

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

На правах рукописи

РОСИХИН ДАНИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ПО ОБОСНОВАНИЮ КОМПЛЕКСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (*SILYBUM MARIANUM* (L.) GAERTN.)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

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

Самара - 2018

Введение.....	6
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	19
1.1. Этимология названия расторопши пятнистой.....	19
1.2. Историческая справка.....	20
1.3 Ботаническое описание	22
1.4. Ареал обитания расторопши пятнистой	25
1.5. Лекарственное растительное сырье расторопши пятнистой.....	27
1.6. Химический состав расторопши пятнистой.....	28
1.7. Фармакологические свойства препаратов на основе сырья расторопши пятнистой и их применение в медицине.....	33
1.8. Применение расторопши пятнистой в народной медицине.....	36
1.9. Актуальные вопросы по созданию новых препаратов на основе расторопши пятнистой	38
1.10. Стандартизация сырья расторопши пятнистой	39
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.....	40
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Объекты исследования.....	42
2.2. Методы исследования.....	44
2.2.1 Методики морфолого-анатомического анализа.....	44
2.2.2. Физические методы анализа.....	46
2.2.3. Химические методы анализа.....	47
2.2.4. Хроматографические методы анализа.....	48
2.2.5. Физико-химические методы анализа.....	52

2.2.6.	Технологические методы анализа.....	53
2.2.7.	Фармакологические методы анализа.....	57
ГЛАВА 3.	МОРФОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ <i>Silybum marianum</i> (L.).....	58
3.1.	Морфолого-анатомическое изучение стебля и листа травы расторопши пятнистой <i>Silybum marianum</i> (L.)....	59
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	69
ГЛАВА 4.	РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ.....	71
4.1	Выделение индивидуальных веществ из травы расторопши пятнистой.....	71
4.1.1.	Физико-химические и спектральные характеристики травы выделенных индивидуальных веществ.....	72
4.1.2.	Идентификация выделенных веществ.....	74
4.2.	Разработка методик стандартизации травы расторопши пятнистой.....	77
4.2.1.	Исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из травы расторопши пятнистой.....	78
4.2.2.	Разработка методик качественного анализа травы расторопши пятнистой	81
4.2.3.	Тонкослойная хроматография	81
4.2.4.	УФ-спектроскопия.....	84
4.3.	Разработка методик количественного определения содержания фенольных веществ в траве расторопши пятнистой.....	87
4.3.1.	Методика анализа суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой.....	87

4.3.2.	Методика анализа суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой.....	89
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....		91
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА МАСЛА РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ		
5.1.	Масло расторопши как перспективный источник лекарственных препаратов.....	93
5.2.	Проблемы стандартизации масла расторопши пятнистой.....	93
5.3.	Сравнительное изучение жирнокислотного состава масла расторопши, подсолнечного масла и облепихового масла	94
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....		99
ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ.....		
6.1.	Обоснование состава, способа получения и подходов к стандартизации препарата «Расторопши сироп».....	101
6.2.	Описание состава и способа получения препарата «Расторопши сироп».....	102
6.3.	Стандартизация препарата «Расторопши сироп».....	102
6.3.1.	Качественный анализ сиропа расторопши пятнистой.....	103
6.3.2.	Количественное определение содержания суммы флаволигнанов в сиропе расторопши пятнистой.....	105
6.3.3.	Числовые показатели сиропа расторопши пятнистой...	108
6.4	Разработка способа получения водорастворимой соли	

	дигемисукцината силибина.....	109
6.5.	Изучение острой токсичности лекарственных препаратов на основе травы расторопши пятнистой.....	115
6.5.	Изучение влияния настоя и настойки травы расторопши пятнистой на экскреторную функцию почек.....	116
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.....	120
	ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	122
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	126
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	127
	Приложение 1. Акты о внедрении результатов диссертационной работы.....	144
	Приложение 2. Патент на изобретение «Способ получения сиропа расторопши пятнистой».....	150
	Приложение 3. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Расторопши пятнистой травы».....	151

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Обеспечение населения Российской Федерации эффективными и безопасными лекарственными препаратами является одной из приоритетных задач фармации. В соответствии с Указом Президента Российской Федерации о Стратегии лекарственного обеспечения населения РФ до 2025 года и Стратегии развития фармацевтической промышленности РФ до 2020 года, импортозамещение лекарственных препаратов для страны становится более значимо. В этом отношении особую актуальность приобретают лекарственные растительные препараты (ЛРП), обладающие широким диапазоном терапевтического действия и рядом преимуществ по сравнению с лекарственными средствами синтетического происхождения. ЛРП отличает относительно низкий риск развития аллергии, более мягкий терапевтический эффект и безопасность (Самылина И.А. и др., 2003, 2010; Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2007, 2016).

В этой связи особого внимания заслуживает расторопша пятнистая [*Silybum maritimum* (L.) Gaertn., сем. Сложноцветные - *Asteraceae*]. Растение широко применяется на территории РФ. В Государственную Фармакопею Российской Федерации XIII издания в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС) включены плоды данного растения. Данное ЛРС нашло широкое применение в медицине в форме источника гепатопротекторных и антиоксидантных пероральных ЛП (Легалон, Карсил, Силимар, Сибектан, Фосфонциале, Гепабене). Широкий спектр активности связан с содержанием в плодах расторопши ценного флаволигнанового комплекса (силимарина), обеспечивающего помимо гепатопротекторного эффекта противовоспалительное, антисклеротическое, противofiброзное, а также противоопухолевое действие (в основном за счет ингибирования перекисного окисления липидов); известно, что флаволигнаны стимулируют биосинтез белка, увеличивая регенерацию клеток печени.

Одним из уникальных свойств силимарина, который получают из плодов расторопши пятнистой, является способность инактивировать действие токсических полипептидов гриба бледной поганки (*Amantia phalloides*): аманитина и фаллоидина. На сегодняшний день в мировой медицинской практике при подобном отравлении существует лишь один ЛП, который производится в Германии и имеет статус орфанного ЛП в Европе - водорастворимый силимарин - Legalon-Sil, однако данный препарат не зарегистрирован на территории России. Отсюда следует вывод, что на данный момент важной задачей остается создание и совершенствование лекарственной субстанции с повышенной биодоступностью (водорастворимого силимарина) с перспективой разработки инъекционной формы для использования в режиме антидота при отравлении гепатотксинами.

Масло расторопши – второй продукт комплексной переработки плодов расторопши, применяемый внутрь и наружно. Данная субстанция обладает антиоксидантным, высокими репаративными и противоязвенными свойствами (масло расторопши - Натурсил). При этом не до конца решенной остается проблема стандартизации масла расторопши пятнистой, связанная с недостаточной изученностью его жирнокислотного состава.

Актуальным также является разработка ресурсосберегающих технологий для всей надземной части растения. Следует отметить, что значительную часть фитомассы расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) составляет трава данного растения. После сбора созревших плодов расторопши пятнистой значительные по массе побеги с множеством сочных листьев и верхушек стеблей в настоящее время не находят применения в отечественной медицинской и фармацевтической практике.

Ряд зарубежных авторов высказывают предположения о возможном наличии перспективных биологических активных соединений (БАС) в листьях расторопши пятнистой, в частности, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, стеренов (C. Pereira, L. Barros, A.M. Carvalho, C. Santos-

Buelgab, I. Ferreira, 2007). Однако сведения о химическом составе надземной части расторопши пятнистой, культивируемой в Российской Федерации, отсутствуют.

Соответственно нерешенными остаются проблемы стандартизации травы расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), связанные с обоснованием анатомо-морфологических диагностических признаков и отсутствием методик качественного и количественного анализа биологических активных соединений (БАС). Следовательно, актуальным вопросом является углубленное фармакогностическое изучение травы расторопши пятнистой с целью научного-теоретического и экспериментального обоснования целесообразности использования в медицинской и фармацевтической практике травы данного растения как нового вида ЛРС.

Таким образом, углубленное фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой является актуальной проблемой современной фармации.

Степень разработанности темы. Плоды расторопши широко используются в медицинской практике РФ в качестве гепатопротекторных ЛП (Wagner, 1973; Vogel, 1977; Куркин В.А., 2003; ГФ РФ XIII изд., 2015). Вместе с тем, в настоящее время не решена в полной мере актуальная и важная проблема – стандартизация масла расторопши пятнистой (препарат Натурсил и БАДы на основе данной субстанции), которое используется в качестве дерматопротектрных и регенерирующих средств, получаемых из плодов данного растения.

Немаловажной проблемой остается создание отечественного водорастворимого силимаринового комплекса с перспективой создания инъекционной лекарственной формы для использования в качестве андидота при отравлении токсинами бледной поганки и другими гепатотоксичными веществами.

Следует отметить, что бóльшая часть фитомассы – трава расторопши, - после сбора плодов не используется в медицинской и фармацевтической практике. На данный момент в Российской Федерации, а также в мировой практике отсутствуют разработанные методики стандартизации травы расторопши пятнистой, в том числе методики качественного анализа и количественного определения БАС. Возможности комплексного использования всей надземной части расторопши пятнистой в научной литературе также не описаны.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой, а также совершенствование стандартизации ЛРС и препаратов на основе данного растения.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проведение морфолого-анатомического исследования травы расторопши пятнистой.
2. Изучение химического состава травы расторопши пятнистой.
3. Разработка методики качественного анализа травы расторопши пятнистой.
4. Разработка методики количественного определения содержания суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой.
5. Разработка методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой.
6. Разработка методики качественного анализа масла расторопши пятнистой методом ГХ/МС.
7. Научное обоснование состава и методики получения сиропа из субстанции «Силимар» («Расторопши сироп»).

8. Разработка методик качественного и количественного анализа лекарственного растительного препарата «Расторопши сироп».
9. Научное обоснование способа получения водорастворимой соли силимарина.
10. Исследование диуретической активности настоя и препарата «Расторопши пятнистой настойка» на основе травы расторопши пятнистой.
11. Разработка проекта ФС «Расторопши пятнистой трава».

Научная новизна. Морфолого-анатомическое исследование травы расторопши позволило впервые выявить морфолого-анатомические признаки, которые характерны для данного вида сырья. Диагностически значимые признаки данного вида сырья заключаются в особенностях проводящей системы стебля, имеющего переходный тип строения, а также в устьичных аппаратах аномоцитного типа амфистоматических листьев данного растения.

Обоснованы методики анализа травы расторопши пятнистой, основанные на определении действующих веществ (флавоноидов и фенилпропаноидов) методами ТСХ, УФ-спектроскопии. Из травы расторопши пятнистой, культивируемой в РФ и странах СНГ, впервые выделены в виде индивидуальных соединений апигенин (5,7,4¹-тригидроксифлавоон), 7-О-β-D-глюкуронид апигенина, гидроксикоричные кислоты – *n*-кумаровая кислота и кофейная кислота, производные гидроксикоричных кислот – 5-*n*-кумароилхинная кислота и хлорогеновая кислота.

Изучение химического состава травы расторопши пятнистой позволило определить, что среди фенольных соединений доминируют фенилпропаноиды и флавоноиды; это свидетельствует о перспективности комплексного использования данного вида сырья.

В рамках исследований по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой впервые выявлено, что изученные настой (1:10) и настойка травы расторопши пятнистой (1:5) на 70% спирте этиловом обладают диуретической активностью, что в совокупности с результатами химического исследования позволило обосновать целесообразность использования нового вида ЛРС «Расторопши пятнистой трава».

Изучены и предложены подходы к получению дигемисукцината силибина натриевой соли, заключающиеся в образовании эфира путем реакции силибина с ангидридом янтарной кислоты, с последующим переводом полученного эфира с использованием спиртового раствора натрия гидроксида в водорастворимую соль.

Разработаны состав и способ получения лекарственного препарата на основе субстанции «Силимар» - «Расторопши сироп», а также подходы к его стандартизации. Предложен вариант пробоподготовки, позволяющий извлечь флаволигнаны ацетоном, с последующим определением силибина как доминирующего и фармакологически значимого компонента.

Результаты изучения химического состава травы расторопши пятнистой и фармакологические данные позволили обосновать целесообразность применения (наряду с плодами расторопши пятнистой) нового вида ЛРС «Расторопши пятнистой трава».

Научная новизна диссертационного исследования подтверждена патентом на изобретение Российской Федерации «Способ получения сиропа расторопши пятнистой» (№ 2647452 от 15.03.2018 г.)

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработана методика качественного анализа методом ТСХ и количественного определения суммы фенилпропаноидов и флавоноидов методом спектрофотометрии в траве расторопши пятнистой. Разработана методика качественного анализа масла расторопши методом ГХ/МС, а также изучены отличительные характеристики в сравнении с облепиховым маслом и маслом подсолнечника.

Изучен состав и предложен способ получения лекарственного препарата «Расторопши сироп», а также методики качественного анализа и количественного определения содержания суммы флаволигнанов в данном препарате.

Предложены подходы к повышению растворимости флаволигнанов на примере силибина. В результате реакции полусинтеза образуется сначала сложный эфир силибина с ангидридом янтарной кислоты, а затем полученный продукт первой стадии переводят в водорастворимую соль с помощью реакции со спиртовым раствором натрия гидроксида и получением дигемисукцината силибина натриевой соли.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс и используются на кафедрах фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, химии фармацевтического факультета, фармацевтической технологии, управления экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также применяются в производственном процессе предприятия ЗАО «Самаралектравы» и в рабочем процессе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Методология и методы исследования.

Методология диссертационного исследования основана на изучении и систематизации литературных данных по фармакогностическому исследованию в плане научного обоснования комплексного использования ЛРС расторопши пятнистой, а также оценки актуальности и степени разработанности данной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами диссертационного исследования являлись образцы ЛРС расторопши пятнистой и препараты, полученные из расторопши пятнистой. Исследования проводили с помощью цифровой микроскопии, с применением метода тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-

спектроскопии, ГХ/МС, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. В диссертационной работе использовались пробирочные и гистохимические реакции на отдельные группы БАС.

Математическая обработка данных диссертационного исследования проводилась с использованием компьютерных программ по методике, описанной в ГФ РФ XIII издания.

Связь задач исследования с планами научных работ. Данная 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»).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты морфолого-анатомического исследования травы расторопши пятнистой.
2. Результаты фитохимического исследования травы расторопши пятнистой.
3. Результаты исследования по разработке методик качественного анализа травы расторопши пятнистой.
4. Результаты исследования по разработке методик количественного определения содержания суммы фенилпропаноидов и флавоноидов в траве расторопши пятнистой, а также суммы флаволигнанов в лекарственном препарате «Расторопши сироп».
5. Результаты качественного анализа масла расторопши пятнистой методом ГХ/МС.
6. Результаты исследования по разработке способов получения лекарственных препаратов на основе ЛРС расторопши пятнистой (настойка

травы расторопши пятнистой, «Расторопши сироп», водорастворимая натриевая соль дигемисукцината силибина).

7. Результаты исследования по стандартизации лекарственных препаратов на основе ЛРС расторопши пятнистой и разработке методик их качественного и количественного анализа.

8. Результаты исследования диуретической активности настоя и настойки травы расторопши пятнистой.

9. Результаты исследования по разработке проекта фармакопейной статьи «Расторопши пятнистой трава».

Степень достоверности. Достоверность проведенных исследований подтверждена экспериментальными данными, полученными с помощью результатов метода микроскопии, а также современных химических, физико-химических и спектральных методов: ТСХ, УФ-спектроскопии, ГХ/МС, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии.

Апробация результатов. Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на конференциях «Аспирантские чтения «Молодые ученые - медицине» (Самара, 2014; 2015; 2016; 2017); X Научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибн Сина с международным участием (г. Душанбе, 2015); «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста, на Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов» (Рязань, 2015); «Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики научно-практической конференции» (Уфа, 2016), I Межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2016); I Межвузовской научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника. Современность и перспективы» (Самара, 2016); 89 Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (г. Симферополь, 2017).

Проведение некоторых этапов данного диссертационного исследования было осуществлено в рамках конкурса У.М.Н.И.К - 2013.

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 24 научные работы, из них 9 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, и 1 патент РФ на изобретение.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования применяются в образовательном процессе на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре химии фармацевтического факультета, на кафедре управления и экономики фармации, на кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы» и ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Личный вклад автора. Все приведенные экспериментальные результаты диссертационного исследования получены самим автором. Автором выполнены исследования по изучению морфологических признаков и анатомо-гистологических особенностей строения стебля и листа расторопши пятнистой, идентифицированы и выявлены диагностические признаки для данного вида сырья.

Изучен химический состав травы расторопши пятнистой. Разработаны методики анализа травы расторопши пятнистой. Разработаны состав и технология получения препаратов – «Расторопши травы настойка» и «Расторопши сироп». Изучен качественный состав масла расторопши методом газожидкостной хроматографии. Изучена в эксперименте диуретическая активность препаратов из травы данного растения. Автором диссертационного исследования предложены и обоснованы методики качественного и количественного анализа препаратов на основе ЛРС расторопши пятнистой методом ТСХ и УФ-спектроскопии. Осуществлен синтез дигемисукцината силибина натриевой соли.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Основные положения, изложенные в данной работе, соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пункту 2 «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; 3 пункту «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 5 пункту «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье» и 6 пункту «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, полученные данные представлены в форме 17 таблиц и проиллюстрированы 32 рисунками. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4 глав, в которых приведены результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения и списка литературы, включающего 152 источника, из которых 38 - на иностранных языках.

Глава 1 содержит обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный проводимым исследованиям ЛРС и препаратам расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). В данной главе представлены имеющиеся сведения по химическому составу плодов расторопши расторопши пятнистой, описаны основные фармакологические эффекты препаратов из данного вида сырья. Отражены основные методики

стандартизации сырья расторопши пятнистой, применяемые в Российской Федерации и зарубежной практике. В обзоре литературы раскрыты актуальные вопросы по созданию новых лекарственных препаратов на основе расторопши пятнистой, что еще раз подтверждает актуальность диссертационных исследований.

В главе 2 представлены и описаны объекты и методы исследования. Глава включает методики идентификации и количественного определения содержания БАС в сырье расторопши пятнистой и в препаратах на ее основе. Описана технология получения водорастворимой натриевой соли дигемисукцината силибина.

В главе 3 представлены результаты морфолого-анатомического анализа, описаны диагностические признаки листа и стебля травы расторопши пятнистой, которые выявлены с использованием метода световой микроскопии и цифрового микроскопа, а также метода люминесцентной микроскопии.

Глава 4 посвящена фитохимическому изучению травы расторопши пятнистой, исследованию подходов к стандартизации травы расторопши пятнистой, на основе которых разработаны методики качественного и количественного анализа травы данного растения.

В главе 5 приводятся результаты изучения жирнокислотного состава масла расторопши пятнистой, а также результаты сравнительного изучения жирнокислотного состава масла расторопши, масла подсолнечного и облепихового масла с применением метода ГХ/МС.

Глава 6 посвящена разработке состава и способа получения сиропа расторопши пятнистой из субстанции «Силимар», а также подходов к стандартизации данной лекарственной формы. В данной главе обсуждаются результаты исследования диуретической активности настоя и настойки травы расторопши пятнистой. Предложены подходы по увеличению растворимости флаволигнанов (силибина), заключающиеся в синтезе натриевой соли дигемисукцината силибина.

Диссертационная работа завершается общими выводами, рекомендациями, заключением и списком литературы, на которые ссылается автор.

В приложениях диссертации представлены акты внедрения, патент РФ «Способ получения сиропа расторопши пятнистой» № 2647452, проект фармакопейной статьи «Расторопши пятнистой трава».

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Этимология названия расторопши пятнистой

Расторопша пятнистая [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] – одно из самых интересных и популярных растений семейства Сложноцветные (*Compositae*), которое широко применяется в медицинской и фармацевтической практике [1, 3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 61, 62, 63, 65, 66, 74, 77, 80, 83, 88, 91]. Известно, что родовое название «*Silybum*» происходит от греч. «*silybon*» и переводится как «кисточка», а видовое название «*marianum*» присвоено растению в честь Святой деви Марии. Считается, что дева Мария лечила и исцеляла несчастных больных с помощью этого особенного растения. Существует одна известная легенда о расторопше, которая повествует об одном тяжело больном человеке, который ходил в церковь и молил Бога послать ему исцеление. По дороге в церковь больной постоянно спотыкался о колючку, растущую у тропы. Бедный больной проклинал в сердце это колючее растение. Однажды во сне больному явилась Святая дева Мария и указала на это растение, как на спасение. Мужчина начал жевать листья растения, пить настой из плодов и вскоре исцелился. Поэтому, вероятнее всего, у французов можно встретить одно из названий «*Chardon-Marie*», что означает «кордон Марии». А в России, в народе, расторопша известна как «Марьин татарник», а также «молочной чертополох» [62, 63, 65, 67, 92].

Истории известно также и другое интересное русское название расторопши пятнистой – «лягушечник», потому как в начале вегетации первые листья очень напоминают ярко-зеленую лягушку. Необходимо отметить, что в народе расторопшу называют часто «остро-пёстро»; «остро» - так как данное растение имеет пурпурные соцветия в виде корзинок, у

которых шипы по краям, а «пестро» - так как крупные, продолговато-овальные листья имеют белые пятна [20, 67, 92].

1.2. Историческая справка

Опыт применения и использования в медицинской практике расторопши пятнистой известен с самых древних времен. В традиционной и народной медицине расторопша пятнистая применяется уже более 2 тысяч лет. Первое научное описание в трудах Теофраста датируется IV в. до н.э. Расторопша упоминается в работах известного древнегреческого врача Диоскорида и знаменитого античного целителя Галена. Следует отметить, что как гепатопротекторное средство расторопша получила признание в средние века, начиная с XVI века, когда начали широко применять настойку плодов расторопши. В начале XVIII века известный клиницист Радемахер использовал расторопшу пятнистую при различных заболеваниях гепатобилиарной системы, считая её специфическим средством при печеночной колике, желтухе, кровавой рвоте, желчно-каменной болезни, хроническом кашле [35, 67, 92, 111]. Примерно в это же время немецкий врач Рейль ввел настойку из плодов расторопши «*Carduus marianus*» в гомеопатическую практику. Известный немецкий врач-гомеопат Винденбанд применял «*Carduus marianus*» при кровотечениях и застое в портальной вене. Доктор Прель применял «*Carduus marianus*» при различных поражениях печени, а доктор Шаретт – при сердечной недостаточности с кардиальным поражением печени. Известно также, что различные части расторопши применяли при чуме в Средневековье [16, 35, 67, 92].

В народной медицине России данное растение известно и применяется также давно. При этом необходимо учесть, что во всех источниках о целебных растениях речь идет о чертополохе, который применялся при различных заболеваниях, однако не исключено, что здесь речь шла именно о чертополохе, который в некоторой степени схож по морфологическим признакам с расторопшой пятнистой [35, 52, 67, 78, 81, 92].

Плоды расторопши пятнистой были включены в третье издание Фармакопеи России в 1880 г. и имели латинское название *Fructus Cardui Mariae*. Позже данное растение исключили из реестра, как и в других странах [67].

Переломным моментом можно назвать 60-е годы XX столетия, когда усилиями немецких ученых (Вагнер, Хансел, Вогел и др.) удалось выделить силимариновый комплекс [96, 127, 133, 136-138]. В то время впервые предложен силимариновый комплекс (субстанция «Силимарин»), позже на основе которого, в Германии, стали выпускать оригинальный препарат «Легалон». После этого в мировом профессиональном сообществе ученых-медиков и фармацевтов появляется особый интерес к данному растению. Именно в тот период расторопша входит в современную медицинскую и фармацевтическую практику, и растение снова получает статус фармакопейного. После этого в 1968 г. немецкими учеными в Мюнхенском институте фармации расшифрован биохимический состав расторопши пятнистой, а также выделены индивидуальные оригинальные биологически активные соединения (БАС) силимаринового комплекса, которые впервые были названы флавонолигнанами или флаванолигнанами, которые чуть позже, по предложению профессора В.А. Куркина и профессора Г.Г. Запесочной, стали называться флаволигнанами [44, 55, 62, 64-66].

Особый интерес в то время к данному растению возникает и в СССР, и в Болгарии, где также были проведены полномасштабные научные исследования по созданию новых гепатопротекторов на основе плодов расторопши пятнистой. Данные исследования привели к значительным успехам по созданию ряда уникальных препаратов: «Карсил», «Сибектан», «Силибор», обладающие гепатопротекторным эффектом [8, 20, 67, 90, 92].

Несмотря на успехи советских ученых, в настоящее время на фармацевтическом рынке Российской Федерации наблюдается дефицит отечественных лекарственных гепатопротекторов на основе плодов расторопши пятнистой. На российском фармацевтическом рынке

доминируют зарубежные лекарственные препараты «Легалон», «Карсил», «Гепабене», «Силибинин» и др. При этом на данный момент на территории РФ выпускается два отечественных лекарственных препарата на основе силимарина: «Силимар» и препарат силимарина в комплексе эссенциальными фосфолипидами – «Фосфонциале», а также лекарственный препарат на основе масла расторопши – «Натурсил» [1, 29, 30, 62, 63, 92, 97, 98].

1.3. Ботаническое описание

Расторопша пятнистая - *Silybum marianum* (L.) Gaertn. - однолетнее или двулетнее диплоидное растение из семейства астровых (*Asteraceae*) - или сложноцветных (*Compositae*) [8, 10, 13, 16, 20, 21, 22, 66, 79].

Стебель расторопши пятнистой: прямой, ветвистый, цилиндрический, бороздчатый, голый или слабопаутинистый, Стебель, как правило, имеет мучнистый налет [10, 34, 41, 51, 70, 71, 89, 104].

Листья расторопши пятнистой больших размеров, достигая длину до 80 см и 30 см в ширину. У расторопши пятнистой листья кожистые, морщинистые, на крылатом черешке, перисто-рассеченные или перистолопастные, продолговато-овальные, темно-зеленые; листья стеблевые несколько мельче, с очередным расположением, верхние листья сидячие, стеблеобъемлющие с широким, коротко низбегающим основанием. Листья, которые расположены на самом верху стебля данного растения имеют еще более меньшие размеры, но с вытянутой верхушкой [10, 34, 41, 51, 70, 71, 89, 104].

Листовая пластинка расторопши пятнистой дорзивентрального типа строения. Клетки верхней эпидермы листьев расторопши пятнистой имеют выпуклую оболочку, с поверхности они паренхимные и имеют тонкую оболочку. Устьичный аппарат – аномоцитного типа. Опушение редкое. Край листа – неровный, по нему расположены зубцы, с острыми, как правило, пожелтевшими колючками. Расторопша пятнистая имеет крупные корзинки,

которые заканчиваются листочками-обертками с пожелтевшими остриями, как правило шиловидной формы [10, 34, 41, 51, 70, 71, 89, 104].

Следует отметить, что соцветия расторопши пятнистой имеют корзинки до 6 см в длину, как правило, шаровидные, но встречаются также продолговатые. Корзинки одиночно расположены на верхушке стебля растения. Обертка расторопши опушенная, но иногда встречаются растения с голой оберткой; наружные листочки прижаты при основании средними листочками, с торчащим наверху жестким придатком, который имеет около 4-6 шипиков по краям; по длине придаток заметно длиннее, чем цветки или примерно равен им; внутренние листочки обертки кожистые с небольшим придатком [20, 21, 38, 62, 86, 99].



Рисунок 1 – Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.) Gaertn., сем.

Сложноцветные – *Compositae*

Цветоложе расторопши пятнистой плоское, мясистое. Трубочатые цветки данного растения сидячие, пурпурной окраски, но иногда встречаются белые и розовые. В соцветии растения обычно формируется от 80 до 100 цветков. Цветение соцветия составляет ориентировочно 26-27 дней. Распускание цветков расторопши пятнистой в соцветии – центробежное [20, 21, 38, 62, 86, 99].

Цветки расторопши пятнистой представлены соцветием-корзинкой, они, как правило, одинаковые и обоеполые. Венчик имеет пурпурное, розовое окрашивание, иногда белое, трубчатый; с удлиненной, узкоцилиндрической трубкой, зев при этом расширенный, колокольчатый, короткий; лопасти венчика узковатые, линейные, по краю цельные. Нити тычинок выше основания слипаются, с густыми волосками со слизию, наверху свободные; связник по длине равен нижним придаткам пыльников. Столбик пестика сверху утолщен и покрыт длинными ветвистыми волосками, несколько скошенный, со сближенными, наверху коротко расходящиеся ветвями столбика, снаружи покрытыми короткими, ветвистыми и густыми волосками [10, 34, 41, 51, 62, 63, 70, 71, 89, 104].



Рисунок 2 – Плод-семянка расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.)

Gaertn., сем. Сложноцветные (Астровые) – *Compositae* (*Asteraceae*)

Плод расторопши представлен семянкой эллиптической или обратнойцевидной формы до 8 мм в длину около 2-4 мм в ширину. При этом следует отметить, что семянка имеет, как правило, хохолок, который отваливается в процессе заготовки. У семянки – блестящая поверхность,

которая лишена волосков и устьиц. Кожура имеет пятнистую пигментацию. На верхней площадке находится приподнятый бугорок (нектарник); хохолок из большого количества пленчатых щетинок, по краю зубчатых, соединенных в колечко при основании, имеется коронка из блестящих, цельнокрайних волосков по верхнему краю. Волоски хохолка между собой не совсем равны, наружные тонкие, белые или желтоватые, внутренние пленчатые, дл. 1-2 см. Известно, что плоды расторопши созревают неравномерно – с августа по сентябрь [10, 34, 41, 51, 62, 63, 70, 71].

1.4. Ареал обитания расторопши пятнистой

Считается, что родиной расторопши пятнистой являются средиземноморские страны, Южная и Атлантическая Европа. Расторопша пятнистая встречается в диком виде в странах Северной Африки, Средней Азии, на Кавказе, в южных частях Западной Сибири [16, 62, 63, 65, 66, 77].

Анализ научной литературы показывает, что расторопша пятнистая широко распространена в странах Западной Европы, Центральной Азии, на юге Австралии, а также на архипелаге Канарских островов [16, 20, 62, 63, 65, 66, 77, 92].

Расторопша пятнистая часто встречается на заброшенных полях, сорных местах и по краям дорог, на сухих местах и на невозделанных местах. Кроме того, расторопшу пятнистую разводят в садах и огородах как декоративное растение [8, 10, 32, 38, 62, 67].

Наиболее активно расторопшу пятнистую в России начинают культивировать с 1975 г. В РФ на протяжении длительного времени расторопша пятнистая традиционно выращивается в Краснодарском крае и в Самарской области. Следует отметить наличие большой производственной базы по возделыванию и переработке данного растения в Самарской области (ЗАО «Самаралектравы», ГНУ «Средне-Волжский филиал ВИЛАР», п. Антоновка Сергиевского района). В последнее время резко увеличились посевные площади в Приволжском федеральном округе (ПФО), в частности:

Пензенской, Ульяновской, Саратовской областях и Республике Башкортостан [67].

Расторопша пятнистая – неприхотливое растение. Она устойчива в морозы и в засушливое время года. Следует отметить, что данное растение особенно стойко переносит засуху во второй половине вегетации развития. Расторопша не предъявляет высоких требований к почве, при этом качественная агротехника и применение удобрений вызывает мощный рост фитомассы данного растения [20, 62, 67, 88, 90, 92]. Под вспашку вносят, как правило, фосфорно-калийные удобрения. Для культивирования растения наиболее пригодными являются супесчаный типа почвы с рыхлыми слоем грунта. Расторопша пятнистая показывает активный рост на слабокислых почвах с примерным значением pH 5,5-6,0. Необходимо подчеркнуть, что данное растение является светолюбивым, а также более благоприятными являются теплые климатические условия. Оптимальным температурным режимом для прорастания плодов данного растения является показатель +25°C. Данный температурный режим обеспечивает повышение всхожести плодов до 86 % и снижает длительность их прорастания до 10-11 дней [62, 67, 80].

Для повышения посевных качеств плодов расторопши пятнистой и поиска эффективных экологически безопасных методов защиты всходов данного растения от различных инфекций применяют химические, биологические, так и физические способы их обработки. Широкое применение получили микроэлементы, гормональные вещества, а также соединения регулирующие рост плодов. По литературным данным известно, что наибольшее стимулирующее действие среди испытанных микроэлементов на всхожесть семян оказали растворы солей сернокислого марганца и цинка в малых концентрациях [90, 92, 102, 103].

Одним из непростых и сложных задач является вопрос сроков и способов уборки. Данный вопрос определяется биологическими особенностями растения, климатическими особенностями места

произрастания [62, 67, 91, 92]. Уборка расторопши связана с трудностями в отношении определения оптимального срока и способа качественной уборки плодов и их высушивании. Уборку сырья, как правило, начинают, когда листочки обертки соцветия уже подсохли, а центр начинает белеть, а плоды начинают приобретать темно-коричневый цвет [20, 62, 67, 92].

Анализ литературных данных показывает, что для повышения урожайности расторопши пятнистой следует использовать высокопродуктивные районированные сорта и совершенствование имеющихся зональных технологий на основе разработки комплекса ведущих агробиологических приемов, таких как применение оптимального срока посева, способа посева растения, также следует учитывать подбор наилучшего предшественника и эффективной обработки почв, внесения оптимальных доз удобрений, стимуляторов роста растений и применения рационального режима полива [1, 8, 20, 56, 62, 67, 82, 88, 92].

1.5. Лекарственное растительное сырье расторопши пятнистой

На территории Российской Федерации официальным фармакопейным ЛРС расторопши пятнистой считаются зрелые и высушенные плоды [25, 26]. На данный момент известно, что плоды данного растения имеют уникальный химический состав, включающий в себя так называемый силимариновый комплекс (флаволигнаны), применяемый при заболеваниях гепатобилиарной системы, а также жирное масло, которое широко применяется в медицине, как регенирующее и ранозаживляющее средство для эпителизации ран и ожогов (лекарственный препарат «Натурсил») [1, 23, 31, 56, 62, 63, 67, 100, 106, 118, 123].

Жирное масло в современном фармацевтическом производстве получают в основном методом прессования [20, 58, 59, 62, 67, 92]. Шрот расторопши, как правило, не утилизируется, а служит сырьем для вторичной переработки [67, 92]. На основе первоначального экстракта из плодов расторопши, с помощью длительной стадийной очистки получают

препараты, обладающие гепатопротекторной активностью – Легалон, Силимар, Карсил, Фосфонциале [1, 3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 61, 62, 63, 65 66, 74, 77, 80, 83, 88, 91].

1.6. Химический состав расторопши пятнистой

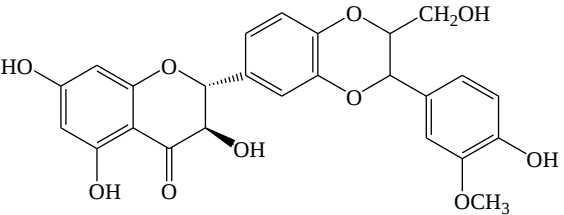
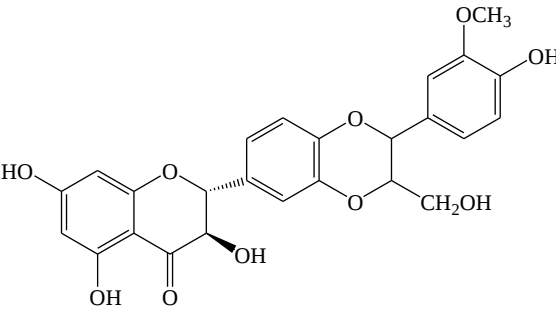
Как было отмечено ранее, плоды расторопши пятнистой содержат уникальные соединения - флаволигнаны, которые являются ведущей группой БАС. Второй, не менее важной группой БАС, является жирное масло. В плодах содержатся также такие соединения, как: флавоноиды, сапонины, горечи, эфирные масла, сахара [3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 61, 62, 63, 65 66, 74, 77, 80, 83, 88, 91, 92, 97, 98, 100, 110, 111].

