормативную документацию на ЛРС «Сенны листья», «Крушины ломкой кора», «Жостера слабительного плоды» для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания.

Научная новизна. Впервые в сравнительном плане проведено анатомо-морфологическое исследование видов ЛРС (кора крушины ломкой, плоды жостера слабительного, листья и плоды сенны александрийской, корни ревеня тангутского, корни марены красильной, листья и побеги алоэ древовидного), содержащего антраценпроизводные, что позволило выявить дополнительные анатомо-гистологические признаки, актуальные с точки зрения идентификации сырья. В результате углубленного фитохимического изучения листьев и плодов сенны александрийской впервые выделены и охарактеризованы с использованием УФ-, ИК-, ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии индивидуальные вещества, относящиеся к антраценпроизводным (неореин, реин, сеннозид В), флавоноидам (кемпферол-3-О-гентиобиозид) и производным нафталина (торахризон-8-О- β -D-глюкопиранозид), причем 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон является новым природным

соединением, для которого установлено химическое строение. При этом определено, что доминирующими компонентами листьев сенны александрийской являются неореин, кемпферол-3-О-гентиобиозид и 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона, коры крушины ломкой - франгулин А и франгулин В, плодов жостера слабительного – 3-О-рутинозид рамнетина и эмодин-1-О-β-D-глюкопиранозид, которые, на наш взгляд, представляют интерес с точки зрения определения подлинности данных видов сырья.

На основе результатов химического исследования коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, листьев сенны александрийской и корней марены красильной разработаны новые методологические подходы к стандартизации сырья данных растений, разработаны методики качественного и количественного определения антраценпроизводных с использованием ИК-, УФ-спектроскопии, ВЭЖХ, ТСХ. При этом научно обоснована целесообразность проведения экстракции с использованием водных спиртов вместо подходов, предусматривающих сочетание экстракции с кислотным гидролизом и последующим извлечением анализируемых веществ диэтиловым эфиром, являющимся огнеопасным растворителем. Кроме того, в разработанных методиках обоснован подход к расчету содержания суммы антраценпроизводных в ЛРС, предусматривающий использование соответствующего стандартного образца (франгулин А, сеннозид В, руберитриновая кислота) или теоретического значения удельного показателя поглощения для вышеперечисленных антраценпроизводных.

Научная новизна подтверждена тремя патентами РФ на изобретение: «Сироп из плодов жостера слабительного», «Сироп крушины ломкой», «Сироп из листьев сенны остролистной», причем для вышеперечисленных лекарственных препаратов обнаружены выраженные слабительные свойства, что делает их перспективными в плане внедрения в медицинскую практику.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате сравнительного изучения химического состава видов ЛРС, содержащего антраценпроизводные, расширены представления о компонентном составе сырья с точки зрения диагностической значимости доминирующих веществ при определении подлинности ЛРС и ЛРП.

Разработаны методики качественного ТСХ-анализа ЛРС, содержащего антраценпроизводные, с использованием стандартных образцов антрагликозидов (раздел «Подлинность» проектов фармакопейных статей).

Научно обоснованы показатели качества, а также методические и методологические подходы к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих антраценпроизводные, заключающиеся в использовании спектрофотометрии, ИК-спектроскопии, ТСХ, ВЭЖХ, а также соответствующих стандартных образцов антрагликозидов (франгулин А, сеннозид В, руберитриновая кислота). Разработаны методики количественного определения суммы антраценпроизводных в ЛРС «Сенны листья», «Сенны плоды», «Марены красильной корни».

Научно обоснованы состав и технология получения лекарственных растительных препаратов «Сенны сироп», «Крушины сироп», «Жостера слабительного сироп», «Сенны плодов густой экстракт», «Марены красильной сироп», а также разработаны показатели качества, методики качественного и количественного анализа лекарственных препаратов, содержащих антраценпроизводные.

Проведено сравнительное исследование слабительного действия лекарственных субстанций на основе сырья крушины ломкой, жостера слабительного и сенны александрийской. Определено, что препараты плодов жостера слабительного и сенны

александрийской (отвар и сироп) обладают более выраженным слабительным эффектом по сравнению с соответствующими препаратами коры крушины ломкой.

На основе результатов фармакогностических исследований разработаны фармакопейные статьи «Крушины ломкой кора», «Жостера слабительного плоды», включенные в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания, а также дополнения к ФС 2.5.0038.15 «Сенны листья» (раздел «Подлинность» и «Количественное определение»).

Внедрение в практику. Проведенные исследования позволили разработать и утвердить:

- фармакопейные статьи «Крушины кора» и «Жостера слабительного плоды», включенные в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания;
- методики качественного ТСХ-анализа ЛРС, содержащего антраценпроизводные, с использованием соответствующих стандартных образцов антрагликозидов (франгулин А, сеннозид В, руберитриновая кислота);
- методики количественного определения суммы антраценпроизводных в ЛРС «Сенны листья», «Сенны плоды»;
- способы получения и методики стандартизации новых лекарственных слабительных препаратов: «Крушины сиропа», «Жостера сироп», «Сенны сироп», «Сенны плодов густой экстракт» и «Марены сироп»;
- разработанные в результате проведенных исследований методики анализа сырья и препаратов, содержащих антраценпроизводные, апробированы и внедрены в работу государственного автономного учреждения здравоохранения «Оренбургский информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения», государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы».

Фрагменты настоящего диссертационного исследования находят применение в научной и учебной работе кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные исследования, проведенные в ходе выполнения диссертационной работы, включены в монографию В.А. Куркина, А.А. Шмыгаревой, А.Н. Санькова «Антраценпроизводные фармакопейных растений» (2016 г.).

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования является поиск, анализ и систематизация литературных данных в области антраценпроизводных, содержащихся в фармакопейных растениях: степень изученности химического состава ЛРС и фармакологических свойств, подходы к стандартизации сырья, разработка нормативной документации на растительное сырье, обобщение материалов в виде выводов, определяющих теоретическое и практическое значение диссертационной работы.

При выполнении фармакогностического исследования применяли физико-химические (УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ, газожидкостная хромато-масс-спектрометрия), макро- и микроскопические, химические, фармакологические, а также статистические методы анализа. Результаты исследований являются методологической основой для дальнейших фундаментальных исследований по проблеме стандартизации сырья лекарственных растений, содержащих в качестве основной группы БАС антраценпроизводные, а также создания лекарственных препаратов слабительного действия.

Разработанные методические и методологические подходы к стандартизации сырья фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные, применимы и для других растений, содержащих антрагликозиды.

Разработаны принципы стандартизации и применения лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, а также другие группы веществ (флавоноиды, производные нафталина, дубильные вещества), являющимися потенциальными биологически активными соединениями.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты сравнительного морфолого-анатомического изучения сырья фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные;
- результаты сравнительного исследования химического состава коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, листьев и плодов сенны александрийской, корней марены красильной, а также лекарственных препаратов на основе вышеперечисленных видов сырья;
- результаты изучения антраценпроизводных и других фенольных соединений (флавоноиды, производные нафталина), методы их выделения, идентификации и установления строения;
- методики качественного ТСХ-анализа ЛРС, содержащего антраценпроизводные, с использованием стандартных образцов антрагликозидов (раздел «Подлинность» проектов фармакопейных статей);
- методики количественного определения суммы антраценпроизводных в ЛРС «Сенны листья», «Сенны плоды», «Марены красильной корни».
- показатели качества, а также методические и методологические подходы к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих антраценпроизводные;
- теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение состава и технологии получения лекарственных растительных препаратов, содержащих антраценпроизводные;
- результаты исследования фармакологической активности лекарственных растительных препаратов на основе сырья, содержащего антраценпроизводные.

Степень достоверности. Научные положения, выводы диссертационной работы основываются на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных фармакогностических, химических, физико-химических (колоночная хроматография, ТСХ, ВЭЖХ), спектральных (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия) и фармакологических методов, что подтверждается большим количеством таблиц, рисунков, схем хроматограмм. Все результаты исследований обработаны статистически в соответствии с требованиями ГФ СССР XI издания и Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания, а также с помощью программы «Microsoft Excel». Различия между группами считались статистически значимыми при $P < 0,05$. Разработанные методики количественного определения валидированы.

Апробация результатов. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: VII Архангельской международной медицинской научной конференции молодых ученых и студентов «Медицина будущего – Арктике» (г. Архангельск, 2014 г.), IV Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (г. Белгород, 2015 г.), XV Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (г. Москва, 2015 г.), VII Международной научно-практической конференции «Инновационные процессы в научной среде» (г. Пермь, 2015 г.), VII Международной научно-практической конференции «Управление инновациями в современной

науке» (г. Самара, 2015 г.), Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий» (г. Белгород, 2015 г.), IX Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2015 г.), VIII Международной научно-практической конференции «Результаты научных исследований» (г. Тюмень, 2016 г.), VIII Международной научно-практической конференции «Современные концепции развития науки» (г. Курган, 2016 г.), Международной конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине», посвященная 85-летию ВИЛАР (Москва, 2016 г.), VIII Международной научно-практической конференции «Наука, образование и инновации» (Екатеринбург, 2016), IV Научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 2016), VIII Международной научно-практической конференции «Традиционная и инновационная наука: история, современное состояние, перспективы» (Екатеринбург, 2016), VIII Международной научно-практической конференции «Современные технологии в мировом научном пространстве» (Казань, 2016), VIII Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития науки в России и мире» (Уфа, 2016), I Межвузовской студенческой научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (Самара, 2016), IX Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития науки в России и мире» (Екатеринбург, 2017), IX Международной научно-практической конференции «Научные исследования и разработки в эпоху глобализации» (Волгоград, 2017), I Межвузовской студенческой научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» (Самара, 2016).

Связь темы исследований с планом научных работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом 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»).

Публикации. По результатам диссертационных исследований опубликовано 55 работ, в том числе 34 статьи в журналах перечня ВАК Министерства образования и науки РФ; 3 патента РФ на изобретение, 1 монография, 2 фармакопейные статьи «Крушины ольховидной кора», «Жостера слабительного плоды» (ГФ РФ XIII издания, 2015 г.).

Личный вклад автора. Автором лично выбраны объекты исследования, направление исследований, поставлены цели и задачи исследования. Все этапы исследовательской работы по сбору, обработке и анализу данных проведены автором лично. Во всех выполненных в соавторстве работах автору принадлежат: постановка задачи, концепция использования различных методов анализа, интерпретация полученных результатов, а также непосредственное участие в проведении экспериментальных исследований.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пунктам 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 354 страницах машинописного текста, данные проиллюстрированы 137 рисунками и изложены в форме 60 таблиц. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов, использованных в ходе выполнения диссертационного исследования, 4-х глав,

описывающих результаты собственных исследований, заключение и список литературы, состоящий из 338 источников, в том числе 76 – 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 лекарственного растительного сырья и препаратов, фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды: сенны александрийской, марены красильной, ревеня тангутского, алоэ древовидного, крушины ломкой, жостера слабительного. В главе изложены имеющиеся сведения о современном состоянии исследований фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды, а также описано применение данных растений в традиционной и народной медицине. Приведена информация о подходах к анализу сырья фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды, 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 лекарственном растительном сырье фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды.

В главе 3 приводятся результаты морфолого-анатомического анализа листьев и плодов сенны александрийской, корней марены красильной, корней ревеня тангутского, листьев и побегов алоэ древовидного, порошка коры крушины ломкой, порошка плодов жостера слабительного.

В главе 4 изложены результаты фитохимических исследований лекарственного растительного сырья фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды, а также приведены результаты выделения индивидуальных БАС.

Глава 5 посвящена результатам по разработке методик качественного и количественного анализа сырья фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды.

В главе 6 приводятся результаты исследований по обоснованию состава, технологии получения и методик анализа препаратов на основе листьев и плодов сенны александрийской, корней марены красильной, коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного. Описаны результаты изучения слабительной активности препаратов на основе лекарственного растительного сырья фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды.

Диссертация завершается заключением и списком литературы.

В приложениях представлены акты внедрения, патенты РФ №2557929 «Сироп крушины ломкой», №2582276 «Сироп жостера слабительного», № 2582982 «Сироп из листьев сенны александрийской», проекты фармакопейных статей «Крушины ольховидной кора», «Жостера слабительного плоды».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

В ходе диссертационного исследования использовался 21 объект ЛРС, содержащий антраценпроизводные, ЛРП (пачки, фильтр-пакеты), отвечающие требованиям действующей нормативной документации фирм-производителей ОАО «Красногорсклексредства», ООО «Лето», ООО «ФитоСтарт», ООО «СТ-Медифарм», ООО ПКФ «Фитофарм» и ЗАО «Здоровье», а также сырье из фонда кафедры управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России и кафедры фармакогнозии

с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: крушины ломкой кора (*Frangula alnus* Mill.), жостера слабительного плоды (*Rhamnus cathartica* L.), сенны александрийской листья и плоды (*Senna alexandrina* Mill.), марены красильной корни (*Rubia tinctorum* L.) и 9 сборов: «Тростинка» (ЗАО Фирма «Здоровье»), «Сибирская ласточка экстра» (ООО «Алтайский кедр»), «Аэлит» (ИП Плескачев), «Фаворит» (ИП Плескачев), «Эффект» (ИП Плескачев), «Комфорт» (ООО «Травы Башкирии»), «Lux» (ООО НПФ «Золотая долина»), «Слабительный» (ООО «Травы Башкирии»), «Для похудения» (ООО «Травы Башкирии»), а также лекарственные препараты: «Сенаде», «Сенадексин», «Крушины экстракта таблетки».

В работе использованы световые микроскопы следующих марок: цифровой микроскоп «Motic DM 111» (возможность увеличения данного прибора представлена четырьмя окулярами: 4x10; 10x10; 40x10; 100x10), цифровой стереоскопический микроскоп «Motic DM-39C-N9GO-A» (x20; x40). Микропрепараты готовили в соответствии с фармакопейной методикой ГФ СССР XI издания, а также с использованием модифицированных методик.

Исследование лекарственного растительного сырья и препаратов на основе лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе «Knauer SmartLine» (Germany) в изократическом режиме (стационарная фаза – «Separon C-18», подвижная фаза – смесь ацетонитрила и воды в различных соотношениях с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты, скорость потока – 0,1 мл/мин) в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы использовали смесь «вода-ацетонитрил» в соотношениях 80:20 (об. %). Детектирование веществ осуществляли УФ-детектором при длинах волн 270 нм.

Выделение веществ из исследуемого ЛРС осуществляли с помощью колоночной хроматографии (силикагель L 40/100 и L 100/160; полиамид марки «Woelm»). Контроль за разделением веществ осуществлялся с помощью метода тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV 254» и «Сорбфил ПТСХ-ПА-УФ», а также «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системах хлороформ-спирт в сочетаниях 9:1; 6:1; 2:1, хлороформ-метанол-вода (26:14:3), хлороформ-спирт этиловый-вода (26:16:3) и *n*-бутанол-вода-ледяная уксусная кислота (4:1:2).

Регистрацию УФ-спектров растворов веществ и водно-спиртовых извлечений проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena), «Unico 2800», «СФ-2000».

Установление строения выделенных веществ осуществляли с помощью УФ-спектроскопии, ¹H-ЯМР-спектроскопии и ¹³C-ЯМР-спектроскопии (спектрометр «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектрометрии (масс-спектрометр «Kratos MS - 30»), различных химических превращений, ТСХ и непосредственным сравнением с достоверно известными образцами веществ.

Статистическую обработку экспериментальных данных исследований (при P=95%) проводили с помощью программ StatSoft Statistica 6.0, Microsoft Excel с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения (ГФ РФ XIII издания).

2. Анатомо-гистологическое исследование фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды

2.1.Анатомо-гистологическое исследование листьев сенны александрийской

Микроскопическое исследование листьев сенны александрийской позволило выявить диагностические признаки сырья, заключающиеся в наличии клеток эпидермиса с многоугольными прямыми стенками; простых, одноклеточных волосков с толстыми стенками и

грубобородавчатой поверхностью; устьиц аномоцитного типа, расположенных с обеих сторон листа; друз оксалата кальция; крупных жилок листа, окруженных кристаллоносной обкладкой. Однако совокупность имеющихся диагностических признаков не позволяет объективно определять подлинность листьев сенны. С целью совершенствования стандартизации лекарственного растительного сырья сенны александрийской нами предложены дополнительные диагностические признаки, относящиеся к особенностям анатомии и гистологии черешка листьев данного растения. Из-за особенностей морфологии листа черешок остается на нем и в большинстве случаев попадает в сырье, в виду чего он является постоянным компонентом сырья и может быть использован для диагностики сырья.

При первичном рассмотрении общей картины поперечный срез черешка листа сенны александрийской не опушен и имеет желобчатую форму. По краям желобка находятся адаксиальные выступы, черешки на поперечном срезе в адаксиальной части выемчатые. Непосредственно под эпидермой у черешка листа сенны александрийской располагается слой колленхимы округлого типа, представленный клетками в 3-4 слоя, непрерывный по всей окружности. В колленхиме обнаружены друзы оксалата кальция. Склеренхимная обкладка над флоэмой состоит из 4-6 рядов клеток с заметно утолщенными стенками. Черешки листьев сенны александрийской имеют пучковый тип строения. Проводящая ткань представлена тремя закрытыми коллатеральными пучками: крупным медиальным и двумя мелкими латеральными. Проводящие элементы ксилема и флоэма расположены в центре срезов по окружности, при этом флоэмная часть более выражена (рис. 1 и 2).



