

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

На правах рукописи

БЕЛОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРНЕЙ И ТРАВЫ
СОЛОДКИ ГОЛОЙ (*GLYCYRRHIZA GLABRA* L.) И СОЛОДКИ УРАЛЬСКОЙ
(*GLYCYRRHIZA URALENSIS* FISH.)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Куркин Владимир Александрович,
доктор фармацевтических наук, профессор

Самара – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. РОД <i>GLYCYRRHIZA</i> L. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	18
1.1. Ботаническая характеристика видов рода Солодка (<i>Glycyrrhiza</i> L.) .	18
1.2. Химический состав надземной части <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. и <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fish.	20
1.3. Химический состав корней солодки уральской и солодки голой	24
1.4. Изучение фармакологической активности надземной части солодки голой и солодки уральской	27
1.5. Фармакологическая активность корней солодки голой и солодки уральской	30
1.6. Современные подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья «Солодки корни»	34
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Объекты исследования.....	37
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Методы микроскопического анализа	39
2.2.2. Методы химического анализа	39
2.2.3. Хроматографические методы анализа	40
2.2.4. Спектральные методы анализа	42
2.2.5. Технологические методы	43
2.2.6. Фармакологические методы исследования	43
2.2.7. Статистическая обработка результатов исследования	45
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (<i>GLYCYRRHIZA GLABRA</i> L.)	49
3.1. Сравнительный морфологический анализ надземных частей видов рода <i>Glycyrrhiza</i> L.....	49

3.1.1. Сравнительная морфология листьев видов рода <i>Glycyrrhiza</i> L.	51
3.1.2. Сравнительная морфология плодов видов рода <i>Glycyrrhiza</i> L.	54
3.1.3. Сравнительная морфология цветков видов рода <i>Glycyrrhiza</i> L.	55
3.2. Сравнительный анатомо-гистологический анализ надземных частей видов рода <i>Glycyrrhiza</i> L.	57
3.2.1. Анатомо-гистологический анализ листьев <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	57
3.2.1.1 Анатомия листовой пластинки <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	58
3.2.1.2. Петиолярная анатомия листа <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	62
3.2.2. Анатомо-гистологический анализ стеблей <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	65
3.2.3. Анатомо-гистологический анализ плодов <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	69
3.2.4. Анатомо-гистологический анализ семян <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	70
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	72
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (<i>GLYCYRRHIZA GLABRA</i> L.)	73
4.1. Выделение индивидуальных веществ из изучаемого вида сырья	73
4.2. Изучение и идентификация индивидуальных веществ травы солодки голой	76
4.2. Сравнительный ТСХ-анализ надземных органов рода Солодка (<i>Glycyrrhiza</i> L.)	79
4.3. Исследование компонентного состава травы солодки голой (<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.) и солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fish.) методом ВЭЖХ	80
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	84

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (<i>GLYCYRRHIZA GLABRA</i> L.)	85
5.1. Качественный анализ травы солодки голой химическими методами.....	85
5.2. Качественный анализ травы солодки голой методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии	86
5.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой	89
5.4. Разработка методики количественного определения пиноцембрина в траве солодке голой.....	98
5.5. Обоснование способа получения стандартного образца пиноцембрина из травы солодки голой	105
5.6. Исследование динамики накопления флавоноидов в траве солодке голой	108
5.7. Определение общих показателей нового лекарственного растительного сырья «Солодки голой трава».....	111
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	113
ГЛАВА 6. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ КОРНЕЙ СОЛОДКИ	115
6.1. Разработка методики качественного анализа БАС растительного сырья корней солодки	115
6.2. Разработка методики количественного анализа БАС растительного сырья корней солодки	117
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	129
ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (<i>GLYCYRRHIZA GLABRA</i> L.) И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	130
7.1. Изучение влияния на экскреторную функцию почек густого экстракта и флавоноидов травы солодки голой	130

7.2. Изучение нейротропной активности густого экстракта и флавоноидов травы солодки голой.....	132
7.3. Изучение острой токсичности густого экстракта травы солодки голой	134
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7.....	135
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
Список литературы.....	140
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	157
Приложение 1. Сравнительный морфологический анализ надземной части представителей рода <i>Glycyrrhiza L.</i>	158
Приложение 2. ЯМР- и масс-спектры индивидуальных веществ, выделенных из травы солодки голой.....	164
Приложение 3. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве солодке голой»	172
Приложение 4. Акты внедрения результатов исследовательской работы	173
Приложение 5. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Солодки голой трава».....	180
Приложение 6. Проект фармакопейной статьи на стандартный образец пиноцембрин	193

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В Российской Федерации (РФ) утверждена «Стратегия развития фармацевтической промышленности в Российской Федерации на период до 2030 года», определяющая развитие фармацевтической отрасли. Разработка безопасных и эффективных лекарственных препаратов (ЛП) – одно из основных приоритетных направлений для фармацевтической индустрии и промышленного сектора экономики РФ. В настоящее время внутренняя политика государства сосредоточена на сохранение технологического суверенитета в сфере производства лекарственных препаратов и медицинских изделий.