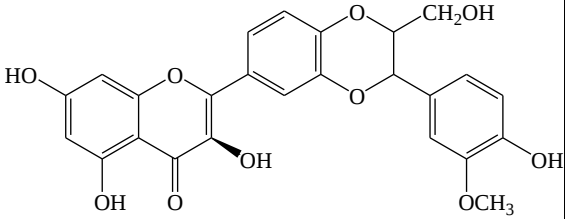
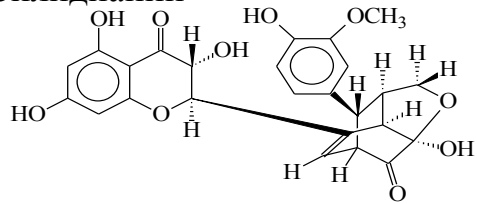
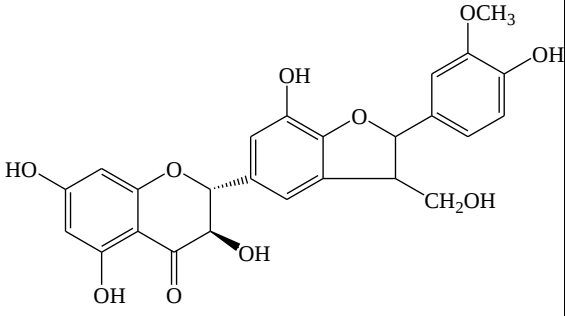
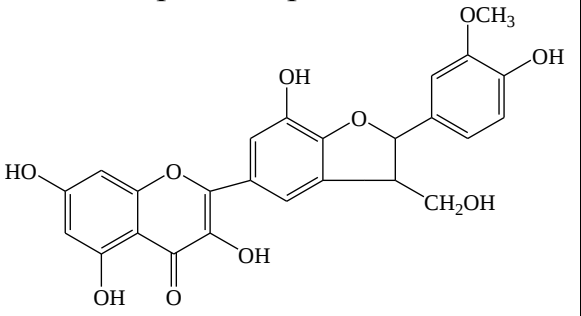
Флаволигнаны – это биологически активные соединения, которые имеют сложное химическое строение [20, 62, 67, 92, 118,]. Они представлены флавоноидами, содержащие в своем составе фенилпропаноидный фрагмент. Флавоноидная часть флаволигнанов представлена флаванолом таксифолином. Следует отметить, что образуются они в растительной клетке в результате свободно-радикального сочетания таксифолина и кониферилового спирта [20, 62, 63, 67, 126, 130, 136, 140].

Содержание флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, по разным научным данным, может варьировать от 1,5 до 4%, в зависимости от хеморасы растения [67]. Согласно литературным данным, у расторопши пятнистой принято выделять две основные хеморасы: хемораса I – силибининовая и хемораса II – силидианиновая [20, 67, 62, 110]. Хеморасы расторопши пятнистой могут представлять собой следствие определенного функционального ответа на изменчивость условий среды произрастания. Химический состав плодов данного растения активно изучают и в настоящее время, потому что этот вид, в зависимости от происхождения или от условий местообитания, содержит разный качественный и количественный состав БАС. Следует отметить, что в зависимости от конкретной хеморасы расторопши пятнистой, будут превалировать те или иные фармакологические свойства [67, 92, 110].

В плодах расторопши пятнистой содержатся такие флаволигнаны как: силибин, силикрестин, силидианин, изосилибин, 2,3-дегидросилибин, силандрин, силимонин, 2,3-дегидросиликрестин, изосиликрестин, силигермин (табл.1). Доминирующими флаволигнанами расторопши являются силибин, силидианин, силикрестин. Сумма данных соединений получила название силимарин или силимариновый комплекс, для которого была установлена гепатопротекторная и антиоксидантная активность. Флаволигнаны расторопши пятнистой были в центре внимания разноплановых научных экспериментов, в том числе структурных, фармакологических, клинических аналитических, технологических и токсикологических исследований [1, 3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 57, 61, 62, 63, 65 66, 74, 77, 80, 83, 88, 91, 92, 97, 98, 100, 110, 111].

Таблица 1 – Флаволигнаны плодов расторопши пятнистой

№ п/п	Соединение / Структурная формула	Физико-химические константы соединения
1	Силибин 	$C_{25}H_{22}O_{10}$ т.пл. 164-168 °С $[\alpha]_D + 10,8^\circ$ (ацетон)
2	Изосилибин 	$C_{25}H_{22}O_{10}$ т.пл. 239-241 °С $[\alpha]_D + 16,9^\circ$ (ацетон)

3	2,3-Дегидросилибин 	$C_{25}H_{20}O_{10}$ т.пл. 254-255 °С
4	Силидианин 	$C_{25}H_{22}O_{10}$ (M^+ 482) т.пл. 189-191 °С [α]_D + 218° (этанол) λ_{max} 288, 322 (пл) нм
5	Силикрестин 	$C_{25}H_{22}O_{10}$ (M^+ 482) т.пл. 174-177 °С [α]_D + 80,5° (пиридин) λ_{max} 289, 325 (пл) нм
6	2,3-Дегидросиликрестин 	$C_{25}H_{20}O_{10}$ т.пл. 274-277 °С
7	Изосиликрестин	$C_{25}H_{22}O_{10}$ т.пл. 155-157 °С [α]_D + 245° (пиридин)

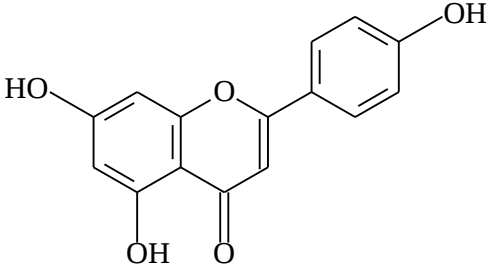
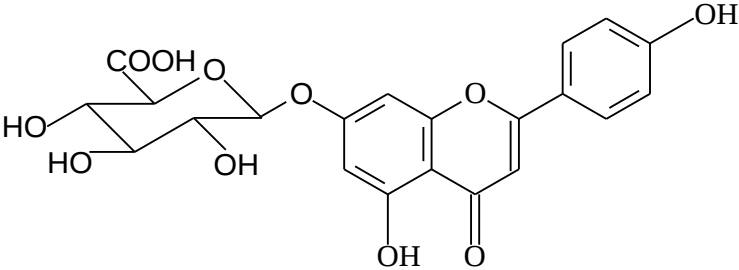
4	Силандрин	$C_{25}H_{22}O_9$ т.пл. 234-236 оС $[\alpha]_D - 42,7^\circ$

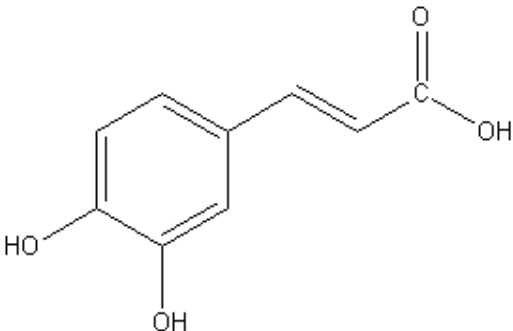
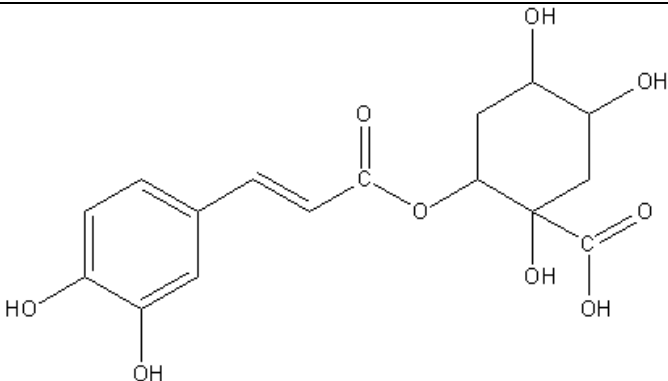
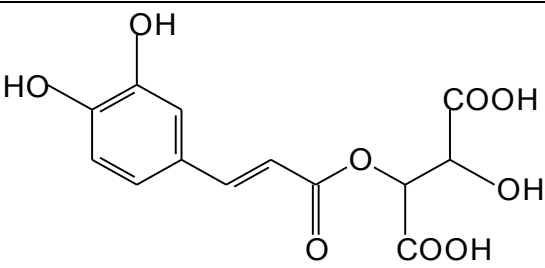
Важным и перспективным классом БАС является также масло расторопши пятнистой, содержание которого в плодах расторопши достигает до 20-30% [20, 62, 67, 92, 110]. В состав плодов расторопши пятнистой входят флавоноиды из класса флавонолы (кемпферол), дигидрофлавонолы – таксифолин и дигидрокемпферол [20, 45, 62, 67, 92, 101, 110, 143, 145]. Сахара, входящие в состав плодов расторопши пятнистой: арабиноза, рамноза, ксилоза, глюкоза [67, 92, 110]. Плоды расторопши пятнистой содержат также макро- и микроэлементы. В состав плодов данного растения также входят до 0,1% эфирного масла [67, 110].

Химический состав травы расторопши пятнистой является малоизученным на данный момент [132]. Литературные данные показывают огромный интерес к изучению химического состава биологически активных соединений, а также изучения фармакологических аспектов применения именно плодов расторопши пятнистой [1, 3, 5, 6, 9, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 53, 56, 61, 62, 63, 65 66, 68, 69, 72, 74, 77, 80, 83, 88, 91, 92, 97, 98, 100, 110, 111].

Следует отметить тот факт, что, несмотря на достаточно хорошо изученный состав плодов, в литературных источниках, практически отсутствует информация о химическом составе, а также научные данные по вопросам изучения и фармакологического применения травы расторопши. Имеются данные о возможном наличии в траве расторопши пятнистой фенилпропаноидов (производных гидроксикоричных кислот) и некоторых флавоноидов – апигенина, кемпферола, лютеолина и их гликозидов, а также бета-ситостерина и его гликозида, ацетат тритерпена, полиацетиленов, и фумаровой кислоты [132]. Описано также содержание флаволигнанов в молодых листьях травы расторопши, хотя данный факт, на наш взгляд, является недостаточно обоснованным [132].

Таблица 2 – Биологические активные соединения травы расторопши пятнистой

Флавоноиды
 Апигенин
Флавоноидные гликозиды
 7-O-β-D-глюкуронид апигенина

Фенилпропаноиды
 Кофейная кислота
 Хлорогеновая кислота
 Монокофеоилвинная кислота

1.7. Фармакологические свойства препаратов на основе сырья расторопши пятнистой и их применение в медицине

Плоды расторопши пятнистой имеют богатый и уникальный химический состав. Необходимо выделить две группы БАС, оказывающие фармакологическое действие: флаволигнаны и жирное масло. Ведущей и главной группой БАС являются флаволигнаны (силимариновый комплекс). Силимарин оказывает антифибротическое, выраженным антиоксидантное,

гепатопротекторное и антитоксическое действие. Второй группой БАС является жирное масло, относящееся к дерматопротекторным средствам растительного происхождения, увеличивающим регенеративные процессы [3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 61, 62, 63, 65 66, 74, 77, 80, 83, 88, 91, 92, 97, 98, 100, 110, 111, 129].

Механизм действия силимаринового комплекса связан с подавлением перекисного окисления липидов, вследствие чего ингибируется повреждение клеточных мембран [16, 19, 20, 21, 24, 35, 46, 54, 62, 63 65, 67, 76]. В гепатоцитах препарат стимулирует полимеразу А ядра, благодаря чему увеличивается синтез белка на рибосомах, а также заметно увеличивается образование фосфолипидов. Данное обстоятельство приводит к стабилизации и к выраженному уменьшению проницаемости клеточных мембран, в результате чего происходит ингибирование перекисного окисления липидов. Силимарин предотвращает потери трансаминаз, что проявляется уменьшением синдрома цитолиза. Также флаволигнаны препятствуют проникновению в клетку некоторых токсинов, в частности, токсинов гриба бледной поганки: фаллоидина и аманитина, поэтому используется как специфический антидот при отравлении ядами данного гриба (препарат «Legalon-SIL»). Однако данный препарат не зарегистрирован на территории РФ. [67, 76, 92, 116, 121, 124, 128, 131, 137]. Также у силимаринового комплекса описаны антифибротические свойства, которые связаны с его способностью повышать клиренс свободных радикалов и с непосредственным подавлением синтеза коллагена [62, 112, 113, 115, 117, 120]. Механизм действия силибина в составе силимарина характеризуется следующим:

1. Нормализует обмен жиров в самих гепатоцитах:
 - а) уменьшает образование жира (в том числе холестерина) пропорционально повышению его поступления из крови;
 - б) изменяет синтез жиров в сторону увеличения удельного веса липопротеинов низкой плотности.

2. Препятствует повреждению структуры внешних и внутренних мембран клеток печени, которые, защищают гепатоциты от проникновения в них токсинов [62, 112, 113, 115, 117, 120].

3. Восстанавливает запасы глутатиона в гепатоцитах, с помощью которого клетки детоксицируют различные токсины (алкоголь, ксенобиотики) [119, 123].

4. Активизирует синтез структурных белков в гепатоцитах, что способствует регенерации поврежденных клеток [138]. Точки применения силимарина исходя из его механизма действия при основных клинически значимых синдромах заболеваний печени можно определить исходя из анализа патогенетических механизмов и диагностических признаков заболеваний [112, 113, 115, 117, 120].

Флаволигнаны расторопши пятнистой предотвращают нарушение структуры и состава клеточных мембран, уменьшают количество коллагена при циррозе, при токсическом поражении тетрахлоридом углерода. Применение силимарина эффективно как при острых, так и при хронических интоксикациях. В экспериментах также было доказано, что силимарин способен предотвращать гемолиз и способствует восстановлению запасов глутатиона в клетках печени при отравлении фенилгидразином [62, 112, 113, 115, 117, 120].

Выявлена противовирусная активность конкретных флаволигнанов силимаринового комплекса, а конкретно – силибинина А и В, изосилибинина А и В. Также было установлено цитокин-опосредованное влияние силимарина на производство интерферона и факторов транскрипции. Данный факт получил свое подтверждение в экспериментальных работах, благодаря которым было обнаружено прямое ингибирующее влияние силибинина на РНК-зависимую РНК полимеразу вируса гепатита С, которое не уступало таковой препарату сравнения — бензимидазолу [118]. При анализе максимально эффективных концентраций, влияющих на репликацию вируса гепатита С (генотип 1В), силибинин даже

превосходил препарат бензимидазол. В исследованиях отмечено, что наиболее высокие концентрации активных веществ создаются при использовании парентерального препарата — «Legalon-SIL» [67, 92, 116].

На отечественном фармацевтическом рынке на сегодняшний день присутствуют такие препараты, как Карсил, Силимар, Легалон, Силибор, Силмарол, Силегон. Кроме того, на фармацевтическом рынке РФ имеются комбинированные средства и монопрепараты из плодов расторопши, таких как: Гепабене, Фосфонциале, Силибохол, Сибектан, Камадол (масляный экстракт), расторопши плодов настойка, расторопши плодов экстракт жидкий. Однако на фармацевтическом рынке РФ в настоящее время не представлена жидкая ЛФ – сироп расторопши. [1, 3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 61, 62, 63, 65 66, 74, 77, 80, 83, 88, 92].

Вторая группа БАС расторопши пятнистой – жирное масло, относящееся к дерматопротекторным средствам растительного происхождения. Препарат Натурсил, выпускающийся на территории РФ, положительно зарекомендовал себя в медицинской практике [20, 62, 67, 77, 58, 59]. Данный препарат улучшает липидный обмен, снижает в крови уровень общего холестерина, триглицеридов и бета-липопротеинов. Натурсил оказывает общее благоприятное воздействие на организм: при введении препарата внутрь повышается содержание общего белка в крови, снижаются процессы трансаминирования и уровня мочевины, стимулируются процессы эритропоэза; при местном нанесении препарат стимулирует репаративные и регенеративные процессы при механических повреждениях и ожогах, ускоряя эпителизацию ожоговых раневых поверхностей. Масло расторопши применяется при лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [62, 97, 98, 100]. Следует отметить, что в настоящее время существуют проблемы стандартизации препарата Натурсил и БАДов на основе данной субстанции. [62, 97, 98, 100].

1.8. Применение расторопши пятнистой в народной медицине

Опыт применения расторопши пятнистой в народной медицине насчитывает около тысячи лет (первое письменное упоминание о расторопше пятнистой в литературе отмечено в 1089 г.) [62, 63, 67, 92]. Для лечебных целей в виде отвара, настойки или плодов, измельченных в порошок, растение используют в комплексной терапии для лечения цирроза печени, гепатита, при воспалении желчных протоков и желчнокаменной болезни, при токсических поражениях печени, геморрое и колитах с запорами, расширении вен конечностей. Расторопша пятнистая на территории России известна издавна, причем как уже отмечалось ранее, плоды расторопши входили третье издание Фармакопеи России в 1880 г. и применялись как желчегонное средство. Следует отметить, что в современных исследованиях желчегонное действие для плодов данного растения не подтверждено [16, 67, 77, 20, 92].

В справочниках по народной медицине имеются рекомендации по приготовлению настоя и кипячению плодов расторопши при заболеваниях гепатобилиарной системы. Для приготовления отвара 30 г измельченных в порошок плоды заливают 500 мл кипящей воды и кипятят на водяной бане до тех пор, пока количество воды не уменьшится примерно в 2 раза, после чего процеживают полученный настой через два-три слоя марли. Принимают настой по 1 столовой ложке через 1 ч. Курс лечения составляет 1-2 месяц. Сухой порошок из плодов расторопши пятнистой принимают по 1-2 чайной ложке 4-5 раз в день за 20-30 минут до приема еды [52, 54, 78, 81, 92, 106, 109]. Следует отметить отсутствие гепатопротекторного эффекта при приеме настоя, так как экспериментально доказано, что флаволигнаны имеют малую растворимость в воде. Данный факт вызывает недоверие к расторопше пятнистой со стороны населения, в том числе и к лекарственным препаратам из данного растения [20, 76, 92].

Анализ литературы показывает популярность травы расторопши в народной медицине. Сок из травы расторопши применяют при запорах, воспалении толстой кишки и слизистой оболочки желудка. Известен опыт

применения сока из листьев расторопши пятнистой в народной медицине при запорах, а также в качестве желчегонного и мочегонного средства [52, 54, 81].

В народной медицине отвар из корней расторопши применяют для полоскания при зубной боли, диарее, нарушении мочеиспускания, радикулите судорогах и спазмах. Отвар корней расторопши готовят из расчета 1 столовая ложка сырья на один стакан кипяченой воды. Далее сырье кипятят в кастрюле на водяной бане около 30 минут, затем процеживают через слой марли, отжимают и доводят до исходного объема кипяченой водой [52, 54, 81]. В народной медицине масло расторопши также применяют как гепатопротекторное и желчегонное средство. Известно, что в официальной медицине в РФ масло расторопши применяется в основном как ранозаживляющее и дерматопротекторное средство при ожогах, трофических язвах, при этом в народной медицине, а также некоторые производители БАД рассматривают масло из плодов расторопши, как препарат, оказывающее гепатопротекторное действие [1, 3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 61- 63, 65 66, 74, 77, 80, 83, 88, 91]. В некоторых источниках указывается наличие флаволигнанных структур в масле расторопши, что не соответствует действительности [92].

1.9. Актуальные вопросы по созданию новых препаратов на основе расторопши пятнистой

На сегодняшний день расторопша пятнистая изучена достаточно хорошо и с успехом применяется в качестве источника гепатопротекторных пероральных препаратов, хотя существуют проблемы, связанные с биодоступностью препаратов расторопши. Это связано с особенностью строения и гидрофобной природой основной группы – флаволигнанных. Исходя из этого, можно отметить, что существует необходимость создания лекарственной формы флаволигнанных расторопши пятнистой с высокой биологической доступностью. В зарубежной практике проблему повышения биодоступности флаволигнанных структур решили путём создания

водорастворимой соли силибинина для парентерального введения. Компания «Rottaparm&Madaus» выпускает Legalon-Sil для инъекций, представляющий собой соль дигемисукцианата силибина – единственный в мире антидот и средство экстренной помощи при отравлении токсинами бледной поганки [62, 67, 92, 114, 116, 137].

Использовались различные подходы для увеличения растворимости силимарина. Описан способ химической модификации гидроксильных групп силибина в положениях С-5, С-7 и С-4". Помимо данного способа известен успешный результат повышения растворимости силибина в воде, путём реакции с циклодекстрином. В литературе также приведены экспериментальные исследования по повышению липофильности флаволигнанных структур с помощью образования комплексов с фосфолипидами [92, 114, 116, 137, 150, 151, 152]. Поэтому на данный момент важной задачей является обращение к технологиям синтеза для получения субстанций с улучшенными терапевтическими и фармакокинетическими параметрами. Для флаволигнанных расторопши пятнистой вопросы повышения растворимости и липофильности очень актуальны, потому как флаволигнаны из плодов данного растения имеют низкую биодоступность, однако само гепатопротективное действие поистине уникально (вплоть до полного ингибирования действия токсинов яда гриба бледной поганки) [114, 116, 137]. В этой связи актуальными и целесообразными представляются исследования по разработке субстанции в РФ с повышенной биодоступностью с перспективой использования в качестве антидота при отравлении рядом токсинов в виде инъекционной лекарственной формы.

1.10. Стандартизация сырья расторопши пятнистой

В Российской Федерации фармакопейным видом сырья являются плоды расторопши пятнистой. Качество сырья и вопросы его стандартизации регламентируются фармакопейной статьей ФС.2.5.0035.15 (ГФ XIII). Для плодов расторопши в ГФ XIII приведены нормы содержания групп БАС:

сумма флаволигнанов – не менее 2,4 % в пересчете на силибин, жирное масло не менее – 15 %, количество экстрактивных веществ – не менее 4 % [25, 26].

ГФ XIII регламентирует идентификацию флаволигнанов в плодах расторопши двумя способами – метод тонкослойной хроматографии со свидетелем ГСО – силибином и спектрофотометрический анализ, который основан на определении максимума поглощения флаволигнанов (289 ± 2 нм) [25, 26].

Определение подлинности плодов расторопши пятнистой предложено проводить методом ТСХ. Данный анализ регламентировано проводить на хроматографической пластинке со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке (система растворителей: углерод четыреххлористый-ацетонитрил в соотношении 6:4) [25, 26].

В настоящее время в РФ отсутствует нормативная документация на траву расторопши пятнистую. Данный факт препятствует применению данного вида сырья в медицинской практике.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.

1. В результате литературных данных было установлено, что в Российской Федерации широко используют плоды расторопши пятнистой в качестве ЛРС как источник для производства гепатопротекторных лекарственных препаратов. Однако после сбора плодов бóльшая часть фитомассы – трава расторопши пятнистой – не применяется в медицине и фармации как перспективное ЛРС. Следует обратить внимание, что имеются данные, свидетельствующие о применении травы расторопши пятнистой в народной медицине в различных медицинских целях. Следует добавить также, что за рубежом имеются некоторые данные о химическом составе травы расторопши пятнистой, в то время как Российской Федерации данный вид сырья с точки зрения химического состава практически не изучен.

2. В Российской Федерации отсутствуют методики стандартизации травы расторопши пятнистой, что свидетельствует о перспективности исследования травы расторопши пятнистой как нового вида ЛРС.
3. В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке отсутствует гепатопротекторный лекарственный препарат в виде жидкой ЛФ – сироп на основе плодов расторопши, который можно было бы применять в педиатрической и гериатрической практике. Создание данного лекарственного препарата и изучение вопросов стандартизации также является важным аспектом изучения в рамках комплексного использования расторопши пятнистой.
4. Разработка водорастворимой лекарственной субстанции силимарина в РФ является актуальной задачей с перспективой создания в будущем инъекционной лекарственной формы как андидота при отравлении токсинами бледной поганки в рамках комплексного исследования расторопши пятнистой.
5. Проблема фальсификации масла расторопши пятнистой является актуальной, так как отсутствуют объективные современные методики стандартизации данной фармацевтической субстанции. Поэтому изучение качественного состава масла расторопши с помощью современных физико-химических методов, а также разработка нормативной документации на данную субстанцию является важной задачей.
6. Имеющийся опыт использования травы расторопши пятнистой в качестве мочегонного средства в народной медицине обуславливает актуальность проведения исследований по изучению диуретической активности.
7. Разработка нормативной документации на новый вид ЛРС «Расторопши пятнистой трава» позволит применять всю доступную надземную часть фитомассу данного растения с целью комплексного использования природных ресурсов и создания отечественных лекарственных препаратов с широким спектром фармакологической активности.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами диссертационного исследования служили образцы сырья – трава и плоды расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], собранные в период с 2015 по 2017 гг. Сырье заготавливали на территории Самарской области.

1. Образцы травы расторопши пятнистой, заготовленные в Средне-Волжском филиале ФГБНУ ВИЛАР (пос. Антоновка Самарской области) в 2015-2017 году.
2. Образцы травы расторопши пятнистой, собранные в Ботаническом саду в 2015-2017 году.
3. Образцы травы расторопши пятнистой, заготовленные в Средне-Волжском филиале ФГБНУ ВИЛАР (пос. Антоновка Самарской области) в 2016 году.
4. Образцы травы расторопши пятнистой, собранные на фармакопейном участке СамГМУ в сентябре 2017 г.
5. Образцы плодов расторопши пятнистой, заготовленные в Средне-Волжском филиале ФГБНУ ВИЛАР (пос. Антоновка Самарской области) в 2016 году.

Изучены такие лекарственные препараты и фармацевтические субстанции, перечисленные ниже:

1. Настойка травы расторопши пятнистой

Состав: Расторопши пятнистой травы 200,0 г

Спирта этилового 70% до получения 1 л настойки

2. Настой травы расторопши пятнистой

Состав: Расторопши пятнистой травы 100,0 г

Воды очищенной до получения 1 л настоя

3. Субстанция «Силимар», произведенная ЗАО «Самаралектравы» (пос. Антоновка Самарской области), 2016 год.

4. Сорбит пищевой – белый гигроскопичный порошок без запаха. Заменитель сахара, который получают каталитическим гидрированием *D*-глюкозы. Содержит не менее 91% *D*-сорбита в пересчете на безводный продукт. Хорошо растворим в воде [37, 48, 49, 105].

5. Сиропа на основе сорбита следующего состава, мас. %:

Силимара	0,5 г
Спирт этиловый 80%	10,0 г
Сорбита	55,8 г
Воды очищенной	34,2 г

6. Расторопши пятнистой масло производства ЗАО «Самаралектравы» (пос. Антоновка Самарской области), 2016 год.

7. Расторопши экстракт жидкий (1:1 на 80% этиловом спирте) получен на кафедре фармакогнозии СамГМУ, 2016 г.

8. Расторопши экстракт сухой производства ЗАО «Самаралектравы» (пос. Антоновка Самарской области), 2016 год.

9. Индивидуальные вещества: силибин, силидианин, силикрестин, дигидрокверцетин, хлорогеновая кислота, цинарозид, рутин, полученные на кафедре фармакогнозии с ботаникой с основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

10. Растворители: спирт этиловый, хлороформ, ацетон, этилацетат, бутанол, марки х.ч.

11. Реактивы, используемые при синтезе:

- Янтарный ангидрид, ч.д.а.
- Пиридин, ч.д.а.
- Гидроокись натрия, х.ч.

Экспериментальные данные были получены с использованием следующей приборной базы.

1. Аналитические весы «Mettler Toledo XS 204»; весы Мора ВА-4М; весы для сыпучих материалов технические ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20; весы электронные САРТО ГОСМ ЛВ 210-А.

2. Спектрофотометр «Specord 40» (Analytik Jena, Германия).
3. Спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ Спектр, РФ).
4. Термостат суховоздушный «ТС-1/80».
5. Набор ареометров общего назначения ИСП.АІ.
6. Хроматографическая бумага FN-11, FN-15.
7. Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ».
8. Хроматографические системы (хлороформ-этанол, хлороформ-этанол-вода, *n*-бутанол-уксусная кислота-вода, бутанол-этанол-аммиак в различных соотношениях).
9. Набор ареометров общего назначения ИСП.АІ.
10. Цифровые микроскопы марки Motic: DM-111 и DM-39C-N9GO-A.
11. Цифровой люминесцентный микроскоп «Альтами ЛЮМ-2»
12. Набор сит с размером отверстий 0,2 мм; 0,5 мм; 1 мм; 2 мм; 3 мм, 7 мм.
13. Спектрометр «Bruker AM-300», используемый при проведении ЯМР-спектроскопии.
14. Масс-спектрометр «Kratos MS-30», используемый при проведении масс-спектрометрии.
15. pH-метр «MP-225».
16. Магнитная мешалка с регулируемым подогревом «ММЗМ 9619».

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа

В данной работе исследовали свежую и воздушно-сухую часть расторопши пятнистой. Сушка сырья проводилась естественным путём под навесами без дополнительного нагрева. Свежее сырьё для микроскопического анализа фиксировались в смеси спирта этилового 96%,

глицерина ректифицированного и воды в соотношении 1:1:1. Высушенное сырье подвергалось классической пробоподготовке в соответствии с требованиями ГФ СССР XI издания и ГФ РФ XIII издания [4, 25, 26, 27, 28, 38].

Проведение данного исследования осуществляли с использованием метода световой микроскопии и цифрового микроскопа марки «Motic DM-111» на светлом поле, в проходящем свете, при котором кратность увеличения составляла $\times 40$, $\times 100$, $\times 400$ соответственно. Кроме того, использовался метод люминесцентной микроскопии на микроскопе «Альтами ЛЮМ-2» (Россия) с использованием голубого светофильтра 32 мм. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт), спектральный диапазон возбуждения люминесценции при которой составлял: 420-550 нм. Осуществление гистохимических реакций и подготовка микропрепаратов производилась нами в соответствии с указаниями общей фармакопейной методики [26, 27, 28].

Следует отметить, что для определения размеров рассматриваемых объектов использовали линейку, а также программное оборудование цифрового микроскопа стереоскопического типа «Motic DM-39C-N9GO-A». Окраску изучаемых объектов устанавливали при использовании дневного освещения, также определяли запах после разламывания объекта и проводили оценку вкусовых характеристик изучаемого сырья.

Проведение исследования микропрепаратов осуществлялось в отраженном и проходящем свете при помощи цифровых микроскопов марки «Motic»: DM-111 и DM-39C-N9GO-A.

Оболочки клеток, которые подверглись одревеснению, раствором сернокислого анилина; производили окраску эпидермиса, содержащего кутин, раствором Судана III и 5% раствором щелочи [26, 27, 28, 62] в соответствии с нижеописанными методиками.

1. Окраска клеточных оболочек, подвергшихся одревеснению и лигнификации. На предметное стекло с исследуемым срезом осуществляли

нанесение капли раствора сернокислового анилина, затем покровным стеклом накрывали объект и рассматривали его под микроскопом. Наблюдалась желтая окраска клеточных оболочек, подвергшихся лигнификации [105,114].

Приготовление раствора сернокислового анилина. 2,0 г сернокислового анилина растворяли в смеси 194 мл этанола 50% и 4 мл ледяной уксусной кислоты [105,114].

2. Окраска клеточных оболочек эпидермиса, содержащих кутин. На предметное стекло с исследуемым срезом осуществляли нанесение капли раствора Судана III, затем покровным стеклом накрывали объект и рассматривали его под микроскопом. Наблюдалась розоватая окраска клеточных оболочек эпидермиса, содержащих кутин [105,114].

Приготовление раствора Судана III. 0,01 г Судана III растворяли в 5 мл этанола 95% и добавляли 5 мл очищенного глицерина [105,114].

2.2.2. Физические методы анализа

Плотность образцов настойки и сиропа определяли экспериментально с помощью набора ареометров общего назначения ИСП.АI по методике, описанной в Государственной Фармакопее Российской Федерации XII и XIII изданий [22, 24].

Показатель преломления образцов сиропа измеряли с помощью рефрактометра RL-3 по методике, описанной в Государственной Фармакопее Российской Федерации XII издания [22].

Величину pH образцов сиропов определяли с помощью pH-метра «MP-225» по методике, описанной в Государственной Фармакопее Российской Федерации XII и XIII изданий [22, 24].

2.2.3. Химические методы анализа

В рамках предварительного фитохимического анализа нами были проведены следующие пробирочные реакции на основные группы БАС.

Цианидиновая реакция (проба Shinoda) использовалась для определения присутствия флавоноидов в извлечении из травы расторопши пятнистой. К 1-2 мл исследуемого извлечения травы расторопши пятнистой добавляли 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и 5-10 мг цинка. Наблюдалось красно-малиновое окрашивание, которое обуславливает образование флавилиевых пигментов [62].

Цианидиновая реакция с модификацией по Брианту является продолжением пробы Shinoda. Полученный в первой реакции раствор разбавляли водой очищенной в соотношении 1:1 и добавляли *n*-бутанол. При наличии агликонов флавоноидов красно-малиновое окрашивание переходит в верхнюю органическую фазу. В случае присутствия гликозидов – окрашивание распределяется в нижнем неорганическом слое [62].

Реакция с алюминия (III) хлоридом является специфической для определения флавоноидов в исследуемом извлечении травы расторопши пятнистой. К 1-2 мл исследуемого извлечения лекарственного добавляли 1-2 мл спиртового раствора 3% раствора алюминия (III) хлорида. Наблюдали появление желтого окрашивания, а также желто-зеленой флуоресценции при $\lambda = 366$ нм.

Борно-лимонная реакция (реакция Вильсона) использовалась для определения наличия в исследуемом извлечении из травы расторопши пятнистой 3- и 5-гидроксифлавонов и 3- и 5-гидроксифлавонолов. К 1-2 мл исследуемого извлечения из травы расторопши пятнистой добавляли 1-2 капли раствора борной кислоты и 1 каплю щавелевой кислоты. В результате образования батохромного комплекса наблюдалось ярко-желтое окрашивание с желто-зеленой флуоресценцией. Устойчивость при добавлении щавелевой (лимонной) кислоты свидетельствует о присутствии свободной фенольной 3-ОН-группы.

При взаимодействии с раствором аммиака флавоны, флаваноны, флавонолы и флаванололы образуют комплекс, окрашенный в желтый цвет.

При нагревании окрашивание переходило в оранжево-красное. При реакции с парами аммиака наблюдалась желто-зеленая флуоресценция при $\lambda=366$ нм.

Реакция со щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК) является специфичной реакцией на свободные ароматические ОН-группы в исследуемых соединениях.

К 1-2 мл извлечения травы расторопши пятнистой добавляли 1-2 капли раствора ДСК. Наблюдалось желтое окрашивание раствора.

Реакция с раствором железа (III) хлорида является специфичной для соединений, имеющих свободные фенольные ОН-группы. При добавлении 1% спиртового раствора железа (III) хлорида наблюдается коричневое окрашивание (в случае присутствия 3-ОН-группы), зеленое окрашивание (присутствует 5-ОН-группа) или синее окрашивание (присутствуют 31,41,51-ОН-группы).

Реакция Сальковского является реакцией, характерной для тритерпеновых сапонинов. Сухой остаток растирают с небольшим количеством хлороформа и добавляют концентрированную серную кислоту. При этом развивается окраска от желтой до красной [62].

Реакция Лафона также проводится для подтверждения наличия в извлечении тритерпеновых сапонинов. К 2 мл водного извлечения прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, 1 мл этилового спирта и 1 каплю 10% раствора сернокислого железа. При нагревании появляется сине-зеленое окрашивание.