Рисунок 1. Поперечный срез средней части черешка сенны александрийской (x100)

Обозначения:

- 1 - абаксильная сторона; 2 - адаксиальная сторона; 3 - эпидермис; 4 - колленхима;
- 5 - склеренхима; 6 - флоэма, 7 - ксилема;
- 8 - медиальный проводящий пучок;
- 9 - латеральный проводящий пучок

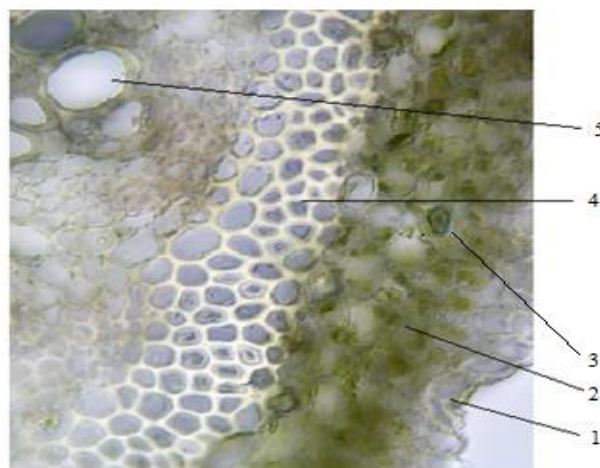


Рисунок 2. Поперечный срез средней части черешка сенны александрийской (x400)

Обозначения:

- 1 - эпидермис; 2 - колленхима; 3 - друзы оксалата кальция; 4 - склеренхима; 5 - флоэма

2.2. Анатомо-гистологическое исследование плодов сенны александрийской

Впервые проведены морфолого-анатомические исследования плодов сенны александрийской. Изучена морфология, анатомия и гистология плодов сенны александрийской, которые заключаются в особенности строения створок, плодоножек и семени боба сенны александрийской (рис. 3, 7).

Выявлены диагностические признаки, характерные для створок боба сены александрийской: экзокарпий - один слой сильно кутинизированных с поверхности клеток с волнистым краем; мезокарпий состоит из слоя крупных паренхимных клеток с бесцветным протопластом; эндокарпий, представляющий собой разнонаправленные слои склеренхимных волокон, дополнительно армированных крупнопросветными склереидами, а также наличие неравномерного по толщине губчатого слоя эндокарпа достигающего в медиальной части до 5 клеток в толщину, а в базальной части отсутствующего; клетки экзокарпия с поверхности пигментированы неравномерно, пигментация усиливается ближе к базальной части боба, в экзокарпии встречаются устьичные аппараты аномоцитного типа; опушение боба составляют простые многоклеточные волоски, степень опушения не зависит от места среза, места прикрепления волосков после их опадания сильно пигментированы, пигмент реагирует с раствором щелочи с усилением окраски (бурый цвет) (рис. 3, 4).

Выявлены диагностические признаки, характерные для плодоножек боба сенны александрийской: поперечное сечение плодоножек овальной формы не пучкового строения. Сердцевина выражена слабо; флоэмная область по периферии армирована клетками со значительно утолщенными целлюлозными стенками; слой первичной коры выполнен основной паренхимой с крупными живыми клетками с заметно утолщенной целлюлозной оболочкой. В паренхиме первичной коры ближе к эпидерме могут встречаться склеренхимные волокна; эпидерма с поверхности покрыта кутикулой. Трихомы отсутствуют (рис. 5).

Выявлены диагностические признаки, характерные для семени сенны александрийской: семена боба симметричные, их форма угловатая, яйцевидная, почти 3-угольная, поверхность складчатая; кожура блестящая, окраска её от золотисто-желтой до светло-зеленой с темно-бурым пятном в области рубчика; спермодерма представлена слоем палисадных клеток высотой до 50-56 мкм. Она покрыта мощным слоем бесцветной кутикулы, достигающей в толщину 20 мкм (рис. 6, 7).

При рассмотрении с поверхности имеет место особое сильноизвилистое очертание клеток; гиподермальный слой образован склереидами с заметно утолщенными стенками катушкообразной формы; пучок рафэ мелкий, коллатеральный, окружен паренхимой, составленный клетками с сильно утолщенными целлюлозными стенками, имеющими живой протопласт, окрашивающийся раствором Судана III в розовый цвет; семенная кожура на поперечном срезе семени имеет волнистую структуру, за счет складок спермодермы и плеврограммы.

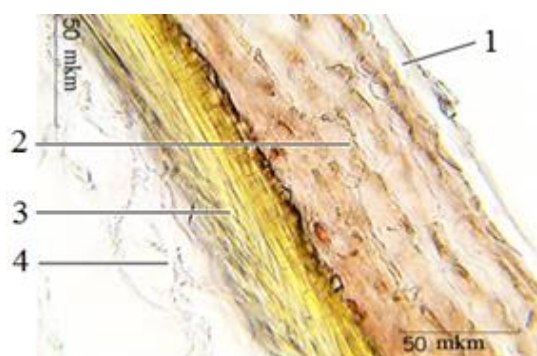


Рисунок 3. Створка боба. Поперечный срез медиальной части (x400)

А – фрагмент с устьищем; Б – фрагмент, окраска серноокислым анилином.

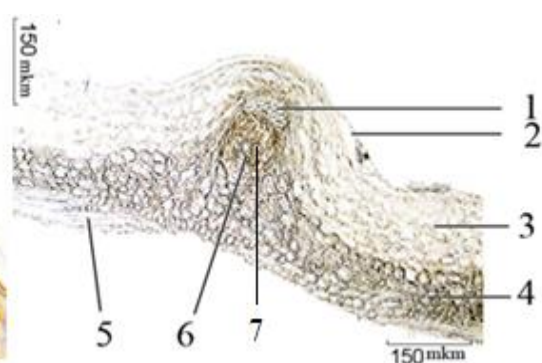


Рисунок 4. Проводящий пучок на продольном сечении створки боба в средней части

А - общий вид; Б - проводящий пучок (x400)

Обозначения: 1 – кутикула; 2 – мезокарпий;
3 – экзокарпий; 4 – паренхима плаценты

Обозначения: 1 – лубяные волокна;
2 – экзокарпий; 3 – паренхима мезо;
4 – склереиды эндокарпия; 5 – волокна
склеренхимы эндо; 6 – элемент ксилемы;
7 – флоэма

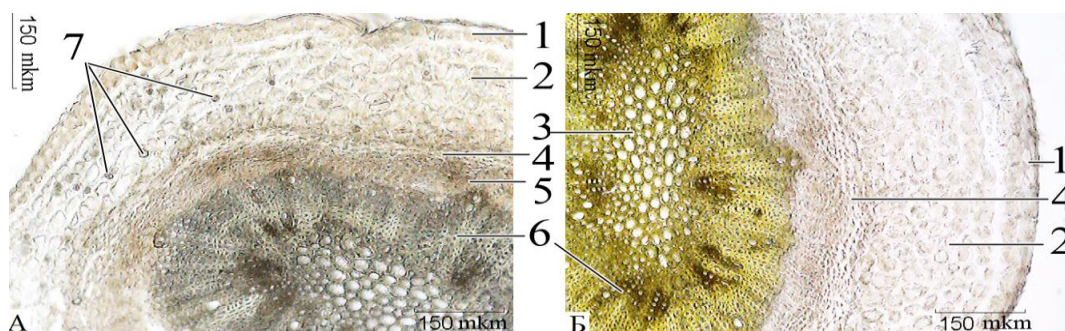


Рисунок 5. Коровая часть плодоножки боба. Поперечный срез (x100)

А – фрагмент до окраски; Б - окраска серноокислым анилином.

Обозначения: 1 – эпидермис; 2 – паренхима коры; 3 – склеренхима; 4 – флоэма;
5 – ксилема; 6 – сердцевина; 7 – друзы

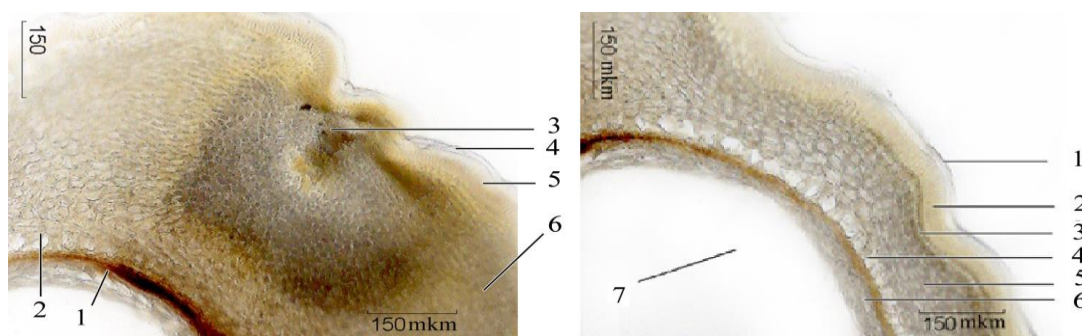


Рисунок 6. Проводящие пучки семени.

Поперечный срез, фрагмент семени с рафэ (x 100)

Обозначения: 1 – эндосперм; 2 – ряд крупнопросветных клеток; 3 – пучок рафэ;
4 – кутикула; 5 – палисадные клетки;
6 – паренхима

Рисунок 7. Семенная оболочка. Поперечный срез. Обработка 5% раствором щелочи, фрагмент оболочки (x100)

Обозначения: 1 – кутикула; 2 – палисадные клетки; 3 – гиподерма; 4 – слой крупнопросветных клеток; 5 – паренхима;
6 – эндосперм; 7 – полость семени

2.3. Анатомио-гистологическое исследование корней марены красильной

В результате проведения морфолого-анатомических и гистологических исследований корней марены красильной подтверждено классическое строение корня, которое заключается в наличии пробкового слоя, состоящего из одного ряда клеток с тонкими оболочками; основной паренхимы, которая представлена крупными извилистыми клетками и содержащей большое количество рафид оксалата кальция; ярко выраженного тонкого, однорядного камбиального кольца; сосудов древесины, полости которых встречаются тиллы, между сосудами расположены группы желтоватых одревесневших лубяных волокон с толстыми стенками, окруженные кристаллоносной обкладкой (рис. 8, 9).

В качестве основной гистохимической реакции на антраценпроизводные использована окраска 33 % раствором натрия гидроксида. Следует заметить, что все структуры корней и корневищ окрашивается в темный красно-фиолетовый цвет под воздействием реактива (рис. 9).

На основе этого сделано предположение, что во всех тканях накапливаются антраценпроизводные.

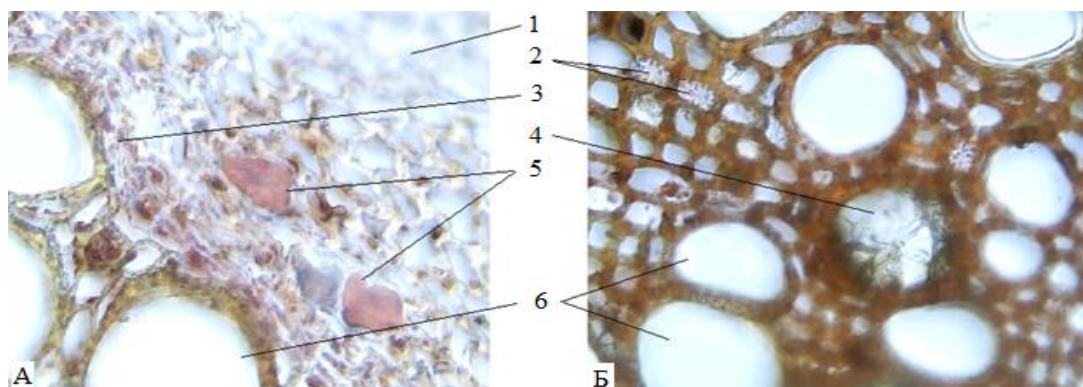


Рисунок 8. Поперечный срез корней марены красильной (x400)

А – фрагмент с камбием; Б – фрагмент с сосудами

Обозначения: 1 – корковая паренхима; 2 – лубяные волокна; 3 – камбий; 4 – тиллы;
5 – рафиды оксалата кальция; 6 – сосуды

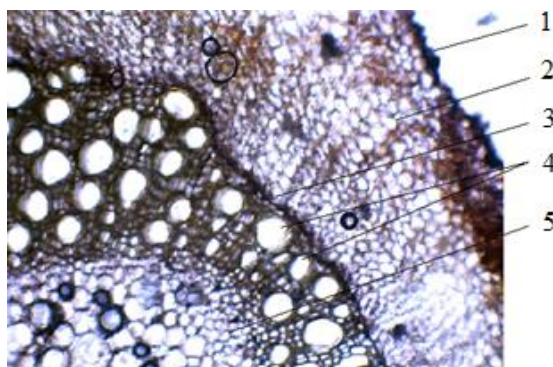


Рисунок 9. Поперечный срез корней марены красильной (x100)

А – фрагмент с поперечного среза; Б – фрагмент, окраска раствором натрия гидроксида.

Обозначения: 1 – пробка; 2 – корковая паренхима; 3 – камбий;
4 – сосуды; 5 – сердцевина

2.4. Анатомо-гистологическое исследование корней ревеня тангутского

При исследовании анатомических признаков установлено, что на поперечном срезе корни имеют лучистое строение и округлую форму; пробковый слой состоит не только из старых слущивающихся слоев, но также имеет новые слои, состоящие из ровных 3-5 рядов клеток правильной прямоугольной формы; паренхима представлена крупными овальными клетками, где содержатся очень крупные друзы оксалата кальция (до 100-120 мкм), расположенные как по отдельности, так и группами; феллодерма представлена слоем из 5-6 рядов клеток правильной прямоугольной формы, с утолщенными стенками; многорядный камбий; узкие, однорядные сердцевинные лучи; многочисленные сосуды, которые располагаются как одиночно, так и группами (рис. 10, 11).

В ходе анатомо-гистологических исследования корней ревеня тангутского проводили гистохимические реакции с такими реактивами, как раствор Люголя, раствор железоаммониевых квасцов и раствор натрия гидроксида. В качестве основной гистохимической реакции на антраценпроизводные использована реакция с раствором натрия гидроксида. Следует заметить, что пробка не окрашивается в красный цвет под воздействием реактива. На основе этого сделано предположение, что антраценпроизводные в покровных

тканях не накапливаются. Глубже, вслед за пробкой, располагается основная паренхима коровой части корня, отдельные клетки которой окрашены в красный цвет, что обусловлено наличием антраценпроизводных. В корнях ревеня тангутского содержится крахмал, который при взаимодействии с раствором Люголя окрашивается в черный цвет. Крахмал диагностируется как в первичной, так и во вторичной коре. При проведении гистохимической реакции на корни ревеня тангутского хорошо диагностируются дубильные вещества, которые при взаимодействии с раствором железисто-аммониевых квасцов окрашивают древесину в темно-зеленый цвет, что свидетельствует о наличии группы конденсированных дубильных веществ, а сердцевину в темно-синий цвет, что говорит о наличии группы гидролизуемых дубильных веществ.

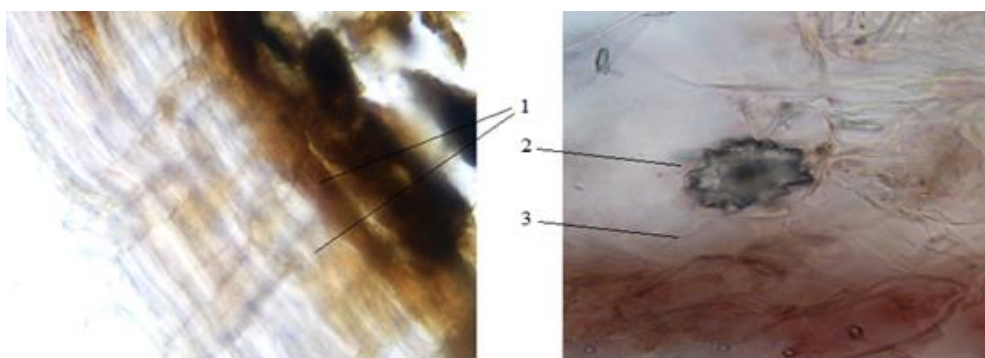


Рисунок 10. Поперечный срез корня ревеня тангутского (*Rheum palmatum* L.) (× 400)

Обозначения: 1 – пробковый слой, 2 – основная паренхима коровой части корня, окрашенная в красный цвет; 3 – друза

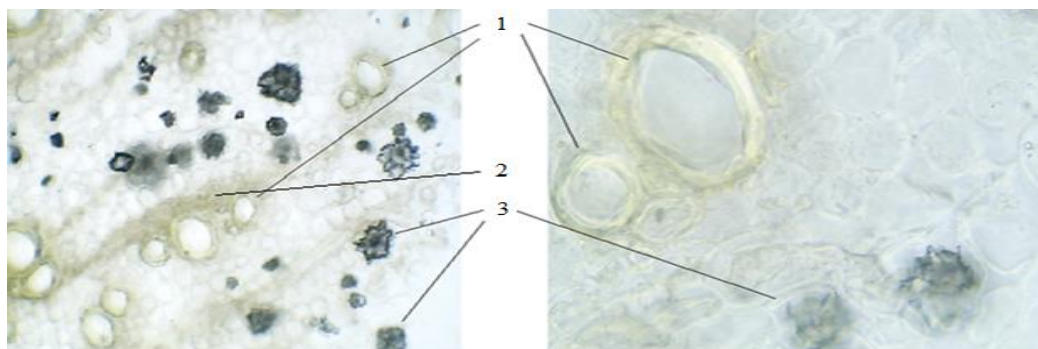


Рисунок 11. Поперечный срез корня ревеня тангутского (*Rheum palmatum* L.)
А - (× 100); Б - (× 400)

Обозначения: 1- сосуды древесины; 2 – сердцевинный луч; 3 – друзы

2.5. Анатомо-гистологическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного

Впервые проведены морфолого-анатомические исследования листьев и побегов алоэ древовидного. Изучены особенности морфологии, анатомии и гистологии листьев и побегов алоэ древовидного. Выявлены диагностические признаки, характерные для листа алоэ древовидного: поверхность листа покрыта восковым слоем, состоящим из сферических, выпуклых бляшек; клетки верхнего эпидермиса с малоизвилистыми или почти прямыми стенками, нижнего – извилистые; устьица с 4 околоустьичными погруженными клетками; толстостенный, однослойный эпидермис; палисадная ткань (хлоренхима), состоящая из округлых клеток, которые содержат рафиды, крупные

клетки мезофилла со слизистым содержимым и рафидами, закрытые коллатеральные проводящие пучки, обращенные ксилемой внутрь, флоэмой снаружи; вокруг флоэмы располагается слой «алоиновых» клеток, содержащих желтый сок (рис. 12, 13).

Поперечный срез побега алоэ не имеет классического строения. Листья алоэ древовидного формируют побег. Нами установлено следующие особенности строения побегов: строение поперечного среза побегов по структуре отражает анатомическое строение листа, с недостаточно сформировавшимися алоиновыми клетками, возможно, с их отсутствием или с трудностью микроскопической диагностики. На поперечном срезе побега алоэ диагностируется слой эпидермы. Субэпидермально располагается слой клеток колленхимного характера. Ближе к периферии находятся слои пластинчатой колленхимы, а глубже - уголковой. Под колленхимой лежит небольшой слой паренхимы первичной коры. Первичная кора содержит в ряде вытянутых вдоль стебля клеток пучки рафид или кристаллов. На границе колленхимы с паренхимой располагаются в 1 ряд, на расстоянии друг от друга коллатеральные закрытые проводящие пучки с флоэмой, обращенной к эпидермису. В паренхиме содержится большое количество рафид или кристаллов (рис. 14, 15).

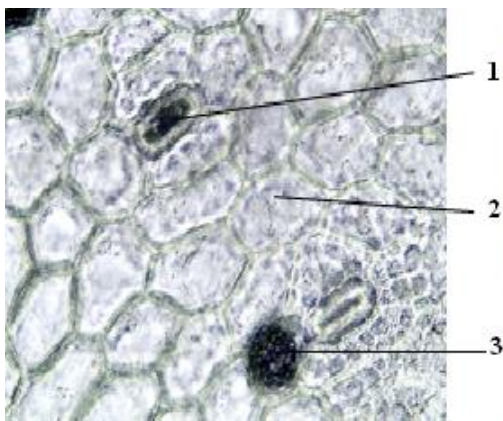


Рисунок 12. Препарат листа алоэ древовидного (верхний эпидермис) (x400)

Обозначения:

- 1 – устьице; 2 – хлоренхима;
- 3 – секреторная клетка

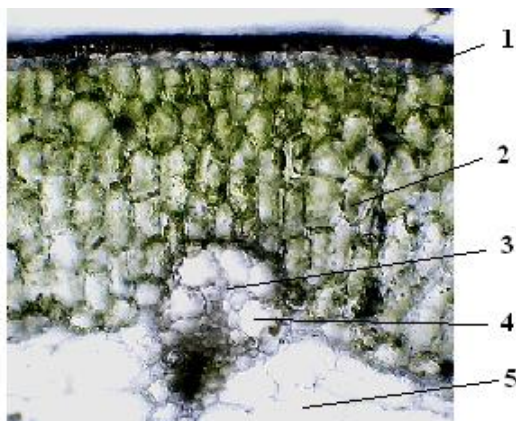


Рисунок 13. Поперечный срез листа алоэ древовидного (x400)

Обозначения:

- 1 – эпидермис; 2 – палисадная ткань;
- 3 - закрытый проводящий пучок;
- 4 – «алоиновые» клетки; 5 – паренхима



Рисунок 14. Поперечный срез побега алоэ древовидного (x100)

Обозначения:



Рисунок 15. Поперечный срез побега алоэ древовидного (x400)

Обозначения:

1 – эпидерма; 2 – колленхима; 3 – паренхима первичной коры; 4 – закрытый проводящий пучок; 5 – крупноклеточная паренхима центрального цилиндра; 6 – кристаллы

1 – Пучки рафид или кристаллов в паренхиме побега

2.6. Анатомо-гистологическое исследование порошка коры крушины ломкой

При рассмотрении порошка коры крушины под лупой (10 х) видна смесь частиц коры желтовато-коричневого цвета с коричневыми, темно-коричневыми, серо-коричневыми, темно-серыми, серыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Пробка коры крушины темно-коричневого цвета. При исследовании анатомических признаков установлено, что клетки пробки коры крушины ломкой имеют квадратную форму, клеточная стенка прямая, равномерно утолщенная. У крушины ломкой паренхима первичной коры хорошо развита и содержит слизесодержащие вместилища, что является отличительным анатомо-гистологическим признаком. При микроскопическом изучении порошка крушины ломкой обнаружены сердцевинные лучи с кристаллоносной обкладкой и друзы оксалата кальция игольчатой формы (рис.16).

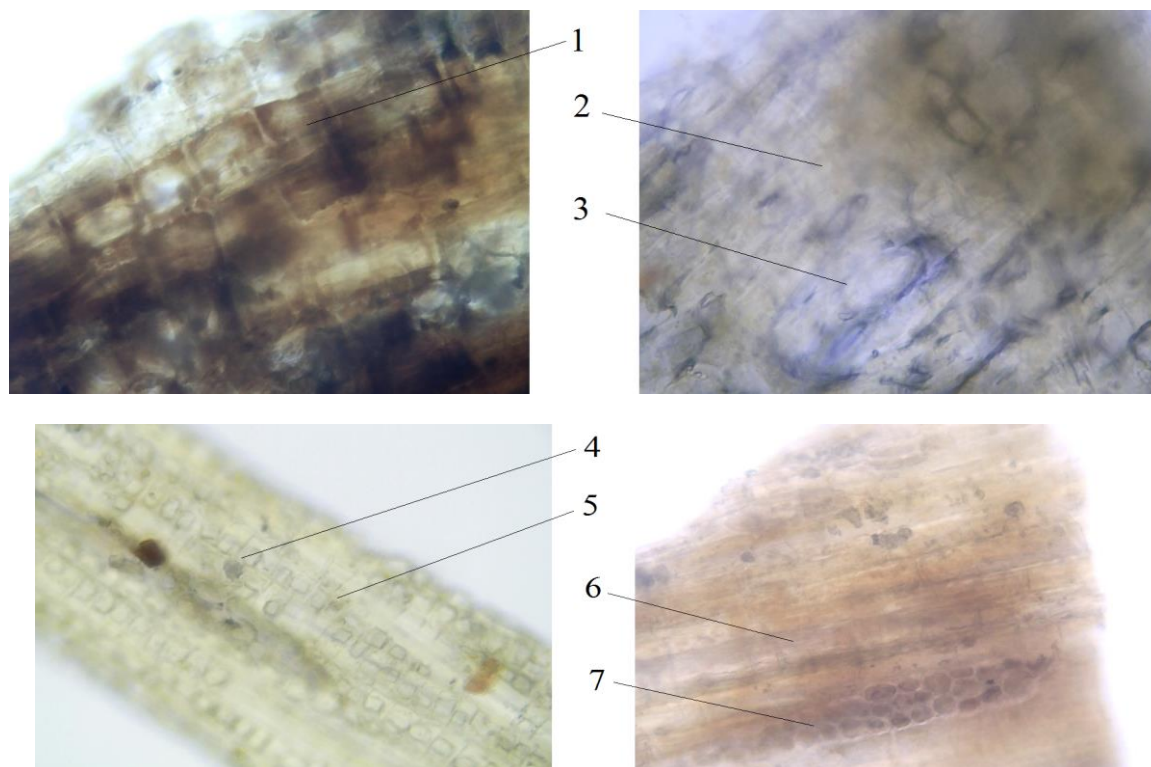


Рисунок 16. Порошок коры крушины ольховидной (х 400)

Обозначения:

1 – пробка; 2 – паренхима первичной коры; 3 – слизесодержащее вместилище; 4 – друзы; 5 – сердцевинный луч; 6 – лубяные волокна; 7 – ткани вторичной коры

2.7. Анатомо-гистологическое исследование порошка плодов жостера слабительного

При рассмотрении порошка плодов жостера слабительного под лупой (10 х) видна смесь частиц плодов коричневого цвета с коричневыми, темно-коричневыми, серо-коричневыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. В изученном порошке плодов жостера слабительного обнаружены фрагменты экзокарпия, мезокарпа, эндокарпа,

обрывки семенной кожуры и ткани зародыша. Порошок плодов жостера слабительного представляет собой совокупность частиц с достаточно хорошо идентифицируемыми диагностически значимыми элементами. А именно фрагменты экзокарпа, состоящего из мелких, довольно толстостенных, полигональных клеток; колленхима, представленная несколькими рядами клеток, причем клетки колленхимы двух наружных рядов крупнее и более толстостенные, в них, как правило, имеется пигмент коричневого цвета, дающий реакцию на дубильные вещества (с раствором алюмо-калиевых квасцов); паренхима мезокарпа, где разбросаны одиночные или собранные группами идиобласты с коричневым содержимым; эндокарпий представлен рядом мелких кристаллоносных клеток, покрывающих ряд толстостенных склереид (рис. 17).

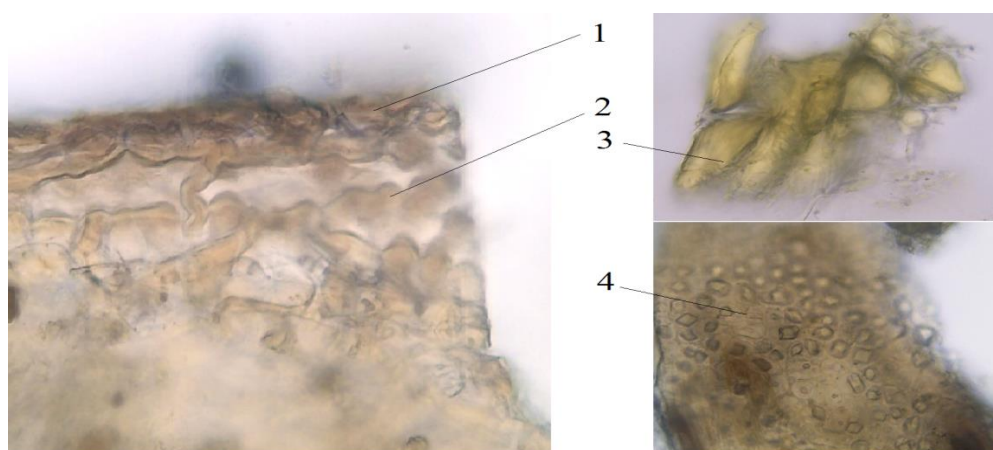


Рисунок 17. Порошок плодов жостера слабительного (х 400)

Обозначения:

1 – экзокарпий; 2 – колленхима; 3 – клетки паренхимы с пигментом; 4 – эндокарпий

Результаты анатомо-гистологических исследований коры крушины ломкой и плодов жостера слабительного включены в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания (ФС.2.5.0021.15 - «Крушины ольховидной кора», ФС.2.5.0014.15 - «Жостера слабительного плоды»). Исследования по анатомо-гистологической характеристике сырья сенны александрийской (*Senna alexandrina* Mill.), ревеня тангутского (*Rheum palmatum* L.), алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.), марены красильной (*Rubia tinctorum* L.) могут быть использованы для определения подлинности и представляют интерес с точки зрения диагностики данного лекарственного растительного сырья.

3. Исследование химического состава фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды

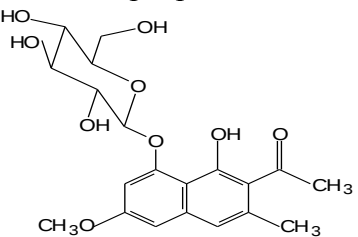
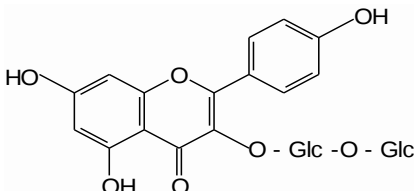
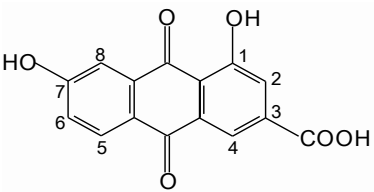
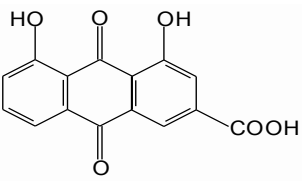
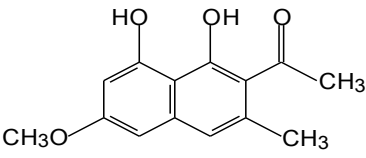
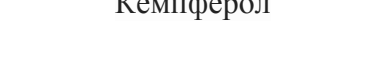
3.1. Фитохимическое исследование лекарственного растительного сырья листьев сенны александрийской

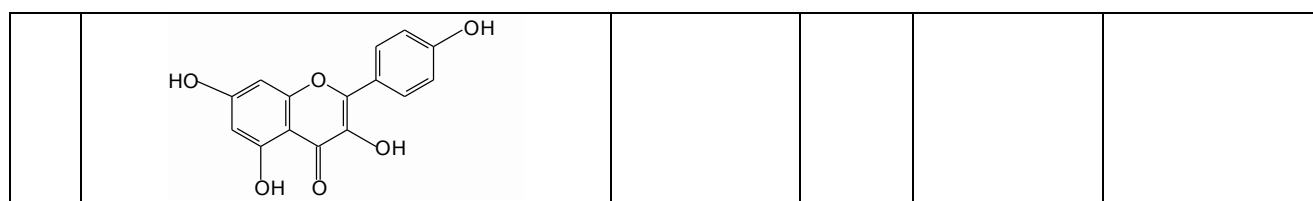
В результате исследования компонентного состава листьев кассии выделены три доминирующих вещества - 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона (производное нафталина), кемпферол-3-О-гентиобиозид (флавоноид) и 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон (антрахинон) (таблица 1).

Для установления структуры выделенных веществ использованы данные ТСХ-анализа, УФ-, ¹H-ЯМР-спектров, ¹³C-ЯМР-спектров, масс-спектрометрии, ИК-спектрометрии,

результаты химических превращений, а также непосредственное сравнение с достоверными образцами веществ.

Таблица 1. Физико-химические и спектральные характеристики соединений, выделенных из листьев сенны александрийской

№	Название, химическая формула	Состав	М ⁺	Т.пл. °С	λ _{max} (EtOH), нм
1.	8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона 	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	М ⁺ 408 М ⁺ агли- кона 246	Аморфное вещество	241, 265пл, 332пл, 344
2	Кемпферол-3-О-гентиобиозид 	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	286 (М ⁺ агли- кона)	174-177	269, 350
3	1,7-Дигидрокси-3- карбоксиантрахинон 	C ₁₅ H ₈ O ₆	М ⁺ 284	305-308	234, 264, 433
4	Реин 	C ₁₅ H ₈ O ₆	М ⁺ 284	318-320	238, 265, 440
5	Торахризон 	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	М ⁺ 246	Аморфное вещество	241, 265пл, 332пл, 344
6	Кемпферол 	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	М ⁺ 286	283-285	267, 359



В ^1H -ЯМР-спектре 1,7-дигидрокси-3-карбоксиянтрахинона обнаруживается наличие одного уширенного синглетного сигнала при 11,91 м.д., принадлежащего 1-ОН-группе, в сочетании с характером сигналов ароматических протонов при С-5, С-6 и С-8 (рис. 18). Структура соединения **3** подтверждается также и данными ^{13}C -ЯМР-спектра, в котором обнаруживаются сигнал С-1 при 160.99 м.д. и сигнал С-8 при 124.03 м.д. (рис. 19).