2.2.4. Хроматографические методы анализа

1. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Методом ТСХ [15, 26, 62, 107] нами были исследованы водные и водно-спиртовые извлечения из травы и плодов расторопши пятнистой, сироп расторопши пятнистой, а также фармацевтическая субстанция «Силимар» и фракции веществ, полученные при разделении экстрактивных

веществ плодов и травы расторопши пятнистой методом колоночной хроматографии.

При проведении хроматографического метода использовались хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». В результате исследований были апробированы системы растворителей: *n*-бутанол – этанол – аммиак (7:2:5), углерод четыреххлористый – ацетонитрил в соотношении 6:4; хлороформ – спирт этиловый 96% - вода (26:16:3), хлороформ – спирт этиловый 96% (9:1).

Перед проведением хроматографического исследования хроматографические пластинки помещали в термостат при температуре 100-105°C для удаления влаги из сорбента. Хроматографическую камеру системы растворителей насыщали парами в течение 24 ч. Исследование проводили при комнатной температуре.

Исследуемые образцы наносили на линию старта хроматографической пластинки стандартным капилляром, затем погружали в камеру и хроматографировали восходящим способом. Окончание хроматографирования определяли по фронту растворителя, который должен был составить около 7-8 см.

Полученные хроматограммы после хроматографического анализа высушивали и просматривали при дневном свете, затем в УФ-свете при $\lambda=366$ нм и $\lambda=254$ нм. На хроматографической пластинке отмечали особенности свечения зон веществ, после чего хроматограммы обрабатывали реактивами: щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты, раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты и 16% раствором серной кислотой при нагревании.

2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография

Методом адсорбционной жидкостной хроматографии [40, 62, 96] нами был исследован химический состав водно-спиртового извлечения из надземной части травы расторопши пятнистой. В качестве сорбента использовали силикагель марки L 40/100 мкм и L 100/250 мкм (Чехия),

сефадекса LH-20 (Швеция). В качестве элюентов нами был использован хлороформ, спирт этиловый 96%, спирто-хлороформные смеси в различных соотношениях, воду очищенную.

В результате проведения исследований были получены фракции, содержащие отдельные БАС надземной части травы расторопши пятнистой. Для очистки индивидуальных соединений использовался полиамид для колоночной хроматографии (производитель *Woelm Pharma*, Германия), а также силикагель марки, описанной выше.

3. Бумажная хроматография

Бумажную хроматографию (БХ) [62] сахаров и других компонентов осуществляли на бумаге FN-11, FN-15 в нисходящем токе растворителей.

Использовали системы растворителей 1-3:

1 - этилацетат-*n*-пропанол-вода, 7:2:1;

2 - 15% уксусная кислота;

3 - *n*-бутанол-уксусная кислота-вода, 4:1:2.

Для идентификации моносахаридов (после метода кислотного или ферментативного гидролиза) на хроматограмме использовали раствор анилинфталата в *n*-бутаноле, насыщенном водой, при последующем нагревании хроматограмм при 105 °С в течение 5-10 мин. Идентификация углеводов проводилась с помощью достоверно известных стандартных образцов глюконовой кислоты, глюкозы, ксилозы, галактозы, рамнозы, арабинозы, апиозы.

4. Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ/МС)

Изучение жирнокислотного состава масла плодов проводили методом газожидкостной хроматографии. Предварительно переводили жирные кислоты в метиловые эфиры по методике ГОСТ 31665-2012, переэтерификацией с метанольным раствором гидроксида калия [36]. 0,5 г масла помещали в коническую колбу, растворяли в 10 мл *n*-гексана, затем добавляли 0,5 мл 2 М раствора гидроксида калия в метаноле, закрывали пробкой, интенсивно перемешивали в течение 5 мин. Полученный раствор

центрифугировали на центрифуге ОПН-3 при частоте вращения 3000 мин⁻¹. Для данного анализа использовался верхний слой.

Состав жирных кислот определяли на газовом хроматографе «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором. Данный анализ проводили с использованием капиллярной кварцевой колонки HP-5ms 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм (неподвижная фаза 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан) фирмы Agilent.

Использовали следующие условия хроматографирования:

- программирование температуры термостата колонок: изотерма 40 °С в течение 1 мин – нагрев до 210 °С со скоростью 15 °С/мин – нагрев до 150 °С со скоростью 7 °С/мин – нагрев до 280 °С со скоростью 5 °С/мин - изотерма 280 °С в течение 10 мин;
- газ-носитель: гелий, скорость газа-носителя: 1 мл/мин;
- температура испарителя 280 °С;
- температура источника ионов 150 °С;
- температура квадруполя 230 °С;
- температура переходной камеры 280 °С;
- сброс 1:100;
- объем вводимой жидкой пробы 1 мкл.

Для идентификации компонентов масла расторопши пятнистой определяли линейные индексы удерживания, затем сопоставляли полученные результаты и полные масс-спектры с библиотечными (библиотеки масс-спектров «NIST 2.0»), использовали также литературные данные. В ходе анализа нами рассматривались только компоненты, определяемые по библиотеке с вероятностью более 90%. Количественный анализ проводили по площади соответствующих пиков на хроматограмме, построенной по полному ионному току.

2.2.5. Физико-химические методы анализа

1. Спектрофотометрия

Метод спектрофотометрического определения [26, 62, 68, 96] применяли для установления содержания суммы флаволигнанов, фенилпропаноидов и флавоноидов в извлечениях и препаратах расторопши пятнистой, а также для анализа индивидуальных веществ, выделенных из травы расторопши пятнистой. Исследования проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 500 нм. Раствором сравнения выступал этиловый спирт 70%. Обработку результатов, полученных в ходе эксперимента осуществляли при помощи программного обеспечения «WinAspect Excel».

2. ^1H -ЯМР-спектроскопия и масс-спектральный анализ

Метод масс-спектрометрии применяется для анализа твердых, жидких или газообразных проб. Качественный масс-спектрометрический анализ основан на измерении массы ионов. Идентификация масс проводится по положению линии на фотопластинке, которое фиксируют, измеряя расстояние между линиями с известной массой и анализируемой линией [15, 26].

Масс-спектрометрия характеризуется высокой универсальностью. К достоинствам метода можно отнести возможность одновременного определения нескольких элементов, а также использование в работе небольших навесок. Регистрацию масс-спектров электронного удара проводили на приборе «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и колебании температурного режима ионного источника от 100 до 250 °С. Определение температуры плавления выделенных соединений проводили на блоке Кофлера.

Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) отражает взаимодействие с магнитным полем магнитного момента ядра [15, 26]. Данное явление основано на эффекте Зеемана, заключающемся в расщеплении спектральных линий или уровней в магнитном поле на

отдельные компоненты. По табличным значениям резонансных сдвигов или по данным предварительной калибровки в исследуемой молекуле устанавливают наличие определенных атомных группировок (информация о структуре), а по площади пиков определяют число ядер. Метод ЯМР-спектроскопии применяется для определения структуры сложных соединений. Спектральные и физико-химические характеристики выделенных соединений исследовали посредством регистрации ^1H -ЯМР-спектров и ^{13}C -ЯМР-спектров на приборе «Bruker AM 300» (300 мГц) [12, 24].

2.2.6. Технологические методы анализа

Настойку травы расторопши пятнистой готовили с использованием нескольких методов: метода перколяции и метода дробной мацерации с элементами модификации в соответствии с общими правилами фармацевтической технологии. Разработанный на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ метод модифицированной ремацерации был апробирован на различных видах сырья, содержащего фенилпропаноиды (Патент РФ на изобретении № 2102999, № 2134584, № 2133620 и др.). Настойку 1:5 получали на 70% спирте этиловом [26, 79, 105].

Получение настойки травы расторопши пятнистой методом
модифицированной дробной мацерации

День 1^{ый}. В три термостойкие широкогорлые колбы помещали по 1 части травы расторопши пятнистой. В первую колбу добавляли 8 объемов спирта этилового 70%, во вторую колбу – 3 объема спирта этилового 70% на смачивание. Плотнo укупоривали колбы с сырьем, оставляли на сутки.

День 2^{ой}. Из первой колбы переливали полученное извлечение во вторую колбу. В первую колбу добавляли 5 объемов чистого экстрагента – спирта этилового 70%. В третью колбу добавляли 3 объема спирта 70% на смачивание. Плотнo укупоривали колбы, оставляли на сутки.

День 3^{ий}. Извлечение из второй колбы переливали в третью колбу, а извлечение из первой колбы – во вторую. В первую колбу добавляли 5 объемов чистого экстрагента. Колбу плотно укупоривали и оставляли на сутки.

День 4^{ый}. Извлечение из третьей колбы собирали в приемник, извлечение из второй колбы переносили в третью колбу. Содержимое первой колбы нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, после чего остужали и переносили полученное извлечение во вторую колбу. Вторую и третью колбу плотно укупоривали и оставляли на сутки. Первую колбу разгружали.

День 5^{ый}. Извлечение из третьей колбы собирали в приемник. Содержимое второй колбы нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, после чего остужали и переносили полученное извлечение в третью колбу. Третью колбу плотно укупоривали и оставляли на сутки. Вторую колбу разгружали.

День 6^{ой}. Содержимое третьей колбы нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут, после чего остужали и переносили полученное извлечение в приемник. Разгружали третью колбу.

Полученное суммарное извлечение травы расторопши (готовый продукт) перемешивали и оставляли на 2 суток при температуре не выше 10 °С. Выпавший осадок отфильтровывали, полученное извлечение фасовали во флаконы темного стекла и оформляли этикетку.

Получение настойки травы расторопши пятнистой осуществляли также методом перколяции [26, 79, 105].

Из 200,0 г травы расторопши пятнистой было получено 1050 мл настойки. Настойка травы расторопши пятнистой 1:5 была получена за 2 дня, технологический процесс проводился по описанной ниже схеме.

День 1^{ый}. 200,0 г травы расторопши заливали 630 мл спирта этилового 70% и оставляли на сутки для смачивания и набухания сырья.

День 2^{ой}. Набухшее сырье распределяли по трем перколяторам в равных количествах и заливали спиртом этиловым соответствующей концентрации до «зеркала». Перколяторы располагали один под другим таким образом, чтобы экстракт с первого перколятора проходил поочередно через сырье второго и третьего перколятора. На выходе из третьего перколятора собирают суммарное извлечение. Перколяцию проводили спиртом соответствующей концентрации со скоростью примерно 1/24 перколятора в час. В первый перколятор непрерывно с такой же скоростью подавали чистый экстрагент. После прохождения всего объема экстрагента отработанное сырье из перколяторов разгружали.

Суммарное извлечение (1000 мл настойки травы расторопши) выдерживали при температуре 10 °С в течение двух суток, фильтровали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку [26, 79, 47, 105].

Сорбитный сироп получали по классической методике [26, 79, 105]. Сорбит загружали в термостойкую колбу и добавляли небольшое количество воды. Когда сорбит начинал распадаться на мелкие крупинки, добавляли остальную воду и нагревали до 60-70°C, перемешивая до полного растворения сахара. После этого полученный сироп доводили до кипения, после этого доводили сироп до кипения еще раз. Затем полученный горячий сироп фильтровали и фасовали в чистые сухие флаконы из темного стекла, оформляли этикетку [26, 47, 79, 105].

Реакция получения водорастворимой соли дигемисукцината силибина [137].

Силибин получен в лабораторных условиях на базе кафедры фармакогнозии СамГМУ методом хроматографического разделения суммы флаволигнанов расторопши из сухого экстракта расторопши (колоночная хроматография). Очистку силибина осуществляли методом перекристаллизации.

Лабораторная схема получения дигемисукцината силибина.

0,75 г силибина растворяли при 45 °С в 1,5 мл пиридина. В результате реакции образовался раствор коричневого цвета. Далее добавляли к раствору

1,0 г ангидрида янтарной кислоты и перемешивали смесь в течение примерно 8 ч при 45 °С при помощи механической мешалки. К полученной смеси добавляли 0,7 мл этилового спирта 95% и продолжали перемешивание до образования гомогенной смеси. Затем при интенсивном перемешивании добавляли к смеси по каплям 1,2 мл воды очищенной для омыления фениловых эфиров в течение примерно 30 мин. В результате реакции выделялось тепло, и раствор изменил цвет на белый. После перемешивания примерно в течение часа при 30 °С фениловые эфиры количественно гидролизуются.

Гидролиз прекращали, добавляя к смеси в плоскодонной колбе 15 мл этилацетата. После чего исходный раствор промывали дополнительно 15 мл этилацетата.

Для отделения избытка янтарной кислоты и пиридина разбавленный этилацетатом реакционный раствор дважды подвергали экстракцией водой порциями по 75 мл (подкисление до данного pH осуществляется с помощью разбавленного водного раствора хлористоводородной кислоты). Для извлечения избытка хлористоводородной кислоты этилацетатную фазу дважды подвергали экстракцией водой до значения pH=4,5-5,0. Затем этилацетатный слой упаривали при температуре 40 °С в вакууме до первоначального объема и разбавляли в этиловом спирте 95% объемом 2,5 мл.

Получение дигемисукцианата силибина натриевой соли

К полученному спиртовому раствору полученного эфира добавляли по каплям 6% спиртовой раствор едкого натра при температуре -5 °С объемом 2,5 мл. Перемешивали суспензию, в результате реакции выпадал осадок. Затем осадок отфильтровывали, промывали 20 мл этилового спирта 95%, а затем сушили при температуре 40 °С. После этого предварительно высушенный осадок измельчали до размера частиц примерно 0,2 мм. В результате реакции получили 0,15 г целевого продукта.

Полученное целевое соединение не имеет определенной температуры плавления. Оно начинает плавиться при температуре около 180 °С, а при температуре около 200 °С плавится с образованием пузырей.

2.2.7. Фармакологические методы анализа

В рамках данной работы проводили исследование влияния извлечений из травы расторопши пятнистой на выделительную функцию почек в хроническом эксперименте [43, 60, 84]. Исследования проводились на 120 белых беспородных крысах обоего пола массой 200-250 г. Всего было поставлено 6 серий экспериментов на кафедре фармакологии Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ). Животные содержались в виварии при свободном доступе к воде на обычном рационе. За день до опыта крысы получали водную нагрузку в объеме 3% от массы тела животного при помощи внутрижелудочного зонда. В день эксперимента животным контрольной группы повторно вводилась водная нагрузка для водных извлечений и водно-спиртовая нагрузка для спиртовых извлечений, а животным опытной группы – внутрижелудочно лекарственный препарат в идентичном объеме [2, 7, 43, 60, 84]. Исследовали настой и настойку расторопши пятнистой 1:5 на 70% этаноле, приготовленные на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ. Животных помещали в обменные клетки на сутки, собирали 4-х и 24-х часовые порции мочи [43]. В каждой порции определяли экскрецию воды, регистрировали концентрацию натрия и калия методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости ПАЖ-1, креатинина – колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3. Статистическую обработку полученных данных проводили по критерию Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 и Microsoft Excel 2010 «Пакет анализа» [26, 42].

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ *SILYBUM MARIANUM* (L.)

Оценка подлинности и качества ЛРС посредством морфолого-анатомического анализа является одним из обязательных критериев стандартизации любого вида сырья [4, 10, 26, 74]. Морфолого-анатомический анализ особенно важен для выявления случайных примесей или намеренной фальсификации сырья. В настоящее время на территории РФ отсутствует нормативная документация на траву расторопши пятнистой. Данный факт препятствует разработке отечественных лекарственных препаратов на основе данного вида ЛРС.

Перспективы внедрения травы расторопши пятнистой в качестве нового лекарственного сырья наряду с плодами создает потенциальные возможности безотходного и рационального использования сырьевых ресурсов РФ [87].

Очевидно, что внедрение нового вида сырья в практическую фармацию предполагает проведение исследований и разработки нормативной документации (ФС), в том числе и в разделе «Микроскопия» [26, 28, 62].

Многочисленные результаты ранее проведенных экспериментальных исследований показали, что зарубежные и отечественные ученые проявляют большую заинтересованность в поиске анатомо-морфологических, диагностических признаков плодов расторопши пятнистой. Однако полной научной информации о гистологии и анатомии травы расторопши пятнистой найдено не было [62, 67, 88].

Нами проведен морфолого-анатомический анализ травы расторопши пятнистой в качестве перспективного источника биологически активных соединений (БАС), необходимый в рамках комплексной переработки сырья расторопши в рамках отечественного фармацевтического производства.

3.1. Морфолого-анатомическое изучение стебля и листа травы расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.)

Трава расторопши пятнистой представляет собой сухие побеги с листьями и соцветиями. Несмотря на поздний срок сбора сырья, в экспериментальной картине присутствуют ювенильные особи (рис. 3А); хорошо развитые прикорневые мутовки листьев без стеблевой части побега (рис. 3Б); бутонизирующие особи (рис. 3В). Цветущие и плодущие экземпляры в общем числе образцов анализируемой выборки растений превалировали (рис. 3Г).

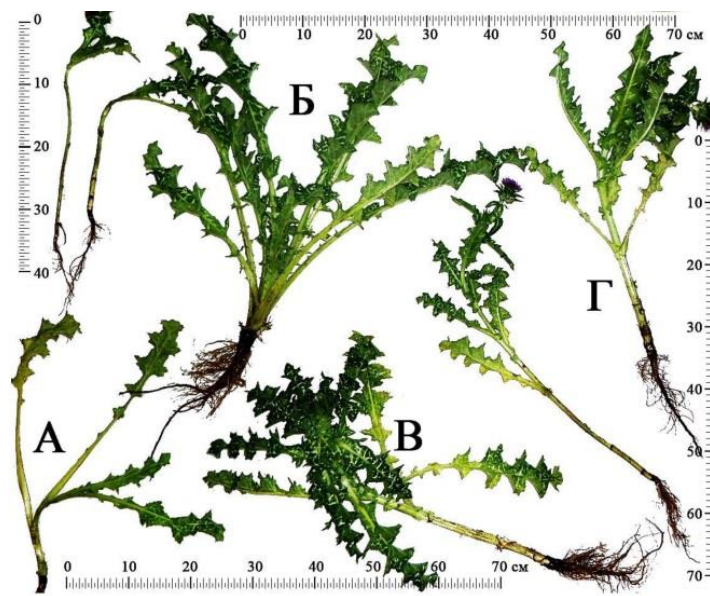


Рисунок 3 – Образцы травы расторопши пятнистой:

А – ювенильные особи; Б – развитые прикорневые мутовки; В – бутонизтрующие особи; Г – цветущие особи

Морфологический анализ показал: стебли расторопши различаются по длине, по диаметру и облиственности.

Анатомо-гистологический анализ проводился на поперечных сечениях цветоносов растений диаметром до 5 мм и крупных стеблях диаметром до 1,5 см.

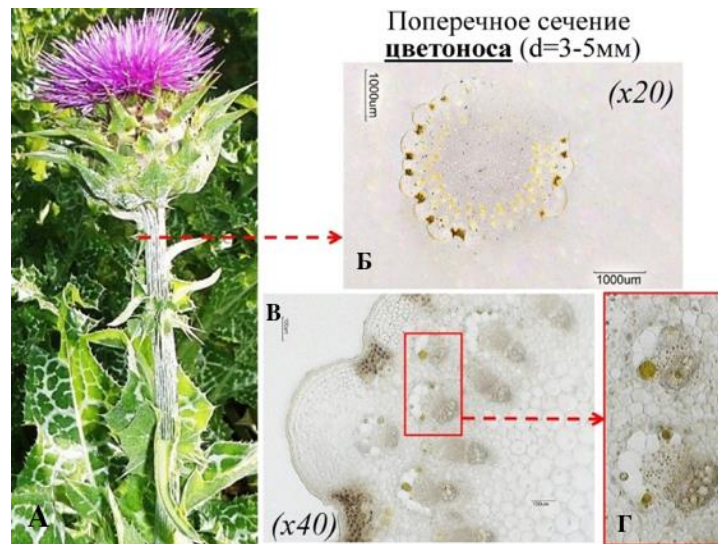


Рисунок 4 – Поперечное сечение цветоноса расторопши пятнистой ($d=3-5\text{ мм}$):

А – нативный образец; Б – общий вид поперечного сечения цветоноса ($\times 20$);

В – фрагмент поперечного сечения цветоноса ($\times 40$); Г – проводящие пучки коллатерального типа ($\times 400$)

Результаты его таковы: цветонос растения на поперечном сечении имеет округлую форму с равномерной волнообразной ребристостью края (рис. 4Б). В ложбинах ребер локализована хлоренхима коровой части, ярко заметная на фоне нативно окрашенных тканей стебля (рис. 4В).

Проводящая система побега переходного типа строения. Пучки различаются по размеру и форме и нестандартно расположены в два круга.

Первый основной круг расположен ближе к центру и состоит из крупных вытянутых пучков овальной формы. Второй круг расположен ближе к периферии и представлен округлыми мелкими пучками, размещенными в рёбрах, непосредственно под колленхимой рёбер стебля (рис. 4Г).

Особенностью пучков является наличие над ними, со стороны флоэмы, крупноклеточной обкладки. Клетки обкладки крупные, широко-просветные, оболочки их целлюлозные. В клетках хорошо заметны капли желтого пигмента, растворимого в спирте этиловом и нерастворимого в воде.

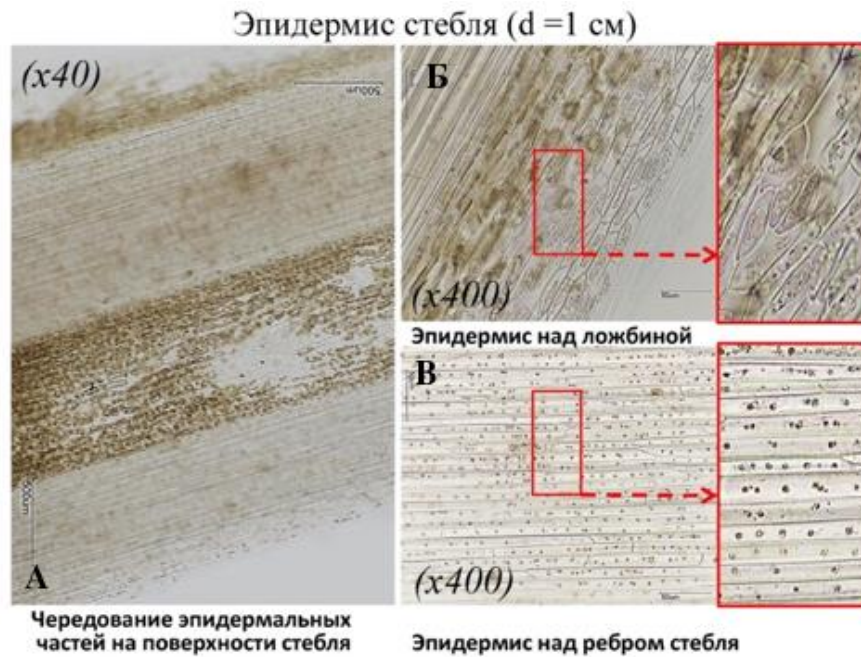


Рисунок 5 – Эпидермис стебля расторопши пятнистой:

А – поверхность стеблевого эпидермиса (x40); Б – эпидермис над ложбиной (x400); В – эпидермис над ребром стебля (x400)

При рассмотрении стебля с поверхности хорошо заметно, что его эпидермис неоднороден. Неоднородность связана с ребристостью поверхности. Визуально это выражается в чередовании неоднородных фрагментов эпидермы, расположенных над жилкой и расположенных в ложбинах, между рёбрами (рис. 5А).

Эпидермис над жилками составлен из прозенхимных клеток с косо усеченными концами (рис. 5В). Клеточные стенки их тонкие, целлюлозные, без заметных пор. Внутри клеток хорошо визуализируются округлые пластиды желто-зеленого цвета. В области над жилками эпидермис не содержит устьичных аппаратов.

Эпидермис в ложбинах представлен клетками вытянутыми по форме, с мягко извилистыми стенками (рис. 5Б). Стенки их тонкие, целлюлозные. Протопласт клеток выраженный, аморфный, по цвету зелено-желтый. В эпидерме со стороны ложбины встречаются устьичные аппараты аномоцитного типа.

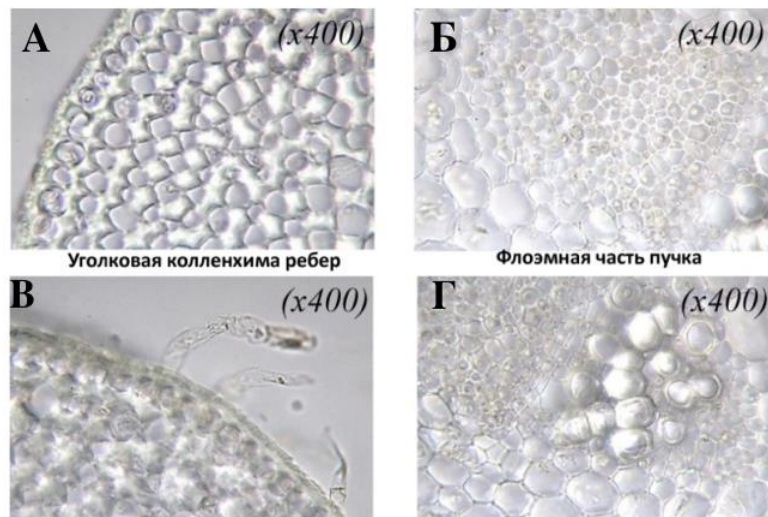


Рисунок 6 – Гистологические особенности цветоноса расторопши пятнистой (d=3-5мм):

А – уголковая колленхима ребёр (x400); Б – флоэмная часть пучка (x400);
В – простые трихомы на эпидерме (x400); Г – ксилемная часть пучка (x400)

С поверхности стебель расторопши пятнистой (d=3-5мм) покрыт мелкоклеточной тонко-кутинизированной эпидермой. Стебель неоднородно опушен простыми многоклеточными волосками. Волоски смятые, часто обломанные, расположены, как правило, по рёбрам стебля (рис. 6В). Протопласт в клетках волосков не диагностируется.

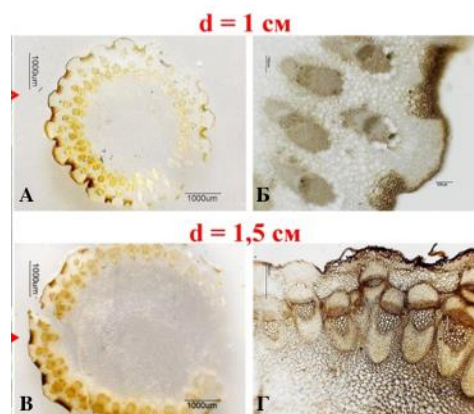


Рисунок 7 – Поперечное сечение стебля расторопши пятнистой (d=1-1,5см):

А – общий вид поперечного сечения стебля (x20); Б – фрагмент поперечного сечения стебля (x40); В – общий вид поперечного сечения стебля (x20);
Г – фрагмент поперечного сечения стебля (x40)

Анатомия более крупных стеблей с диаметром от 1 см до 1,5 см принципиально не отличается от анатомии цветоноса. Основное гистологическое отличие заключается в развитости пучков в стебле; а именно, их армированности со стороны флоэмной части большой группой склеренхимных волокон (рис. 7Б, Г).

Обкладочная паренхима пучков, с нативно жёлтым содержимым, описанная для цветоносов, в стебле присутствует, но выражена слабее. Проводящие пучки расположены в два круга, но ввиду их бóльших размеров они плотно прилегают друг к другу (рис. 7В).

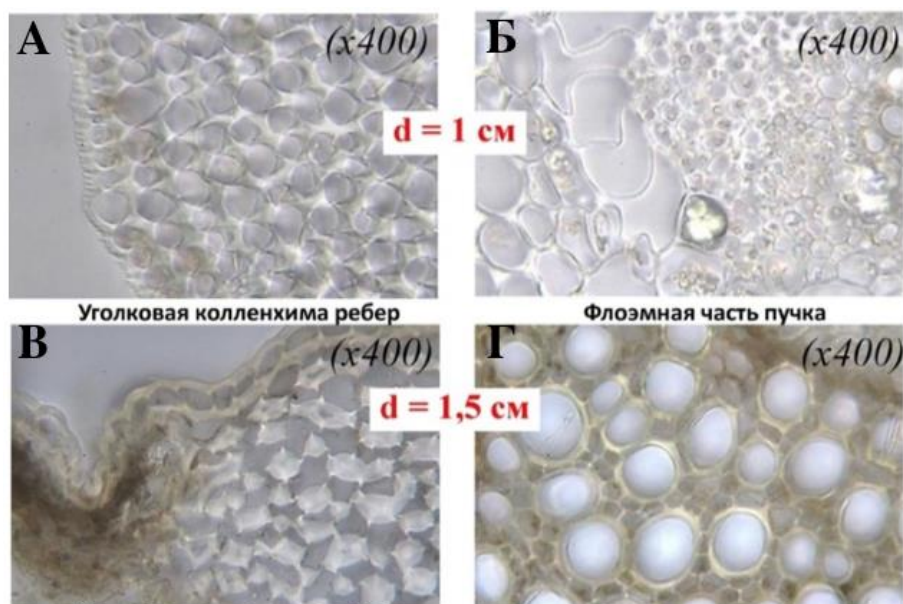


Рисунок 8 – Гистологические особенности стебля расторопши пятнистой (x400):

А – уголковая колленхима рёбер; Б – флоэмная часть пучка;

В – уголковая колленхима рёбер; Г – ксилемная часть пучка

Расположенная под эпидермисом колленхима в стеблях бóльшего размера значительно выражена (рис. 8А, В). Эпидермис в крупных стеблях имеет более утолщенные стенки и значительную, хорошо выраженную кутикулу (рис. 8В). Во флоэмной части пучков в клетках изредка встречаются сферокристаллы инулина (рис. 8Б).



Рисунок 9 – Образцы сидячих листьев расторопши пятнистой:

А – листья у основания стебля; Б – листья на верхушке стебля

Стебель растения облиственен. На стебле поочерёдно расположены простые сидячие, струговидные по форме листья (рис. 9). Листья вытянутые, перисторассеченные, с широкой центральной жилкой. Край листа неоднородно пильчатый, по краю с острыми вытянутыми шипами на зубцах.

У основания побегов листья образуют прикорневую розетку, в последствии, к началу плодоношения отмирающую.

Размеры листьев на побеге варьируют. Наиболее крупные листья расположены ближе к основанию стебля. Мелкие листья с нисбегающим основанием расположены на верхушке стебля – цветоносе.

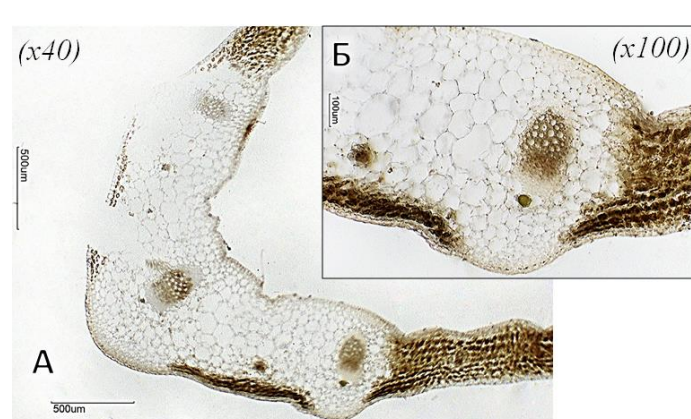


Рисунок 10 – Структура центральной жилки листовой пластинки расторопши пятнистой:

А – общий вид поперечного сечения листовой пластинки(х40); Б – фрагмент поперечного сечения с проводящим пучком(х100)

Широкая светло-зеленая, почти белая, центральная часть листовой пластинки на поперечном сечении сильно паренхимизирована (рис. 10А). Основная паренхима крупноклеточная не пигментированная. В паренхиме локализованы три далеко отстоящих друг от друга коллатеральных пучка. Пучки по размеру приблизительно одинаковые (рис. 10Б).

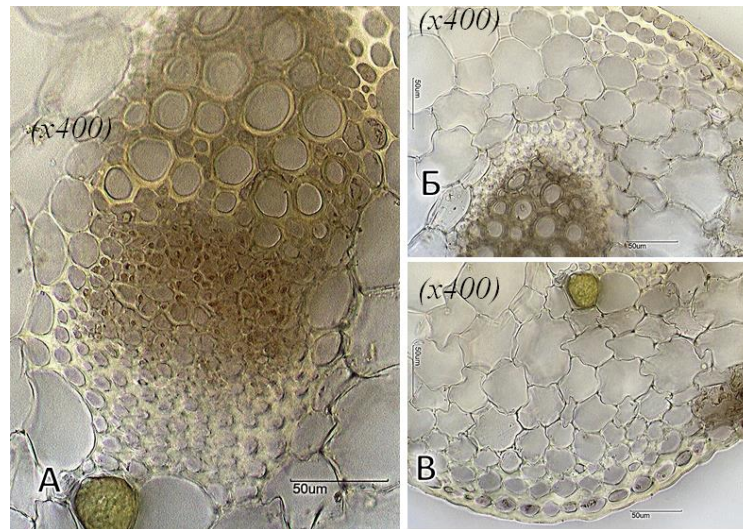


Рисунок 11 – Проводящий пучок коллатерального типа в листовой пластинке расторопши пятнистой (х400):

А – общий вид пучка; Б – ксилемный участок;

В – флоэмный участок со смолистым содержимым

С флоэмной и ксилемной сторон пучки значительно армированы склеренхимными волокнами (рис. 11А). На периферии флоэмы, выше склеренхимы, встречаются крупные клетки основной ткани со смолистым содержимым желтого цвета, ранее описанные в стеблях (рис. 11В).

Эпидермис в центральной части листа мелкоклеточный, стенки его клеток значительно утолщены. Непосредственно под эпидермой локализуется колленхима уголкового типа: в два ряда с нижней и в три ряда с верхней сторон листовой пластинки.

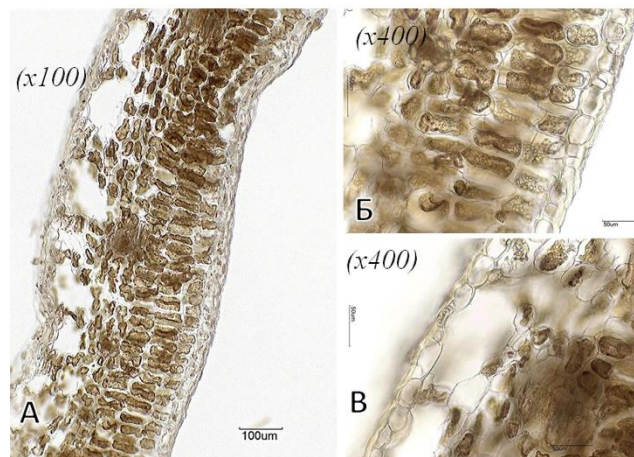


Рисунок 12 – Поперечное сечение листовой пластинки расторопши пятнистой:

А - общий вид (x100); Б - столбчатый мезофилл (x400);

В - губчатый мезофилл (x400)

На поперечных сечениях листовая пластинка дорзовентрального типа с обеих сторон покрыта мелкоклеточным эпидермисом (рис. 12).

Столбчатый мезофилл выражен и насчитывает в толщину до 3-х слоев клеток (рис. 12А).

Губчатый мезофилл имеет крупные полости, которые приближены в области устьичных аппаратов непосредственно к нижнему эпидермису листовой пластинки (рис. 10Б).