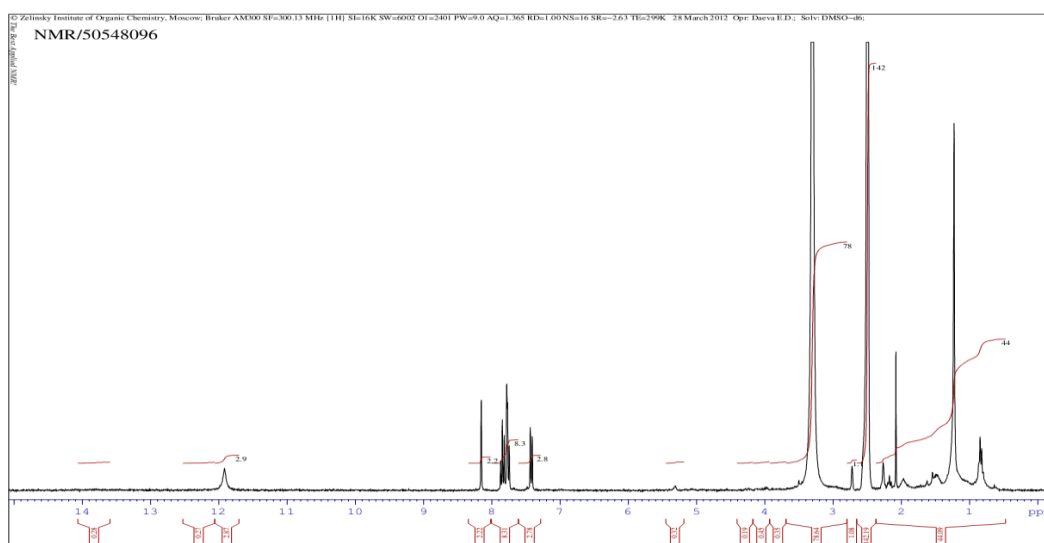


Рисунок 18. ^1H -ЯМР спектр 1,7-дигидрокси-3-карбоксиянтрахинона (неореина)

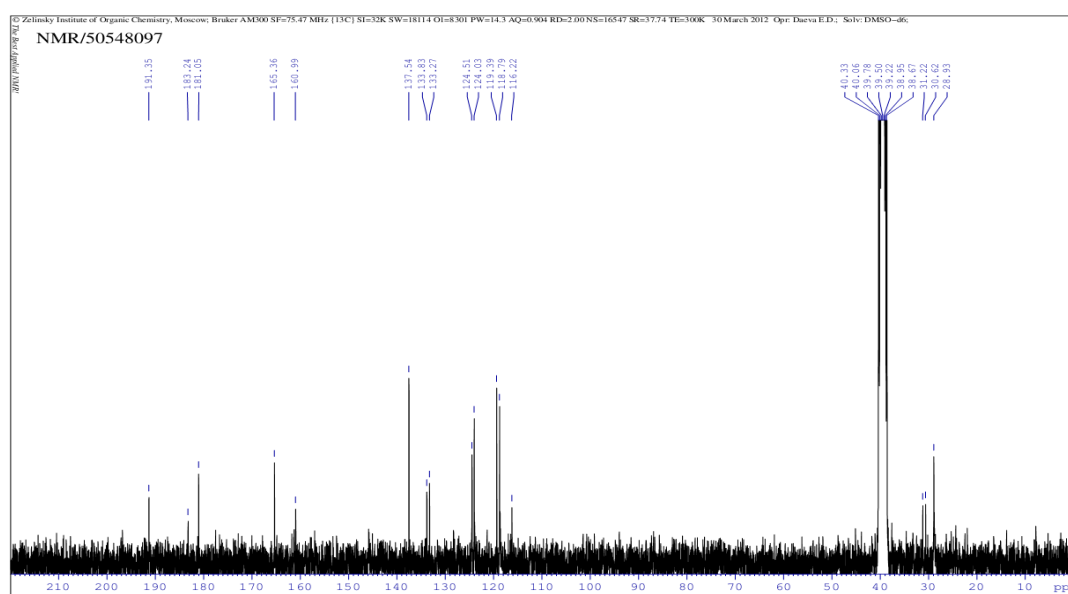
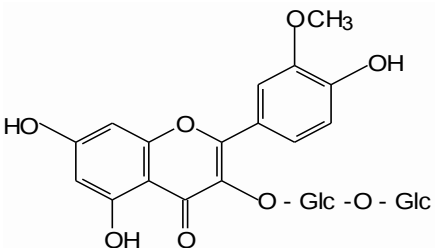
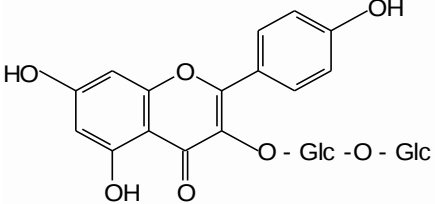
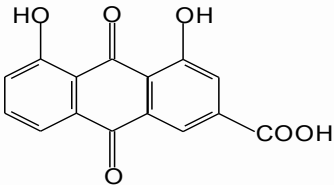
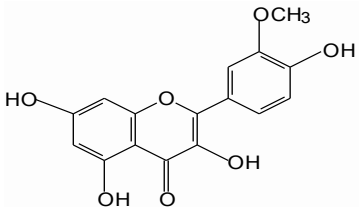


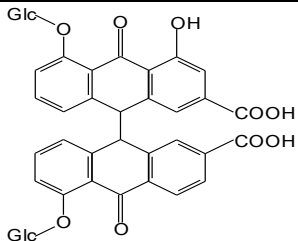
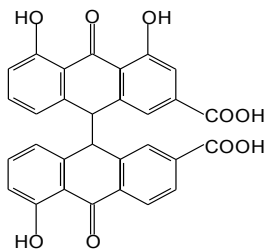
Рисунок 19. ^{13}C -ЯМР спектр 1,7-дигидрокси-3-карбоксиянтрахинона (неореина)

3.2. Фитохимическое исследование лекарственного растительного сырья плодов сенны александрийской

В результате исследования компонентного состава плодов кассии остролистной выделены два доминирующих вещества - изорамнетин-3-О-гентиобиозид (флавоноид) и 1,8-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон (реин) (антрахинон). Кемпферол-3-О-гентиобиозид (флавоноид), являющийся доминирующим флавоноидом листьев сенны остролистной, а также сеннозид В (антрагликозид), выделены в минорных количествах (таблица 2).

Таблица 2. Физико-химические константы выделенных соединений

№	Название, химическая формула	Состав	M ⁺	Т.пл. °С	λ _{max} (EtOH), нм
1.	Изорамнетин-3-О-гентиобиозид 	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	316 (M ⁺ агли- кона)	174-177	266, 275(пл), 368
2	Кемпферол-3-О-гентиобиозид 	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	286 (M ⁺ агли- кона)	174-177	269, 350
3	1,8-Дигидрокси-3-карбоксиантрахинон (реин) 	C ₁₅ H ₈ O ₆	M ⁺ 284	318-320	238, 265, 440
4	Изорамнетин 	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	M ⁺ 316	295-297	256, 269 пл, 370
5	Сеннозид В	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	M ⁺ 862	180-185	210, 270, 307, 356

					
6	Сеннидин В (диреин) 	$C_{30}H_{18}O_{10}$	$M^+ 538$	178-186	210, 240, 270, 306, 355

В 1H -ЯМР-спектре реина характерным является двухпротонный синглетный сигнал при 11,91 м.д., свидетельствующий о наличии свободных 1-ОН-группы и 8-ОН-группы (рис. 20). Сигналы ароматических протонов проявляются следующим образом: Структура соединения 3 подтверждается также и данными ^{13}C -ЯМР-спектра, в котором обнаруживаются сигнал С-1 при 161.05 м.д. и сигнал С-8 при 161.39 м.д. Сигнал карбоксильной группы присутствует в спектре при 191,34 м.д., следовательно, соединение **является** реином (рис. 21).

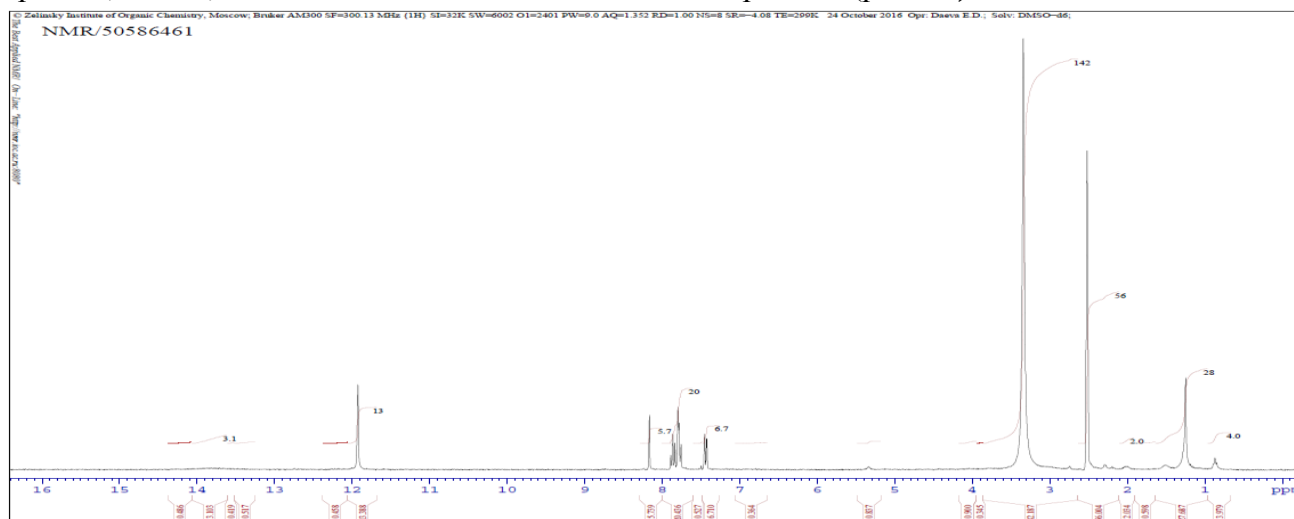


Рисунок 20. 1H -ЯМР спектр 1,8-дигидрокси-3-карбоксиантрахинона (реина)

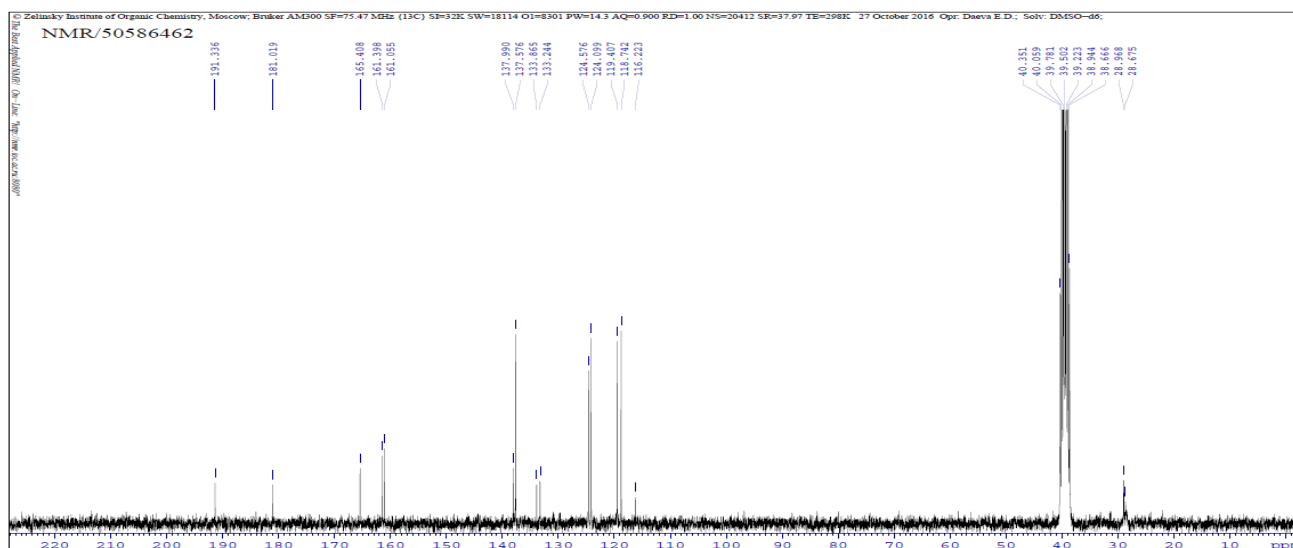


Рисунок 21. ^{13}C -ЯМР спектр 1,8-Дигидрокси-3-карбоксиантрахинона (реина)

3.3. Фитохимическое исследование лекарственного растительного сырья корней марены красильной

В результате исследования компонентного состава корней марены красильной выделено доминирующее вещество - руберитриновая кислота (антрахинон) (таблица 3).

Таблица 3. Физико-химические константы выделенных соединений

№	Название, химическая формула	Состав	M^+	Т.пл. °C	λ_{max} (EtOH), нм
1.	Руберитриновая кислота	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	557 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	255-257	260, 331, 416

В основе руберитриновой кислоты лежит ализарин, или 1,2-дигидроксиантрахинон. Этот вывод сделан на основании данных ^1H -ЯМР-спектра соединения руберитриновой кислоты: наличие при 13,00 м.д. одного уширенного синглетного сигнала, принадлежащего 1-ОН-группе, в сочетании с характером сигналов ароматических протонов при C-3, C-4, C-5, C-6, C-7 и C-8 (рис. 22), которые соответствуют литературным данным.

Строение руберитриновой кислоты подтверждается и данными ^{13}C -ЯМР-спектра, который согласуется с литературными данными (рис. 22, 23).

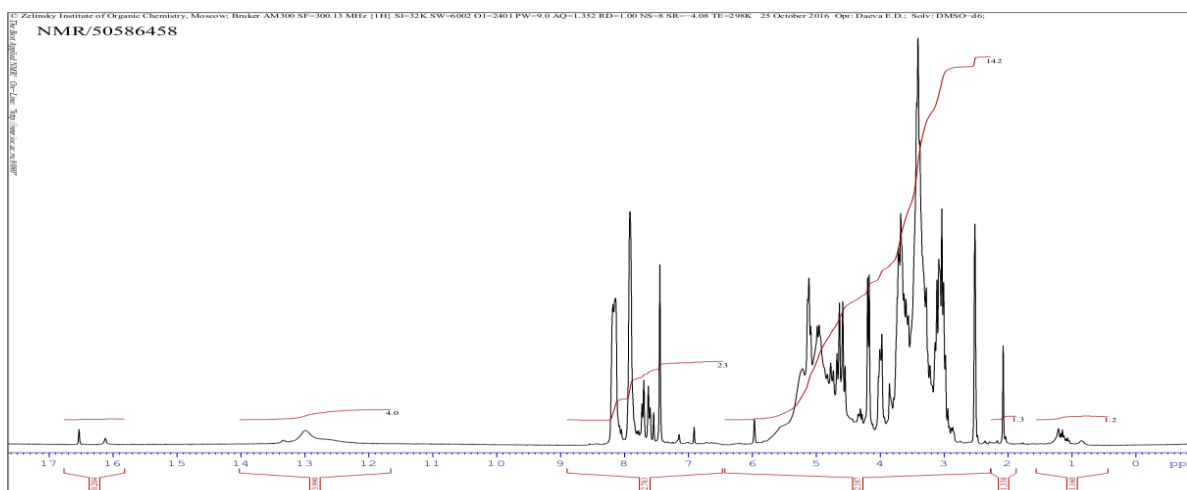


Рисунок 22. ^1H -ЯМР спектр руберитриновой кислоты в DMSO-d_6

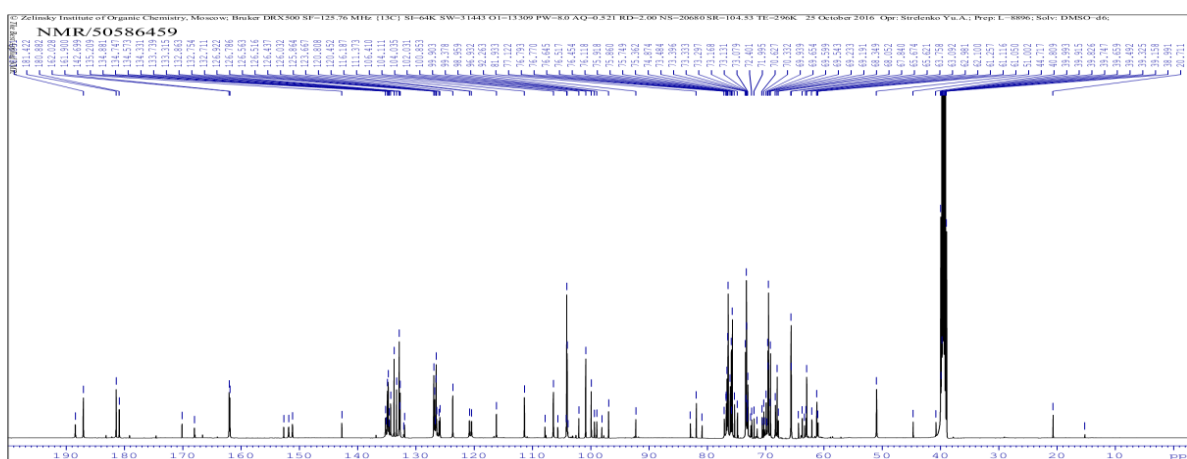


Рисунок 23. ^{13}C -ЯМР спектр руберитриновой кислоты

4. Стандартизация сырья фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные

Сравнительная оценка подходов к стандартизации сырья фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные, свидетельствует о том, что во многих случаях в разделе «Качественные реакции» не предусмотрено использование ТСХ, и анализ осуществляется с использованием химических реакций. Что касается раздела «Количественное определение», то, во-первых, существующие методики крайне громоздки и многостадийны и, во-вторых, не во всех случаях расчет содержания суммы антраценпроизводных осуществляют на вещества, содержащиеся в анализируемом ЛРС. Кроме того, в нормативной документации некоторых видов сырья (плоды сенны александрийской, корни марены красильной) анализ не предусмотрен. Всё это свидетельствует об актуальности проведения исследований в области стандартизации ЛРС и фитопрепаратов, содержащих антраценпроизводные.