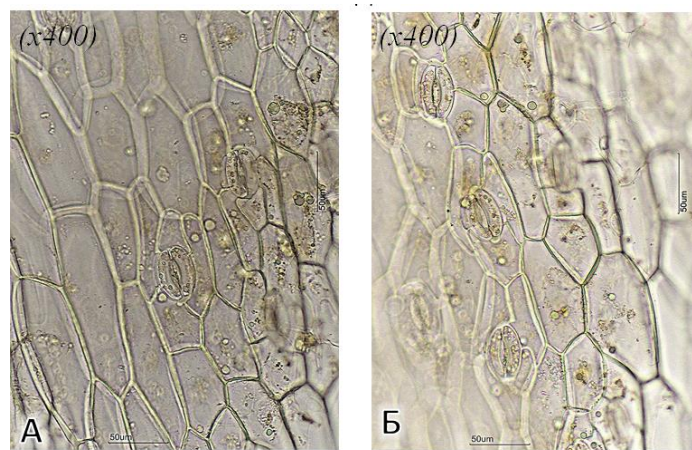


Рисунок 13 – Верхний эпидермис листа расторопши пятнистой (x400):

А - эпидермис над жилкой; Б - эпидермис над пластинкой

Анализ листовой поверхности выявил, что устьичные аппараты расположены с верхней и с нижней стороны листа (листья амфистоматические) (рис. 13).

Клетки верхнего эпидермиса, расположенного над жилкой, вытянутые, угловатые, с заметными ядрами в протопласте. Их клеточные стенки без заметных поровых каналов, тонкие, целлюлозные (рис. 13А).

Размеры их на большей части листовой пластинке мелкие. Устьичные аппараты аномоцитного типа, околоустьичные клетки заметно мельче клеток основной эпидермы (рис. 13Б).

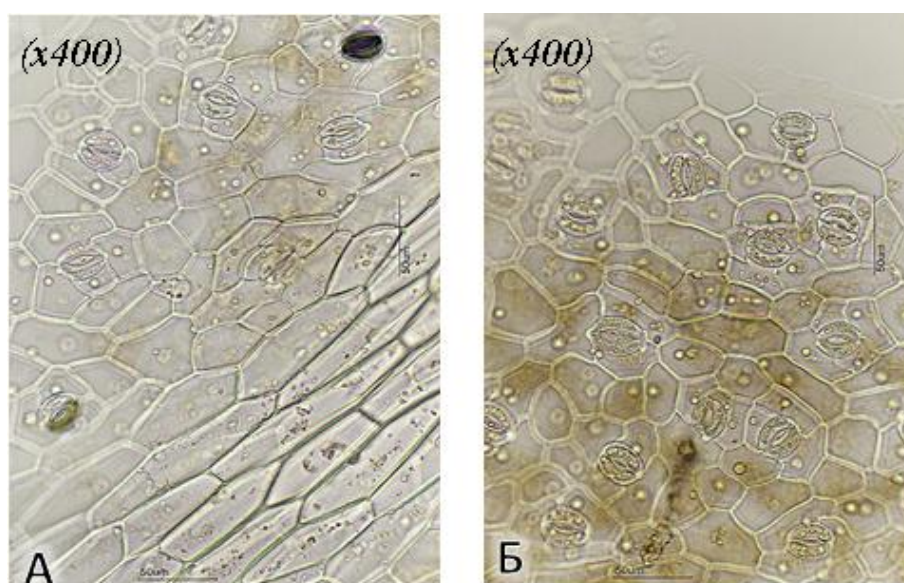


Рисунок 14 – Нижний эпидермис листа расторопши пятнистой (x400):

А – эпидермис над жилкой; Б – эпидермис над пластинкой

Нижний эпидермис листа расторопши сложен более мелкими по размеру клетками, со слабо извилистыми, слегка угловатыми стенками (рис. 14А). Устьичные аппараты здесь встречаются значительно чаще, чем на верхней поверхности листа (рис. 14Б).

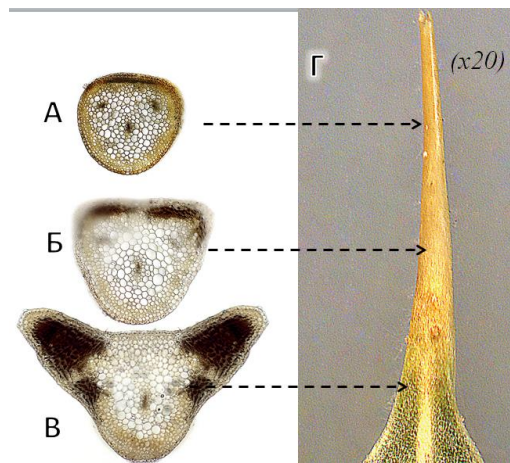


Рисунок 15 – Остистый шип, расположенный на листовой пластинке расторопши пятнистой:

А – срез апикальной части шипа; Б – срез медиальной части шипа;

В – срез базальной части шипа; Г – нативный вид (x20)

Анализ листовой пластинки по краю обнаруживает хорошо заметные остистые разно-размерные шипы светло-желтого цвета (рис. 15Г).

Форма поперечного сечения в апикальной его части округлая. Далее по длине листовой пластинки наблюдается изменение округлой формы сечения в треугольную в медиальной части и крылатую в базальной части шипа (рис. 15А-В).

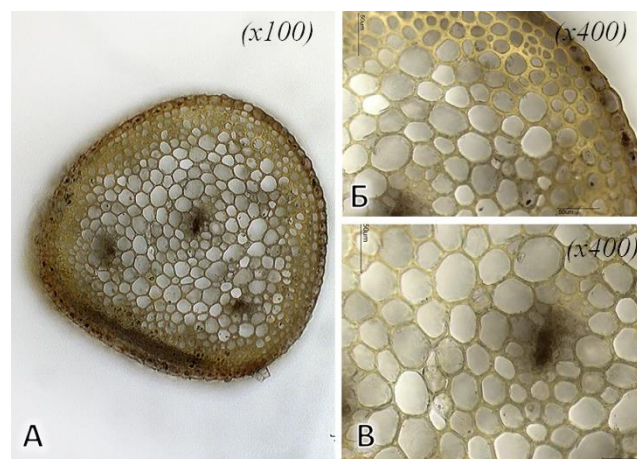


Рисунок 16 – Срез апикальной части шипа, расположенного на листовой пластинке расторопши пятнистой:

А – общий вид (x100); Б – основная ткань с лигнифицированными клетками

(x400); В – коллатеральный пучок (x400)

Эмергенец (шип) покрыт толстостенной эпидермой, под которой локализована основная ткань, стенки её клеток лигнифицированы (рис. 14Б). В центре среза клетки крупнее. Проводящие ткани сложены в три мелких коллатеральных пучка, раздвинутых к поверхности (рис. 16В).

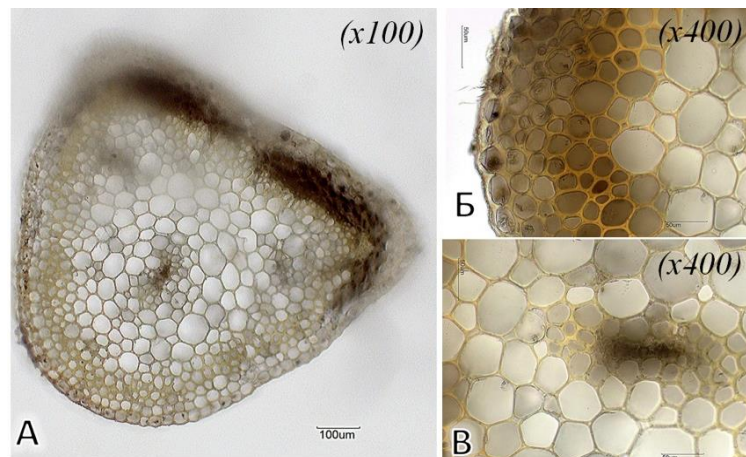


Рисунок 17 – Срез медиальной части шипа, расположенного на листовой пластинке расторопши пятнистой:

А – общий вид (x100); Б – уголковая колленхима (x400);

В – коллатеральный пучок (x400)

В медиальной части поперечных сечений в структуре шипа появляется хлоренхима, расположенная строго с адаксиальной, т.е. верхней стороны шипа (рис. 17А). В этой области заметна треугольная форма поперечного среза, впоследствии переходящая в листовую пластинку.

Из гистологических особенностей считаем нужным отметить наличие уголковой колленхимы под эпидермисом на поперечных срезах в медиальной части шипов (рис. 17Б).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3:

1. Проведено сравнительное морфолого-анатомическое исследование листьев и стебля травы расторопши пятнистой.
2. В результате проведенных морфолого-анатомических исследований были определены следующие диагностически значимые признаки, необходимые для подтверждения подлинности травы расторопши пятнистой:
 - волнообразная ребристость края округлого стебля растения;
 - гистологическая неоднородность эпидермиса стебля, связанная с ребристостью его поверхности;
 - проводящая система стебля – переходного типа: нестандартно расположенные в два круга проводящие пучки, различные по размеру и форме;
 - заметные капли желтого пигмента, растворимого в спирте этиловом и не растворимого в воде в клетках паренхимной обкладки над флоэмой;
 - отсутствие пигментов в паренхиме центральной части листа, где локализованы три далеко отстоящих друг от друга коллатеральных пучка со смолистым содержимым желтого цвета;
 - сильно утолщенные клеточные стенки мелкоклеточного эпидермиса листовых пластинок;
 - амфистоматические листья;
 - устьичные аппараты аномоцитного типа;
 - двухслойная уголковая колленхима с нижней стороны и в три с верхней стороны листа;
 - шипы (эмергенцы) светло-желтого цвета, под толстостенной эпидермой которых локализована основная ткань, стенки клеток которых лигнифицированы.
3. Признаки, имеющие диагностическое значение, могут быть рекомендованы для внесения в раздел «Микроскопия» проекта фармакопейной статьи на новые виды лекарственного растительного сырья «Расторопши пятнистой трава».

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

В настоящее время в Российской Федерации в качестве ЛРС используются исключительно плоды расторопши пятнистой, которые используются для производства гепатопротекторных препаратов и в качестве источника получения масла расторопши пятнистой [1, 3, 5, 13, 16, 20, 21, 53, 56, 61, 62, 63, 65 66, 74, 77, 80, 83, 88, 91]. Надземная часть расторопши пятнистой после сбора созревших плодов представляет собой значительную фитомассу с множеством сочных листьев и верхушек стеблей. По некоторым литературным данным известно, что трава расторопши пятнистой популярна в народной медицине в качестве диуретического средства [109]. Для разработки проекта фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Расторопши пятнистой трава», а также для обоснования методик качественного анализа и количественного определения биологических активных соединений потребовались исследования химического состава травы расторопши пятнистой.

4.1. Выделение индивидуальных веществ из травы расторопши пятнистой

Выделение индивидуальных соединений проводили методом колоночной хроматографии. Исследованию подвергали настойку травы расторопши пятнистой, полученную методом модифицированной дробной мацерации на 70% этиловом спирте. Из 200 г сырья получили 1050 мл водно-спиртового извлечения. Для проведения колоночной хроматографии 950 мл настойки расторопши пятнистой упаривали в роторном вакуумном испарителе до жидкого экстракта, при этом объем которого составил около 100 мл. Полученный в результате упаривания жидкий экстракт наносили на сорбент - силикагель L 40/100, затем высушивали полученную пробу. Навеска сорбента для пробы составила 58,0 г, примерно 30% от массы сырья.

Приблизительно такое же количество сорбента отмеривали для колоночной хроматографии.

Далее высушенный порошок с пробой (сухой экстракт + силикагель) наносили на слой силикагеля (диаметр – 8 см, высота – 6 см), сформированный в виде взвеси в хлороформе. Колонку последовательно элюировали хлороформом и смесью хлороформ-этанол и этанол-вода в различных соотношениях.

Полученные в результате элюирования фракции из травы расторопши пятнистой собирали в маркированные емкости и упаривали в вакуумном испарителе до объема примерно 5-10 мл. Полученные концентрированные фракции переносили в пенициллиновые флаконы и затем подвергали дальнейшему исследованию.

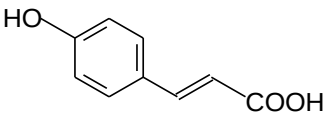
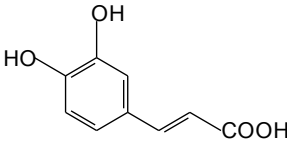
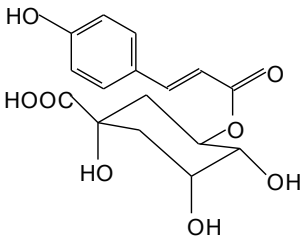
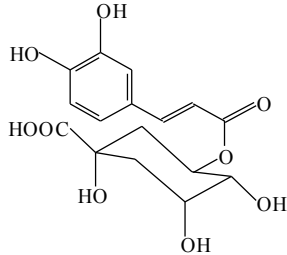
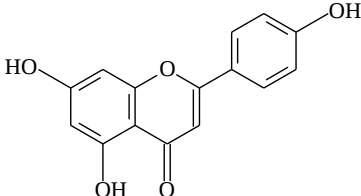
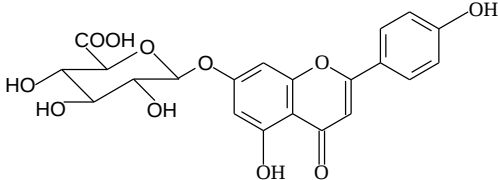
Детектирование хода элюации колоночной хроматографии проводили визуально (по интенсивности окрашивания раствора), а также с использованием метода ТСХ. На хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», предварительно активированную в сушильном шкафу при 105 °С, наносили концентрированные фракции. Разделение проводили в системе растворителей *n*-бутанол – этанол – аммиак (7:2:5). После прохождения фронтом примерно 7-8 см пластинку вынимали, затем высушивали и просматривали в УФ-свете при длине волны 366 нм и 254 нм, а затем обрабатывали щелочным раствором ДСК и ФМК.

В качестве стандартных образцов использовали ГСО силибина, ГСО цинарозида, РСО рутина, РСО хлорогеновой кислоты, РСО кофейной кислоты, РСО апигенина.

4.1.1. Физико-химические и спектральные характеристики выделенных индивидуальных веществ

В результате колоночной хроматографии были выделены индивидуальные вещества из фракций №10, 20, 68, 129, 130. Идентификацию выделенных флавоноидных гликозидов и агликонов, а также фенилпропаноидов (гидроксикоричные кислоты) (табл.3) осуществляли с использованием УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также различных химических превращений (химический и ферментативный гидролиз). Спектры ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР получали на приборах «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30», регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena, Германия).

Таблица 3 – Выделенные вещества из травы расторопши пятнистой

	
<i>n</i> -Кумаровая кислота (1)	Кофейная кислота (2)
	
5- <i>n</i> -кумароилхинная кислота (3)	Хлорогеновая кислота (4)
	
Апигенин (5)	7-О-β-D-глюкуронид апигенина (6)

4.1.2. Идентификация выделенных веществ

***n*-Кумаровая кислота (1).** Светло-желтое аморфное вещество состава $C_9H_8O_3$, т.пл. 206-208 (хлорформ-этиловый спирт). Масс-спектр (EI-MS, 180 °C, m/z): M^+ 164 (100%). λ_{max} EtOH 285, 316 (пл) нм. 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 9,78 (1H, с, ароматическая OH), 7,47 (1H, д, 16 Гц, H-7), 7,38 (2H, д, 9 Гц, H-2, H-6), 6,77 (2H, д, 9 Гц, H-3, H-5), 6,32 (д, 16 Гц, H-8).

Кофейная кислота (2). Кристаллическое вещество светло-желтого цвета состава $C_9H_8O_4$, т. пл. 201-203° (вода). λ_{max} EtOH 217, 243, 298 пл, 328 нм. 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 9,60 и 9,20 (с, 2 ароматические OH), 7,48 (д, 16 Гц, H-7), 7,10 (д, 2,5 Гц, H-2), 7,04 (дд, 2,5 и 9 Гц, H-6), 6,82 (д, 9 Гц, H-5), 6,22 (д, 16 Гц, H-8).

***n*-Кумаройлхинная кислота (3).** Светло-желтое аморфное вещество состава $C_{16}H_{18}O_8$. Масс-спектр (EI-MS, 180 °C, m/z): M^+ 338 (16%). λ_{max} EtOH 285, 316 (пл) нм. 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 9,79 (1H, с, ароматическая OH), 7,46 (1H, д, 16 Гц, H-7¹), 7,37 (2H, д, 9 Гц, H-2¹, H-6¹), 6,76 (2H, д, 9 Гц, H-2¹, H-6¹), 6,31 (д, 16 Гц, H-8¹), 5,30 (1H, м, H-5), 4,09 (1H, м, H-3), 3,71 (1H, м, H-4), 1,80-2,21 (4H, м, 2H-2 и 2H-6).

Хлорогеновая кислота (4). Кристаллическое вещество белого цвета состава $C_{16}H_{18}O_9$, т. пл. 202-204° (вода). λ_{max} EtOH 217, 242, 299 пл, 329 нм. 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 9,61 и 9,19 (с, 2 ароматические OH), 7,47 (д, 16 Гц, H-7¹), 7,09 (д, 2,5 Гц, H-2¹), 7,03 (дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 6,81 (д, 9 Гц, H-5¹), 6,21 (д, 16 Гц, H-8¹), 5,11 (дт, 5 и 9 Гц, H-5¹), 3,90 (кв, 3 Гц, H-3), 3,61 (дд, 3 и 9 Гц, H-4), 1,70-2,10 (4H, м, 2H-2 и 2H-6).

Апигенин (5,7,4¹-тригидроксифлавонон) (5). Кристаллы светло-желтого цвета состава $C_{15}H_{10}O_5$ с т.пл. 223-225°С (водный спирт). УФ-спектр: λ_{max} 271, 336 нм; +NaOAc 275, 378 нм; +AlCl₃ 280, 389 нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °C, m/z): 271 $[M + H]^+$. 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,97 (с, 5-OH группы), 7,92 (д, 9 Гц, H-2¹ и H-6¹ - 2H), 7,01 (д, 9 Гц,

H-3¹ и H-5¹ - 2H), 6.93 (д, 2,5 Гц, H-8), 6.78 (с, H-3), 6.48 (д, 2 Гц, H-8), 6.19 (д, 2 Гц, H-6).

7-О-β-D-глюкуронид апигенина (6). Аморфное вещество светло-желтого цвета состава C₂₁H₁₈O₁₁ с т.пл. 225-227⁰С (водный спирт); УФ-спектр: λ_{max} 270, 335 нм; +NaOAc 269, 378 нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °С, m/z): 447 [М + Н]⁺. ¹Н-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 7,95 (д, 9 Гц, H-2¹ и H-6¹ - 2H), 6,94 (д, 9 Гц, H-3¹ и H-5¹ - 2H), 6.80 (д, 2,5 Гц, H-8), 6.83 (с, H-3), 6.41 (д, 2 Гц, H-6 и H-8), 5,07 (д, 7,2 Гц, H-1¹¹), 4,0-3.3 (м, 4Н глюкуроновой кислоты).

Соединения **1** и **2** относятся к гидроксикоричным кислотам и представляют собой *n*-кумаровую кислоту и кофейную кислоту соответственно. В ¹Н-ЯМР-спектре *n*-кумаровой кислоты содержатся сигналы протонов ароматического ядра, характерные для замещения в положении С-4 (*n*-положение): 7,37 м.д. (2Н, д, 9 Гц, H-2, H-6), 6,76 м.д. (2Н, д, 9 Гц, H-3, H-5). О трансконфигурации двойной связи при С-7 и С-8 свидетельствует тот факт, что ¹Н-ЯМР-спектре *n*-кумаровой кислоты присутствуют однопротонные дублетные сигналы с константой спин-спинового взаимодействия 16 Гц при 7,47 м.д. (1Н, д, 16 Гц, H-7), 6,32 м.д. (д, 16 Гц, H-8). В ¹Н-ЯМР-спектре кофейной кислоты также содержатся однопротонные дублетные сигналы с константой спин-спинового взаимодействия 16 Гц при 7,47 (H-7) и 6,21 м.д. (H-8), однако характер сигналов протонов ароматического ядра свидетельствует о нахождении гидроксильных групп в положении С-3 и С-4: 7,10 (д, 2,5 Гц, H-2), 7,04 (дд, 2,5 и 9 Гц, H-6), 6,82 (д, 9 Гц, H-5).

Структура *n*-кумаровой кислотой (**1**) и кофейной кислоты (**2**) подтверждается данными УФ-, масс-спектров (табл. 3), физико-химических констант, а также сравнением с достоверно известными образцами веществ.

Наряду с *n*-кумаровой кислотой и кофейной кислотой (соединения **1** и **2**) из травы расторопши пятнистой, культивируемой в Российской Федерации и странах СНГ, впервые выделены производные данных гидроксикоричных

кислот - 5-*n*-кумароилхинная кислота (**3**) и хлорогеновая кислота (**4**). В ^1H -ЯМР-спектре 5-*n*-кумароилхинной кислоты присутствуют сигналы протонов хинной кислоты при 5,30 м.д. (1H, м, H-5), 4,09 м.д. (1H, м, H-3), 3,71 м.д. (1H, м, H-4) и 1,80-2,20 м.д. (4H, м, 2H-2 и 2H-6), а также *n*-кумаровой кислоты: 7,46 м.д. (1H, д, 16 Гц, H-7¹), 7,37 м.д. (2H, д, 9 Гц, H-2¹, H-6¹), 6,76 м.д. (2H, д, 9 Гц, H-2¹, H-6¹), 6,31 м.д. (д, 16 Гц, H-8¹). В ^1H -ЯМР-спектре хлорогеновой кислоты (**4**) наряду с сигналами протонов хинной кислоты обнаружены сигналы протонов кофейной кислоты, свидетельствующие о характере замещения в положениях C-3 и C-4: 7,09 (д, 2,5 Гц, H-2¹), 7,03 (дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 6,81 (д, 9 Гц, H-5¹). О трансконфигурации двойной связи при C-7 и C-8 свидетельствуют однопротонные дублетные сигналы с константой спин-спинового взаимодействия 16 Гц при 7,47 (H-7¹) и 6,21 м.д. (H-8¹).

В основе выделенных флавоноидного гликозида (**6**) лежит агликон апигенин (**5**) – 5,7,4¹-тригидроксифлавоон, в ^1H -ЯМР-спектре которого присутствуют характерные сигналы протонов H-2¹ и H-6¹, а также H-3¹ и H-5¹ при 7,92 м.д. и 7,01 м.д. соответственно в виде двух двухпротонных с константой спин-спинового взаимодействия 9 Гц. О замещении кольца А в положениях 5 и 7, к которым отнесены гидроксильные группы, свидетельствует тот факт, что в ^1H -ЯМР-спектре при 6,78 м.д. и 6,48 м.д. обнаружены два однопротонных дублетных сигнала протонов H-8 и H-6 с константой спин-спинового взаимодействия 2,5 Гц. О флавоновой природе соединения (**5**) свидетельствует тот факт, что в его ^1H -ЯМР-спектре обнаружен однопротонный синглетный сигнал протона H-3 при 6,93 м.д. Наличие свободной гидроксильной группы 5-ОН в соединении **5** подтверждается характерным однопротонным синглетным сигналом при 12,97 (с, 5-ОН группы).

В результате кислотного гидролиза (5% раствор серной кислоты при нагревании на водяной бане в течение 2 часов) доказано, что в гидролизате гликозида **6** содержатся глюкуроновая кислота и апигенин. Присоединение

глюкуроновой кислоты к гидроксильной группе при С-7 свидетельствует то обстоятельство, что в УФ-спектре гликозида **6** в присутствии натрия ацетата батохромный сдвиг не наблюдается, который характерен для свободной 7-ОН-группы флавоноидов. О β -конфигурации гликозидной связи свидетельствует тот факт, что ^1H -ЯМР-спектре при 5,07 м.д. имеется однопротонный дублетный сигнал аномерного протона ($\text{H}-1^{11}$) глюкуроновой кислоты с константой спин-спинового взаимодействия 7 Гц.

4.2. Разработка методик стандартизации травы расторопши пятнистой

Как уже было отмечено ранее, бóльшая часть фитомассы расторопши пятнистой, а именно трава данного растения, в медицинской и фармацевтической практике не используется. С точки зрения ресурсосбережения и использования всей фитомассы растения данный подход использования ЛРС расторопши пятнистой, на наш взгляд, является нерациональным. Однако изучение нами фитохимического состава травы расторопши пятнистой показало присутствие ценных БАС, таких как фенилпропаноиды и флавоноиды. Отсутствие нормативной документации на территории РФ на траву расторопши пятнистой препятствует ее использованию в официальной медицинской практике как перспективного источника нового вида ЛРС. Данный факт подтверждает необходимость разработки методик стандартизации на данный вид ЛРС.

Необходимо отметить, что для придания растению статуса фармакопейного вида, а также для разработки нормативной документации, регламентирующей качество сырья, необходима разработка раздела «Подлинность». Данный раздел включает качественные реакции (результаты микро-, гистохимических реакций, хроматографических проб), числовые показатели (количественное содержание БАС, зависимость параметров экстракции на выход БАС, количественное содержание биологических активных соединений и экстрактивных веществ и др.) [26, 62].

4.2.1. Исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из травы расторопши пятнистой

Трава расторопши пятнистой для данного исследования была заготовлена на территории ЗАО «Самаралектравы» (ГНУ «Средне-Волжский филиал ВИЛАР») в поселке Антоновка Самарской области в сентябре 2016 г., а также на территории Самарского ботанического сада в сентябре 2017 г. после сбора зрелых плодов. Собранное сырье было высушено на воздухе без доступа прямых солнечных лучей.

Проводилось исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья. Прежде всего, изучалось влияние экстрагента на процесс экстракции (табл. 4 и 5). При этом спирт этиловый 70%-ной концентрации был выбран в качестве оптимального экстрагента. Данный факт согласуется с литературными данными, которые получены ранее для сырья, содержащего фенилпропаноиды и флавоноиды [2, 62].

Таблица 4 – Зависимость выхода фенилпропаноидов в траве расторопши
пятнистой от концентрации этилового спирта

№ п/п	Экстрагент	Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту
1	Вода	$1,32 \pm 0,05\%$
2	40% спирт	$2,36 \pm 0,07\%$
3	70% спирт	$2,72 \pm 0,09\%$
4	96% спирт	$0,82 \pm 0,04\%$

Таблица 5 – Зависимость выхода флавоноидов травы расторопши пятнистой от концентрации этилового спирта

№ п/п	Экстрагент	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и цинарозид
1	Вода	$0,54 \pm 0,02\%$
2	40% спирт	$0,95 \pm 0,03\%$
3	70% спирт	$1,23 \pm 0,03\%$
4	96% спирт	$0,39 \pm 0,01\%$

Нами также изучен вопрос относительно продолжительности экстракции на кипящей водяной бане (табл. 6).

Таблица 6 – Зависимость выхода БАС из травы расторопши пятнистой от времени экстракции на кипящей водяной бане

№ п/п	Время экстракции на кипящей водяной бане	Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и цинарозид
1	30 мин	$2,64 \pm 0,04\%$	$1,22 \pm 0,02\%$
2	60 мин	$2,70 \pm 0,09\%$	$1,28 \pm 0,03\%$
3	90 мин	$2,69 \pm 0,06\%$	$1,30 \pm 0,03\%$

Результаты исследований по выбору оптимального соотношения «сырье-экстрагент» приведены в таблице 7. Определено, что оптимальными параметрами экстракции являются: извлечение 70 % этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:100.

Таблица 7 – Зависимость выхода флавоноидов травы расторопши пятнистой от соотношения «сырье-экстрагент»

№ п/п	Соотношение «сырье- экстрагент»	Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и цинарозид
1	1:30	$2,37 \pm 0,08\%$	$1,17 \pm 0,05\%$
2	1:50	$2,60 \pm 0,06\%$	$1,18 \pm 0,03\%$
3	1:100	$2,81 \pm 0,07\%$	$1,37 \pm 0,04\%$

Таблица 8 – Зависимость выхода флавоноидов травы расторопши пятнистой от степени измельченности сырья

№ п/п	Размер частиц	Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и хлорогеновую кислоту	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье и цинарозид
1	1 мм	$2,77 \pm 0,08\%$	$1,26 \pm 0,04\%$
2	2 мм	$2,79 \pm 0,06\%$	$1,35 \pm 0,05\%$
3	3 мм	$2,68 \pm 0,09\%$	$1,36 \pm 0,05\%$

Зависимость выхода биологически активных соединений из травы расторопши пятнистой от степени измельченности сырья представлена в таблице 8. Следует отметить, что, по нашим данным, степень измельчения от 1 до 3 мм сильного влияния на экстракцию не оказывает. Однако в качестве оптимальной нами выбрана степень измельчения 2 мм.

4.2.2. Разработка методик качественного анализа травы расторопши пятнистой

Для разработки подходов к стандартизации травы расторопши пятнистой использованы результаты исследований компонентного состава сырья данного растения.

С целью проведения качественного анализа травы расторопши пятнистой нами предлагается использовать качественные реакции и метод ТСХ с использованием в качестве стандартного образца фенилпропаноида хлорогеновой кислоты, а также метод спектроскопии с последующим описанием полученного электронного спектра водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой.

Для определения содержания флавоноидов проводили качественные реакции с 1 % спиртовым раствором железа окисного хлорида, по реакции с порошком цинка в концентрированной хлористоводородной кислоте и с помощью реакции с 2 % спиртовым раствором алюминия хлорида.

4.2.3. Тонкослойная хроматография

Исследованию подвергалась трава расторопши пятнистой, собранная на территории в Самарской области, в поселке Антоновка (ЗАО «Самаралектравы», ГУ «Средне-Волжский филиал ВИЛАР») в сентябре 2016 г., а также на территории Самарского ботанического сада в сентябре-октябре 2017 г. после сбора созревших плодов данного растения. Собранное сырье расторопши пятнистой было высушено на воздухе без доступа прямых солнечных лучей.

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера 2 мм. Около 1 г сырья (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом объемом 200 мл, прибавляли 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывали пробкой и взвешивали на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждали в

течение 30 минут при комнатной температуре, закрывали той же пробкой и снова взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтровали через фильтр с красной полосой во флакон из темного стекла.

Данное извлечение впоследствии наносили на хроматографические пластинки. С помощью метода ТСХ-анализа в извлечении из травы трава расторопши пятнистой при разделении в системе *n*-бутанол –этанол– аммиак (7:2:5) на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» удалось обнаружить зоны веществ, предположительно, фенилпропаноидной и флавоноидной природы.

На линию старта хроматографической пластинки, предварительно активированной в сушильном шкафу при температуре 100-105°C, микропипеткой наносили 0,02 мкл водно-спиртового извлечения из травы травы расторопши пятнистой. В качестве веществ-свидетелей на пластинку также наносили спиртовой раствор РСО кофейной кислоты, спиртовой раствор ГСО силибина, спиртовой раствор ГСО цинарозида, ГСО рутина спиртовой раствор РСО хлорогеновой кислоты. Пластинку помещали в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителей в течение 24 ч, хроматографирование проводили восходящим способом. После того, как фронт растворителя проходил около 8 см, пластинку доставали из хроматографической камеры, затем высушивали и детектировали зоны веществ.

Полученную хроматограмму просматривали при дневном свете, в УФ-свете при $\lambda=366$ нм и $\lambda=254$ нм, а также пластинку обрабатывали щелочным раствором ДСК. Схема полученной хроматограммы представлена на рисунке 18.

На полученной хроматограмме видно, что в извлечении из травы расторопши пятнистой обнаруживается зона доминирующего вещества с $R_f = 0,55$. По характеру свечения в УФ-свете, а также по окрашиванию реактивом ДСК можно сделать вывод, что данное вещество представляет собой

фенилпропаноид. Из веществ-свидетелей наиболее близким значением подвижности обладает РСО хлорогеновой кислоты ($R_f = 0,5$). Из веществ фенилпропаноидной природы детектируется также кофейная кислота, которая совпадает по подвижности $R_f = 0,7$ с веществом-свидетелем (РСО кофейной кислоты). Кроме того, в извлечении из травы расторопши пятнистой обнаруживаются вещества, близкие по хроматографической подвижности с цинарозидом ($R_f = 0,64$), а также на хроматограмме детектируется флавоноид апигенин ($R_f = 0,82$).

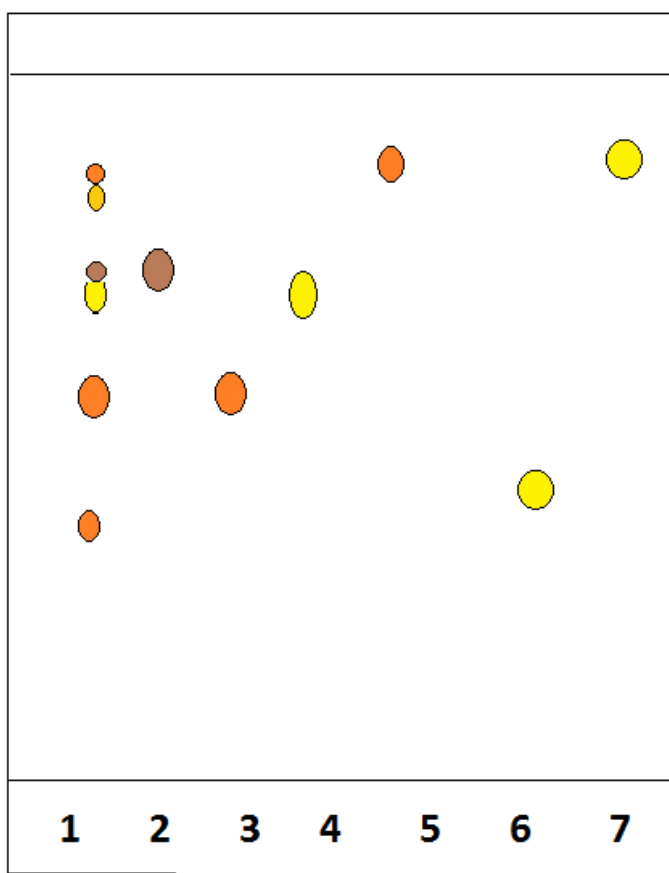


Рисунок 18 – Схема хроматограммы извлечения из травы расторопши пятнистой в системе *n*-бутанол –этанол– аммиак (7:2:5)

Обозначения: 1 – извлечение из травы расторопши пятнистой; 2 – РСО кофейной кислоты; 3 – РСО хлорогеновой кислоты; 4 – ГСО цинарозида; 5 – РСО апигенина 6 – ГСО рутина 7 – ГСО силибина

Необходимо обратить внимание на то, что в траве расторопши пятнистой в результате хроматографирования не обнаружены силибин –

флаволигнан, который является доминирующим в плодах расторопши пятнистой и имеет диагностическое значение. Следует также отметить, что в надземной части не обнаруживается и флавоноид рутин.

4.2.4. УФ-спектроскопия

Для изучения электронного спектра извлечения из травы расторопши пятнистой готовили извлечение. Для приготовления испытуемого раствора А около 1 г сырья (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывали пробкой и взвешивали на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Затем колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждали в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывают той же пробкой снова взвешивали, восполняя недостающий экстрагент до первоначальной массы. Полученное извлечение фильтровали через фильтр с красной полосой во флакон темного стекла.

1 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). Электронный спектр снимали на сканирующем спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena, Германия) в кювете с толщиной слоя 10 мм и на спектрофотометре СФ-2000(ОКБ Спектр, РФ).

Полученный УФ-спектр имеет максимум при 333 ± 2 нм, а также «плечо» при длине 296 ± 2 нм. При добавлении 2% спиртового раствора алюминия (III) хлорида на УФ-спектре наблюдается батохромный сдвиг (рис. 19).