4.1. Качественный анализ фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные

Для определения подлинности фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные, разработаны методики тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ИК- и УФ-спектрофотометрии.

4.1.1. Тонкослойная хроматография

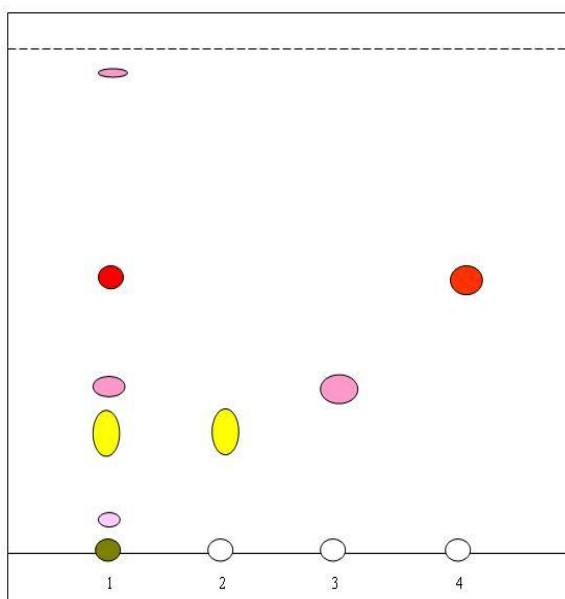


Рисунок 24. Хроматографический профиль водно-спиртового извлечения из листьев сенны александрийской

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение сырья; 2 - кемпферол-3-О-гентиобиозид; 3 - неореин; 4 - 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона

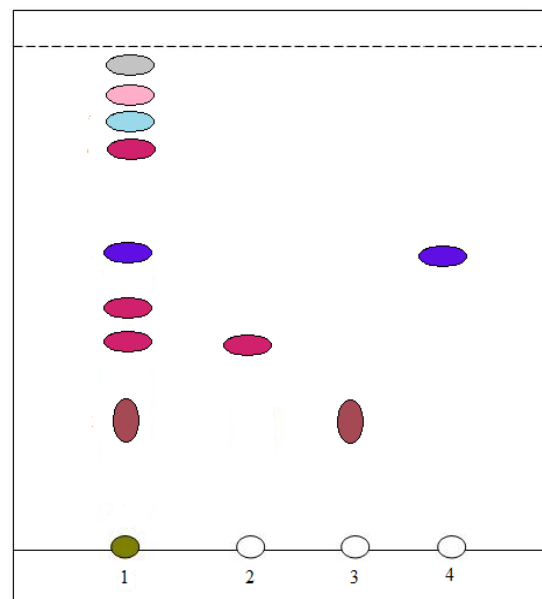


Рисунок 25. Хроматографический профиль водно-спиртового извлечения из плодов сенны александрийской

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение сырья; 2 – реин; 3 - изорамнети-3-О-гентиобиозид; 4 - 8-О-глюкозид торахризона

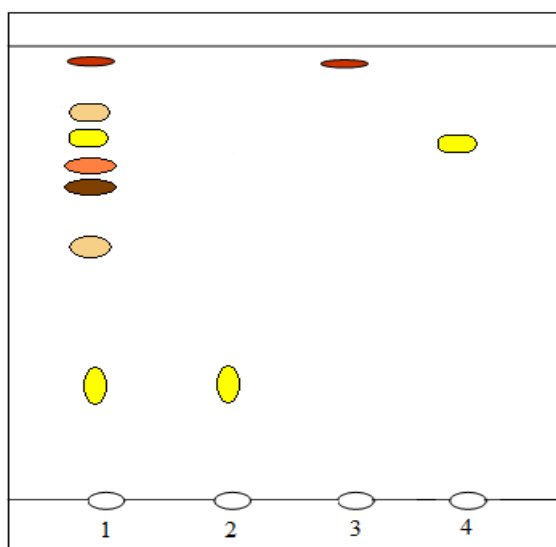


Рисунок 26. Хроматографический профиль водно-спиртового извлечения из корней марены красильной

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение сырья; 2 – руберитриновая кислота; 3 – эмодин; 4 – ализарин

При просмотре хроматографического профиля водно-спиртового извлечения из листьев сенны александрийской в УФ-спектре при длине 254 нм неореин обнаруживается в виде доминирующего пятна с ярко желтой флуоресценцией (R_f около 0,3), 8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона обнаруживается в виде пятна с фиолетовой флуоресценцией (R_f около 0,6), кемпферол-3-О-гентиобиозид обнаруживается в виде пятна с оранжево-красной флуоресценцией (R_f около 0,2) (рис. 24).

При изучении хроматографического профиля водно-спиртового извлечения из плодов сенны александрийской в УФ-спектре при длине волны 254 нм реин обнаруживается в виде доминирующего пятна оранжево-красного цвета (R_f около 0,4), 8-О-глюкозид торахризона (производное нафталина) обнаруживается в виде пятна фиолетового цвета (R_f около 0,6),

изорамнети-3-О-гентибиозид (флавоноид) обнаруживается в виде пятна красно-коричневого цвета (R_f около 0,3) (рис. 25).

На хроматографическом профиле водно-спиртового извлечения из корней марены красильной в УФ-спектре при длине волны 254 нм обнаруживается доминирующие пятна антраценпроизводной природы, имеющее желтую окраску с величиной R_f около 0,3 (руберитриновая кислота), а также темно-красное пятно с величиной R_f около 0,8 (эмодин) (рис. 26).

В Государственной фармакопее РФ XIII издания фармакопейные статьи на марену красильную и плоды сенны александрийской отсутствуют, и в случае марены красильной приходится использовать устаревшие методики качественного анализа Государственной фармакопеи СССР XI издания. В фармакопейной статье «Сенны листья» хроматографические профили водно-спиртового извлечения сравнивают лишь со стандартным образцом сеннозида В и отсутствующем в сырье барбалоином. Разработанные нами методики тонкослойной хроматографии лекарственного растительного сырья фармакопейных растений, содержащих антрагликозиды, позволят более качественно проводить стандартизацию.

4.1.2. ИК-спектроскопия

В ИК-спектрах антрагликозидов, в структуре которых имеются две карбонильные группы ($C=O$), в области $1625-1620\text{ см}^{-1}$ обнаруживаются две характерные интенсивные полосы поглощения (рис. 27-30).

Интенсивная полоса поглощения в ИК-спектрах в области 3358 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями углеводных ОН-групп, что подтверждает гликозидную природу веществ. Аналогичная полоса поглощения наблюдается и в ИК-спектре флавоноида сенны александрийской (кемпферол-3-О-гентибиозид), что также подтверждает гликозидную природу вещества (рис. 28, 29).

В области $1400-1200\text{ см}^{-1}$ ИК-спектров наблюдаются также полосы поглощения, характерные для фенольных соединений, в том числе антраценпроизводных и флавоноидов. В области $3100-3000\text{ см}^{-1}$ ИК-спектров наблюдаются полосы поглощения, обусловленная валентными колебаниями ароматических $C-H$ (рисунок 27-31).

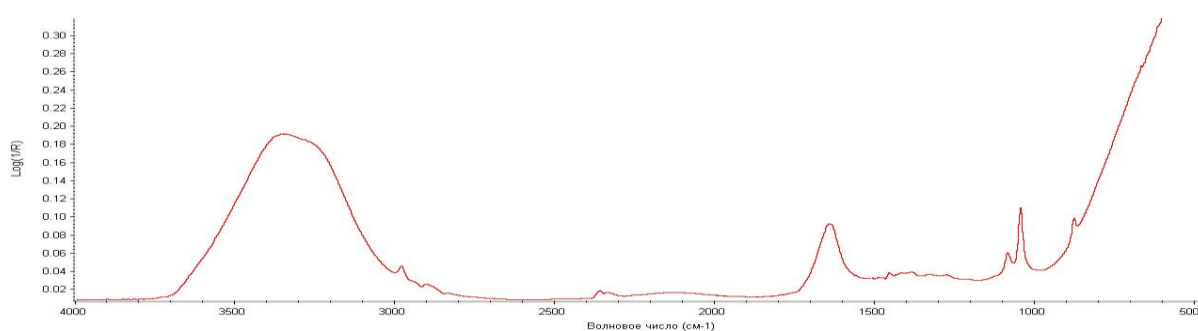


Рисунок 27. ИК-спектр РСО сеннозида В

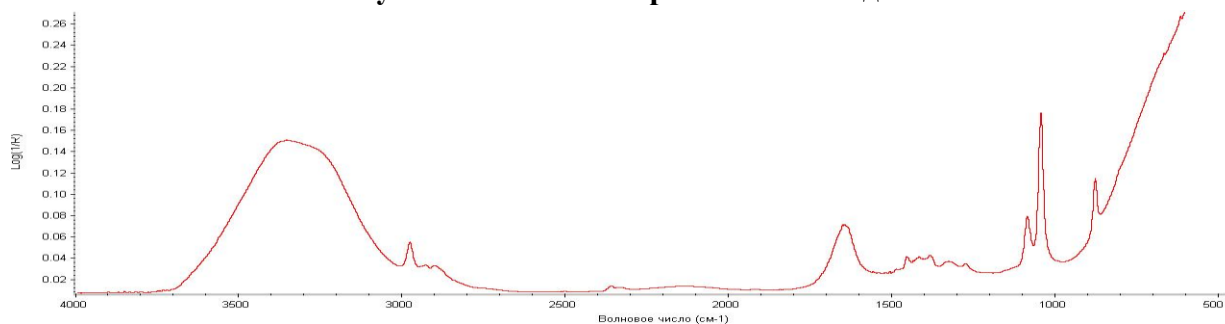


Рисунок 28. ИК-спектр ИК-спектр водно-спиртового извлечения из листьев сенны александрийской

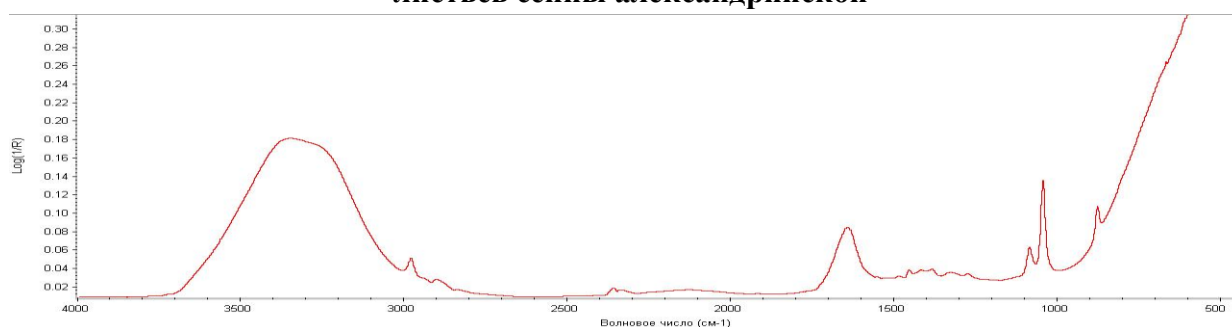


Рисунок 29. ИК-спектр ИК-спектр водно-спиртового извлечения из плодов сенны александрийской

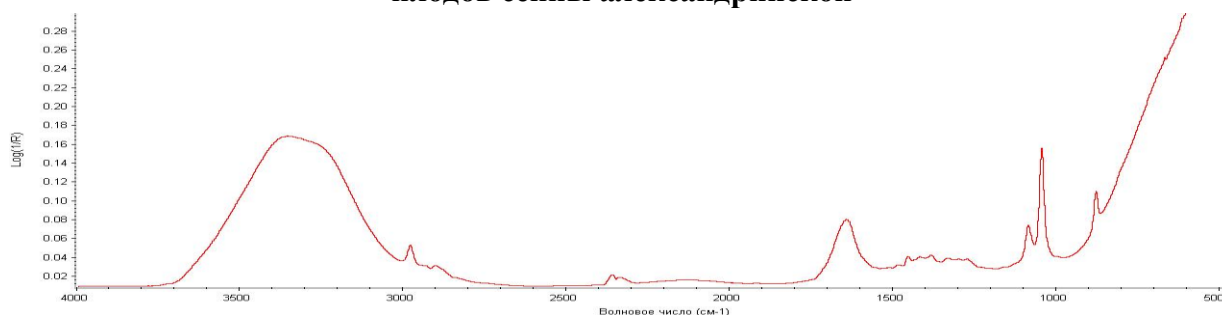


Рисунок 30. ИК-спектр РСО руберитриновой кислоты

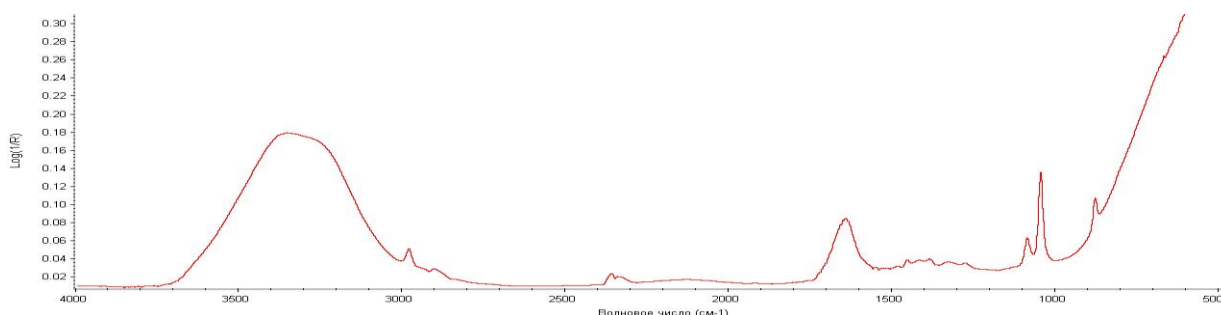


Рисунок 31. ИК-спектр водно-спиртового извлечения из корней марены красильной

В связи с тем, что в Государственной фармакопее РФ XIII и ГФ СССР XI издания отсутствуют методики ИК-спектроскопии для определения подлинности лекарственного растительного сырья, содержащего антрагликозиды, нами разработаны методические подходы использования ИК-спектроскопии для целей стандартизации, заключающиеся в определении характерных интенсивных полос поглощения в области $1625-1620\text{ см}^{-1}$, обусловленных карбонильными группы (C=O) антраценпроизводных.

4.1.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Исследование показало, что одним из характерных компонентов водно-спиртовых извлечений из плодов и листьев сенны александрийской является сеннозид В (антрагликозид) (рис. 33, 34), время удерживания которого практически совпадает с таковым на хроматограмме сеннозида В (рис. 32). В случае водно-спиртового извлечения из корневищ и корней марены

красильной доминирует руберитриновая кислота (рис. 35), время удерживания которой практически совпадает с таковым на хроматограмме руберитриновой кислоты (рис. 36).