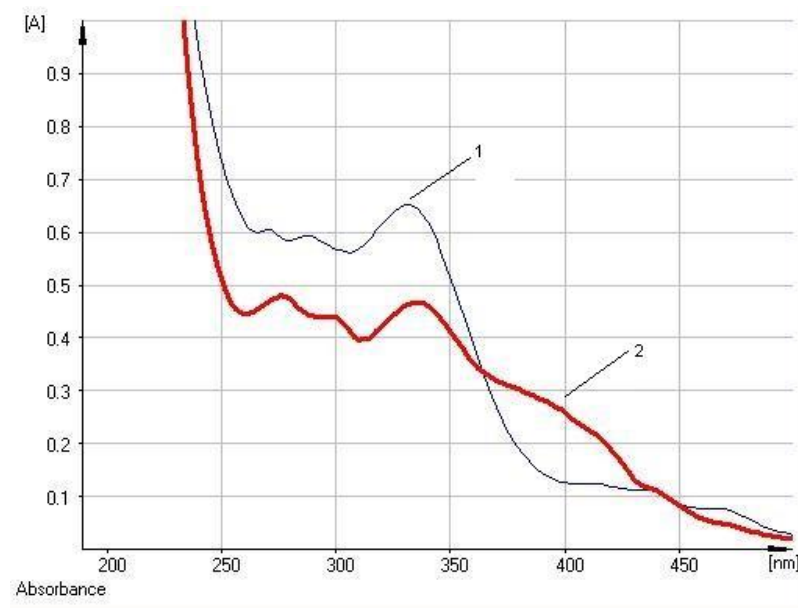


Рисунок 19 – УФ спектр водно-спиртового извлечения травы
расторопши пятнистой

Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор в присутствии AlCl_3

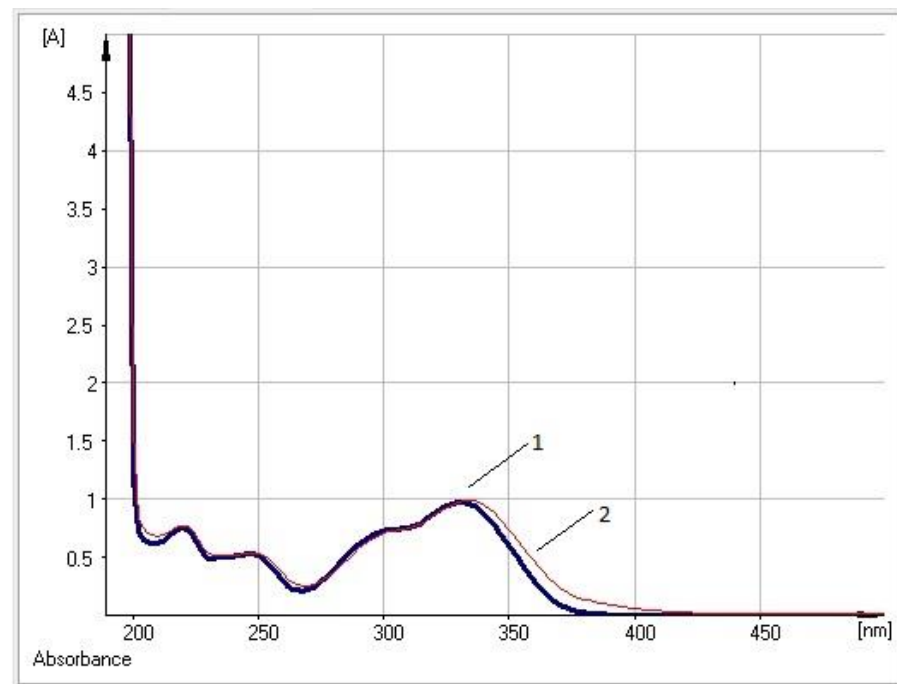


Рисунок 20 – УФ-спектры спиртового раствора РСО хлорогеновой
кислоты

Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор в присутствии AlCl_3 .

Сравнительное изучение УФ-спектров водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой свидетельствует о том, что основной вклад в кривую поглощения УФ-спектра водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой вносят фенилпропаноиды. Для определения аналитической длины волны нами были изучены УФ-спектры водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой на 70% спирте этиловом и УФ-спектр хлорогеновой кислоты (рис. 20).

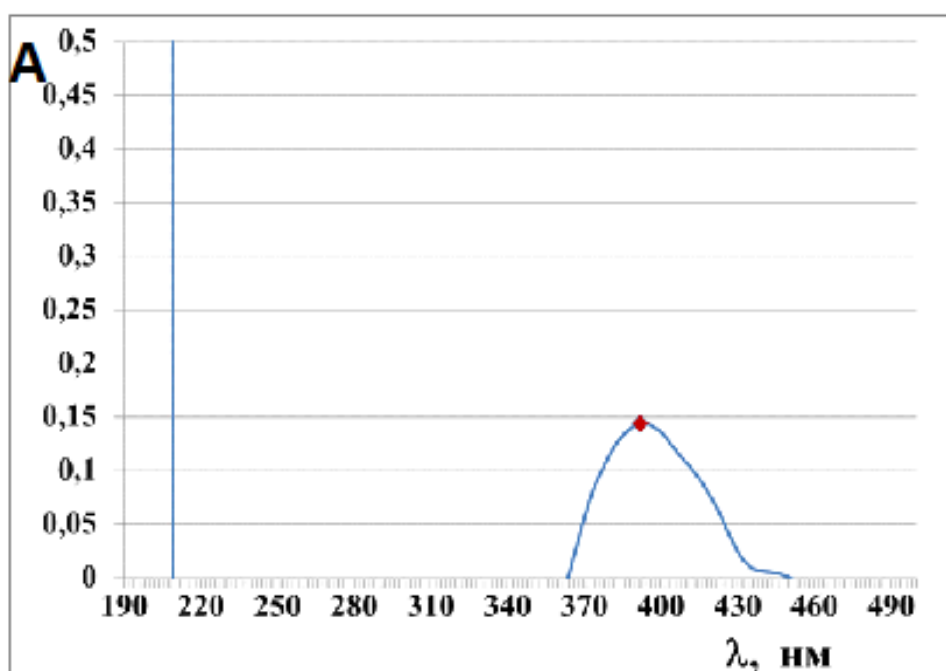


Рисунок 21 - Дифференциальный спектр водно-спиртового извлечения травы расторопши пятнистой

При добавлении к исследуемому извлечению из травы расторопши пятнистой раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромный сдвиг. Следует обратить внимание, что максимум дифференциального спектра извлечения из травы расторопши пятнистой находится при 392 ± 2 нм (рис. 21).

4.3. Разработка методик количественного определения содержания фенольных веществ в траве расторопши пятнистой

4.3.1. Методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой.

Трава расторопши пятнистой для данного эксперимента была заготовлена на территории Самарского ботанического сада в сентябре-октябре 2017 г. после сбора зрелых плодов. Собранное сырье было высушено на воздухе без доступа прямых солнечных лучей. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера 2 мм. Около 1 г сырья (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывают той же пробкой снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через фильтр с красной полосой (извлечение из листьев). Испытуемый раствор для анализа флавоноидов готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). Раствором сравнения служит 70% этиловым спиртом (раствор сравнения А).

С целью пересчета содержания веществ фенольной природы в извлечении из травы расторопши пятнистой на хлорогеновую кислоту нами был рассчитан удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при $\lambda=330$ нм для прямой спектрофотометрии. Значение $E_{1\text{см}}^{1\%}=497$ было включено в формулу расчета, что позволило не использовать РСО хлорогеновой кислоты в последующих определениях.

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

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{497 \times m \times 1 \times (100-W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты;

m – масса сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании, в процентах

Таблица 9 – Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой

f	$\bar{x}$	S	S ²	P (%)	T (P, f)	ΔX	E, %
10	2,81	0,1061	0,0113	95	2,228	±0,07	±2,49

Результаты статистической обработки полученных результатов количественного определения травы расторопши пятнистой свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более ± 2,49% - для методики определения методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась нами по основным показателям: линейность, правильность и прецизионность. Межлабораторная воспроизводимость проводилась на двух спектрофотометрах «Specord 40» (Analytik Jena, Германия) и СФ-2000 (ОКБ Спектр, РФ). Линейность данной методики определяли для серии растворов хлорогеновой кислоты (с концентрациями в диапазоне от 0,00979 до 0,03911

мг/мл). Коэффициент корреляции при этом составил 0,99987. Для установления прецизионности проводили определение содержания для пяти параллельных измерений. Правильность данной методики определяли методом добавок путем добавления раствора РСО хлорогеновой кислоты с известной концентрацией (25%, 50%, 75%) к исследуемому раствору. Открываемость находилась в пределах от 98% до 102%.

4.3.2. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой.

Следует отметить, что максимум поглощения извлечения травы расторопши с раствором хлорида алюминия приближается к 400 нм. Поэтому возможным методом анализа для суммы флавоноидов травы расторопши является дифференциальная спектрофотометрия в пересчет на цинарозид [108].

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера 2 мм. Около 1 г сырья (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывают той же пробкой снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через фильтр с красной полосой (извлечение из листьев). Испытуемый раствор для анализа флавоноидов готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл,

доводят объем раствора до метки 70% этиловым спиртом (раствор сравнения А).

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 400 нм через 40 мин после приготовления всех растворов. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{350 \times m \times 1 \times (100-W)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

350 – удельный показатель поглощения цинарозида;

m – масса сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой

f	$\bar{x}$	S	S ²	P (%)	t (P, f)	ΔX	E, %
10	1,36	0,0531	0,0028	95	2,228	±0,04	±2,94

Результаты статистической обработки полученных результатов количественного определения травы расторопши пятнистой свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более ± 2,94% - для методики определения методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид.

Валидационная оценка разработанной нами методики проводилась по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность и

воспроизводимость. Специфичность методики определялась нами по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы расторопши пятнистой и цинарозида с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов цинарозида (с концентрациями в диапазоне от 0,00213 до 0,0231 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99989. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора цинарозида с известной концентрацией (25%, 50% и 75 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 99,11%.

Таким образом, разработанная методика количественного определения суммы флавоноидов в траве расторопше пятнистой отвечает всем параметрам валидации, поэтому может использоваться для оценки качества сырья «Расторопши пятнистой трава».

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4:

1. Из надземной части расторопши пятнистой впервые в Российской Федерации выделены и идентифицированы флавоноидные гликозиды, фенилпропаноиды (гидроксикоричные кислоты) в виде индивидуальных соединений: *n*-кумаровая кислота, 5-*n*-кумароилхинная кислота, кофейная кислота, хлорогеновая кислота, апигенин, 7-О-β-D-глюкуронид апигенина.
2. Полученные данные о химическом составе травы расторопши пятнистой были приняты за основу при разработке методик стандартизации травы расторопши пятнистой и препаратов на ее основе.
3. Результаты проведенных нами исследований наглядно свидетельствуют о том, что оптимальным подходом к анализу травы расторопши пятнистой является экстракция в течение 60 мин на кипящей водяной бане, где в качестве экстрагента используется 70% этиловый спирт в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:100.

4. Разработаны методики качественного анализа травы расторопши пятнистой методом тонкослойной хроматографии с использованием в качестве веществ-свидетелей хлорогеновой кислоты, рутина, ГСО силибина, ГСО цинарозида, в системе *n*-бутанол - этанол – аммиак (7:2:5). Следует отметить, что из веществ-свидетелей наиболее близкое значение хроматографической подвижности имеет РСО хлорогеновой кислоты ($R_f = 0,5$). Кроме того, в извлечении из травы расторопши лекарственного обнаруживаются вещества, совпадающие по подвижности с цинарозидом ($R_f = 0,64$) и апигенином.
5. Определены параметры УФ-спектра водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой, а именно максимум при $\lambda=333\pm 2$ нм и «плечо» при $\lambda=296\pm 2$ нм. В присутствии спиртового раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромный сдвиг, максимум дифференциального спектра при $\lambda=392\pm 2$ нм.
6. Разработаны методики количественного определения суммы фенилпропаноидов (прямая спектрофотометрия) при $\lambda=333\pm 2$ и суммы флавоноидов (метод дифференциальной спектрофотометрии) $\lambda=392\pm 2$ нм. Определено суммарное содержание фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту при аналитической волны составляет 1,23-2,81%, а содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид лежит в пределах от 1,17-1,37%.
7. Разработанные методики стандартизации включены в проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС - «Расторопши пятнистой трава».

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА МАСЛА РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

5.1. Масло расторопши как перспективный источник лекарственных препаратов

Масло расторопши пятнистой широко используется в медицинской практике при различных рода заболеваниях. Лекарственный препарат «Натурсил», получаемый из масла расторопши, оказывает благоприятное действие на липидный обмен, снижая в крови уровень общего холестерина, бета-липопротеинов и триглицеридов [58, 59, 77, 83, 85, 98, 100]. Известно также, что масло расторопши оказывает общее благоприятное воздействие на организм: при введении внутрь повышает содержание общего белка в крови, при этом снижает процессы трансаминирования и уровня мочевины, стимулируя процессы эритропоэза; стимулирует при местном нанесении репаративные и регенеративные процессы при механических и термических повреждениях [62, 93, 100].

5.2. Актуальные аспекты стандартизации масла расторопши пятнистой

В аспекте комплексного использования расторопши пятнистой особое внимание занимает такая актуальная проблема, как фальсификация масел растительного происхождения, в том числе масла расторопши и облепихового масла. Следует отметить, что замена какого-либо компонента, как известно, может привести к изменению фармакологического эффекта, изменению органолептических свойств и срока годности данной субстанции. По хроматографическому профилю большинство жирных масел растительного происхождения мало отличаются от подсолнечного масла. Важно отметить, что подсолнечное масло может быть использовано для экстракции облепихового масла, поэтому необходимо установить

возможность идентификации облепихового масла на фоне традиционных для Российской Федерации растительных масел [18]. На фармацевтическом рынке представлено значительное количество лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе масла облепихи, в связи с чем увеличивается риск фальсификации [23, 29].

5.3. Сравнительное изучение жирнокислотного состава масла расторопши, подсолнечного масла и облепихового масла

Изучение жирнокислотного состава масел проводили методом газожидкостной хроматографии. Предварительно переводили жирные кислоты в метиловые эфиры по методике ГОСТ 31665-2012 с помощью реакции переэтерификации с метанольным раствором гидроксида калия [1]. Для этого 0,5 г масла помещали в коническую колбу, растворяли в 10 мл *n*-гексана, затем добавляли 0,5 мл 2 М раствора гидроксида калия в метаноле и закрывали пробкой, интенсивно перемешивали в течение 5 минут. После этого полученный раствор центрифугировали на лабораторной центрифуге ОПН-3 с частотой вращения 3000 мин⁻¹. Для анализа использовали верхний слой.

Состав жирных кислот изучаемых масел определяли с помощью газового хроматографа «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели «Agilent 5975» и автоинжектором.

В результате газохроматографического разделения в масле расторопши были идентифицированы 15 жирных кислот, в облепиховом масле – 13, в подсолнечном масле – 14. Состав и количественное содержание идентифицированных компонентов жирных масел представлены в таблице 11. Следует отметить, что во всех исследуемых образцах преобладали ненасыщенные жирные кислоты: в масле расторопши – 61%, в облепиховом масле 74,3% и в подсолнечном масле 79%. Относительно высокое количество насыщенных жирных кислот в составе жирного масла плодов

расторопши пятнистой подтверждает особенность данной субстанции – аномально низкое значение йодного числа, которое составляет 60-80.

Основной профиль масла расторопши на хроматограмме создают ненасыщенные кислоты – линолевая ($C_{18:2}$; $34,8 \pm 3,0\%$), олеиновая кислоты ($C_{18:1}$; $25,7 \pm 3,5\%$), 11-эйкозеновая ($C_{20:1}$; $1,6 \pm 0,5\%$), а также насыщенные – стеариновая ($C_{18:0}$; $11,4 \pm 1,0\%$), пальмитиновая ($C_{16:0}$; $9,9 \pm 0,2\%$), арахидовая ($C_{20:0}$; $6,9 \pm 0,6\%$) и бегеновая ($C_{22:0}$; $3,8 \pm 0,4\%$) (таблица 11; рис. 22). В изучаемом объекте – масле расторопши также найдены следы маргаритовой (0,09%), геникозеновой (0,09%), гептадеценовой (0,06%), пентадециловой (0,03%), лауриновой кислот (0,006%). Впервые были идентифицированы лауриновая кислота ($C_{12:0}$), пентадециловая кислота ($C_{15:0}$), гептадеценовая кислота ($C_{17:1}$), геникозеновая кислота ($C_{21:0}$) (таблица 11; рис. 22). Анализ литературных данных показал, что состав жирного масла расторопши пятнистой, полученного на предприятии ЗАО «Самаралектравы», сопоставим с литературными данными по составу масла расторопши пятнистой, выращенной в различных географических условиях [62, 67, 92]. В результате сопоставления полученных данных, а также литературных данных по количественному содержанию жирных кислот необходимо рекомендовать в качестве критериев подлинности наличие пиков на хроматограмме, соответствующих метиловым эфирам линолевой (35-55% от общего содержания), олеиновой (22-30%), пальмитиновой (8-15%), стеариновой (4,5-12%), арахидовой (2-7%), бегеновой (3-8%), 11-эйкозеновой (1-3%) кислот.

Что касается облепихового масла, то в данной субстанции преобладали ненасыщенные жирные кислоты: линолевая кислота ($C_{18:2}$; $29,15 \pm 0,20\%$), олеиновая кислота ($C_{18:1}$; $28,08 \pm 0,18\%$), пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$; $17,36 \pm 0,15\%$) и пальмитоолеиновая кислота ($C_{16:1}$; $15,18 \pm 0,11\%$). Следует отметить, что облепиховое масло в процентном содержании, практически, по всем идентифицированным компонентам отличаются по сравнению с исследуемым образцом масла расторопши, за исключением линолевой ($C_{18:2}$) и олеиновой кислот ($C_{18:1}$) (таблица 11, рис. 23).

В свою очередь, в подсолнечном масле доминировали линолевая ($C_{18:2}$; $55,07 \pm 0,10\%$), олеиновая ($C_{18:1}$; $23,81 \pm 0,11\%$), пальмитиновая ($C_{16:0}$; $10,46 \pm 0,04\%$), стеариновая ($C_{18:0}$; $8,31 \pm 0,09\%$) кислоты. Однако имелись отличия по сравнению с субстанцией масла расторопши в процентном содержании 11-эйкозеновой, арахидовой, бегеновой, лигноцериновой кислот (таблица 11; рис. 24).

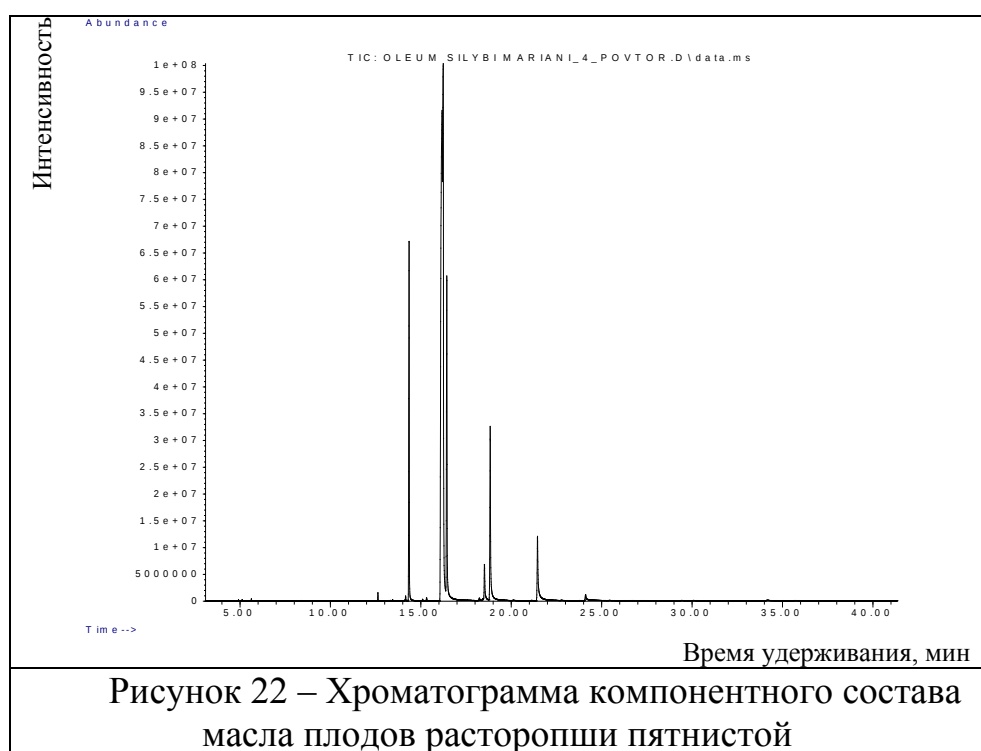
По результатам экспериментальных данных в подсолнечном масле не обнаружены лауриновая ($C_{12:0}$), гептадеценовая ($C_{17:1}$) и генэйкозановая ($C_{21:0}$) кислоты, идентифицируемые в составе масла расторопши, в масле расторопши в свою очередь не обнаружена 9-гексадеценовая кислота ($C_{16:1}$). В частности, в облепиховом масле идентифицированы 10-нонадеценовая и 13-докозеновая кислоты, 7,10-гексадекадиеновая кислота, не обнаруживаемые в исследуемых образцах других масел. В отличие от подсолнечного масла в облепиховом масле обнаруживаются, кроме перечисленных выше кислот, лауриновая, не обнаружены пентадециловая кислота ($C_{15:0}$), 9-гексадеценовая кислота ($C_{16:1}$), гептадеценовая кислота ($C_{17:1}$) и лигноцериновая кислота ($C_{24:0}$). Вместе с тем следует подчеркнуть, что все соединения представлены в незначительных количествах (менее $0,2\%$), данный факт дает основание говорить о необходимости дополнительных статистических данных, для того, чтобы определить их возможное диагностическое значение.

В итоге хотелось бы подчеркнуть, что количественное содержание флаволигнанов и жирных кислот, содержащихся в плодах расторопши пятнистой, зависит от особенностей конкретной хеморасы [67].

Таблица 11 – Жирнокислотный состав исследуемых жирных масел

№	Идентифицированный компонент	Время удерживания	Масло расторопши, % от общего содержания жирных кислот	Облепиховое масло, % от общего содержания жирных кислот	Подсолнечное масло, % от общего содержания жирных кислот
1	Лауриновая кислота (C _{12:0})	11,05	0,01±0,005	0,28±0,03	-
2	Миристиновая кислота (C _{14:0})	12,64	0,13±0,05	0,05±0,02	0,09±0,01
3	Пентадециловая кислота (C _{15:0})	13,44	0,03±0,005	-	0,02±0,005
4	7,10-гексадекадиеновая кислота (C _{16:2})	14,07	-	0,01±0,005	-
5	Пальмитолеиновая кислота (C _{16:1})	14,16	0,11±0,05	15,18±0,11	0,02±0,006
6	9-гексадеценовая кислота (C _{16:1})	14,17	-	-	0,14±0,01
7	Пальмитиновая кислота (C _{16:0})	14,35	9,9±0,2	17,36±0,15	10,46±0,04
8	Гептадеценовая кислота (C _{17:1})	15,10	0,06±0,005	-	-
9	Маргариновая кислота (C _{17:0})	15,32	0,09±0,01	0,17±0,08	0,05±0,01
10	Линолевая кислота (C _{18:2})	16,18	34,8±3,0	29,15±0,20	55,07±0,10
11	Олеиновая кислота (C _{18:1})	16,24	25,7±3,5	28,08±0,18	23,81±0,11
12	Стеариновая кислота (C _{18:0})	16,44	11,4±1,0	5,95±0,09	8,31±0,09
13	10-нонадеценовая кислота (C _{19:1})	17,32	-	0,09±0,01	-

14	11-эйкозеновая кислота (C _{20:1})	18,52	1,6±0,5	0,73±0,08	0,32±0,01
15	Арахидоновая кислота (C _{20:0})	18,84	6,9±0,6	0,74±0,06	0,40±0,02
16	Генэйкозановая кислота (C _{21:0})	20,59	0,09±0,005	-	-
17	13-докозеновая кислота (C _{22:1})	21,12	-	0,10±0,03	-
18	Бегеновая кислота (C _{22:0})	21,45	3,8±0,4	0,35±0,04	0,95±0,03
19	Лигноцериновая кислота (C _{24:0})	24,11	0,54±0,07	-	0,13±0,01



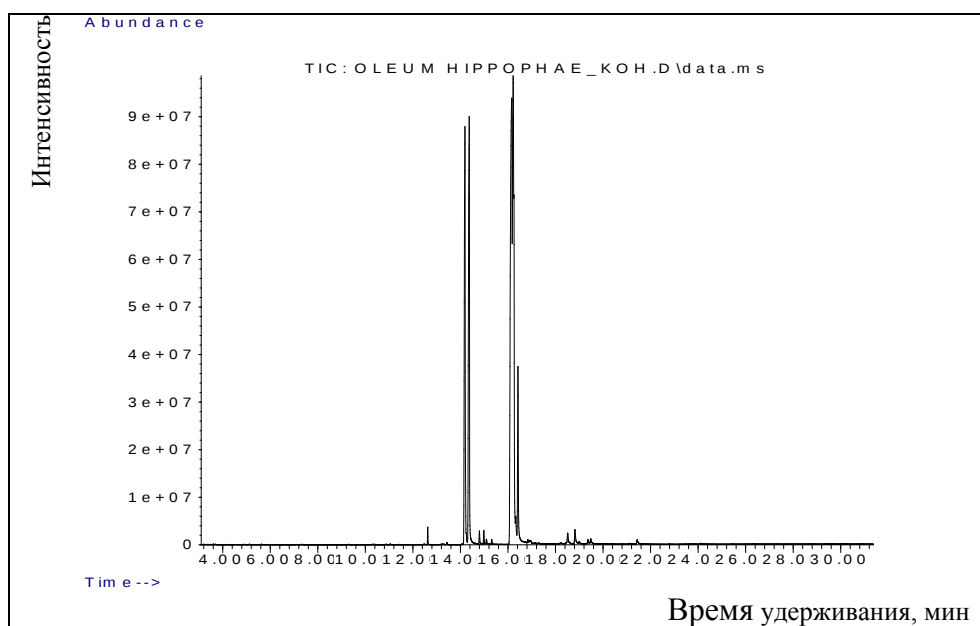


Рисунок 23 – Хроматограмма компонентного состава
облепихового масла

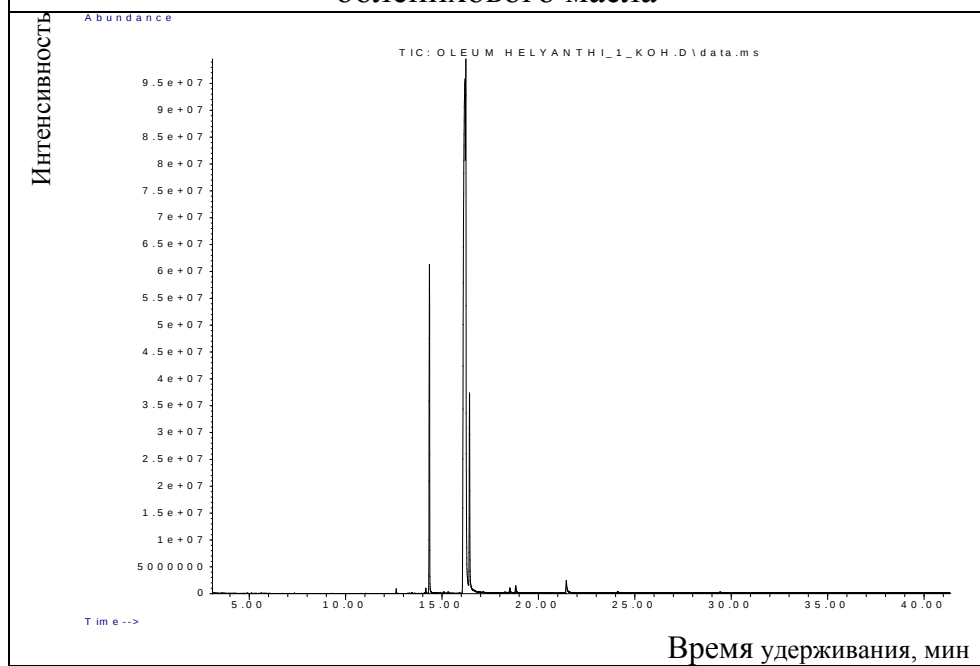


Рисунок 24 – Хроматограмма компонентного состава
подсолнечного масла

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5:

1. Проведено сравнительное исследование жирнокислотного состава масла расторопши пятнистой, культивируемой на территории Самарской области, лекарственного препарата «Облепиховое масло» подсолнечного масла фармакопейного качества, методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием после предварительного получения метиловых эфиров.
2. Определено, что состав исследуемых масел имеет некоторые различия. В облепиховом масле преобладали ($C_{18:2}$; $29,15 \pm 0,20\%$), олеиновая кислота ($C_{18:1}$; $28,08 \pm 0,18\%$), пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$; $17,36 \pm 0,15\%$) и пальмитоолеиновая кислота ($C_{16:1}$; $15,18 \pm 0,11\%$). Отличительной особенностью является относительно высокое содержание пальмитолеиновой кислоты. Основной профиль масла расторопши на хроматограмме создают ненасыщенные кислоты - линолевая ($C_{18:2}$; $34,8 \pm 3,0\%$), олеиновая кислоты ($C_{18:1}$; $25,7 \pm 3,5\%$), 11-эйкозеновая ($C_{20:1}$; $1,6 \pm 0,5\%$), а также насыщенные - стеариновая ($C_{18:0}$; $11,4 \pm 1,0\%$), пальмитиновая ($C_{16:0}$; $9,9 \pm 0,2\%$), арахидовая ($C_{20:0}$; $6,9 \pm 0,6\%$) и бегеновая ($C_{22:0}$; $3,8 \pm 0,4\%$). В подсолнечном масле преобладали линолевая ($C_{18:2}$; $55,07 \pm 0,10\%$), олеиновая ($C_{18:1}$; $23,81 \pm 0,11\%$), пальмитиновая ($C_{16:0}$; $10,46 \pm 0,04\%$), стеариновая ($C_{18:0}$; $8,31 \pm 0,09\%$) кислоты.
3. Результаты проведенного жирнокислотного анализа состава масел позволяют сделать вывод о том, что содержание компонентного состава масла расторопши пятнистой и подсолнечного масла имеют близкий состав по процентному содержанию триглицеридов, однако имеют некоторые характерные отличия. Важно отметить, что в масле подсолнечном не обнаружены лауриновая, гептадеценовая и генэйкозановая кислоты, которые идентифицируются в масле расторопши, при этом, несмотря на незначительное содержание этих кислот, их следует рассматривать как диагностически значимые.

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

6.1. Обоснование состава, способа получения и подходов к стандартизации препарата «Расторопши сироп»

В рамках данной работы был разработан препарат «Расторопши сироп» на основе сорбита, содержащий в качестве действующих компонентов – флаволигнаны из лекарственного растительного препарата «Силимар». «Силимар» – это лекарственное препарат, который представляет собой высокоочищенный экстракт из плодов расторопши пятнистой путем многостадийной очистки нативного экстракта расторопши пятнистой от сопутствующих веществ [67, 92].

Гепатопротекторное действие препарата «Силимар» обусловлено за счет ведущей группы БАС – флаволигнанов (силибин, силикрестин, силидианин), которые обладают сильным антиоксидантным действием. Флаволигнановые структуры взаимодействует со свободными радикалами в клетках печени, благодаря чему снижают их гепатотоксичное действие. Флаволигнаны прерывают процесс перекисного окисления липидов и препятствует дальнейшему разрушению гепатоцитов [1, 3, 5, 6, 9, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 53, 56, 61, 62, 63, 65 66, 68, 69, 72, 74, 77, 80, 83, 88, 91, 92, 97, 98, 100, 110, 111].

В настоящее время на фармацевтическом рынке РФ представлены в основном пероральные лекарственные формы из плодов расторопши пятнистой (таблетки, капсулы, драже) [30]. Необходимо отметить, что на данный момент не представлена жидкая лекарственная форма (сироп). Создание такой лекарственной формы, как сироп расторопши пятнистой, позволит использовать его наряду с уже существующими лекарственными формами при различных заболеваниях печени в педиатрической и гериатрической практике.

6.2. Описание состава и способа получения препарата «Расторопши сироп».

Следует отметить, что в литературе имеются данные о сиропе расторопши, получаемого из экстракта расторопши жидкого и сахарного сиропа, однако, на наш взгляд, это решение не лишено недостатков, так количественное содержание флаволигнанов в пересчете на силибин в готовом продукте достаточно низкое и составляет – 0,22%. Необходимо также отметить, что в данном способе получения длительная продолжительность технологического процесса – 7 суток и 18 технологических стадий. Серьезными недостатками технологии данного препарата является нестабильность - выпадение в осадок флаволигнанов при хранении и возможность аллергизации из-за наличия сахарозы и невозможность его применения пациентами, страдающими сахарным диабетом.

Технический результат достигается тем, что для приготовления сиропа использовали водно-спиртовой раствор силимара, который получают, растворяя 0,5 г силимара в 10 мл 80% спирта этилового при нагревании, и используют для получения сиропа на основе сорбита (см. главу 2 «Объекты и методы исследования»).

6.3. Стандартизация препарата «Расторопши сироп»

В соответствии с установленными на сегодняшний момент требованиями к стандартизации лекарственных средств в РФ необходимо соблюдать преемственность в аспектах стандартизации между ЛРС, субстанцией и лекарственным препаратом [107,131].

Поэтому для введения нового лекарственного препарата в клиническую практику необходимо в первую очередь разработать разделы фармакопейной статьи «Подлинность» и «Количественное определение». В этой связи актуальным вопросом является разработка методик стандартизации такой лекарственной формы, как «Расторопши сироп».

6.3.1. Качественный анализ сиропа расторопши пятнистой

Для тонкослойно-хроматографического анализа препарата «Расторопши сироп» использовали хроматографические пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия), а систему растворителей: углерод четыреххлористый-ацетонитрил в соотношении 6:4. Следует отметить, что при анализе сиропов метод ТСХ не применяется, поскольку при нанесении препарата «Расторопши сироп» на пластинку не удаётся добиться достаточного хроматографического разделения веществ.

В связи с этим, нами введена специальная пробоподготовка для данной лекарственной формы, основанная на экстракции действующих веществ, в данном случае флаволигнанов, из сиропа ацетоном с последующим нанесением на хроматографическую пластинку спиртового раствора упаренного ацетонового извлечения. Необходимо отметить, что ацетон был выбран нами в качестве экстрагента ввиду того, что он не смешивается с сиропом из-за значительной разности их плотностей. В то же время ацетон позволяет добиться достаточно полной экстракции действующих веществ из такой лекарственной формы, как сироп.

Для проведения ТСХ-анализа около 5 мл сиропа расторопши пятнистой помещали в делительную воронку, затем добавляли 1 каплю ледяной уксусной кислоты (для более полного извлечения действующих веществ), затем тщательно перемешивали. Далее добавляли 5 мл ацетона и экстрагировали в течение 10 минут и затем ацетоновый слой отделяли. После чего ацетоновый слой упаривали на выпарительной чашке и растворяли сухой остаток в 1 мл 95% спирта этилового.

На линию старта хроматографической пластинки наносили: 10 мкл водно-спиртового раствора препарата «Силимар», 10 мкл ацетонового извлечения, и рядом 20 мкл ГСО силибина. При разработке методики ТСХ-анализа были использованы рабочие стандартные образцы силидианина, силикрстина и 2,3-дегидросилибина (рис. 25).

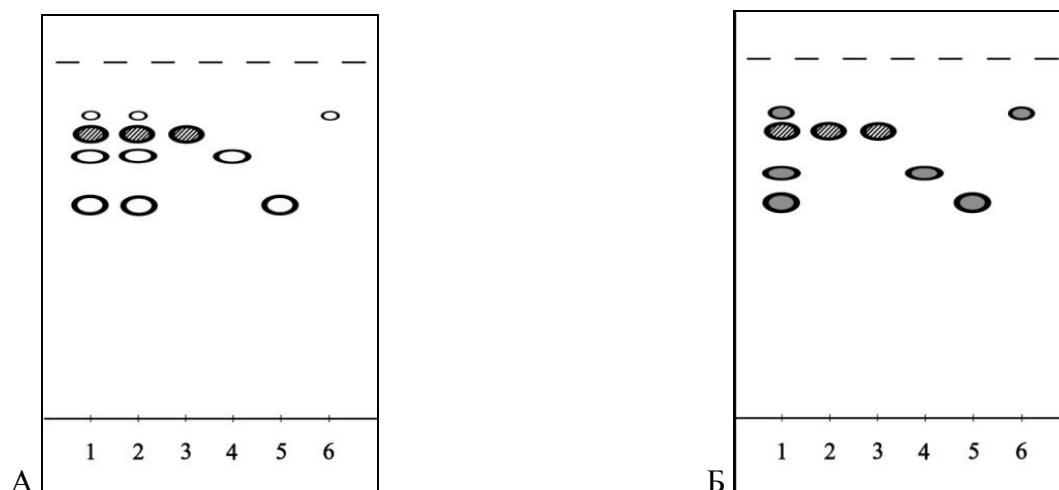


Рисунок 25 - Хроматографический профиль препарата «Расторопши сироп»

А - вид хроматограммы в УФ-свете 254 нм; Б - вид хроматограммы после обработки реактивом ДСК

Обозначения: 1 – водно-спиртовой раствор препарата «Силимар»; 2 - «Расторопши сироп»; 3 - ГСО силибина; 4 - РСО силидианина; 5 - РСО силикристина; 6 - РСО 2,3-дегидросилибина

Хроматографическую пластинку с нанесенными пробами сушили, затем помещали в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 2 ч. смесью растворителей: углерод четыреххлористый-ацетонитрил в соотношении 6:4, и хроматографируют восходящим слоем. После того как фронт растворителей пройдет около 80-90% длины пластинки от линии старта, её вынимали из камеры, затем сушили до удаления следов растворителей и просматривали в УФ-свете при длине волны $\lambda=254$ нм.

Детекцию пятен проводили УФ-облучением при длине волны $\lambda=254$ нм до и после обработки свежеприготовленным раствором ДСК [58].

В результате проведения ТСХ-анализа, были получены хроматограммы (рис. 25).

В предложенных условиях ТСХ было достигнуто четкое разделение доминирующих флаволигнанов – силибина, силидианина, силикристина, 2,3-дегидросилибина, которые при облучении хроматограммы УФ-светом

$\lambda=254\text{nm}$ (рис. 25А) обнаруживаются в виде доминирующих пятен с яркой фиолетовой флуоресценцией с величиной R_f силибина, силидианина и силикрстина 0.8 (на уровне пятна 3 – ГСО силибина), 0.7, 0,85 и 0.6 соответственно. На хроматограмме обнаруживается также пятно 2,3-дегидросилибина (рис. 25А).

Таким образом, на хроматограмме препарата «Расторопши сироп» детектируется доминирующим пятном с ярко-фиолетовой флуоресценцией с величиной R_f силибина (R_f около 0,8) (рис. 25А).

После обработки свежеприготовленным диазореактивом и выдерживании в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 5 мин препарат «Расторопши сироп» на хроматограмме также детектируется пятном ярко-оранжевого цвета, что свидетельствует о том, что силибин является доминирующим флаволигнаном (рис. 25Б).

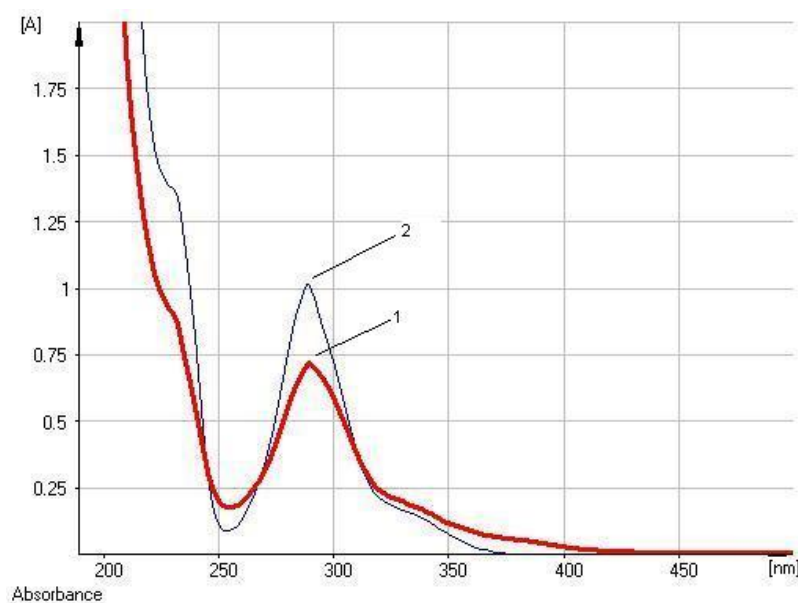


Рисунок 26 – Электронные спектры раствора
препарата «Расторопши сироп»

Обозначения: 1 – раствор ГСО силибина; 2 – раствор препарата
«Расторопши сироп»

Для приготовления раствора А 1 мл сиропа помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили водой очищенной до метки. 5 мл полученного раствора

А помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 96% (раствор Б).

Спектры регистрировали на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) сканирующего типа в кюветах с толщиной 10 мм. Полученный электронный спектр имеет максимум при $\lambda_{\text{max}}=289\pm 2$ нм (флаволигнаны). Аналогичный УФ-спектр характерен для ГСО силибина. Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о возможности применения разработанных методик стандартизации для препарата «Расторопши сироп» (рис. 26).

6.3.2. Количественное определение содержания суммы флаволигнанов в сиропе расторопши пятнистой

Количественное определение суммы флаволигнанов «Расторопши сироп» проводили методом прямой спектрофотометрии на приборе Specord 40 (спектрофотометр Analytik Jena) при длине волны 289 нм в пересчете на ГСО силибина.

Для приготовления раствора А 1 мл исследуемого сиропа помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили водой очищенной до метки. 5 мл полученного раствора А помещали в мерную колбу объемом 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 96% (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 289 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 95 %. Параллельно измеряли оптическую плотность спиртового раствора Б ГСО силибина при длине волны 289 нм.

Согласно полученным данным, на электронных спектрах препарата «Расторопши сироп» обнаруживается максимум при $\lambda=289$ нм, характерный для такового раствора ГСО силибина (рис. 26).

Количественное определение суммы флаволигнанов проводили методом прямой спектрофотометрии в пересчете на силибин. Для расчета

количественного содержания флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» использовали формулу:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 25 \times 25}{D_0 \times m \times 100 \times 25 \times 5}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО силибина;

m – масса исследуемого сиропа;

m_0 – масса субстанции, г.

Также допускается количественное определение суммы флаволигнанов в пересчете на силибин вычислять с использованием величины удельного показателя поглощения силибина по формуле:

$$X = \frac{D \times 25 \times 25}{450 \times 5}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

450 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) ГСО силибина при длине волны $\lambda=289$ нм.

Содержание суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» варьирует от 0,31% до 0,43% (в пересчете на силибин). Ошибка единичного определения содержания суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 3,57$ %.

Примечание. Приготовление раствора ГСО силибина. Около 0,02 г (точная навеска) ГСО силибина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 80 мл 95 % спирта при нагревании на водяной бане при температуре от 70 до 80 °С. Раствор охлаждают, доводят объем раствора до метки 95 % спиртом и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки 95% спиртом и перемешивают (раствор Б). Срок годности раствора 1 месяц.

Таблица 12 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп».

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	0,35	0,0004	95	2,23	0,0008	$\pm 3,57$

Таким образом, метод прямой спектрофотометрии может быть использован для количественного определения суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» на основе сорбита.

6.3.3. Числовые показатели сиропа расторопши пятнистой

В соответствии с нормативной документацией для осуществления стандартизации разрабатываемого сиропа [24] необходимо определить некоторый ряд показателей качества сиропа, таких как, pH, плотность, концентрация спирта, показатель преломления, микробиологическая чистота, а также содержание суммы флаволигнанов (табл. 13).

Таблица 13 - Числовые показатели сиропа расторопши пятнистой

Показатель	Значение
Плотность (г/см ³)	1,32±0,002
Показатель преломления	1,4370±0,001
pH	5,1±0,1
Концентрация спирта (%)	2,1±0,05
Микробиологическая чистота	Аэробных бактерий – 180 Грибов – 28 Отсутствуют бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Сумма флаволигнанов (%)	не менее 0,3

6.4. Разработка способа получения водорастворимой соли дигемисукцината силибина

Реакция получения водорастворимой соли дигемисукцината силибина

Для получения водорастворимой соли дигемисукцината силибина была разработана схема получения доминирующего флаволигнана в препарате «Силимар» – силибина. Силибин получен в лабораторных условиях на базе кафедры фармакогнозии СамГМУ методом хроматографического разделения суммы флаволигнанов расторопши из препарата «Силимар» методом колоночной хроматографии. Очистку силибина проводили методом перекристаллизации.

Флаволигнан силибин, выделенный из плодов расторопши пятнистой, идентифицирован нами на основании данных ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, УФ-, масс-спектров, физико-химических констант, а также сравнением с достоверно известным образцом вещества.

Силибин. Кристаллы белого цвета состава $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ с т.пл. 162-164 °C (смесь этилового спирта и ацетона). λ_{max} EtOH 289, 325(пл) нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °C, m/z): 505 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

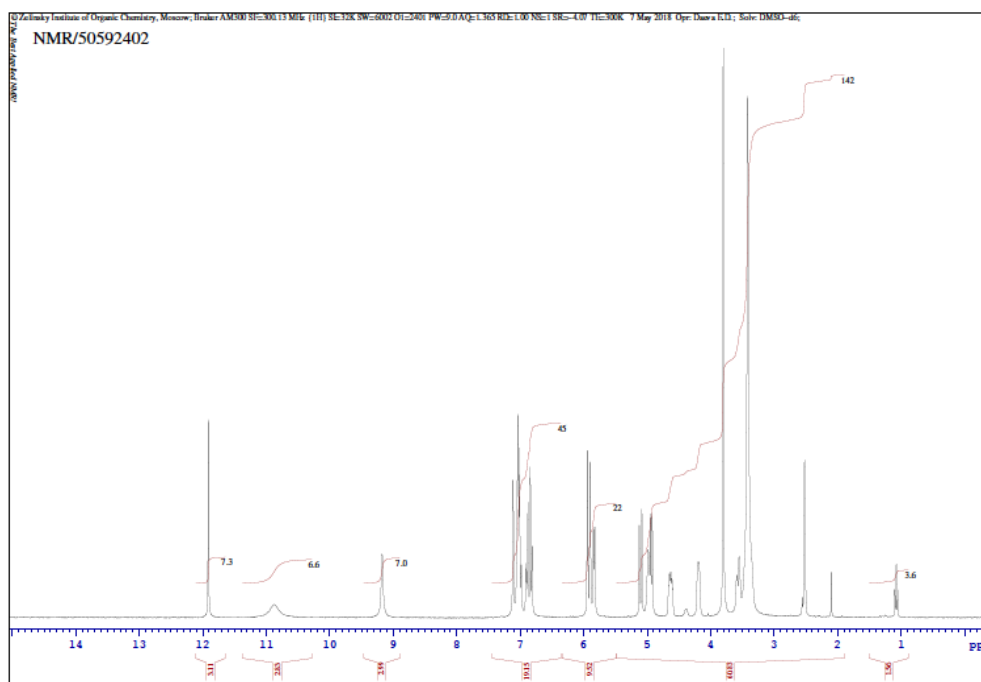


Рисунок 27 – ^1H ЯМР спектр силибина, полученного в ходе колоночной хроматографии

^1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 11,85 (1H, с, 5-OH), 10,77 (1H, с, 7-OH), 9,06 (1H, с, 4¹¹-OH), 6,82-7,10 (6H, м, шесть ароматических протонов), 5,93 (1H, д, 2 Гц, H-8), 5,88 (1H, д, 2 Гц, H-6), 5,07 (1H, д, 12 Гц, H-2), 4,88 (д, 8 Гц, H-7¹), 4,57 (д, 12 Гц, H-3), 4,15 (м, H-8¹), 3,78 (с, 3H, CH₃O), 3,30-3,50 (2H, м, 2H-9¹¹) (рис. 27).

^{13}C -ЯМР спектр (50 МГц, ДМСО- d_6 , δ_{C} , м.д.): C-2 (162,47), C-3 (130,63), C-4 (197,74), C-5 (163,30), C-6 (95,03), C-7 (168,81), C-8 (96,07), C-9 (147,63), C-10 (100,47), C-1¹ (130,07), C-2¹ (121,33), C-3¹ (143,63), C-4¹ (143,25), C-5¹ (116,62), C-6¹ (121,16), C-1¹¹ (127,49), C-2¹¹ (116,30), C-3¹¹ (147,01), C-4¹¹ (147,01), C-5¹¹ (115,33), C-6¹¹ (120,52), OCH₃ (55,70) (рис. 28).

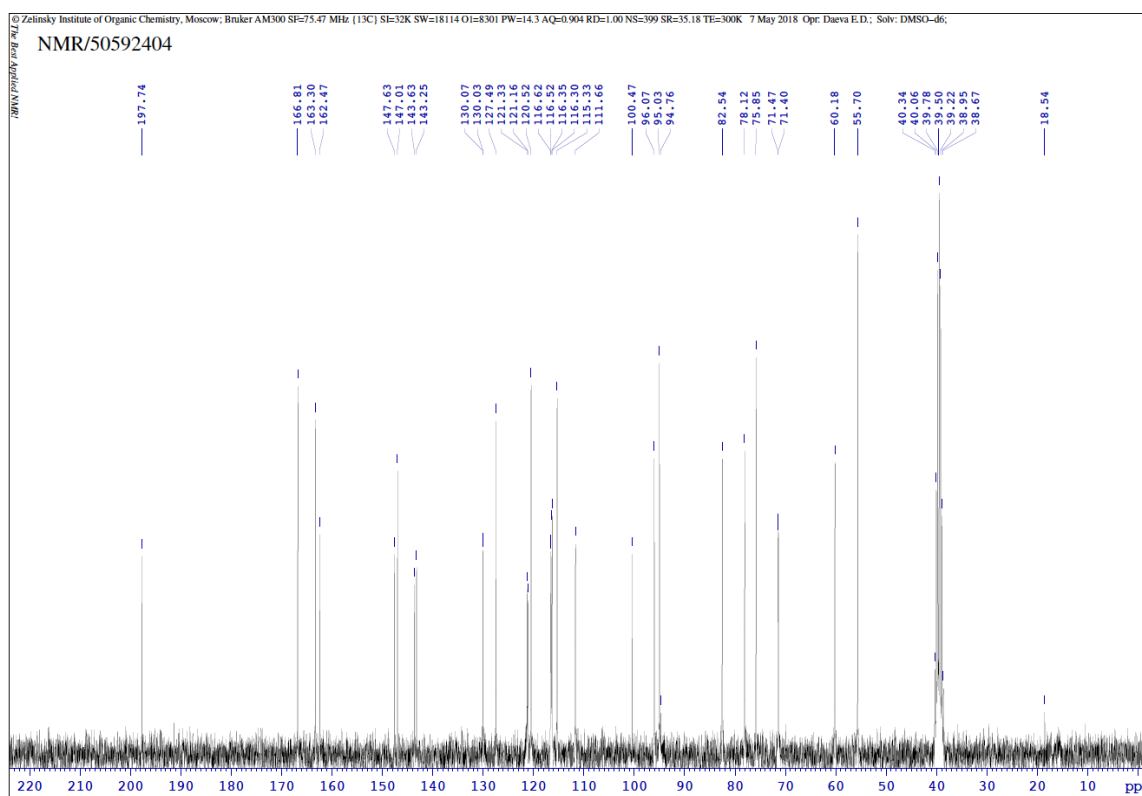


Рисунок 28 – ^{13}C -ЯМР спектр силибина, полученного в ходе колоночной хроматографии

Флаволигнан силибин использован нами для получения водорастворимого производного - силибина дигемисукцината динатриевая соль, представляющего огромный интерес для создания водорастворимого

импортозамещающего силибинина, являющегося в зарубежной медицине (лекарственный препарат «Силимарин водорастворимый») уникальным антидотом при отравлении токсинами гриба бледной поганки [67, 121].

В результате реакции образуется сначала эфир путем реакции силибина с ангидридом янтарной кислоты, а затем полученный переводят эфир в водорастворимую соль в результате реакции со спиртовым раствором натрия гидроксида, с получением дигемисукцината силибина натриевой соли (ход реакции см. в главе 2 «Объекты и методы»).

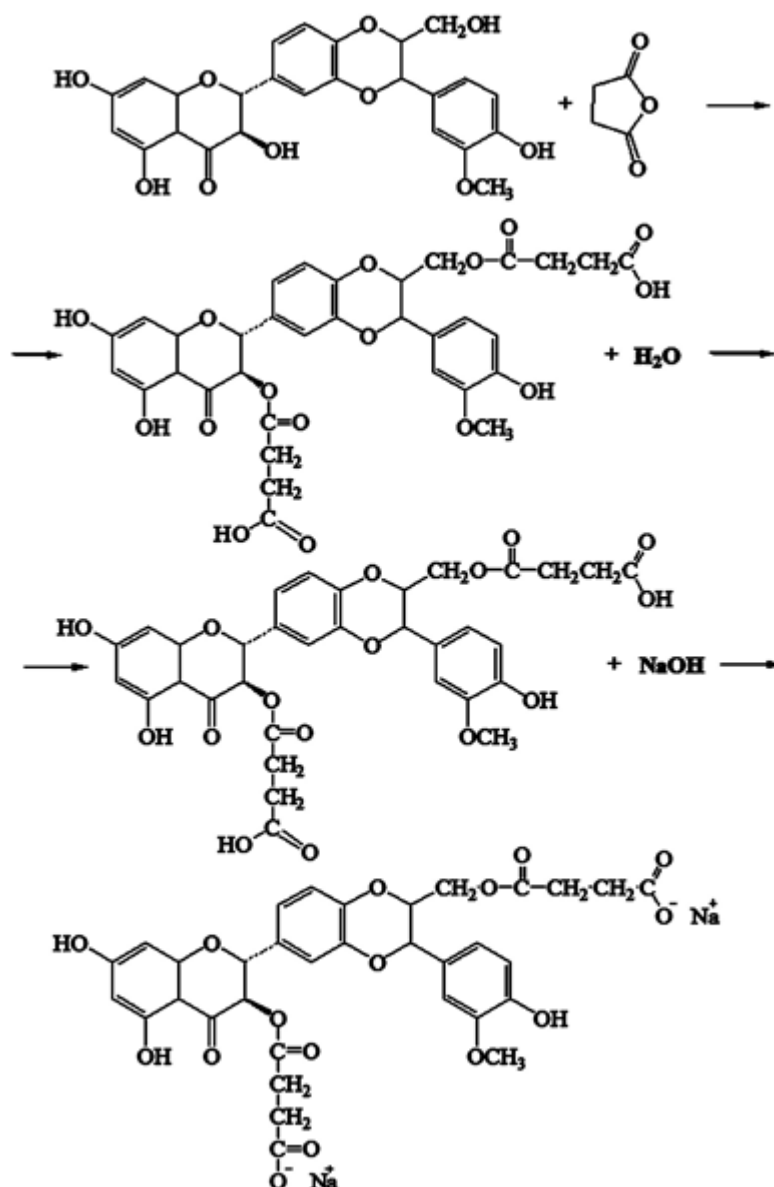


Рисунок 29 – Схема получения дигемисукцинатасилибина натриевой соли

В ходе синтеза получен дигемисукцинат силибина натриевой соли о чем свидетельствует данные масс-спектра, ^1H -ЯМР спектра и ^{13}C -ЯМР спектра полученного соединения.

Силибина дигемисукцинат динатриевая соль. Кристаллическое вещество светло-коричневого цвета состава $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{O}_{16}\text{Na}_2$. λ_{max} H_2O 280, 320(пл) нм. Масс-спектр (ESI-MS, 180 °C, m/z): 627 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

В масс-спектре соединения 8 присутствует пик иона с m/z 727 $[\text{M} + \text{H}]^+$, подтверждающий молекулярную массу соединения 726 (рис. 29).

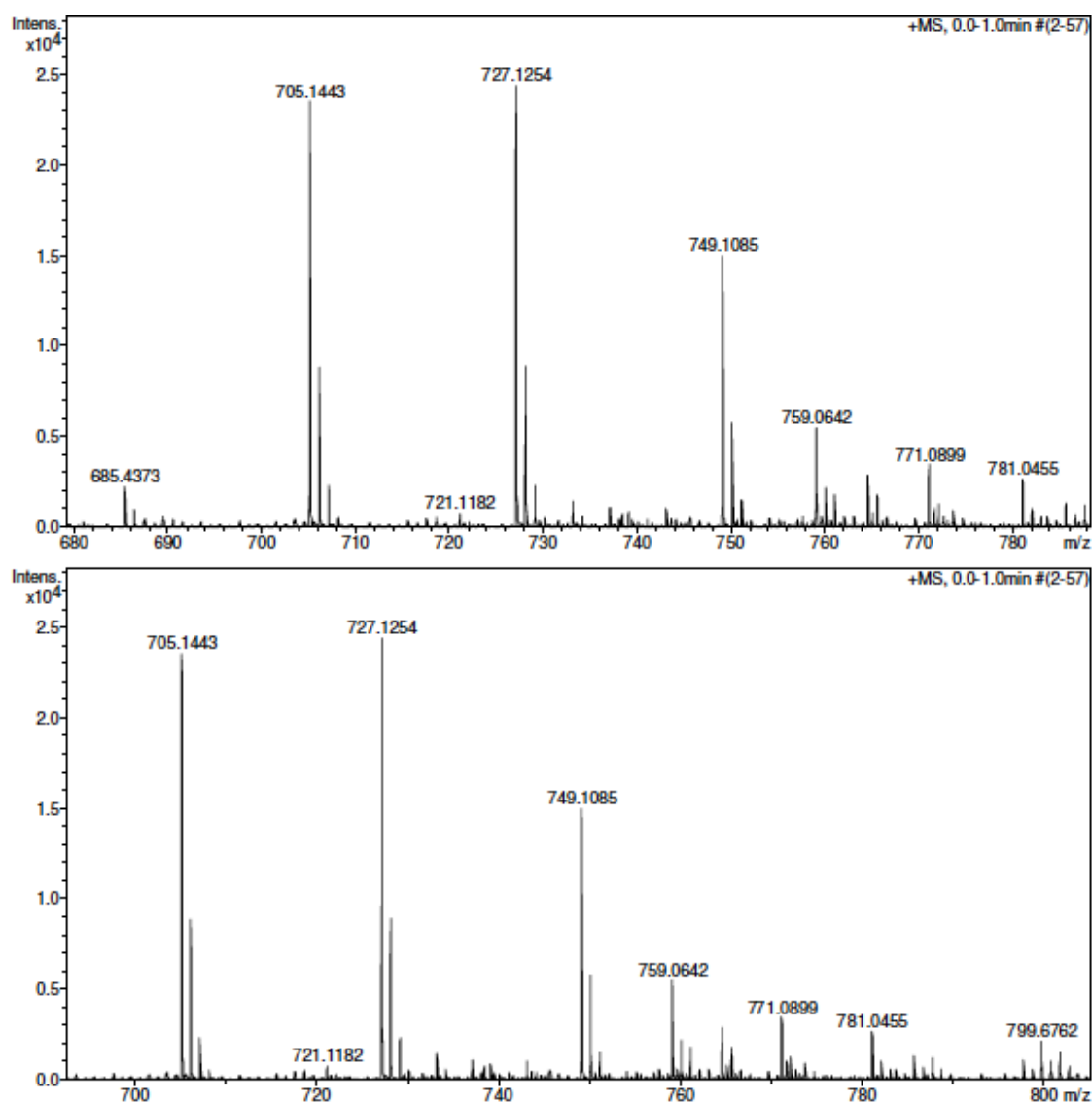


Рисунок 30 – Масс-спектр дигемисукцинат силибина натриевой соли

В ^1H -ЯМР-спектре полученного соединения (рис. 31) присутствуют все сигналы протонов, характерные для силибина.

^1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 6,55-6,90 (6H, м, шесть ароматических протонов), 5,93 (1H, д, 2 Гц, H-8), 5,65 (1H, д, 2 Гц, H-6), 5,45 (1H, д, 12 Гц, H-2), 5,13 (д, 8 Гц, H-7¹), 4,46 (д, 12 Гц, H-3), 4,06 (м, H-8¹), 3,73 (с, 3H, CH₃O), 3,50-3,90 (2H, м, 2H-9¹¹), 2,10-2,40 (8H, м, сигналы восьми протонов 4-х метиленовых групп).

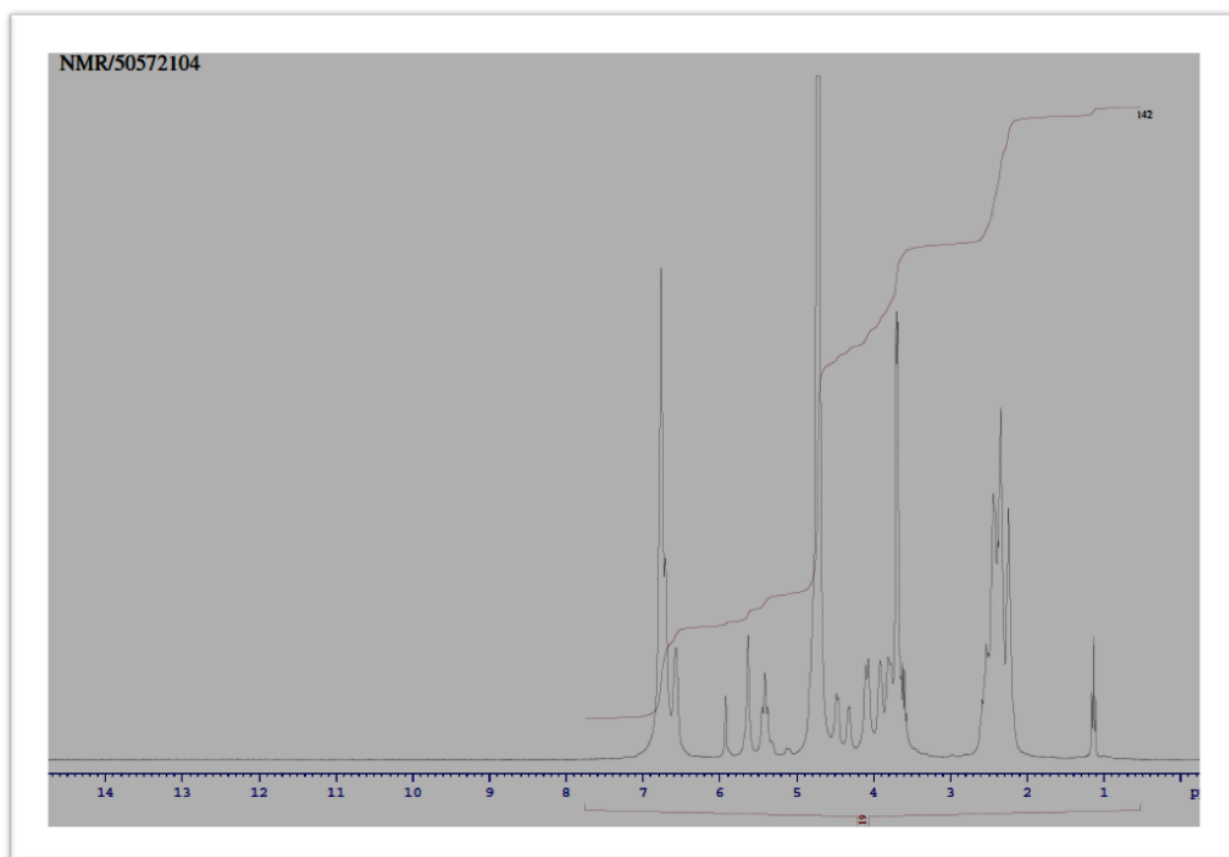


Рисунок 31 – ^1H ЯМР спектр дигемисукцината силибина натриевой соли

Обнаружены также в ^{13}C -ЯМР-спектре полученного соединения сигналы углеродных атомов, характерные для силибина (рис. 32), однако при этом присутствуют дополнительные сигналы, свидетельствующие о наличии четырех карбонильных группы двух фрагментов янтарной кислоты, а также четырех метиленовых групп двух фрагментов янтарной кислоты.

^{13}C -ЯМР спектр (50 МГц, ДМСО- d_6 , δ_c , м.д.): C-2 (157,45), C-3 (128,68), C-4 (174,88), C-5 (162,66), C-6 (96,97), C-7 (167,68), C-8 (96,61), C-9 (147,54), C-10 (100,98), C-1¹ (128,68), C-2¹ (122,58), C-3¹ (143,40), C-4¹ (143,32), C-5¹

(116,99), C-6¹ (120,83), OCH₃ (55,89), C-1¹¹ (127,82), C-2¹¹ (115,93), C-3¹¹ (147,50), C-4¹¹ (145,86), C-5¹¹ (115,93), C-6¹¹ (120,61), C=O (191,51), COONa (180,46; 179,86), 4CH₂ (34,12; 31,67; 31,57; 30,11).

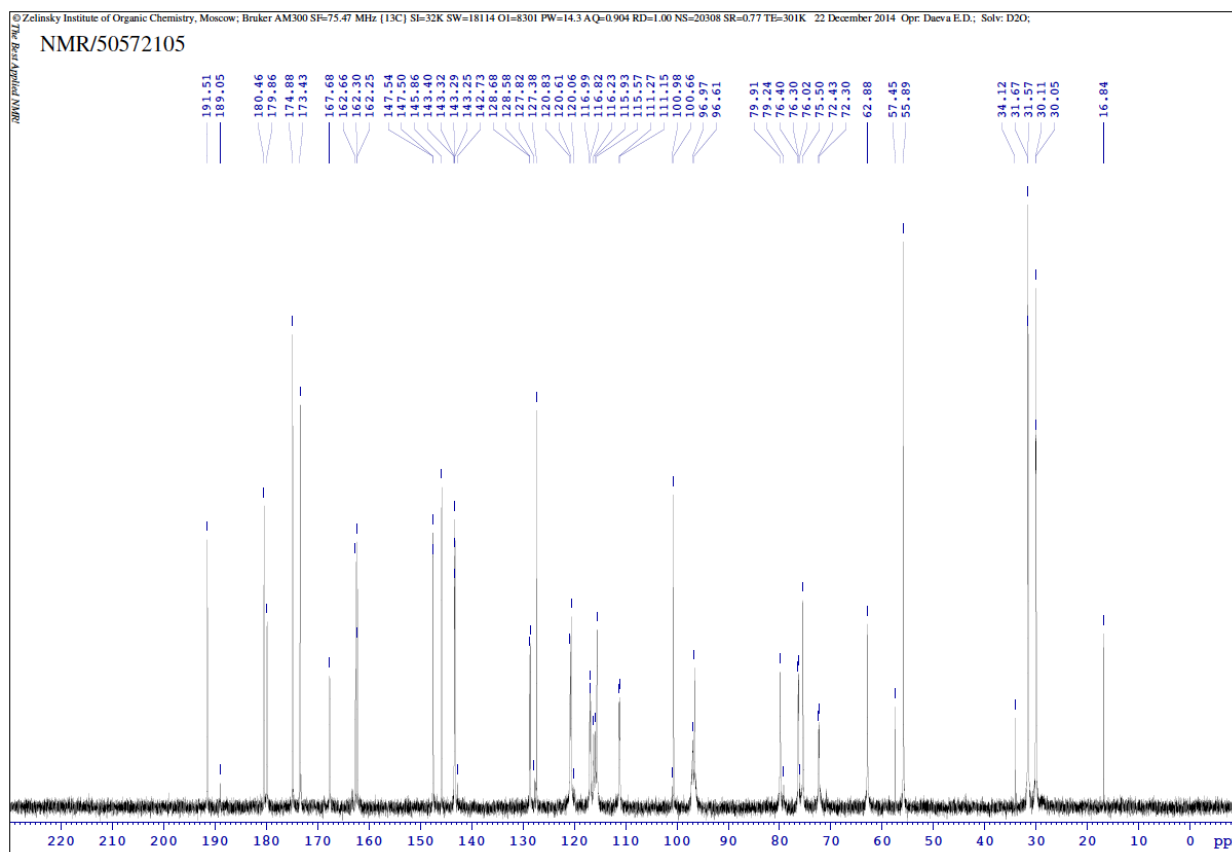


Рисунок 32 – ¹³C-ЯМР спектр дигемисукцината силибина натриевой соли

По данным масс-спектра, ¹H-ЯМР спектра и ¹³C-ЯМР спектра можно сделать вывод, что синтезированное соединение представляет собой силибина дигемисукцината натриевую соль.

6.5. Изучение острой токсичности лекарственных препаратов на основе травы расторопши пятнистой

Создание новых лекарственных препаратов невозможно без изучения вопросов безопасности их применения. С этой целью нами было проведено исследование острой токсичности для настоя травы расторопши пятнистой и настойки расторопши пятнистой. Опыты по изучению острой токсичности

были поставлены на 20 белых беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 200-220 г. Животные были разделены на 2 группы по 10 крыс в каждой. Первая группа животных получала однократно внутривентрикулярно препараты из расторопши (настой и настойка расторопши пятнистой) в дозе 15 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, а вторая группа – дистиллированную воду в аналогичном объеме. В первый день животные находились под непрерывным наблюдением, общая продолжительность эксперимента для каждого из препаратов составила 14 дней.

В ходе исследования летальных случаев зарегистрировано не было при изучении острой токсичности как настоя травы расторопши пятнистой, так и для настойки расторопши пятнистой. За все время наблюдения нарушений в поведенческой активности крыс контрольной и опытной групп не было зафиксировано. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, настой травы расторопши и настойка травы расторопши пятнистой в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относятся к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

6.6. Изучение влияния настоя и настойки травы расторопши пятнистой на экскреторную функцию почек

В настоящее время трава расторопши пятнистой не используется в медицинской практике. Следует отметить, что в народной медицине отмечают возможность применения травы расторопши в качестве диуретического средства, а также в пищевых целях. В результате изучения фитохимического состава травы расторопши пятнистой были обнаружены и выделены флавоноиды и фенилпропаноиды (см. главу 4). Известно, что флавоноиды в лекарственном растительном сырье, как правило, проявляют диуретические свойства [68]. Сочетание в препаратах травы и плодов расторопши пятнистой диуретических и гепатопротекторных свойств, на наш взгляд, представляет интерес в плане создания эффективных лекарственных препаратов на основе флаволигнанов плодов и фенольных соединений травы

данного растения. Это связано с тем обстоятельством, что между печенью и почками в организме существуют регуляторные и функциональные взаимосвязи. Известно, что нарушение функции почек может приводить к увеличению и задержке в организме продуктов метаболизма и экскреторных веществ, что в свою очередь может вызвать нарушение регуляции процессов выделения. Диуретическое действие, которое оказывает БАС из травы расторопши пятнистой, будет усиливать детоксикационный эффект, которые проявляют флаволигнанные структуры их плодов расторопши пятнистой [60].