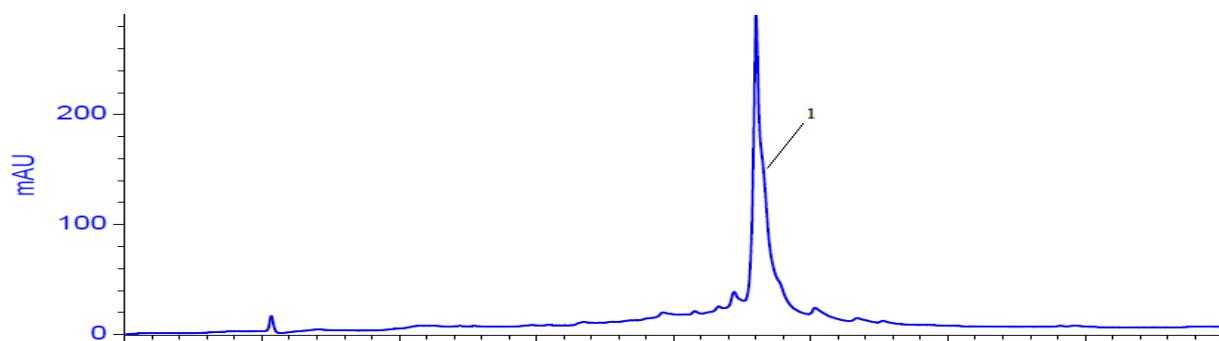


Рисунок 32. Схема хроматограммы ВЭЖХ сеннозида В (пик 1)
(длина волны 270 нм)

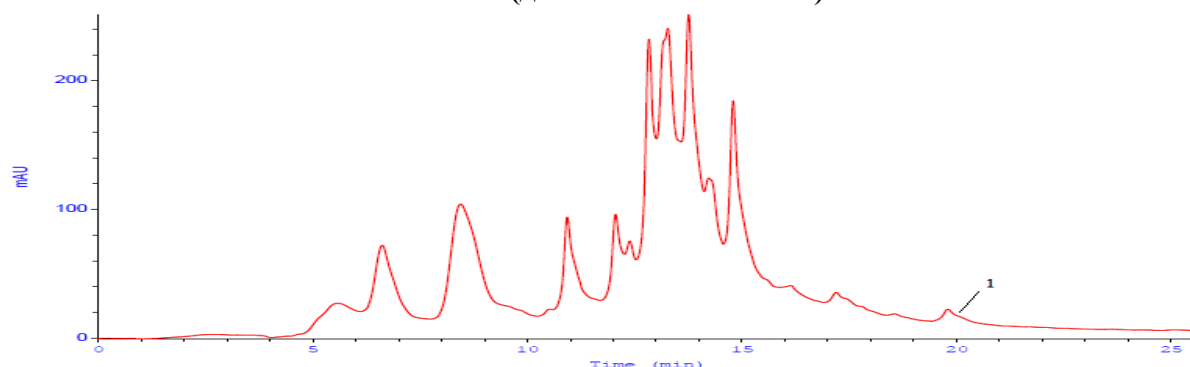


Рисунок 33. Схема хроматограммы ВЭЖХ водно-спиртового извлечения из
листьев сенны александрийской (длина волны - 270 нм)
Обозначения пиков веществ: 1 – сеннозид В

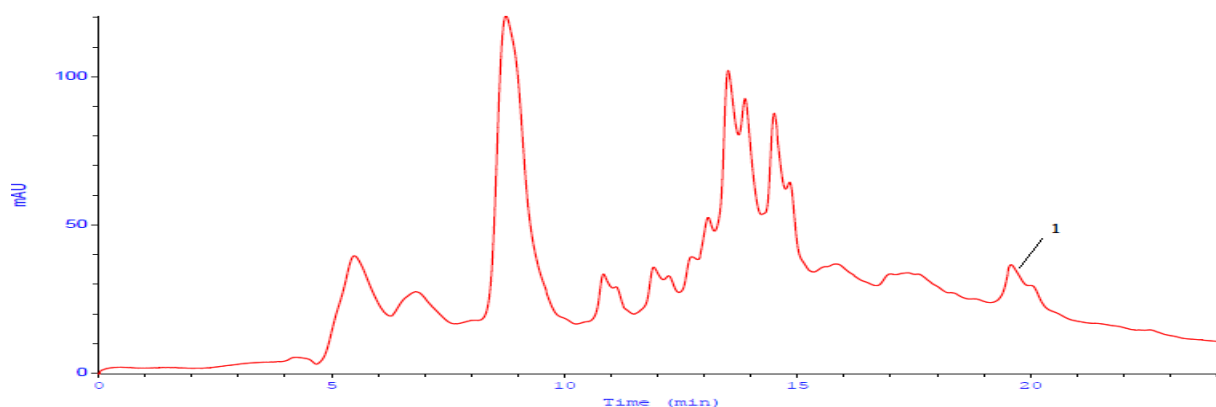


Рисунок 34. Схема хроматограммы ВЭЖХ водно-спиртового извлечения из
плодов сенны александрийской (длина волны - 270 нм)
Обозначения пиков веществ: 1 – сеннозид В



Рисунок 35. Схема хроматограммы ВЭЖХ руберитриновой кислоты (пик 1)



Рисунок 36. Схема хроматограммы ВЭЖХ водно-спиртового извлечения из корней марены красильной (длина волны - 270 нм)

Обозначения пиков веществ: 1 – руберитриновая кислота

Для определения подлинности лекарственного растительного сырья, содержащего антрагликозиды в Государственной фармакопее РФ XIII и ГФ СССР XI издания методики ВЭЖХ-анализа не используются. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о перспективности использования ВЭЖХ для целей стандартизации ЛРС (раздел «Подлинность»), содержащего антрагликозиды.

4.2. Количественный анализ фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные

4.2.1. Количественный анализ антраценпроизводных в листьях сенны александрийской

Исследование УФ-спектров показало, что кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из листьев сенны обусловлена в основном флавоноидами (максимумы поглощения около 270 нм и 350 нм) и коррелируют с таковыми характеристиками кемпферол-3-О-гентиобиозида (рис. 37). При исследовании электронных спектров максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из листьев сенны александрийской находится при длине волны 530 ± 2 нм (рис. 38). В видимой области спектра щелочно-аммиачного раствора сеннозида В также наблюдается четкий максимум поглощения при 530 ± 2 нм (рис. 38). Следовательно, за аналитическую длину волны можно принять значение 530 нм, а стандартным образцом может служить доминирующий антрагликозид – сеннозид В. В случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано установленное в этих условиях значение удельного показателя поглощения вещества – 240.

Определены оптимальные условия экстракции антраценпроизводных в листьях сенны александрийской: экстрагент – спирт этиловый 70%; соотношение сырье: экстрагент – 1:30; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 мин.

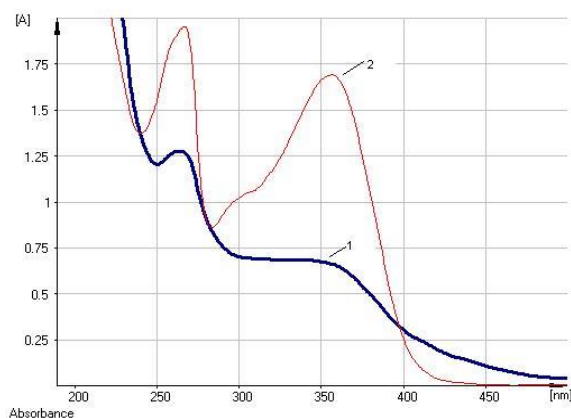


Рисунок 37. Электронные спектры исходный раствор водно-спиртового извлечения из листьев кассии (1) и раствора 3-О-гентиобиозида кемпферола (2)

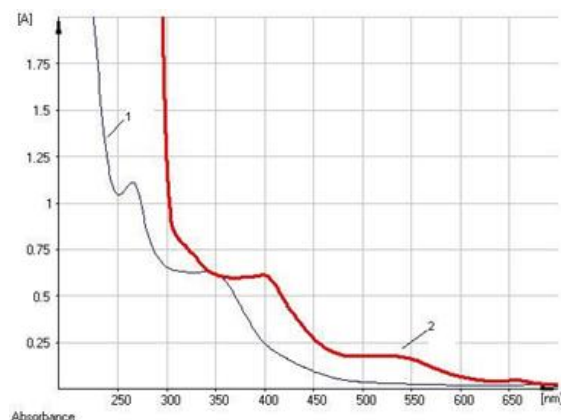


Рисунок 38. Электронные спектры исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из листьев кассии (2)

Содержание антраценпроизводных в листьях сенны александрийской находится в диапазоне 1,52 – 2,25 %.

Метрологические характеристики методики количественного определения листьев сенны александрийской методом спектрофотометрии представлены в таблице 4. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения антраценпроизводных в листьях сенны александрийской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,27$ %.

Таблица 4. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антраценпроизводных в листьях сенны александрийской

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	1,88	0,0276	95	2,23	$\pm 0,061$	$\pm 3,27$

4.2.2. Количественный анализ антраценпроизводных в плодах сенны александрийской

В ходе разработки методики количественного определения суммы антраценпроизводных в плодах сенны александрийской изучены УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из плодов и стандартного раствора сеннозида В. Исследование УФ-спектров показало, что максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из плодов сенны александрийской в длинноволновой области спектра находится при 530 ± 2 нм (рис. 39). В длинноволновой области электронного спектра щелочно-аммиачного раствора сеннозида В также наблюдается четкий максимум поглощения при 530 ± 2 нм (рис. 40). Следовательно, в качестве аналитической длины волны может быть использовано значение 530 нм, а стандартным образцом может служить доминирующий антрагликозид – сеннозид В, причем в случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано теоретическое значение удельного показателя поглощения – 240.

Определены оптимальные условия экстракции антраценпроизводных из плодов сенны александрийской: экстрагент - 40% этиловый спирт; соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 мин.

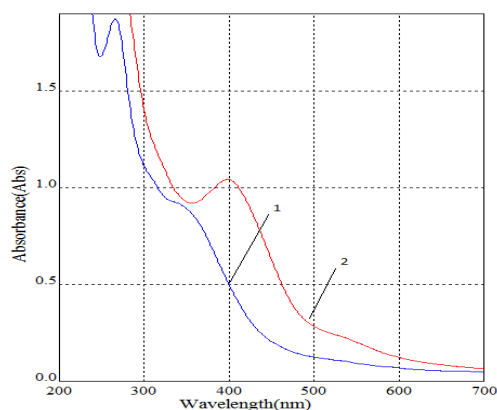


Рисунок 39. Электронные спектры исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора (2) водно-спиртового извлечения из плодов сенны александрийской

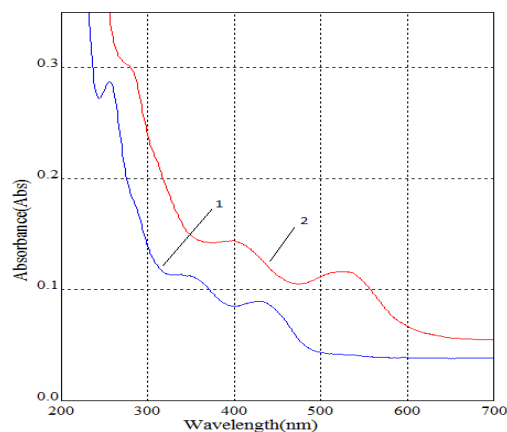


Рисунок 40. Электронные спектры исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора сеннозида В (2)

Содержание антраценпроизводных в плодах сенны александрийской находится в диапазоне 1,27 – 2,18%.

Метрологические характеристики методики количественного определения плодов сенны александрийской методом спектрофотометрии представлены в таблице 5. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения антраценпроизводных в плодах сенны александрийской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,24$ %.

Таблица 5. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антраценпроизводных в плодах сенны александрийской

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	1,44	0,0276	95	2,23	$\pm 0,061$	$\pm 4,24$

4.2.3. Количественный анализ антраценпроизводных в корнях марены красильной

Исследование УФ-спектров показало, что максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из корней марены красильной в длинноволновой области спектра находится при 520 ± 2 нм (рис. 41). В длинноволновой области электронного спектра щелочно-аммиачного раствора руберитриновой кислоты также наблюдается четкий максимум поглощения при 520 ± 2 нм (рис. 42). Следовательно, в качестве аналитической длины волны может быть использовано значение 520 нм, а стандартным образцом может служить доминирующий антрагликозид – руберитриновая кислота, причем в случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано теоретическое значение удельного показателя поглощения – 520.

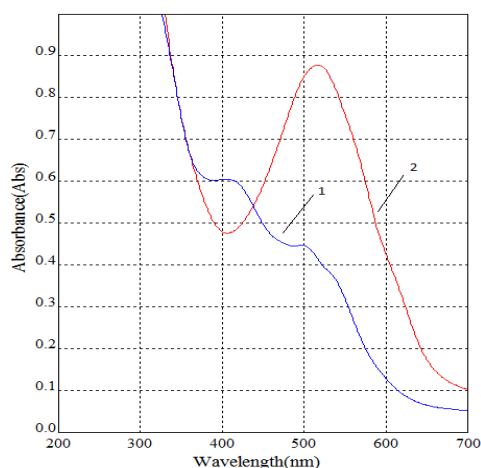


Рисунок 41. Электронные спектры исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора (2) водно-спиртового извлечения из корней марены красильной

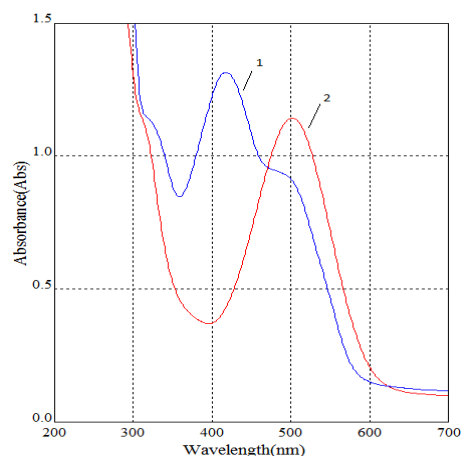


Рисунок 42. Электронные спектры исходного раствора руберитриновой кислоты (1) и щелочно-аммиачного раствора руберитриновой кислоты (2)

Содержание антраценпроизводных в корнях марены красильной находится в диапазоне 4,5 – 5,0%.

Метрологические характеристики методики количественного определения корней марены красильной методом спектрофотометрии представлены в таблице 6. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения антраценпроизводных в корнях марены красильной с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,18$ %.

Таблица 6. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антраценпроизводных в корнях марены красильной

f	$\bar{X}$	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
10	4,85	0,0692	95	2,23	$\pm 0,154$	$\pm 3,18$

4.3. Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения антраценпроизводных

Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения антраценпроизводных были определены по следующим показателям: линейности, прецизионности (повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, межлабораторной прецизионности), правильности.

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций от теоретического содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на сеннозид В и руберитриновую кислоту в исследуемых объектах (таблица 7-9, рис. 43-45). Растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличения аликвоты для измерения количественного содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на сеннозид В и руберитриновую кислоту в растворах, имеющих концентрацию 50, 75, 100, 125 и 150%. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка к единице, то совокупность данных можно описать прямой линией.

Таблица 7. Определение линейности методики

№ измерения	Аликвота, %	Аликвота, мл	Оптическая плотность, D	Содержание антраценпроизводных в аликвоте, С, %
Листья сенны александрийской				
1	50	0,5	0,138	0,95
2	75	0,75	0,181	1,42
3	100	1	0,23	1,88
4	125	1,25	0,277	2,34
5	150	1,5	0,330	2,81
Плоды сенны александрийской				
1	50	0,5	0,175	0,71
2	75	0,75	0,22	1,09
3	100	1	0,26	1,39
4	125	1,25	0,30	1,65
5	150	1,5	0,335	1,98
Корни марены красильной				
1.	50	0,5	0,41	2,49
2.	75	0,75	0,64	3,70
3.	100	1	0,88	4,85
4.	125	1,25	1,1	6,00
5.	150	1,5	1,34	7,24

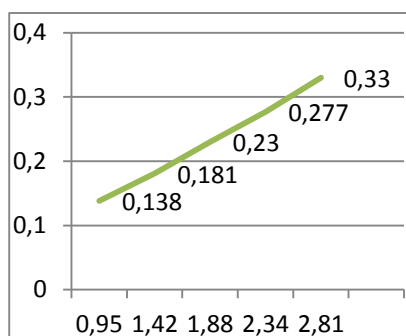


Рисунок 43. График зависимости оптической плотности извлечения из листьев сенны александрийской от концентрации

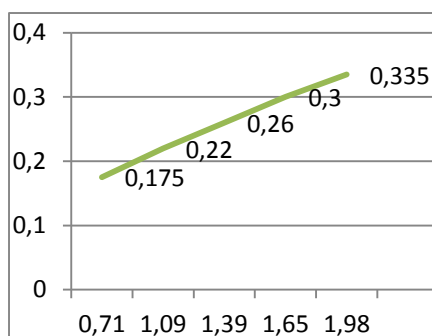


Рисунок 44. График зависимости оптической плотности извлечения из плодов сенны александрийской от концентрации

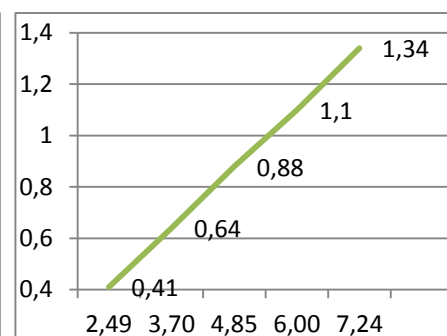


Рисунок 45. График зависимости оптической плотности извлечения из корней марены красильной от концентрации

Данные для расчета коэффициента корреляции представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8. Данные для расчета коэффициента корреляции

D	C	DC	D²	C²
Листья сенны александрийской				
0,138	0,95	0,131	0,019	0,902
0,181	1,42	0,257	0,033	2,016
0,23	1,88	0,432	0,053	3,534
0,277	2,34	0,648	0,076	5,475
0,330	2,81	0,927	0,108	7,896
$\Sigma D=1,156$	$\Sigma C=9,4$	$\Sigma DC=2,395$	$\Sigma D^2=0,289$	$\Sigma C^2=19,823$
Плоды сенны александрийской				
0,175	0,71	0,1242	0,0306	0,5141
0,22	1,09	0,2398	0,0484	1,1881
0,26	1,39	0,3614	0,0676	1,9321
0,30	1,65	0,495	0,09	2,7225
0,335	1,98	0,6633	0,11222	3,9204
$\Sigma D=1,29$	$\Sigma C=6,82$	$\Sigma DC=1,8837$	$\Sigma D^2=0,3488$	$\Sigma C^2=10,2772$
Корни марены красильной				
0,41	2,49	1,0209	0,1681	6,2001
0,64	3,7	2,368	0,4096	13,69
0,88	4,85	4,268	0,7744	23,5225
1,1	6,0	6,6	1,21	36
1,34	7,24	9,7016	1,7956	52,4176
$\Sigma D=4,37$	$\Sigma C=24,28$	$\Sigma DC=23,958$	$\Sigma D^2=4,357$	$\Sigma C^2=108,307$

Коэффициенты корреляции для исследуемых объектов составили более 0,99 (табл. 9). Следовательно, можно утверждать, что методики отвечают параметрам валидации.

Таблица 9. Расчет коэффициента корреляции

Объекты исследования	SSx = $\Sigma D^2 - (\Sigma D)^2/5$	SSy = $\Sigma C^2 - (\Sigma C)^2/5$	SPxy = $\Sigma DC - (\Sigma D \cdot \Sigma C)/5$	r = SPxy / $\sqrt{SSx \cdot SSy}$
Листья сенны александрийской	0,21	13,707	1,694	0,99
Плоды сенны александрийской	0,263	7,247	1,382	0,996
Корни марены красильной	2,947	96,242	16,429	0,975

где SSx - сумма квадратов отклонения баллов (D) испытуемых от среднего арифметического;

SSy - сумма квадратов отклонения баллов (С) испытуемых от среднего арифметического;
SPxy - сумма попарных произведений; r - коэффициент корреляции.

Для определения повторяемости методики использовали один образец сырья и проводили исследование в 11 повторениях. Определяли величину относительного стандартного отклонения, которая не должна превышать 10%. Для листьев сенны александрийской эта величина составила 3,27% (таблица 4), для плодов сенны александрийской – 4,24% (таблица 5), для корней марены красильной -3,18% (таблица 6).

Для определения внутрилабораторной прецизионности методики использовали 3 образца сырья и исследовали в трех повторениях двумя исследователями (табл. 10-12). Определяли величину относительного стандартного отклонения, которая не должна превышать 15%.

Таблица 10. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности разработанной методики для листьев сенны александрийской

Повторность	Содержание антраценпроизводных в пересчете на сеннозид В в листьях сенны александрийской, %			
	Аналитик 1	Сырье 1	Сырье 2	Сырье 3
1		1,89	1,78	1,82
2		1,85	1,767	1,79
3		1,86	1,81	1,83
4	Аналитик 2	1,84	1,833	1,87
5		1,88	1,82	1,84
6		1,9	1,79	1,83
Среднее значение		1,87	1,8	1,83
Относительное стандартное отклонение (%)		±3,26	±3,9	±3,53

Таблица 11. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности разработанной методики для плодов сенны александрийской

Повторность	Содержание антраценпроизводных в пересчете на сеннозид В в плодах сенны александрийской, %			
	Аналитик 1	Сырье 1	Сырье 2	Сырье 3
1		1,425	1,39	1,41
2		1,433	1,426	1,405
3		1,44	1,417	1,415
4	Аналитик 2	1,455	1,383	1,43
5		1,463	1,374	1,435
6		1,44	1,41	1,425
Среднее значение		1,44	1,4	1,42
Относительное стандартное отклонение (%)		±4,24	±3,95	±4,1

Таблица 12. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности разработанной методики для корней марены красильной

Повторность	Содержание антраценпроизводных в пересчете на руберитриновую кислоту в корнях марены красильной, %			
	Аналитик 1	Сырье 1	Сырье 2	Сырье 3
1		4,825	4,98	4,39
2		4,84	4,72	4,6
3		4,82	4,82	4,45
4	Аналитик 2	4,875	4,71	4,41
5		4,86	4,62	4,35
6		4,88	4,58	4,2
Среднее значение		4,85	4,7	4,4
Относительное стандартное отклонение (%)		±3,18	±3,9	±3,57

Проведенные нами исследования показали, что относительное стандартное отклонение не превышает 15%, что свидетельствует о том, что разработанная методика воспроизводима в указанных условиях.

Для определения межлабораторной прецизионности методики определяли количественное содержание образцов сырья на трех спектрофотометрах «Specord 40» (Analytik Jena), «СФ-2000», «UNICO 2800» (таблица 13). Определяли величину относительного стандартного отклонения, которая не должна превышать 15%.

Таблица 13. Результаты определения межлабораторной прецизионности разработанной методики для листьев, плодов сенны александрийской и корней марены красильной

Анализируемое лекарственное растительное сырье	Содержание антраценпроизводных в пересчете на сеннозид В (листья и плоды сенны александрийской) и руберитриновую кислоту (корни марены красильной), %			Относительное стандартное отклонение (%)
	Спектро-фотометр – «Specord 40» (Analytik Jena)	Спектро-фотометр – «СФ-2000»	Спектро-фотометр – «UNICO 2800»	
Листья сенны александрийской	1,90	1,73	1,88	±3,53
Плоды сенны александрийской	1,45	1,35	1,44	±4,21
Корни марены красильной	4,83	4,80	4,85	±3,22

При определении правильности методики устанавливали содержание антраценпроизводных в пересчете на сеннозид В и руберитриновую кислоту в извлечениях,

полученных при добавлении определенного количества 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл рабочего стандартного раствора (сеннозида В, руберитриновой кислоты), к полученному нами извлечению для получения различных концентраций. Критерием приемлемости методики является величина среднего процента восстановления при применении растворов определенных концентраций, скорректированная на 100%. Средняя величина критерия приемлемости определяется рамками $100 \pm 5\%$.

**Таблица 14. Результаты определения правильности методики
(эксперименты с добавками сеннозида В)**

	Содержание антрацен-производных мг, в пересчете на сеннозид В	Добавлено РСО сеннозида В, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Полученная ошибка, %	Статистические характеристики
1	1,88	0,125	2,01	2,003	102,16	$\bar{x}$ = 100,83 % S = 1,81945 ΔX = 4,057 E = 4,02%
2	1,88	0,125	2,01	2,005	103,36	
3	1,88	0,125	2,01	2,019	101	
4	1,88	0,250	2,13	2,135	98,5	
5	1,88	0,250	2,13	2,139	99,7	
6	1,88	0,250	2,13	2,128	100,86	
7	1,88	0,375	2,26	2,268	101,9	
8	1,88	0,375	2,26	2,259	99,96	
9	1,88	0,375	2,26	2,255	100,1	
Средняя ошибка 100,83 %						

Проведенные исследования показали, что процент восстановления в разработанной методике варьирует от 98,50% до 103,36%, при этом средняя величина его составила 100,83%.

Как видно из данных, приведенных в таблице 14, в разработанной методике отсутствует систематическая ошибка, относительная ошибка при доверительной вероятности 95% не превышает 4,02% (таблица 14).

**Таблица 15. Результаты определения правильности методики
(эксперименты с добавками руберитриновой кислоты)**

	Содержание антрацен-производных мг, в пересчете на руберитриновую кислоту	Добавлено РСО руберитриновой кислоты, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Полученная ошибка, %	Статистические характеристики
1	4,85	0,125	4,975	4,968	99,53	$\bar{x} = 100,67 \%$ $S = 1,8099$ $\Delta X = 4,036$ $E = 4,0\%$
2	4,85	0,125	4,975	4,97	101,7	
3	4,85	0,125	4,975	4,978	98,5	
4	4,85	0,250	5,1	5,11	103,4	
5	4,85	0,250	5,1	5,092	100,2	

6	4,85	0,250	5,1	5,125	98,9	
7	4,85	0,375	5,225	5,216	100,37	
8	4,85	0,375	5,225	5,221	102,4	
9	4,85	0,375	5,225	5,234	101,8	
Средняя ошибка 100,67 %						

Проведенные исследования показали, что процент восстановления в разработанной методике варьирует от 98,50% до 103,4%, при этом средняя величина составляет 100,67%

Как видно из данных, приведенных в таблице 15, в разработанной методике отсутствует систематическая ошибка, относительная ошибка при доверительной вероятности 95% не превышает 4,0% (таблица 15).

5. Стандартизация лекарственных препаратов фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные

5.1. Технология изготовления лекарственных растительных препаратов «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Сенны сироп», «Марены сироп»

Изготовление сиропа в лабораторных условиях начинали с получения отвара из лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, с использованием разных соотношений «сырье - готовый продукт» (1:3 - использовали для приготовления сиропа крушины и сиропа жостера с дополнительным кипячением на плитке; 1:7 - использовали для приготовления сиропа сенны; 1:8 - использовали для приготовления сиропа марены). Объем экстрагента для получения заданного объема готового продукта определяли с учетом коэффициента водопоглощения, который для крушины ломкой составляет 2,2 мл/г, для остальных видов лекарственного растительного сырья – 1 мл/г. Большинство отваров готовили фармакопейным методом: известное количество сырья заливали определенным количеством воды очищенной комнатной температуры, нагревали на кипящей водяной бане 30 мин, охлаждали в течение 10 мин, фильтровали и доводили при необходимости полученный объем до необходимого соотношения «сырье – готовый продукт». С целью сравнения влияния жесткого нагрева на выход антраценпроизводных из сырья и их стабильность, в одном случае водное извлечение (1:3) получили кипячением в течение 15-20 мин на плитке сырья в определенном объеме воды очищенной, охлаждении в течение 10-15 мин и фильтровании. Полученный объем доводили до необходимого соотношения водой очищенной.

Водные извлечения из лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, использовали вместо воды очищенной для получения сахарных сиропов фармакопейным способом.

5.2. Технология изготовления фармацевтической субстанции растительного происхождения «Сенны плодов экстракт густой»

Экстрагирование плодов сенны александрийской проводили методом перколяции из навесок одной и той же выборки сырья, при одинаковых условиях, соотношение «сырье – экстрагент» - 1:10. Извлечения представляли собой темную, мутную жидкость, а при отстаивании образовывался осадок. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 40 % (как показавший преимущества в фармакологических экспериментах).

5.3. Количественное определение суммы антраценпроизводных в лекарственных препаратах, содержащих антраценпроизводные с помощью УФ-спектрофотометрии

Содержание суммы антраценпроизводных в сиропе крушины (пересчете на франгулин А) варьирует от $0,30 \pm 0,01\%$ до $0,39 \pm 0,01\%$.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения суммы антраценпроизводных в сиропе крушины с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,17\%$.

Метрологические характеристики метода количественного определения суммы антраценпроизводных в сиропе крушины представлены в таблице 16.

Таблица 16. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в сиропе крушины

n	f	$\bar{X}$	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
11	10	0,37	0,0069	95	2,23	$\pm 0,015$	$\pm 4,17$

Содержание суммы антраценпроизводных в сиропе жостера (пересчете на франгулин А) варьирует от $0,22 \pm 0,002\%$ до $0,25 \pm 0,003\%$.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения суммы антраценпроизводных в сиропе жостера с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,17\%$.

Метрологические характеристики метода количественного определения суммы антраценпроизводных в сиропе жостера представлены в таблице 17.

Таблица 17. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в сиропе жостера

f	$\bar{X}$	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
10	0,22	0,0041	95	2,23	$\pm 0,009$	$\pm 4,17\%$

В результате проведенного количественного анализа, определено, что содержание суммы антраценпроизводных в сиропе сенны (в пересчете на сеннозид В) варьирует от $0,026\% \pm 0,001\%$ (на основе отвара, полученного в соответствии с ГФ СССР XI издания) до $0,055\% \pm 0,002\%$ (на основе отвара, полученного с использованием кипячения). С учетом содержания суммы антраценпроизводных в исследуемом сырье (1,68%) выход антраценпроизводных из сырья сенны в случае использования режима кипячения в 1,5 раза выше по сравнению с фармакопейным методом (таблица 18).

Таблица 18. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в сиропе сенны

n	f	$\bar{X}$	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
11	10	0,055	0,0010	95	2,23	$\pm 0,0023$	$\pm 4,25$

Содержание суммы антраценпроизводных в густом экстракте плодов сенны (в пересчете на сеннозид В) варьирует от $10,0 \pm 0,02\%$ до $10,3 \pm 0,02\%$.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения суммы антраценпроизводных в густом экстракте плодов сенны с

доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,40\%$.

Метрологические характеристики метода количественного определения суммы антраценпроизводных в густом экстракте плодов сенны александрийской представлены в таблице 19.

Таблица 19. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в густом экстракте плодов сенны александрийской

n	f	$\bar{X}$	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
11	10	10,20	0,2013	95	2,23	$\pm 0,45$	$\pm 4,40$

Содержание суммы антраценпроизводных в сиропе марены (пересчете на руберитриновую кислоту) варьирует от $0,02 \pm 0,001\%$ до $0,025 \pm 0,001\%$.

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения суммы антраценпроизводных в сиропе марены с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,17\%$.

Метрологические характеристики метода количественного определения суммы антраценпроизводных в сиропе марены представлены в таблице 20.

Таблица 20. Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в сиропе марены

f	$\bar{X}$	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
10	0,025	0,00049	95	2,23	$\pm 0,001$	$\pm 4,37\%$

5.4. Сравнительные доклинические исследования лекарственных препаратов «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Сенны сироп», «Сенны плодов густой экстракт»

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном слабительном действии фитопрепаратов как на основе коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, так и на основе листьев сенны. Так, на фоне действия препаратов на основе коры крушины ломкой максимальный слабительный эффект достигается в дозе 50 мг/кг, что же касается препаратов на основе жостера слабительного и сенны александрийской, эффект достигается в значительно меньшей дозе. Аналогичная корреляция наблюдается и в случае образцов сиропа: максимальный слабительный эффект в случае крушины ломкой достигается в дозе 50 мг/кг, тогда как для жостера слабительного и сенны это значение составляет 25 мг/кг. Сироп крушины ломкой, сироп жостера слабительного и сироп сенны являются перспективными препаратами, обладающими выраженным слабительным действием, что позволяет рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве слабительных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных диссертационных исследований научно обоснована целесообразность использования коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного, листьев и плодов сенны александрийской, корней марены красильной в качестве источника биологически активных соединений (БАС) для создания отечественных лекарственных препаратов. Теоретически и экспериментально обоснована стандартизация лекарственного растительного сырья, сборов и лекарственных препаратов фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные, на основе разработанных методологических подходов,

закключающихся в определении качественного состава и количественного содержания анализируемых веществ с использованием ТСХ, ВЭЖХ, УФ-, ИК-спектроскопии и соответствующих стандартных образцов веществ, имеющих диагностическое значение.

ВЫВОДЫ

1. Проведено сравнительное исследование морфолого-анатомических признаков образцов лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные: листьев и плодов сенны александрийской (*Senna alexandrina* Mill.), корней ревеня тангутского (*Rheum palmatum* L.), листьев и побегов алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.), корней марены красильной (*Rubia tinctorum* L.), порошка коры крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.), порошка плодов жостера слабительного (*Rhamnus cathartica* L.). В ходе микроскопических исследований были подтверждены основные анатомо-гистологические признаки, характерные для каждого вида сырья, а также выявлены дополнительные диагностические признаки: особенности анатомии и гистологии черешка листьев, стручка боба и семени сенны александрийской; особенности локализации антраценпроизводных и дубильных веществ в корнях ревеня тангутского, марены красильной; недостаточно сформировавшиеся алоиновые клетки у побегов алоэ древовидного, что также может быть использовано в целях идентификации и определения подлинности данных растений и сырья.

2. Результаты анатомо-гистологических исследований коры крушины ломкой и плодов жостера слабительного нашли свое отражение в Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания (Крушины ольховидной кора – ФС.2.5.0021.15; Жостера слабительного плоды – ФС. 2.5.0014.15)

3. В результате изучения химического состава листьев сенны александрийской выделено шесть индивидуальных веществ (8-О-β-D-глюкопиранозид торахризона (производное нафталина), кемпферол-3-О-гентиобиозид (флавоноид), антраценпроизводное, названное нами неореином, который является новым природным соединением и имеет строение 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинона, реин (антрахинон), торахризон (производное нафталина), кемпферол (флавоноид); из плодов сенны александрийской выделено шесть индивидуальных веществ (изорамнетин-3-О-гентиобиозид (флавоноид), кемпферол-3-О-гентиобиозид (флавоноид), 1,8-дигидрокси-3-карбоксиантрахинон (реин), сеннозид В (антрагликозид), сеннинин (антрахинон) и изорамнетин (флавоноид); из корней марены красильной выделено одно индивидуальное вещество (руберитриновая кислота); из коры крушины ломкой и плодов жостера слабительного выделено пять основных индивидуальных веществ, четыре из них относятся к антраценпроизводным (франгулин А, франгулин В, 1-О-β-D-глюкопиранозид эмодин эмодин), одно выделенное вещество относится к флавоноидам (3-О-рутинозид рамнетины).

4. С использованием ИК-, УФ-спектроскопии, ВЭЖХ, ТСХ разработаны методики качественного и количественного определения антраценпроизводных в сырье сенны александрийской, марены красильной. Для сырья данных лекарственных растений обоснован числовой показатель «Содержание суммы антраценпроизводных, который рекомендован для включения проекты фармакопейных статей на листья и плоды сенны александрийской и корневищ марены красильной.

5. С использованием УФ-спектрометрии разработаны методики количественного определения антраценпроизводных в сборах «Тростинка», «Проктофитол», «Лух», «Сибирская ласточка экстра», «Аэлит», «Фаворит», «Эффект», «Слабительный», «Для похудения» «Комфорт», «Для очищения организма», а также в лекарственных препаратах «Сенаде»,

«Сенадексин», «Крушины экстракт таблетки».