На наш взгляд, создание препаратов на основе травы расторопши пятнистой, обладающих умеренным мочегонным действием, представляется целесообразным, так как будут способны обеспечивать профилактику самых разнообразных профессиональных заболеваний, связанных с контактом с различными гепатотоксичными реагентами [60].

Исследованию подвергали настой травы и препарат «Расторопши пятнистой настойка». Исследование проводилось по методике, описанной в главе 2 «Объекты и методы исследования» [7, 43, 60, 84].

Таблица 14 – Влияние внутрижелудочного введения настоя травы расторопши пятнистой в дозе 100 мкл/кг на выделительную функцию почек крыс за 4 ч опыта

4 часа	Диурез, мл	Натрийурез, мкмоль	Калийурез, мкмоль	Креатинин- урез, мг
Контроль (вода)	100%	100%	100%	100%
	1,63±0,10	233,95±39,27	126,88±13,78	2,54±0,29
Опыт (настой травы расторопши)	120%	143%	138%	113%
	1,95±0,07 *	335,26±21,40 *	175,39±7,98 *	2,88±0,22
	p=0,017	p=0,043	p=0,010	p=0,359

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших воду, $p < 0,05$.

В ходе экспериментов было установлено, что настой травы расторопши при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг на фоне 3% водной нагрузки в первые 4 ч эксперимента вызывал достоверное увеличение следующих показателей экскреторной функции почек: диуреза (на 20%), натрийуреза (на 43%) и калийуреза (на 38%) по сравнению с водным контролем преимущественно за счет снижения канальцевой реабсорбции воды и ионов в почечных канальцах ($p<0,05$) (табл. 14).

Спустя 24 ч эксперимента препарат способствовал увеличению диуреза (на 28%), натрийуреза (на 34%) и креатининуреза (на 34%) в опытной группе животных по сравнению с водным контролем как за счет снижения канальцевой реабсорбции, так и за счет повышения клубочковой фильтрации ($p<0,05$) (табл. 15).

Таблица 15 – Влияние внутрижелудочного введения настоя травы расторопши пятнистой в дозе 100 мкл/кг на выделительную функцию почек крыс за 24 ч опыта

24 часа	Диурез, мл	Натрийурез, мкмоль	Калийурез, мкмоль	Креатинин- урез, мг
Контроль (вода)	100%	100%	100%	100%
	1,71±0,13	301,03±27,11	142,21±13,88	2,64±0,28
Опыт (Настой травы расторопши)	128%	134%	112%	134%
	2,19±0,09 *	403,88±24,60 *	164,57±8,89	3,55±0,23 *
	p=0,011	p=0,016	p=0,200	p=0,028

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших воду, $p<0,05$.

В свою очередь, препарат сравнения гипотиазид, введенный в дозе 20 мг/кг, способствовал значительному достоверному возрастанию диуреза (на 40%), натрийуреза (на 54%) и калийуреза (на 55%) в опыте относительно водного контроля (табл. 16).

Таблица 16 – Влияние внутрижелудочного введения гипотиазида на выделительную функцию почек крыс за 24 ч эксперимента

Контроль/ Опыт	Диурез, мл/сут	Натрийурез, мкм/сут	Калийурез, мкм/сут	Креатинин- урез, мг\сут
Контроль (вода)	2,73±0,17	462,88±52,16	155,86±20,70	5,27±0,55
Опыт (гипотиазид)	3,83±0,22*	711,31±90,84*	241,60±19,26*	6,85±0,59

* - достоверность отличий показателей опытной группы от показателей контрольной группы животных, получавших воду, $p < 0,05$.

Таким образом, полученные результаты наглядно свидетельствуют о диуретической и салуретической активности настоя травы расторопши пятнистой в дозе 100 мкл/кг за 4 ч и 24 ч эксперимента, сравнимой с действием препарата сравнения гипотиазида в средней терапевтической дозе, а также о креатининуретической активности препарата.

Таблица 17 – Протокол 4-х часового хронического эксперимента с внутрижелудочным введением препарата настойки расторопши пятнистой на этиловом спирте 70% в дозе 100 мкл/кг на фоне 3% водной нагрузки

4 часа	Диурез, мл	Натрийурез, мкмоль	Калийурез, мкмоль	Креатининурез, мг
Контроль (вода)	100%	100%	100%	100%
	0,82±0,06	123,53±12,01	64,96±7,54	1,54±0,14
Опыт (Настой травы расторопши)	118%	132%	143%	121%
	0,97±0,06	162,92±12,24 *	93,04±6,88 *	1,86±0,14
	p=0,098	p=0,040	p=0,018	p=0,133

Примечание: * - достоверность отличия показателей опытной группы животных относительно показателей контрольной группы животных, $p < 0,05$.

Было проведено также исследование диуретической активности препарата настойки расторопши пятнистой. В ходе данного эксперимента было установлено, что данный препарат при однократном

внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг на фоне 3% водной нагрузки в первые 4 ч эксперимента вызывает достоверное увеличение следующих показателей экскреторной функции почек: натрийуреза (на 32%) и калийуреза (на 43%) по сравнению с водно-спиртовым контролем, диурез и креатининурез при этом изменяются недостоверно ($p < 0,05$) (табл. 17).

Спустя 24 ч эксперимента препарат не вызывает достоверных изменений в почечной экскреции воды, натрия, калия и креатинина по сравнению с водно-спиртовым контролем (табл. 18).

Таблица 18 – Протокол 24-х часового хронического эксперимента с внутрижелудочным введением препарата «Расторопши пятнистой травы настойка» на 70% этаноле в дозе 100 мкл/кг на фоне 3% водной нагрузки

24 часа	Диурез, мл	Натрийурез, мкмоль	Калийурез, мкмоль	Креатининурез, мг
Контроль (вода)	100%	100%	100%	100%
	0,96±0,14	167,41±18,99	78,40±13,95	1,93±0,27
Опыт (Настой травы расторопши)	117%	119%	117%	121%
	1,12±0,25	199,37±43,21	91,80±26,74	2,33±0,56
	p=0,585	p=0,511	p=0,665	p=0,531

Примечание: * - достоверность отличия показателей опытной группы животных относительно показателей контрольной группы животных, $p < 0,05$.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6:

1. Разработаны и обоснованы состав и способ получения препарата «Расторопши сироп» на основе препарата «Силимар», а также предложены подходы к стандартизации данного препарата.
2. Обоснована методика ТСХ-анализа препарата «Расторопши сироп», заключающаяся в специальной пробоподготовке с извлечением флаволигнанов из сиропа ацетоном с последующей возможностью разделения и обнаружении их с использованием ГСО силибина.
3. Предложена и обоснована методика количественного определения суммы флаволигнанов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на силибин. Содержание суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» варьирует от $0,31 \pm 0,01\%$ до $0,45 \pm 0,01\%$.
4. Разработана схема получения дигемисукцината силибина натриевой соли, заключающаяся в первоначальном образовании эфира путем реакции силибина с ангидридом янтарной кислоты с последующем переводом полученного эфира в водорастворимую соль со спиртовым раствором натрия гидроксида. По данным масс-спектра, ^1H -ЯМР спектра и ^{13}C -ЯМР спектра можно сделать вывод, что полученное соединение представляет собой силибина дигемисукцинат натриевую соль. Данное соединение представляет интерес с точки зрения перспективы создания импортозамещающего лекарственного препарата как антидота при отравлении токсинами гриба бледной поганки.
5. Для настоя и настойки травы расторопши пятнистой определены параметры диуретической активности. Полученные результаты наглядно свидетельствуют о диуретической и салуретической активности настоя травы расторопши пятнистой в дозе 100 мкл/кг за 4 ч и 24 ч эксперимента, сопоставимой с действием препарата сравнения гипотиазида в средней терапевтической дозе, а также о

креатининуретической активности препарата. Настойка травы расторопши пятнистой при однократном внутрижелудочном введении в дозе 100 мкл/кг на фоне 3% водной нагрузки в первые 4 ч эксперимента вызывает достоверное увеличение следующих показателей экскреторной функции почек: натрийуреза (на 32%) и калийуреза (на 43%) по сравнению с водно-спиртовым контролем, диурез и креатининурез при этом изменяются недостоверно. Спустя 24 ч эксперимента – препарат не вызывает достоверных изменений в почечной экскреции воды, натрия, калия и креатинина по сравнению с водно-спиртовым контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой позволяет сделать следующие **общие выводы**:

1. Проведенное морфолого-анатомическое исследование позволило выявить особенности строения травы расторопши пятнистой и впервые определить диагностические признаки, характерные для данного вида сырья, заключающиеся в особенностях проводящей системы стебля, имеющей переходный тип строения, а также в устьичных аппаратах аномоцитного типа амфистоматических листьев данного растения. Результаты данных исследования включены в раздел «Микроскопические признаки» проекта ФС на траву расторопши пятнистой.

2. В результате изучения химического состава травы расторопши пятнистой впервые в РФ выделены и идентифицированы шесть индивидуальных соединений флавоноидной и фенилпропаноидной природы (апигенин, 7-О-β-D-глюкуронид апигенина, *n*-кумаровая кислота, 5-*n*-кумароилхинная кислота, кофейная кислота, хлорогеновая кислота), идентификация которых проведена с использованием данных УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии и масс-спектроскопии, а также результатов различных химических превращений.

3. Разработана методика качественного анализа травы расторопши пятнистой методом тонкослойной хроматографии с использованием в качестве стандартных образцов хлорогеновой кислоты и ГСО цинарозида, в системе *n*-бутанол - этанол – аммиак (7:2:5), а также с помощью УФ-спектроскопии, позволяющей определить характерный максимум поглощения при длине 330±2 нм для фенилпропаноидов.

4. Разработана методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой с использованием метода прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 330 нм. Определено, что сумма фенилпропаноидов в пересчете на

хлорогеновую кислоту в сырье данного растения варьирует от $1,23 \pm 0,01\%$ до $2,81 \pm 0,01\%$.

5. Предложена методика количественного определения суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид при аналитической длине волны 392 нм. Установлено, что содержание суммы флавоноидов в сырье данного растения варьирует в пределах от $1,17 \pm 0,01\%$ до $1,37 \pm 0,01\%$.

6. В результате сравнительного исследования жирнокислотного состава масла расторопши пятнистой, подсолнечного масла, облепихового масла методом ГХ/МС впервые определено наличие в масле расторопши пятнистой лауриновой, гептадеценовой и генэйкозановой кислот, имеющих важное диагностическое значение.

7. Разработан способ получения лекарственного растительного препарата «Расторопши сироп», заключающийся в использовании фармацевтической субстанции «Силимар» в виде водно-спиртового раствора и в качестве основы сорбита.

8. Разработаны новые подходы к стандартизации качественного анализа лекарственного препарата «Расторопши сироп». Обоснована методика ТСХ-анализа препарата «Расторопши сироп», заключающаяся в специальной пробоподготовке с извлечением флаволигнанов из сиропа ацетоном с последующим обнаружением в присутствии ГСО силибина доминирующего и диагностического значимого компонента – силибина. Предложена методика количественного определения суммы флаволигнанов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на силибин, с помощью которой определено, что содержание суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» варьирует от $0,31 \pm 0,01\%$ до $0,45 \pm 0,01\%$.

9. Впервые в РФ разработана схема получения дигемисукцината силибина натриевой соли, заключающаяся в образовании эфира путем реакции силибина с ангидридом янтарной кислоты, с последующим

переводом полученного эфира со спиртовым раствором натрия гидроксида в водорастворимую соль, химическое строение которой доказано с использованием данных ^1H -ЯМР спектра, ^{13}C -ЯМР-спектра и масс-спектра.

10. В результате сравнительного исследования параметров диуретической активности настоя и настойки травы расторопши пятнистой определено, что настой обладает диуретической, салиуретической и креатининуретической активностью в дозе 100 мкг/кг за 4 часа и 24 часа эксперимента, сопоставимой с действием препарата сравнения – гипотиазида, тогда так настойка травы расторопши пятнистой оказывает соответствующие эффекты только в первые 4 часа эксперимента.

11. В результате анатомо-морфологических, фитохимических, аналитических и фармакологических исследований обоснована целесообразность использования в медицинской практике нового вида лекарственного растительного сырья «Расторопши пятнистой трава», на который разработан проект фармакопейной статьи.

Практические рекомендации:

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего фенилпропаноиды, флавоноиды и флаволигнаны, и могут быть использованы в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих флаволигнаны, фенилпропаноиды, флавоноиды, а также разработки методик анализа и стандартизации лекарственного растительного сырья. Кроме того,

важным является научное обоснование комплексного использования всей фитомассы расторопши пятнистой в медицинской и фармацевтической практике как перспективного нового вида лекарственного растительного сырья.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

БАВ – биологически активные вещества
БАС – биологически активные соединения
ВФС – временная фармакопейная статья
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГСО – государственный стандартный образец
ГФ – Государственная Фармакопея
ДСК – диазобензолсульфокислота
НД – нормативная документация
ЛП – лекарственный препарат
ЛР – лекарственное растение
ЛРП – лекарственный растительный препарат
ЛРС – лекарственное растительное сырье
ЛС – лекарственное средство
ЛФ – лекарственная форма
ОФС – общая фармакопейная статья
РСО – рабочий стандартный образец
СО – стандартный образец
ТСХ – тонкослойная хроматография
УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр
ФС – фармакопейная статья
ФСП – фармакопейная статья предприятия
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Авдеева, Е.В. Теоретическое и экспериментальное обоснование использования лекарственных растений, содержащих фенилпропаноиды, для получения гепатопротекторных и иммуномодулирующих препаратов: автореф. ...докт. фарм. наук: 15.00.02 / Авдеева Елена Владимировна. – Пермь, 2006. – 44 с.
2. Азнагулова, А.В. Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.): автореф. канд. фарм. наук: 14.04.02 / Азнагулова Анастасия Викторовна. – Самара, 2016. – 23 с.
3. Акопов, И.Э. Важнейшие отечественные лекарственные растения и их применение / И.Э. Акопов. - Ташкент: Медицина, 1990. - 444 с.
4. Березовская, Т.П. Методы микроскопического анализа ботанических объектов / Т.П. Березовская, Н.В. Дощинская, Е.А. Серых. – Томск, 1978. – 113 с.
5. Баргуш, С.А. Сравнительное исследование методов стандартизации плодов расторопши *Silybum marianum* / С. А. Буркуш [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Мед. науки. - 2016. - № 4. - С. 30-39.
6. Беликов, В.В. Оценка содержания флаволигнанов в плодах *Silybum marianum* (L.) / В. В. Беликов // Растительные ресурсы. - 1985. – Вып. 21. - № 3. - С.350-358.
7. Берхин, Е.Б. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Е.Б. Берхин // Омская правда. – 1972. 200 с.
8. Богачев, М.Ф. Опыт выращивания расторопши пятнистой / М.Ф. Богачев, Т.В. Власенко // Вопросы лекарственного растениеводства. – М., 1980. - С.12-14.
9. Бондаренко, Л.Т. Хромато-спектрофотометрический метод количественного определения силибина в плодах *Silybum marianum* / Л.Т.

- Бондаренко, А.А. Кирьянов, М.Е. Перельсон // Хим.-фарм. журн.-1980.-Т. 14, Вып. 4.- С.57-60.
10. Ботанико - фармакогностический словарь: Справочное пособие / Под. ред. К.Ф. Блиновой, Г.П. Яковлева. - М.: Высшая школа, 1990. - С. 229-230.
 11. Бубенчикова, В.Н. Разработка методов анализа растительного сырья, содержащего флавоноиды / В.Н. Бубенчикова, Т.В. Точкова // Состояние и перспективы развития фармации в Сибири и на Дальнем Востоке: Тез. докл. научно-практической конференции, посвященной 50-летию фармацевтического факультета 1991 г. – Томск, 1991. – С. 117-118.
 12. Быков, В.А. Эффективность разработки лекарственных средств из растительного сырья / В.А. Быков // Химия, технология, медицина: тр. Всерос. науч.-исслед. ин-та лекарственных и ароматических растений. – М., 2000. – С. 177-185.
 13. Быков, В.А. Технологические, аналитические и фармакоэкономические аспекты, исследования плодов расторопши пятнистой / В.А. Быков, В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная и др. // Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности: материалы докл. Междунар. науч. конф. - Томск, 2000. - С. 210-212.
 14. Быков, В.А. Фармацевтическая технология. Руководство к лабораторным занятиям: учеб. пособие / В.А. Быков, Н.Б. Демина, С.А. Скатков, М.Н. Анурова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 304 с
 15. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Книга 2: Физико-химические метода анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец.- 5-е изд., стереотип. / В.П. Васильев. – М.: Дрофа, 2005. – 383 с.
 16. Вайс, Р.Ф. Фитотерапия. // Р.Ф. Вайс, Ф. Финтельманн / Руководство: Пер. с нем. – М.: Медицина, 2004. –552 с.

17. Венгеровский, А. И. Гепатозащитное действие силибинина при экспериментальной интоксикации CCl_4 / А.И. Венгеровский, В. С. Чучалин, Е.А. Морокова, Т. П. Прищеп, А.С. Саратиков // Фармакология и токсикология, 1987. - Т. 50 - № 5. - С. 67-69.
18. Верещагин, А.Л. Сравнительный анализ композиций облепихового и подсолнечного масел / Н.В. Горемыкина, Н.В. Бычин, Ю.А. Кошелев // Техника и технология пищевых производств. - 2013. - № 2. - С. 1-4.
19. Владимиров, Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М., 1972 – С. 12-14.
20. Волоцуева, А.В. Фитохимическое исследование по созданию гепатопротекторных лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой: дис. к. фарм.наук: 15.00.02 / Волоцуева Алла Валериевна. – Пермь, 2004. – 140 с.
21. Волоцуева, А.В. Фармакогностические аспекты исследования плодов расторопши пятнистой / А.В. Волоцуева // Тез. докл. II Междунар. конф. молодых ученых. – Курск, 2001. -С.48.
22. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения: справочное пособие. -3-е издание, переработанное и дополненное / А.Ф. Гаммерман, Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. – М.: Высшая школа, 1983. – 400 с.
23. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук – Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1990. – 330 с.
24. Гордиенко, А.Д. Гепатопротекторный механизм действия флавоноидов / А.Д. Гордиенко // Фармация. - 1990. – Т. 39, №3. – С. 75-78
25. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.1 / М. – 2015. – 1470 с.
26. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.2 / М. – 2015. – 1004 с.
27. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание / МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.

28. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
29. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>. – 20.05.2018.
30. Государственный реестр лекарственных средств. Т.1: офиц. изд. (по состоянию на 1 апреля 2008 г.) (VIII ежегод. периодич. изд.) / Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и соц. развития; Науч. центр экспертизы средств мед. применения. - М.: Медицина, 2008. – 1300 с.
31. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский. - Новосибирск: Наука, 1990, - 352 с.
32. Гринкевич, Н.И. Фармакогнозия. Атлас / Н.И. Гринкевич, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1989. – 512 с.
33. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. - М., Высш. Шк., 1983. - С. 176.
34. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: Покрывосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов. - М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. - С.496.
35. Губергриц, Н.Б. Фармакотерапевтические эффекты и клинические возможности эталонного препарата силимарина / Н.Б Губергриц П.Г. Фоменко, Г.М. Лукашевич, О.А. Голубова // Фарматека – 2012.– №.2. – С.24–31.
36. ГОСТ 31665-2012. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот.
37. ГОСТ Р 53904 – 2010. Добавки пищевые. Подсластители пищевых продуктов. Термины и определения. – Введ. 01.07.11. – М.: Стандартиформ, 2011. – 14 с.

38. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1977. – 275 с.
39. Дейнека, В.И. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в анализе растительных масел. Метод контроля подлинности и установления фальсификации облепихового масла / Л.А. Дейнека, В.Н. Сороколудов // Химико-фармацевтический журнал. - 2009. - Т. 43, № 1. - С. 33-36.
40. Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака (пер. с англ.). – М.: Мир. – 1978. – 428 с.
41. Задорожный, А.М. Справочник по лекарственным растениям / А.М. Задорожный, А.Г. Кошкин, С.Я. Соколов. - М., 1988. - 228 с.
42. Зайцев, В.М., Прикладная медицинская статистика / Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. – С.-Пб. Фолиант. - 2003. – 432 с.
43. Зайцева, Е.Н. Способ получения диуреза у лабораторных животных: патент на изобретение 2494703 Рос. Федерация / Е.Н. Зайцева // №2012104057/13; заявл. 06.02.12; опубл. 10.10.13, Бюл. № 28. 11 с.
44. Запесочная, Г.Г. Фенилпропаноиды в стандартизации лекарственных растений / Г.Г. Запесочная, В.А. Куркин // III Международная конференция «Экологическая патология и ее фармакокоррекция»: Тез. докл. - Чита, 1991. - Ч. II. - С. 23.
45. Запесочная, Г.Г. О флавоноидах некоторых лекарственных растений / Г.Г. Запесочная, А.И. Баньковский // Тр. / ВНИИЛР. - М., 1969. - Т. XV. - С. 629 -640.
46. Зориков, П.С. Оптические свойства настойки плодов расторопши пятнистой / П. С. Зориков, В. М. Колдаев // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2014. - №2. - С. 80-85.
47. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. – Т.2 / Н.В. Меньшутина [и др.]. – М.: БИНОМ, 2013. – 480 с.
48. Ким, М.Е. Сиропаы с фитопрепаратами: номенклатура, разработка, особенности состава, технологии (обзор) / М.Е. Ким, Т.А. Олейникова,

- С.Б. Евсеева // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2015. – №2-2. – С. 21-26.
49. Ким, М.Е. Сиропы: состав, технология, современное состояние исследований (обзор литературы) / М.Е. Ким, Э.Ф. Степанова, С.Б. Евсеева // Фармация и фармакология. – 2014. - № 3. – С. 7-14.
50. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х томах. / Пер. с англ. Под ред. д.х.н., проф. В.Г. Березкина. – М.: Мир. –1981. – 1139 с.
51. Корона, В.В., Васильев, А.Г. Строение и изменчивость листьев растений: Основы модульной теории. Екатеринбург: Изд-во Екатеринбург. – 2002. – 224 с.
52. Кортиков, В.Н. Справочник народной медицины / В.Н. Кортиков, А.В. Кортиков. - Минск: Белмаркет, 1993. - 240 с.
53. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов/ В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Фундаментальные исследования. – 2014. - №11. – С. 366-371.
54. Куркин, В.А. Антиоксидантные свойства комплексного гепатопротекторного лекарственного препарата силибохол / В.А. Куркин, А.А. Лебедев, Е.А. Батаков и др. // Растительные ресурсы.- 2001.- Т.37, вып. 2.-С.69-73.
55. Куркин, В.А. Влияние фитопрепаратов, содержащих фенилпропаноиды, на физическую работоспособность животных (статья) / Куркин В.А., Дубищев А.В., Запесочная Г.Г. и др. (всего десять авторов) // Хим. - фармац. журн. – 2006. - № 3. – С. 30-31.
56. Куркин, В.А. Количественное определение флавоноидов и суммы флаволигнанов в плодах *Silybum marianum* (L.) / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, Е.В. Авдеева и др. // Растительные ресурсы. – 1996. – Т. 32, Вып. 3 – С. 80-87.
57. Куркин, В.А. Проблемы стандартизации растительного сырья и препаратов, содержащих фенилпропаноиды / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева // Фармация. – 2009. - №1. – С. 51-54.

58. Куркин, В.А. Сравнительное исследование состава жирных кислот масла расторопши и подсолнечного масла / В. А. Куркин, Д. В. Росихин, Т. К. Рязанова // Медицинский альманах. - 2017. - №1. - С. 99-102.
59. Куркин, В.А. Сравнительное изучение состава жирных кислот масла расторопши, подсолнечного масла и облепихового масла / В. А. Куркин, Д. В. Росихин, Т. К. Рязанова // Фармация. - 2017. - Т. 66, №6. - С. 25-29
60. Куркин, В.А. Сравнительное исследование диуретической активности водно-спиртовых извлечений лекарственных растений, содержащих флавоноиды / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Куркина, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. - Т. 159, № 3. - С. 348-352.
61. Куркин, В.А. Стандартизация сиропа расторопши / В. А. Куркин, Д. В. Росихин // Фармация. - 2017. - Т. 66, №1. - С. 19-22
62. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с.
63. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие / В.А.Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
64. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Распространение, классификация, структурный анализ, биологическая активность / В.А. Куркин // Химия природных соединений. – 2003. – № 2. – С. 87-110.
65. Куркин, В.А. Флаволигнаны и другие природные лигнаноиды. Проблемы структурного анализа / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная // Химия природн. соедин. – 1987. - № 1. – С. 11-34.
66. Куркин, В.А, Флаволигнаны плодов *Silybum marianum* / В.А. Куркин, А.А. Лебедев, Г.Г. Запесочная и др. // Химия природных соединений. - 2001. - № 5. - С. 37-41.

67. Куркин, В.А. Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37 – № 4. – С. 27-41.
68. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография/ А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
69. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды: автореф. ...докт. фарм. наук: 14.04.02 / Куркина Анна Владимировна. – Самара, 2013. – 48 с.
70. Кучина, Н.С. Лекарственные растения средней полосы европейской Н.С. Кучина. - М.: Планета, 1992. - 187 с.
71. Ладыгина, Е.Я. Фармакогнозия. Атлас / Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1989.
72. Лебедев, А.А. Антиоксидантные свойства комплексного гепатопротекторного лекарственного препарата силибохол / А.А. Лебедев // Раст. ресурсы. – 2001, вып. 1. – С. 280-290.
73. Лекарственные растения Государственной фармакопеи 1 и 2 том / Под ред. Самылиной И.А., Северцева В.А. М. Анми. – 1999, 2003.
74. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие / Под ред. Г.П. Яковлева. СПб.: СпецЛит, 2006. – С. 350-354.
75. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие / Под ред. Г.П. Яковлева. СПб.: СпецЛит, 2006. – С. 350-354.
76. Лечение растениями: основы фитотерапии: Учеб. пособие / В.М. Баева – М.: ООО «Издательство Астрель», 2004. – 202 с.
77. Луценко, С.В. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал / С.В. Луценко, Н.Б. Фельдман, Е.В. Луценко., В.А. Быков. – Москва, 2006. – 235 с.

78. Маркова, А.В. Тайны народной медицины. Полная энциклопедия / сост. А.В. Маркова. – М., 2003. – 637 с.
79. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учебное пособие. – 2-е изд., перераб. и доп. / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
80. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
81. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: Использование в народной медицине и быту / Л.В. Пастушенков, А.Л. Пастушенков, В.Л. Пастушенков. – Л.: Лениздат, 1990. – 384 с.
82. Пименов, К.С. Вредители расторопши пятнистой и меры борьбы с ними /К.С. Пименов, Г.В. Мельникова // Генетические ресурсы лекарственных и ароматических растений: сб. науч. тр. междунар. конф., посвящ. 50-летию ботан. сада ВИЛАР. – М., 2001. – С.348.
83. Питкевич, Э.С. Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.) / Э.С. Питкевич, А.Н. Лызиков, С.В. Цаприлова // Проблемы здоровья и экологии. – 2008. - № 4. – С. 119-126.
84. Патент на ПМ 115651 Рос. Федерация №2011138631/13. Устройство для введения водной нагрузки лабораторным животным / Зайцева Е.Н.[и др.]; заявл. 20.09.11; опубл. 10.05.12 // Изобретения. Полезные модели. – 2012; 13: 2 с.
85. Патент № 2129873 Способ получения масла расторопши пятнистой, обладающего ранозаживляющей активностью / Е.В. Ахтемиров, В.А. Куркин, А.А. Лебедев и др.; СамГМУ. - А 61 К 35/78; заявл. 07.12.97; опубл. 10.05.99; Приор. 07.12.97– 1999: 6 с.
86. Производственная практика по стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов: Учеб. пособие для студентов фармацев. вузов / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева и др. – Самара: Офорт, 2007. – 126 с.

87. Попов, И.В., Попова, О.И. Современное состояние проблемы использования лекарственного растительного сырья в Северо-Кавказском Федеральном округе // Научно-практическая конференция, посвященная 65-летию факультета промышленной технологии лекарств: сб. науч. тр. - Ч. 1. - СПб: Изд-во СПХФА, 2010. - 212 с
88. Поспелов, В.С. Расторопша пятнистая: вопросы биологии, культивирования и применения / В.С. Поспелов, В.Н. Самородов. – Полтава: Изд-во Полтавской СХА, 2008. – 164с.
89. Практикум по фармакогнозии: Учеб. Пособие для студентов ВУЗа/ под общ. редакцией В.Н. Ковалева // Харьков: Изд-во НФаУ: золотые страницы: МТК-Книга. – 2004. – 512 с.
90. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. — Л.: Наука, Т. 1—7, 1987—1993.
91. Росихин, Д.В. Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой / Д.В. Росихин, В.А Куркин, В.М. Рыжов // Аспирантский вестник Поволжья. - 2015. - № 5-6 (2). - С. 342-346.
92. Рыжов, В.М. Исследование по стандартизации и созданию лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) .): дис. к. фарм.наук: 15.00.02 / Рыжов Виталий Михайлович. – Курск, 2009. – 159 с.
93. Самигуллина, Л.И. Иммуностропные свойства препаратов расторопши пятнистой: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.25 / Л.И. Самигуллина; Башк. гос. мед. ун-т. – Уфа, 2002. -23с.
94. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 39-41.
95. Самылина, И.А. Перспективы создания сухих экстрактов / И. А. Самылина [и др.] // Фармация. — 2006. — Т. 54, № 2. — С. 43–46.

96. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т.2. – С. 364.
97. Сокольская, Т.А. Комплексная переработка плодов расторопши пятнистой и создание на ее основе препарата «Силимар» / Т.А. Сокольская // Хим.-фарм. журнал. – 2000. – Т. 34, №9. – С. 27-30.
98. Сокольская, Т.А. Создание лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой (получение, стандартизация и контроль качества) / Т.А. Сокольская // Фармация. - №1. – 2002. - С. – 32.
99. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия): Справ. / Сост.: С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М.: Медицина, 1988. – 463 с.
100. Самигуллина, Л.И. Новые перспективы применения препаратов расторопши пятнистой / Л.И. Самигуллина, Д.Н. Лазарева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67 – №4. С. 77 – 80.
101. Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдраилова, Е.Н. Музафарова. – Пушино: Synchronobook, 2013. – 310 с.
102. Тарутина, О.Л. Онтогенетический морфогенез расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaerth / О.Л. Тарутина // Известия ТСХА. - 1993. - Вып.4. - С. 85-91.
103. Топалова, В. Сравнительное испытание на *Silibum marianum* / В. Топалова, С. Георгиев // Растениевод. науки. - 1993. – Вып. 30; №5-6. - С. 70-72.
104. Фармакогнозия. Атлас. Учеб. пособие для студентов фармацевт. ин-тов и фармацевт. фак-тов мед. ин-тов / Е.Я. Ладыгина, Н.И. Гринкевич, И.А. Самылина и др.; Под ред. Н.И. Гринкевич., Е.Я. Ладыгиной. – М.: Медицина, 1989. – 511 с.

105. Фармацевтическая технология. Руководство к лабораторным занятиям: учеб. пособие / В.А. Быков, Н.Б. Демина, С.А. Скатков, М.Н. Анурова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 304 с.
106. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / Под ред. В.Г. Кукеса. - М.: Медицина, 1999. – 192 с.
107. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия (аналитика). В 2 кн. Кн. 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа: Учебник для вузов. – М.: Высш. шк., 2001. – 559 с.: ил.
108. Хусаинова А.И. Фармакогностическое исследование цветков пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.): дис.фарм.наук: 14.04.02 / Хусаинова Алия Ильясовна. – Самара, 2015. – 206 с.
109. Ходжиматов, М. Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана / М. Ходжиматов. – Душанбе: Гл. научн. ред. Тадж. сов. энцикл., 1989. – С. 251
110. Щехатихина, А. С. Оценка содержания изомеров флаволигнанов расторопши пятнистой в гепатопротекторных препаратах / А.С. Щехатихина, Гавриленко Н.М., Курченко В. П. // Вестник БГУ. – 2010. – №2. – С. 73-78
111. Цаприлова, С.В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение / С.В. Цаприлова, Р.А. Родионова // Вестник фармации. – 2008. - № 3, Вып. 41.– С. 92-104.
112. Bhatia, N., Inhibition of human carcinoma cell growth and DNA synthesis by silibinin, an active constituent of milk thistle comparison with silymarin / N. Bhatia, I. Zhao, D.M.Wolf , R. Agarial // Cancer Sett., 1999. – Vol. 147. – P. 77-84.
113. Boigk, G. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced billiary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats / G. Boigk et al. // Hepatology. - 1997. - Vol. 26, No. 3. - P. 643-649.

- 114.Campos, R. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver / R.Campos, A. Garido, R. Guerra // *Planta Medica*. - 1989. - Vol. 55, No. 3. - P. 417-419.
- 115.Chrungoo, V.J. Silymarin mediated differential modulation of toxicity induced by carbon tetrachloride, paracetamol and D-galactosamine in freshly isolated rat hepatocytes / V.J. Chrungoo, K. Singh , I .Singh // *Indian J Exp Biol*. - 1997. – No. 35. - P. 611-617.
- 116.Carducci, R. Silybinin and acute poisoning with *Amanita phalloides*, Armellino NIF / R. Carducci, C. Volpe // *Minerva Anesthesiol*. -1996. –Vol. 62.-P. 187-193.
- 117.Cholbi, M.R. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄ – induced microsomal lipid peroxidation / M.R. Cholbi, M. Paya, H.Y. Alcaras // *Experientia*. – 1991. – Vol.47. – P.195-199
- 118.Corchete, P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin / P.Corchete // *Bioactive molecules and medicinal plants* / P. Corchete, K.G. Ramawat, J.M. Merillon. – Berlin Heidelberg: Springer, 2008. – P. 123-148.
- 119.Deak , G., Immunomodulator effect of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases / G. Deak , G. Muzes., I. Lang // *Orv Hetil.*, 1990. - P. 1291-1292, 1295-1296.
- 120.Dehmlow, C. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells / C. Dehmlow. N. Murawski, H. de Groot // *Life Sci*. - 1996. – No. 58. - P. 1591-1600.
- 121.Desplaces, A., The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning / A. Desplaces, J. Choppin., G. Vogel // *Arzneimittelforschung*. - 1975. – No. 25. - P. 89-96.
- 122.Ding, T. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. / T. Ding [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - 2001. - V. 26. - P 155-161.