6. В результате проведенных исследований лекарственных средств разработаны способы получения новых лекарственных слабительных препаратов: «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Сенны сироп», «Марены сироп», «Густой экстракт плодов сенны».

7. С использованием ИК-спектроскопии и ВЭЖХ разработаны методики качественного определения антраценпроизводных в новых лекарственных слабительных препаратах: «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Сенны сироп», «Марены сироп», «Густой экстракт плодов сенны».

8. С использованием УФ-спектрометрии разработаны методики количественного определения антраценпроизводных в новых лекарственных слабительных препаратах: «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Сенны сироп», «Марены сироп», «Густой экстракт плодов сенны». В ходе исследований научно обосновано использование в методиках количественного определения БАС стандартных образцов сеннозида В и руберитриновой кислоты для анализа соответствующих препаратов.

9. В ходе исследования выявлено выраженное слабительное действие отваров и сиропов, полученных из коры крушины ломкой плодов жостера слабительного и листьев сенны. Препараты плодов жостера слабительного и сенны александрийской (отвар и сироп) обладают более выраженным слабительным эффектом по сравнению с соответствующими препаратами коры крушины ломкой. Сироп крушины ломкой, сироп жостера слабительного и сироп сенны являются перспективными препаратами, обладающими выраженным слабительным действием, что позволяет рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве слабительных средств.

Практические рекомендации

Разработанные методологические подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антрагликозиды, а также методики качественного и количественного анализа сырья исследуемых лекарственных растений вошли в проекты фармакопейных статей на ЛРС для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации. Предложенные алгоритмы фармакопейного анализа могут быть использованы при разработке методик качественного и количественного определения антраценпроизводных в других видах ЛРС. Разработанные методики анализа ЛРС, содержащего антрагликозиды, могут быть адаптированы для анализа лекарственных растительных препаратов, содержащих антрагликозиды.

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, и могут быть использованы в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств, на фармацевтических предприятиях, специализирующихся в области стандартизации и создания лекарственных растительных препаратов, а также в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия».

Перспективы дальнейшей разработки темы

Предложенные методологические и методические подходы к разработке методик стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антрагликозиды, могут быть реализованы в целях совершенствования методик качественного и количественного определения антраценпроизводных с использованием современных физико-химических и спектральных методов. На основе принципа гармонизации методик стандартизации в ряду: «лекарственное растительное сырье - лекарственный растительный препарат – лекарственная форма» актуальными являются унификация методик анализа и научное обоснование такого

числового показателя, как содержание биологически активных веществ в ЛРС и лекарственных растительных препаратах. Результаты структурных исследований антраценпроизводных с использованием современных физико-химических и спектральных методов создают методологическую основу для изучения биологически активных соединений ЛРС и лекарственных растительных субстанций. Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии, в том числе с целью дальнейшего изучения химического состава лекарственных растений, содержащих антрагликозиды.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Куркин, В.А. Стандартизация желудочного сбора №3 / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.А.Саньков // **Фармация**. – 2014. – № 1. – С. 11-13.
2. Куркин, В.А. Разработка новых подходов к стандартизации проктофитола / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.А.Саньков // **Медицинский альманах**. – 2014. – № 2 (32). – С. 138-141.
3. Куркин, В.А. Количественное определение суммы антраценпроизводных в лекарственном препарате «Крушины сироп» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова, А.А. Саньков // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2014. - Том 48, № 7. – С.41-43.
4. Куркин, В.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «LUX» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.А.Саньков // **Фундаментальные исследования**. – 2014. - № 6. - С. 1237-1241.
5. Kurkin, Vladimir The development of new approaches to standardization of Cassia acutifolia leaves / Vladimir Kurkin, Anna Shmygareva // **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Studies**. – 2014. – № 3 (3). - P. 163-167.
6. Kurkin, Vladimir Quantitative Determination of Total Anthracene Derivatives in Frangula Syrup Preparation / Vladimir Kurkin, Anna Shmygareva, Tatyana Ryazanova, Anatoliy Sankov // **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2014. - № 48 (7). – P. 467-469.
7. Шмыгарева, А.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Комфорт» / А.А. Шмыгарева // **Известия Оренбургского государственного аграрного университета**. – 2014. - № 6 (50). - С. 152-155.
8. Куркин, В.А. Сравнительное слабительное действие различных извлечений из коры *Frangula alnus* Mill. и плодов *Rhamnus cathartica* L. / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.А.Саньков // **Растительные ресурсы**. – 2015. - Том 51, № 2. – С.207-212.
9. Куркин, В.А. Определение суммы антраценпроизводных в препарате «Крушины экстракт таблетки» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова, А.А.Саньков // **Фармация**. – 2015. – № 1. – С. 10-12.
10. Куркин, В.А. Сравнительный анализ номенклатуры группы растительных слабительных лекарственных препаратов, представленных на Российском рынке / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, М.Р. Дударенкова, А.А.Саньков // **Известия Оренбургского государственного аграрного университета**. – 2015. - № 1 (51). - С. 135-137.
11. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, и слабительных препаратов на их основе / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, И.К. Петрухина, А.А. Шмыгарева, А.И.Агапов, В.Н.Ежков // **Фундаментальные исследования**. – 2015. - № 2. - С. 1424-1431.
12. Куркин, В.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Для очищения организма» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.А.Саньков // **Известия Оренбургского**

- государственного аграрного университета. – 2015. - № 2 (52). - С. 171-174.
13. Шмыгарева, А.А. Сравнительное слабительное действие препаратов на основе коры крушины, плодов жостера и листьев сенны / А.А. Шмыгарева, В.А. Куркин // **Сеченовский вестник**. – 2015. - № 1 (19). - С.138.
 14. Shmygareva, A.A. IR-Spectrophotometry of Laxatives Herbal Preparations Based on Bark of *Frangula alnus* Mill. / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research**. – 2015. - № 7 (4). - P. 653-655.
 15. Shmygareva, A.A. Quantitative Determination of Total Anthracene Derivatives in Rhamnus Syrup Preparation / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research**. – 2015. - № 7 (4). - P. 669-672.
 16. Куркин, В.А. Неореин – новый антрахинон листьев *Cassia acutifolia* / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева // XV Международная научно-практическая конференция. – Москва, 2015. - № 6. - С. 137-139.
 17. Куркин, В.А. Морфолого-анатомическое исследование листьев *Senna alexandrina* Mill. / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н.Саньков // **Современные проблемы науки и образования**. – 2015.- № 4.
 18. Куркин, В.А. Сравнительное исследование слабительного действия препаратов, содержащих антрагликозиды / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н.Саньков // **Медицинский альманах**. – 2015. – № 3 (38). – С. 220-222.
 19. Куркин, В.А. Анатомио-морфологическое исследование плодов сенны / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н.Саньков // **Традиционная медицина**. – 2015. - № 3 (42). - С. 37-40.
 20. Shmygareva, A.A. Quantitative Determination of Total Anthracene Derivatives in Rubia Syrup Preparation / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research**. – 2016. - № 8 (2). - P.332-334.
 21. Shmygareva, A.A. The Development of New Approaches of Standardization of Rubia tinctorum rhizomata et radices / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research**. – 2016. - № 8 (3). - P. 415-418.
 22. Shmygareva, A.A. Validated high-performance liquid chromatography method for quantitative determination of anthracenderivatives in decoction, syrup and water-alcohol extract of *Rhamnus cathartica* L. fruits / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research**. – 2016. - № 8, (4). - P.683-685.
 23. Куркин, В.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Тростинка» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н.Саньков // **Научные ведомости Белгородского государственного университета. Секция Медицина. Фармация**. – 2016. - № 5 (226). - С. 109-114.
 24. Куркин, В.А. Морфолого-анатомическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н.Саньков, С.Н. Витвинина // **Известия Самарского научного центра РАН**. – 2015. – т. 17, № 5 (3). - С. 947-950.
 25. Куркин, В.А. Новые подходы к стандартизации листьев сенны / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева // **Химия растительного сырья**. - 2016. - № 1. - С. 71-77.
 26. Шмыгарева, А.А. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование алоэ древовидного и алоэ пестрого/ А.А. Шмыгарева, А.Н.Саньков, В.А. Куркин, С.Н. Витвинина // **Медицинский альманах**. – 2016. - № 2 (42). - С. 147-149.
 27. Shmygareva, A.A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Herbal Preparations Based on Rhizome with Roots of *Rubia tinctorum* L. / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov //

- International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research.** – 2016. - № 8 (7). - P. 1118-1120.
28. Shmygareva, A.A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Herbal Preparations Based on Leaves and Fruits of *Senna alexandrina* Mill./ A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical research.** – 2016. - № 8 (9). - P. 1478-1480.
 29. Куркин, В.А. Морфолого-анатомическое исследование ревеня тангутского/ В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.А.Саньков // **Научные ведомости Белгородского государственного университета. Секция Медицина. Фармация.** – 2015. - № 35. - С. 106-110.
 30. Куркин, В.А. Количественное определение суммы антраценпроизводных в лекарственном препарате «Сенны сироп» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова, А.А. Саньков // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2016. - Том 50, № 10. - С. 47-50.
 31. Kurkin, Vladimir Quantitative Determination of Total Anthracene Derivatives in Senna Syrup Preparation / Vladimir Kurkin, Anna Shmygareva, Tatyana Ryazanova, Anatoliy Sankov // **Pharmaceutical Chemistry Journal.** – 2017. - № 50 (10). - P 691-694.
 32. Shmygareva, A.A. Validated High-performance Liquid Chromatography Method for Quantitative Determination of Anthracenderivatives in Decoction, Syrup and Water-alcohol Extract of *Frangula alnus* Mill. Bark / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // **International Journal of Pharmaceutical quality assurance.** – 2016. - № 7 (3). - P. 35-38.
 33. Куркин, В.А. Разработка новых подходов к стандартизации плодов сенны александрийской (*Cassia acutifolia* Del.) / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков // **«Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине»: сборник международной научно-практической конференции.** – Москва, 2016. - С. 385-388.
 34. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации видов лекарственного растительного сырья, включенных в государственную фармакопею российской федерации XIII издания / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, А.В. Куркина, О.Е. Правдивцева, В.Б. Браславский, В.М. Рыжов, М.В. Егоров, В.В. Стеняева, Н.Р. Варина, А.В. Егорова, Л.В. Тарасенко, Т.К. Рязанова, А.И. Хусаинова, П.В. Афанасьева, Д. В. Росихин, А.А. Шмыгарева // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** – 2016. – т. 18, № 2 (3). - С.730-736.
 35. Kurkin, Vladimir The development of new approaches of standardization of the species "the Siberian swallow / Vladimir Kurkin, Anna Shmygareva // *Journal of Medicinal Plants Studies.* - 2014. - № 2 (3). - P. 25-30.
 36. Шмыгарева, А.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Слабительный» / А.А. Шмыгарева // «VII Архангельская международная медицинская научная конференция молодых ученых и студентов»: сборник трудов. – Архангельск, 2014. - С. 179.
 37. Shmygareva, A.A. Comparative IR-spectrophotometry of laxatives herbal preparations based on bark of *Frangula alnus* Mill. and on fruits of *Rhamnus cathartica* L. / A.A. Shmygareva, V.A. Kurkin, A.N. Sankov // *Journal of Medicinal Plants Studies.* – 2015. - № 3 (4). - P. 20-22.
 38. Шмыгарева, А.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Аэлит» / А.А. Шмыгарева // «IV Международная научно-практическая конференция»: сборник материалов. – Белгород, 2015. – С. 63-64.
 39. Шмыгарева, А.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Эффект» / А.А. Шмыгарева // «VII Международная научно-практическая конференция»: сборник материалов. – Пермь, 2015. – С. 272-274.

40. Шмыгарева, А.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Для похудения» / А.А. Шмыгарева // «Управление инновациями в современной науке»: сборник VII международной научно-практической конференции. – Самара, 2015. - С. 139.
41. Шмыгарева, А.А. Разработка новых подходов к стандартизации сбора «Фаворит» / А.А. Шмыгарева // «Международная научно-практическая конференция»: сборник трудов. – Белгород, 2015. - С.49-50.
42. Шмыгарева, А.А. Определение суммы антраценпроизводных в препарате «Сенаде» / А.А. Шмыгарева // «Результаты научных исследований»: сборник VIII международной научно-практической конференции. – Тюмень, 2016. - С. 147-148.
43. Шмыгарева, А.А. Определение суммы антраценпроизводных в препарате «Сенадексин» / А.А. Шмыгарева // «Современные концепции развития науки»: сборник VIII международной научно-практической конференции. – Курган, 2016. - С. 172-173.
44. Куркин, В.А. Морфолого-анатомическое исследование корневищ с корнями марены красильной / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.А.Саньков // Традиционная медицина. – 2016. - № 2 (45). - С. 47-49.
45. Куркин, В.А. Разработка технологии получения и исследования слабительного действия густого экстракта из плодов сенны александрийской / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н.Саньков // Медицинский альманах. – 2016. - № 5 (45). - С. 217-220.
46. Семенюта, К.Н. Сравнительный анализ номенклатуры группы растительных лекарственных средств, на основе ревеня тангутского, представленных на российском рынке. / К.Н. Семенюта, А.А. Шмыгарева // «Наука, образование и инновации»: сборник VIII международной научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2016. - С. 226-229.
47. Шмыгарева, А.А. Фитохимическое исследование сырья фармакопейных растений, содержащих антраценпроизводные / А.А. Шмыгарева, В.А. Куркин // «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине»: сборник IV научно-практической конференции. – Москва, 2016. - С. 90-91.
48. Шмыгарева, А.А. Сравнительное количественное определение суммы флавоноидов в лекарственном растительном сырье мяты перечной и мелисы лекарственной, произрастающем на территории оренбургской области / А.А. Шмыгарева, Е.И. Гулина, Т.Г. Маркова // «Традиционная и инновационная наука: история, современное состояние, перспективы»: сборник VIII международной научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2016. - С. 199-204.
49. Глущенко, С.Н. Сравнительный анализ номенклатуры группы растительных лекарственных средств, на основе алоэ древовидного, представленных на российском рынке / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева // «Современные технологии в мировом научном пространстве»: сборник VIII международной научно-практической конференции. – Казань, 2016. - С. 166-169.
50. Шмыгарева, А.А. Разработка новых подходов к стандартизации корней ревеня тангутского (*Rheum palmatum* L.) / А.А. Шмыгарева // «Современные проблемы фармакогнозии»: сборник I межвузовской студенческой научно-практической конференции. – Самара, 2016. - С. 157-162.
51. Глущенко, С.Н. Сравнительный качественный анализ листьев алоэ древовидного (*Aloe arborescens* L.) и листьев алоэ пестрого (*Aloe variegata* L.) / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева // «Современные проблемы фармакогнозии»: сборник I межвузовской студенческой научно-практической конференции. – Самара, 2016. - С. 78-82.

52. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, А.В. Куркина, О.Е. Правдивцева, В.Б. Браславский, В.М. Рыжов, М.В. Егоров, В.В. Стеняева, Н.Р. Варина, А.В. Егорова, Л.В. Тарасенко, Т.К. Рязанова, А.И. Хусаинова, П.В. Афанасьева, Д. В. Росихин, А.А. Шмыгарева // «Современные проблемы фармакогнозии»: сборник I межвузовской студенческой научно-практической конференции. – Самара, 2016. - С. 163-180.
53. Правдивцева, О.Е. Актуальные вопросы стандартизации антраценсодержащих видов лекарственного растительного сырья, включенных в государственную фармакопею Российской Федерации / О.Е. Правдивцева, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, А.В. Куркина, А.А. Шмыгарева, А.И. Агапов, О.Л. Кулагин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2016. - № 12-2. - С. 272-276.
54. Шмыгарева, А.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих слабительных лекарственных препаратов / А.А. Шмыгарева, К.Н. Семенюта, М.В. Рыбалко, С.Н. Глущенко // «Проблемы и перспективы развития науки в России и мире»: сборник IX международной научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2017. - С. 135-137.
55. Рыбалко, М.В. Сравнительный анализ номенклатуры группы слабительных растительных лекарственных средств, представленных на фармацевтическом рынке Оренбургской области / М.В. Рыбалко, А.А. Шмыгарева // «Научные исследования и разработки в эпоху глобализации»: сборник IX международной научно-практической конференции. – Волгоград, 2017. - С. 217-223.

Патенты

1. Патент РФ № 2557929 на изобретение «Сироп крушины ломкой» от 30.06.2015 Заявка № 2014113074 от 03.04.2014 г. Авторы: Куркин В.А., Рязанова Т.К., Шмыгарева А.А.
2. Патент РФ № 2582276 на изобретение «Сироп жостера слабительного» от 30.03.2016 Заявка № 2015110374 от 23.03.2015 г. Авторы: Куркин В.А., Рязанова Т.К., Шмыгарева А.А., Саньков А.Н.
3. Патент РФ № 2582982 на изобретение «Сироп из листьев сенны александрийской» от 06.04.2016 Заявка № 2015110376 от 23.03.2015 г. Авторы: Куркин В.А., Рязанова Т.К., Шмыгарева А.А., Саньков А.Н.

Монография

1. Антраценпроизводные фармакопейных растений: монография / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков. – Самара: ООО «Офорт»: ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 210 с.