123. Ferenci, P. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver / P. Ferenci et al. // J. Hepatology. - 1989. - Vol. 9. - P.105-113.
124. Farghali, H. Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury /H. Farghali, H L. Kamenikova, S .Hynie // Pharmacol Res. - 2000. – Vol. 41, No. 2 – P. 231-238.
125. EMA/HMPC/294188/2013 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Assessment report on *Silybum marianum* (L.) Gaertn., fructus, 2015.
126. European Pharmacopoeia. – 5-th Ed. – Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc. – 2008. – P. 2524.
127. Janiak, B Phytochemisch-pharmakognostische Untersuchungen über fructus *Cardui mariae* / R. Hänsel // Planta Medica. – 1960. – Vol. 8, No.1. – P. 71-84.
128. Hammons, G.J. Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes / G.J. Hammons [et al.] // Carcinogenesis. – 1997. - Vol. 18, No.14. –P. 851-854
129. Gappelletti, E.M. Silymarin localization in the fruit and seed *Silybium marianum* (L.) Gaertn. / E.M. Gappelletti, R. Caniato //Herba hung., 1984. 23. No.1-2. P. 53-66.
130. Kurkin, V.A. Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // Chemistry of Natural Compounds. – 2003. – Vol. 39. – No.2. – P. 123-153.
131. Nassuato, G. Effect of silibin on biliary lipid composition: experimental and chemical study/ G. Nassuato, R.M. Iemomolo, M. Strazzabasco et al. // J. Hepatol. - 1991. - Vol. 12. - P. 209-295.
132. Pereira, C. Infusions of artichoke and milk thistle represent a good source of phenolic acids and flavonoids / C. Pereira, L.Barros, A.M. Carvalho, C. Santos-Buelgab, I. Ferreira // Food Func. – 2015 – No.3. – P.56-62

133. Pelter, A. Structur des Silybins: in Abbaueversuche / A. Pelter, R. Hansel // Chem. Ber, 1975. - Bd. 108, No. 1 - P. 790-802.
134. Ramasamy, K. Multitargeted therapy of cancer by silymarin / K. Ramasamy, K. R. Agarwal // Cancer Lett. — 2008. — Vol. 269, No. 2. — P. 352–362
135. Ismaili, S.A. Chemical composition of two non-conventional oils in Morocco: *Melia azadirachta* and *Silybum marianum* (L.) / H. Harhar, S. Gharby // Journal of Materials and Environmental Science. - 2016- Vol. 7, No. 6. - P. 2208-2213.
136. Vogel, G. A peculiarity among the Flavonoids - silymarin, a compound active on the liver / G.A. Vogel // Flavonoids and Bioflavonoids: Akademiai Kiado. – Budapest. – 1982. - P. 461-474.
137. Vogel, G. Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles / G. Vogel, B. Tuchweber, W. Trost // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 1984. – No. 73. - P. 355-362.
138. Vogel, G. Natural substances with effects on the liver // New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical activity. – Berlin Springer Verlag. – 1977. – P. 249-265.
139. Wagner, H. Chemische Wertbestimmung eines Silymarin-haltigen Flavonoidkonzentrates aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. / H. Wagner // Arzneimittel – Forschung. – 1968. – No. 18. - P. 696-698.
140. Wagner, H. The antihepatotoxic principle of *Silybum marianum* Gaertn. / H. Wagner // In: Recent Flavonoids Research. – Budapest: Akademiai Kiado. – 1973. – P. 51-68.
141. Wagner, H. Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas / H. Wagner, S. Bladt, E.M. Zgainski: Translated by Th. A. Scott. – New York: Springer-Verlag. – 1984. – 385 p.
142. Wagner, H. The structure of silychristin – a ¹³C-NMR study / H. Wagner // Tetrahedron Letters. – 1978. – No. 4. – P. 381-384.

143. Wagner, H. Zur Chemie des Silymarins (Silybin), des Wirkprinzips der Frucht von *Silybum marianum* (L.) Gaertn. / H. Wagner // *Arzneimittelforschung*. - 1968. - No. 18. - P. 688-696.
144. Wagner, H. *Pharmazeutische Biologie* / H. Wagner // Gustav Fischer Verlag. - Stuttgart. - New York: . - 1993. - 522 p.
145. Wagner, H. Zur Chemie und Analytik von Silymarin aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. // *Arzneimittel – Forschung*, 1974. - No. 24. - P. 466-471.
146. Wagner, H. Silydianin und Silychristin, zwei Isomere aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Mariendistel) / H. Wagner et al. // *Z. Naturforschung*. - 1976. - Bd. 31B. - No. 6. - P. 876-884.
147. Wagner, H. Antihepatotoxic flavonoids / H. Wagner et al. // *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. - New York: Alan R. Liss, Inc. - 1986. - P. 545-558.
148. Wagner, H., Plant constituents with antihepatotoxic activity / H. Wagner Beal J.L., Reinhard E. // *Natural Products as Medicinal Agents: Hippokrates-Verlag*. - Stuttgart. - 1981. - P. 22-24.
149. Min, K Immunosuppressive effect of silibinin in experimental autoimmune encephalomyelitis / K. Min [et al.] // *Arch Pharm Res*. —2007. — Vol. 30, No. 10. — P. 1265–1272.
150. US Patent No. 4.764.508. Complexes of flavanolignans with phospholipids, preparation thereof and associated pharmaceutical compositions (Gabetta B., Bombardelli E., Pifferi G.), 1988.
151. US Patent No. 6.699.900 Hydrophilic and lipophilic silibinin pro-forms (J.E. Zelinski), 2004.
152. US Patent № 4.895.839 Pharmaceutical and cosmetic compositions containing complexes of flavanolignans with phospholipids (Bombardelli E.), 1990.

ПРИЛОЖЕНИЯ

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор И.Л. ДАВЫДКИН

« 26 » _____ 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Росихина Данила Владимировича «Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, д. фарм. н., доцента И.К. Петрухиной, д. фарм. н., доцента Е.П. Гладуновой, к. фарм. н., доцента Е.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Росихина Д.В., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе расторопши пятнистой в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области фармакоэкономических исследований гепатопротекторных и диуретических лекарственных препаратов.

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе травы расторопши пятнистой и создания конкурентоспособных диуретических лекарственных средств, а также новых гепатопротекторных лекарственных препаратов – сиропа расторопши пятнистой из плодов данного растения.

Члены комиссии:

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

И.К. ПЕТРУХИНА

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

Е.П. ГЛАДУНОВА

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

Е.Л. АБДУЛМАНОВА

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор И.Л. ДАВЫДКИН

«26» 03 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Росихина Даниила Владимировича «Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии: зав. кафедрой фармацевтической технологии, д. фарм. н., профессора С.В. Первушкина, доцента, к. фарм. н. Л.Д. Климовой, старшего преподавателя, к. фарм. н. О.В. Бер подтверждает использование материалов диссертационного исследования Росихина Д.В., посвященного изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и препаратов на основе расторопши пятнистой в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по производству лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья расторопши пятнистой.

Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья и лекарственных препаратов являются методической и методологической основой для научного обоснования ресурсосберегающих технологий.

Члены комиссии:

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



С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры фармацевтической технологии,
к. фарм. н.



Л.Д. КЛИМОВА

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



О.В. БЕР

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

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор И.Л. ДАВЫДКИН

« 26 » 03 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Росихина Даниила Владимировича «Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д. фарм. н., профессора В.А. Куркина, д. фарм. н., профессора Е.В. Авдеевой, доцента, д. фарм. н. О.Е. Правдивцевой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Росихина Д.В., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных препаратов на основе сырья расторопши пятнистой, содержащего фенилпропаноиды, флавоноиды (трава); флаволигнаны и жирное масло (плоды), в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и аспирантами, а также в научно-исследовательской работе.

Внедренные результаты способствуют разработке объективных методик диагностики и определения качества сырья расторопши пятнистой и препаратов на основе данного растения.

Члены комиссии:

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

В.А. КУРКИН

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

Е.В. АВДЕЕВА

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

О.Е. ПРАВДИВЦЕВА

«Утверждаю»
 Проректор по научной и инновационной работе
 ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
 д.м.н., профессор  М.Л. ДАВЫДКИН
 «26» 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Росихина Данила Владимировича
 «Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования
 расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)» на соискание ученой степени
 кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая
 химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического
 факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета:
 зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, доцента к.фарм.н. А.В. Воронина,
 доцента, к.б.н. Н.В. Расцветовой, доцента, к.х.н. С.Х. Шариповой подтверждает
 использование материалов диссертационного исследования Росихина Д.В., посвященного
 изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию
 подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных
 препаратов расторопши пятнистой в учебном процессе при проведении практических
 занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения
 лекарственного растительного сырья, содержащего фенилпропаноиды, флавоноиды и
 флаволигнаны.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации
 лекарственных препаратов на основе расторопши пятнистой.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета,
 к. ф. н.,
 доцент

 А.В. ВОРОНИН

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

 Н.В. РАСЦВЕТОВА

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
 к. х. н.
 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

 С.Х. ШАРИПОВА

«Утверждаю»

Генеральный директор

ЗАО «Самаралектравы»

Н.Д. ЛУЖНОВ

« _____ » 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Росихина Даниила Владимировича «Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой (*Silybum marianum*(L.) Gaertn.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загорянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Росихина Д.В., посвященного разработке способа получения и методик анализа препарата «Расторопши пятнистой настойка» и препарата «Сироп расторопши пятнистой» из препарата «Силимар», а также изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья – травы расторопши пятнистой в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа травы расторопши пятнистой, а также настойки из данного вида сырья и сиропа из лекарственного препарата «Силимар» апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе расторопши пятнистой.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»

А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»

А.В. НИКИТЕНКОВ

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

«Утверждаю»

Начальник центра ГБУЗ

«Центр контроля качества лекарственных
средств Самарской области»

Е.А. КАЛАБУХОВА

«26» 03 2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Росихина Данила Владимировича «Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» заместителя начальника центра Демидовой Г.А., провизора-аналитика Ибадовой М.А., провизора-аналитика Ждамировой О.К. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Росихина Д.В., посвященного фармакогностическому изучению по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на ее основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы предприятия. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и УФ-спектроскопии в присутствии ГСО силибина, ГСО цинарозида, ГСО апигенина, РСО рутина, РСО кофейной и РСО хлорогеновой кислоты. Методики определения подлинности сырья и препаратов расторопши пятнистой, а также методики определения суммы фенилпропаноидов, флавоноидов и флаволигнанов воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Росихина Д.В. будет способствовать повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья расторопши пятнистой, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

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

Г.А. ДЕМИДОВА

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

М.А. ИБАДОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области»
443070, г. Самара, ул. Партизанская, д. 33

О.К. ЖДАМИРОВА

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2647452

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СИРОПА РАСТОРОПШИ
ПЯТНИСТОЙ**

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

Авторы: *Куркин Владимир Александрович (RU), Росихин Данил
Владимирович (RU), Рыжов Виталий Михайлович (RU),
Лужнов Николай Данилович (RU)*

Заявка № 2016138502

Приоритет изобретения 28 сентября 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 15 марта 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 28 сентября 2036 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

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

_____ **Е.И.**

САКАНЯН

«___» _____ 20__ г

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

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

Расторопши пятнистой
трава

ФС 42 –
Вводится впервые

Silybi mariani herba

	Срок	введения
установлен	с « _____ 20__ г.	
до « _____ 20__ г.		

Собранная в период сбора плодов и высушенная надземная часть
культивируемого травянистого растения расторопши пятнистой - *Silybi
mariani* (L.) Gaertn., сем. Астровых — *Asteraceae*, цельная, измельченная,
используемая для производства лекарственных средств и применяемая в
качестве лекарственного средства.

Спецификация
лекарственного растительного сырья
«Расторопши пятнистой трава»

Показатели	Используемый метод	Нормируемое значение
1	2	3
Внешние признаки	<i>Просмотр невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х) или стереомикроскопа (8х, 16х, 20х, 40х).</i>	Соответствие морфологическим признакам.
Микроскопия	Просмотр под микроскопом с увеличением <i>(не менее 40х).</i>	Соответствие анатомическим признакам.
Качественные реакции	1. Качественная реакция. 2. УФ-спектр 3. ТСХ-анализ.	1. положительная цианидиновая реакция: розовое окрашивание. 2. соответствует приведенному рисунку. 3. ТСХ: наличие хлорогеновой кислоты с R_f около 0,5, пятна кофейной кислоты с $R_f=0,7$

Внешние признаки. Сырье исследуется невооруженным глазом, с помощью лупы (x10) или стереомикроскопа (8х, 16х, 20х, 40х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIII).

Цельное сырье. Листовые пластинки, стебли, цветоносы и фрагменты соцветий. Листья простые, сидячие, струговидной формы с низбегающим основанием, на стебле расположены очерёдно, у основания стебля образуют

мутовку. Листовая пластинка в верхней части перисто-раздельная, к низу перисто-рассеченная. Край листовой пластинки двояко пильчатый со светло-желтыми остистыми шипами в углах. С верхней стороны листа цвет темно-зелёный с характерными бело-серыми пятнами по вторичным жилкам, что создаёт их специфическую пёструю окраску. Центральная жилка светло-зелёная, расширяющаяся к основанию листа. С нижней стороны лист однородно окрашен в светло-зелёный цвет без белых пигментных пятен. Вся поверхность листа гладкая глянцевая. Ближе к основанию молодых листьев заметно бело-войлочное опушение.

Стебли прямостоячие округлые с равномерной ребристостью. У основания стебли почти не опушены. Цветоносы окрашены темнее основного стебля и покрыты войлочным опушением.

В сырье могут встречаться соцветия и его фрагменты: обёртки, темно-бурые семянки и трубчатые цветки пурпурного цвета.

Запах сырья своеобразный, вкус - горький.

Измельченное сырье – измельченные листовые пластинки с остистыми шипами и характерной пятнистой окраской поверхности, фрагменты стеблей светло-зеленого цвета, цветоносы с войлочным опушением и заметной однородной ребристостью. Могут встречаться фрагменты цветочных корзинок, отдельные язычковые цветки пурпурного цвета, фрагменты цветоложа и листочков обертки, фрагменты семян, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм.

Цвет от светло-зеленого до зеленовато-бурого. Запах сырья своеобразный, вкус - горький.

Порошок. Смесь кусочков листовых пластинок, себелей, цветоносов, язычковых цветков, цветоложа, листочков обертки, семян, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет зеленый с желтыми, зеленовато-бурыми, коричнево-желтыми вкраплениями. Запах своеобразный, вкус - горький.

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

Цветоносы растения на поперечном сечении округлой формы с равномерной волнообразной ребристостью края (рис. 1-1). В ложбинах ребер локализована хлоренхима, ярко заметная на фоне исходно слабоокрашенных тканей стебля (рис. 1-2).

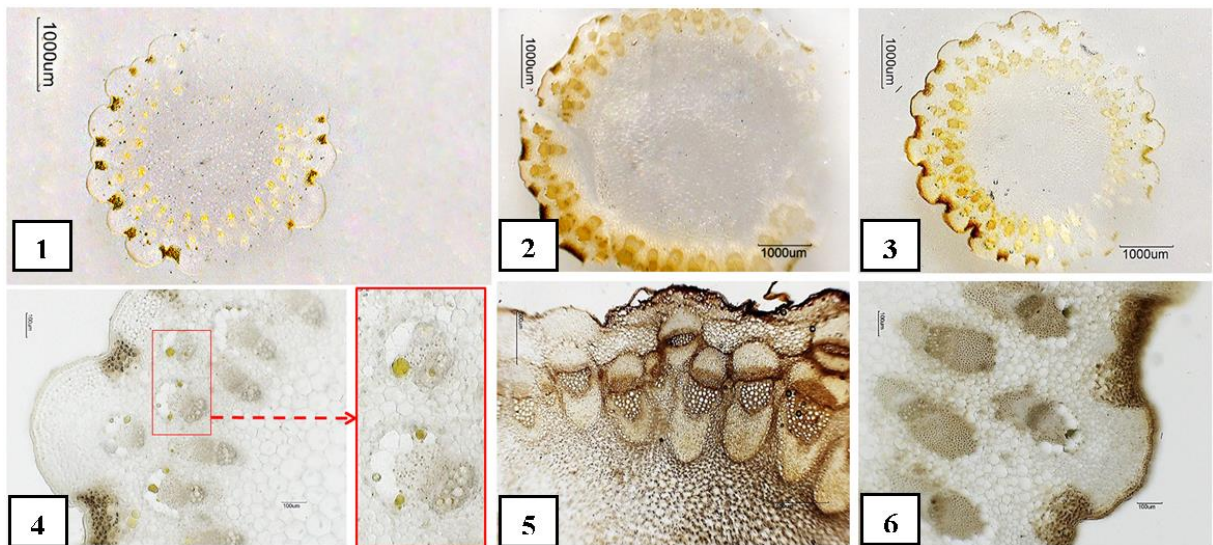


Рисунок 1 – Поперечное сечение стеблей: 1 - Цветонос расторопши (x40), 2 – стебель $d=1,5\text{ см}$ (x40), 3 - стебель $d=1\text{ см}$ (x40), 4 – ребристость и пигментация обкладки пучков (x100), 5 – крупные сближенные пучки (x100), 6 – двух рядность стели стебля (x100).

Проводящая система побега переходного типа строения. Пучки различаются по размеру и форме и нестандартно расположены в два круга (рис. 1). Первый, основной круг, расположен ближе к центру и состоит из крупных вытянутых пучков овальной формы. Второй круг расположен ближе к периферии и представлен округлыми мелкими пучками, размещенными в рёбрах, непосредственно под колленхимой рёбер стебля (рис. 1-6).

В пучках, со стороны флоэмы, имеется крупноклеточная обкладка. Клетки обкладки крупные, широко-просветные, оболочки их целлюлозные. В клетках хорошо заметны капли желтого пигмента, растворимого в спирте этиловом и нерастворимого в воде.

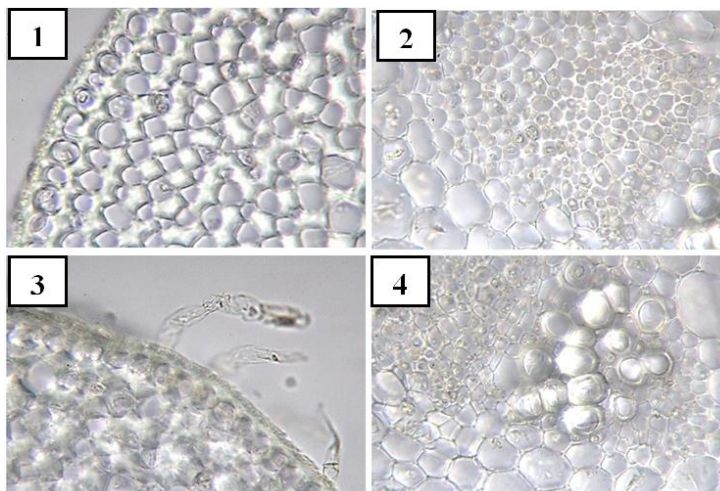


Рисунок 2 – Гистологические особенности цветоноса расторопши пятнистой: 1 – уголковая колленхима ребёр (x400); 2 – флоэмная часть пучка (x400); 3 – простые трихомы на эпидерме (x400); 4 – ксилемная часть пучка (x400).

Стебель неоднородно опушен простыми многоклеточными волосками. Волоски смятые часто обломанные, расположены, как правило, по рёбрам стебля (рис. 2-3).

Анатомия более крупных стеблей с диаметром от 1 см до 1,5 см принципиально не отличается от анатомии цветоноса. Основное гистологическое отличие заключается в развитости пучков в стебле; а именно, их армированности со стороны флоэмной части большой группой склеренхимных волокон (рис. 1-2, 1-3).

Обкладочная паренхима пучков, с нативно жёлтым содержимым, в крупных стеблях выражена слабее. Проводящие пучки расположены также, в два круга, но плотнее прилегают друг к другу (рис. 1-5).

С поверхности эпидермис неоднороден. Визуально это выражается в чередовании фрагментов эпидермы, расположенных над жилкой и в ложбинах, между рёбрами (рис. 5А).

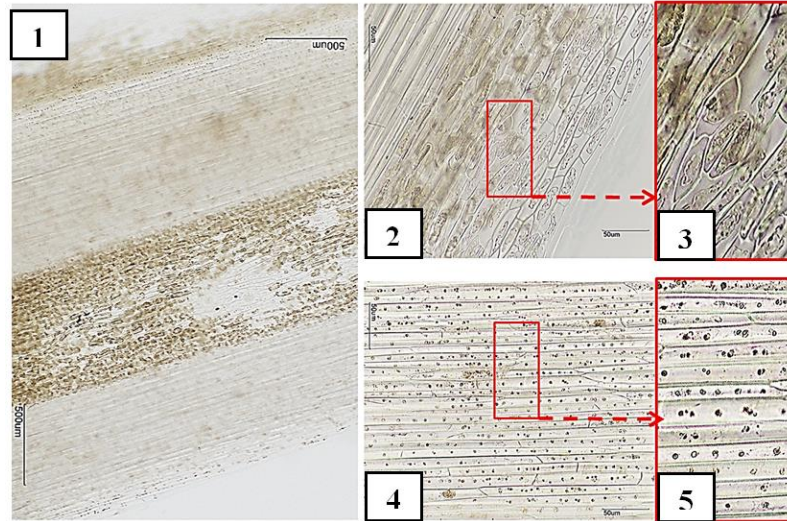


Рисунок 3 – Эпидермис стебля расторопши пятнистой: 1 – неоднородность поверхности стеблевого эпидермиса (x40); 2 – эпидермис над ложбиной (x400), 3 – устьица аномоцитного типа, 4 – эпидермис над ребром стебля (x400), 5 – хлоропласты в прозенхимных косо усечённых клетках эпидермы.

Эпидермис над жилками составлен из прозенхимных клеток с косо усеченными концами (рис. 3-1). Их клеточные стенки тонкие, целлюлозные без заметных пор. Внутри клеток хорошо визуализируются округлые пластиды желто-зеленого цвета. В области над жилками эпидермис не содержит устьичных аппаратов (рис. 3-4).

Эпидермис в ложбинах представлен клетками вытянутыми по форме, с мягко извилистыми стенками (рис. 3-2). Стенки их тонкие, целлюлозные. Протопласт клеток выраженный, аморфный, по цвету зелено-желтый. В эпидерме со стороны ложбины встречаются устьичные аппараты аномоцитного типа.

Листовая пластинка дорзовентрального типа с обеих сторон покрыта мелкоклеточным эпидермисом (рис. 4-1). Столбчатый мезофилл выражен и

насчитывает в толщину до 3-х слоев клеток (рис. 4-2). Губчатый мезофилл имеет крупные полости, которые приближены в области устьичных аппаратов непосредственно к нижнему эпидермису листовой пластинки (рис. 4-3).



Рисунок 4 – Особенности анатомии листьев расторопши пятнистой на поперечном сечении: 1 –дорзовентральная листовая пластинка (x100), 2 – выраженный столбчатый мезофилл (x400), 3 – полости в губчатом мезофилле (x400), 4 – паренхимизация центральной жилки листа (x 100), 5 - проводящий пучок коллатерального типа (x400), 6 - ксилемный участок пучка (x400), 7 – флоэмный участок с окрашенным смолистым содержимым (x400).

Широкая светло-зеленая, почти белая, центральная часть листовой пластинки на поперечном сечении сильно паренхимизирована (рис. 4-4). Основная паренхима крупноклеточная не пигментированная. В паренхиме

локализованы три далеко отстоящих друг от друга коллатеральных пучка. Пучки по размеру приблизительно одинаковые (рис. 4-5).

С флоэмной и ксилемной сторон пучки значительно армированы склеренхимными волокнами (рис. 4-6). На периферии флоэмы, выше склеренхимы, встречаются крупные клетки основной ткани со смолистым содержимым желтого цвета, ранее описанные в стеблях (рис. 4-7).

Эпидермис в центральной части листа мелкоклеточный, стенки его клеток значительно утолщены. Непосредственно под эпидермой локализуется колленхима углового типа: в два ряда с нижней и в три ряда с верхней сторон листовой пластинки.

Анализ листовой поверхности выявил, что устьичные аппараты расположены и с верхней, и с нижней стороны листа (листья амфистоматические) (рис. 5-1, 5-3).

Клетки верхнего эпидермиса, расположенного над жилкой вытянутые, угловатые, с заметными ядрами в протопласте. Их клеточные стенки без заметных поровых каналов, тонкие, целлюлозные (рис. 5-3). Размеры их на большей части листовой пластинке мелкие. Устьичные аппараты аномоцитного типа, и околоустьичные клетки заметно мельче клеток основной эпидермы (рис. 5-4).

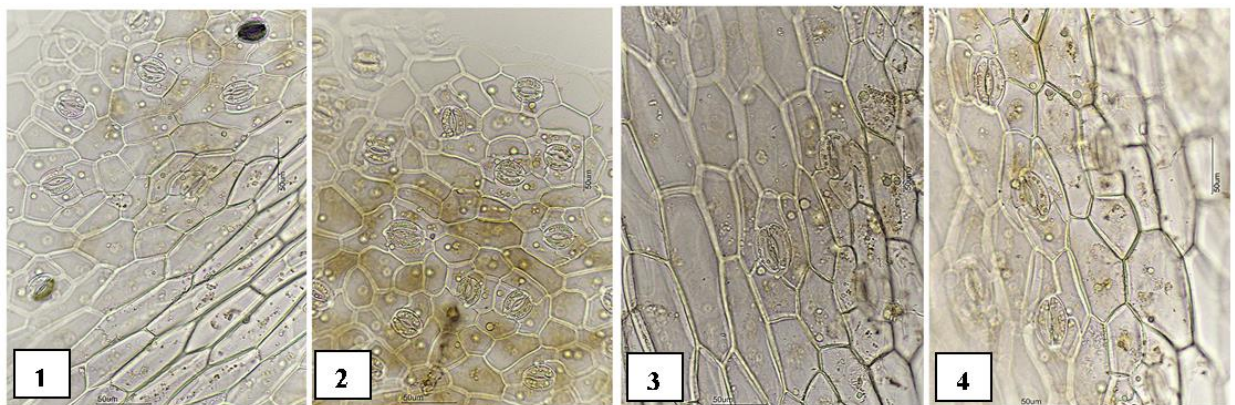


Рисунок 5 – Эпидермис листовой пластинки: 1 - нижний эпидермис листа над жилкой (x400), 2 - нижний эпидермис листа над пластинкой (x400), 3 –

верхний эпидермис листа над жилкой (x400), 4 - верхний эпидермис листа над пластинкой.

Нижний эпидермис листа расторопши сложен более мелкими по размеру клетками, со слабо извилистыми, слегка угловатыми стенками (рис. 5-1). Устьичные аппараты здесь встречаются значительно чаще, чем на верхней поверхности листа (рис. 5-2).

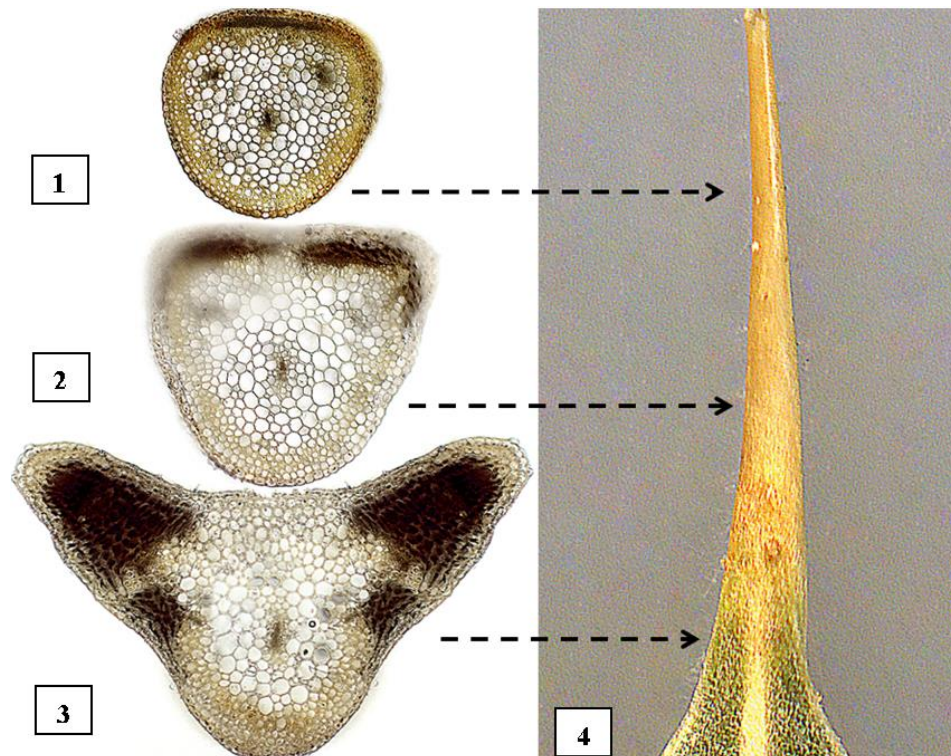


Рисунок 6 – Остистый шип, расположенный на листовой пластинке расторопши пятнистой: 1 – срез апикальной части шипа (x400); 2 – срез медиальной части шипа (x400); 3 – срез базальной части шипа (x400); 4 – нативный вид остистого шипа (x20).

По краю листовой пластинки имеются хорошо заметные остистые разно-размерные шипы светло-желтого цвета (рис. 6-4).

Форма поперечного сечения в апикальной части шипа округлая. Далее по длине листовой пластинки наблюдается изменение округлой формы сечения в треугольную в медиальной части, и крылатую в базальной части шипа (рис. 6-1, 6-2, 6-3).

Шип покрыт толстостенной эпидермой, под которой локализована основная ткань с лигнифицированными стенками. Проводящие ткани сложены в три мелких коллатеральных пучка, раздвинутых к поверхности. В медиальной части поперечных сечений в структуре шипа появляется хлоренхима, расположенная строго с адаксиальной, т.е. верхней стороны шипа. В этой области заметна треугольная форма поперечного среза, впоследствии переходящая в листовую пластинку. В медиальной части шипов под эпидермисом локализована уголковая колленхима.

Измельченное сырье.

Диагностируются фрагменты цветоносов с волнообразной ребристостью края, фрагменты эпидермиса цветоноса с чередующимися областями ребра и ложбины, Фрагменты стебля опушенного простыми смятыми непигментированными волосками, фрагменты стеблей с проводящими элементами ксилемы и волокнами склеренхимы, фрагменты флоэмных частей проводящих пучков с заметными каплями желтого пигмента, растворимого в спирте этиловом и нерастворимого в воде. Часто встречаются фрагменты листовых пластинок с устьичными аппаратами аномоцитного типа; фрагменты крупных шипов светло-желтого цвета с толстостенной эпидермой.

Порошок.

В порошке обнаруживаются фрагменты: основной непигментированной и хлорофиллоносной паренхимы цветоносов, мелкие части эпидермиса листа и цветоноса с аномоцитами устьичными аппаратами, стеблей с проводящими элементами ксилемы и волокнами склеренхимы, флоэмных частей проводящих пучков с редкими каплями желтого пигмента, листовых пластинок с устьичными аппаратами аномоцитного типа; склеренхимной ткани шипов светло-желтого цвета.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. К 1 мл полученного извлечения (раствор А, см. раздел «Количественное определение») прибавляют цинк металлический (1 таблетка) или 0,1 г порошка магния, после прибавляют 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты; постепенно появляется розовое окрашивание (флавоноиды).
2. Ультрафиолетовый спектр раствора А (см. раздел «Количественное определение») в области от 100 нм до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны $333 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$, а также «плечо» в области $296 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ (гидроксикоричные кислоты) (рис. 7).

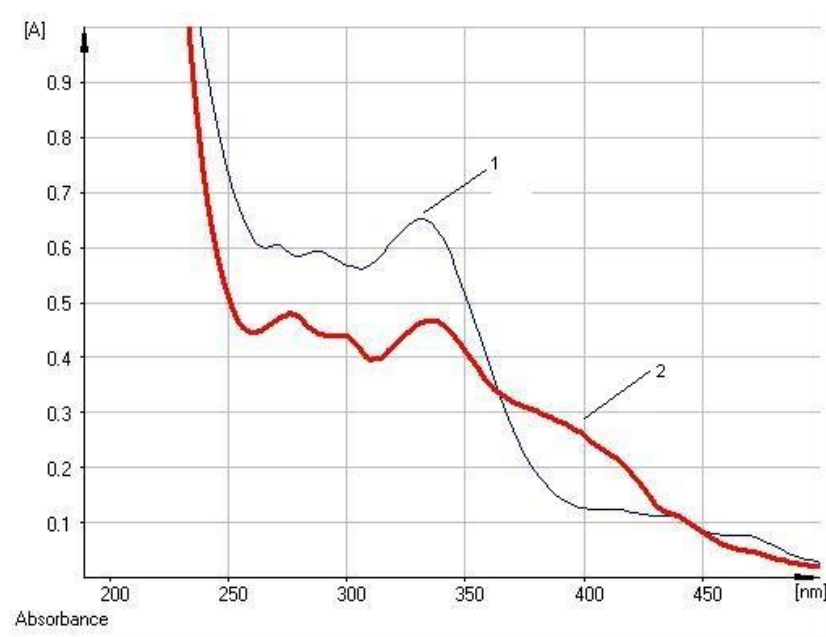


Рисунок 7 – УФ-спектр водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой (1:2500) исходный (1); с добавлением AlCl_3 (2).

*Приготовление растворов***3. Тонкослойная хроматография**

1. Приготовление раствора диазобензолсульфокислоты. 0,01 г диазобензолсульфокислоты (ГФ Х, стр. 876) растворяют в 10 мл 10 % раствора натрия карбоната.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление раствора ГСО цинарозида. Около 0,02 г (точная навеска) цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15-20 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А).
3. Раствор стандартного образца (СО) хлорогеновой кислоты. 0,02 г СО хлорогеновой кислоты растворяют в 25 мл спирта 70 %. Срок годности раствора 3 месяца при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» размером 10 х 10 см или размером 10 х 15 и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100 - 105 °С в течение 1 ч. На линию старта пластинки микропипеткой наносят 0,02 мл водно-спиртового извлечения (см. раздел «Качественные реакции», пункт 1) в виде точки. Рядом микропипеткой наносят 0,01 мл раствора хлорогеновой кислоты (раствор А) в виде точки и 0,01 мл раствора ГСО цинарозида (раствор А) в виде точки (см. примечание «Приготовление раствора Государственного стандартного образца цинарозида»). Хроматографическую пластинку помещают в камеру, которую предварительно насыщают в течение 1 часа смесью растворителей: *n*-бутанол – этанол – аммиак (7:2:5), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 8 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм. При этом на хроматограмме обнаруживается пятно с величиной R_f около 0,5 (хлорогеновая кислота) совпадающее с пятном стандарта хлорогеновой кислоты. Кроме того обнаруживается пятно фиолетового цвета R_f около 0,4, и пятно с $R_s = 0,1$, совпадающее по подвижности с ГСО цинарозида. Затем хроматограмму проявляют щелочным раствором

ФС 42-_____ С.13

диазобензолсульфокислоты и нагревают при 100-105 °С. При этом пятно хлорогеновой кислоты приобретает коричневую окраску. Допускается наличие других пятен, в частности, апигенина (величина R_f около 0,8) и кофейной кислоты (величина R_f около 0,7).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок - не более 12 %.

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок - не более 9 %.

Посторонние примеси

Остатки цветоносов, в том числе отделенные от корзинок при анализе. Цельное сырье – не более 2 %.

Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). Цельное сырье, измельченное сырье – не более 4 %.

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

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 0,5 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

ФС 42-_____ С.14

Около 1 г сырья (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывают той же пробкой снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через фильтр с красной полосой (извлечение из травы). Испытуемый раствор для анализа готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор А). Раствором сравнения служит 70% этиловым спиртом (раствор сравнения А).

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

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{497 \times m \times 1 \times (100-W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты;

m – масса сырья, в граммах;

W – потеря в массе при высушивании, в процентах

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Ректор ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
Академик РАН, лауреат
Государственной премии РФ и
дважды лауреат премии
Правительства РФ, заслуженный
деятель науки РФ, профессор

Г.П. Котельников
«__» _____ 2018 г.

Заведующий кафедрой фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России, доктор
фармацевтических наук, профессор

В.А. Куркин
«__» _____ 2018 г.

Очный аспирант кафедры
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
России

Д.В. Росихин
«__» _____ 2018 г.