Фармакогнозия играет важную роль в развитии и формировании ассортимента лекарственных растительных средств (ЛРС). Согласно данным Государственного реестра лекарственных средств и литературных источников, количество ЛП растительного происхождения превышает около 4000 наименований (Государственный реестр лекарственных средств; Самылина И.А. и др., 2016; Киселева Т.Л. и др., 2013). Для расширения номенклатуры ЛРС выстраиваются такие приоритетные задачи, как: поиск значимых природных соединений, изучение химического состава новых видов ЛРС, а также расширение представлений о потенциале уже официального ЛРС, исследование показателей качества ЛРС и ЛП, усовершенствование и решение актуальных вопросов стандартизации ЛРС и ЛП, исследование способов получения и обоснование использования в лечебной практике (Куркин В.А., Авдеева Е.В. и др., 2016).

Диссертационная работа посвящена фармакопейным видам рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.), а именно солодке голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодке уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). Применение корней солодки данного растения в медицинской практике уже исторически обосновано и доказано исследованиями (Куркин В.А., 2014; Егоров М.В., 2005; В.А. Куркин, Т.К. Рязанова и др., 2021; Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н. и др., 2018; Бровченко Б.В., Ермакова В.А. и др., 2018). Однако надземная часть в РФ не используется в

качестве источника ЛП. В ходе литературного обзора нами был выявлен интерес ряда зарубежных и отечественных ученых (Юлдашев М.П., Нигматуллаев А.М. и др., 2000; Миртурсунова И.М., Абдурахманов Б.А. и др., 2019; Siracusa L., Occhiuto C. et al., 2020; Molonia M.S., Occhiuto C. et al., 2018; Tundis R., 2019; Яницкая А.В., О.В. Недилько и др., 2020) к изучению химического состава травы солодки голой, в связи с содержащимися в них фенольных соединений флавоноидной природы, что свидетельствует об актуальности комплексной переработки данного растения.

Актуальным является и вопрос стандартизации корней солодки голой. Необходим пересмотр и доработка методов качественного и количественного анализа, отвечающих современным требованиям.

Степень разработанности темы. В медицинской практике Российской Федерации широко используются корни солодки (ГФ РФ XIV изд.), тогда как другие виды сырья данного растения не применяются.

Исследования химического состава надземной части (трава) солодки голой посвящены изучению флавоноидного состава. Основными ведущими флавоноидами являются пиноцембрин, глабринин, пурнетин (Юлдашев М.П., Нигматуллаев А.М. и др., 2000; Миртурсунова И.М., Абдурахманов Б.А. и др., 2019). Разработанные методики регламентируют количественное и качественное содержание суммы флавоноидов в траве солодки голой (Маматханова М.А., Абдурахманов Б.А. и др., 2016). Исходя из трудоемкости проведения пробоподготовки (многократной экстракции сырья 96% этиловым спиртом), дополнительных вспомогательных операций, в том числе упаривания и фильтрования, считаем актуальным проведение оптимизации методик анализа травы солодки голой.

Ранее зарубежными учеными установлена фармакологическая активность (гепатопротекторная, нейропротекторная, антибактериальная и др.) извлечения травы солодки голой, а также выделенных веществ из данного сырья (Юлдашев

М.П., Нигматуллаев А.М. и др., 2000; Aiello F., Armentano B., 2017; Tundis R., 2019; Lee I. Y., Chang S.F., et al., 2022).

Следовательно, актуальным является изучение химического состава травы солодки голой и решение проблем стандартизации перспективного вида ЛРС – травы солодки голой.

Методики стандартизации, применяемые в анализе ЛРС и препаратов корней солодки, недостаточно обоснованы в плане особенностей химического состава корней солодки, следовательно, в недостаточной степени специфичны. В ГФ РФ XIV издания ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни», в разделе «Подлинность» предусматривается определение кверцетина, однако данный флавоноид отсутствует в сырье. Диагностически значимым флавоноидом для корней солодки является ликуразид. В разделе «Количественное определение» рассматривается определение глицирризиновой кислоты в испытуемом сырье методом спектрофотометрии. Однако этот метод не учитывает возможность количественного определения диагностически значимого флавоноида (халкона) – ликуразида.

Цель работы и основные задачи исследования. Цель диссертационной работы заключается в проведении фармакогностического исследования корней и травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) по научному обоснованию разработки и совершенствования методов стандартизации растительного сырья.

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

1. Сравнительный морфологический анализ травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.), а также и других примесных видов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.), а также анатомо-гистологическое исследование травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).

2. Выделение индивидуальных веществ из травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.), а также сравнительное изучение химического состава

травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и других примесных видов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.).

3. Разработка методик качественного анализа травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).

4. Разработка методик качественного анализа травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).

5. Разработка способа получения стандартного образца пиноцембрина из травы солодки голой.

6. Изучение динамики накопления действующих веществ в зависимости от стадии вегетации травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).

7. Разработка методик качественного и количественного определения БАС – глицирризиновая кислота и ликуразид в сырье корней солодки.

8. Изучение диуретической, нейропротективной активности густого экстракта из травы солодки голой, а также выделенных из данного вида сырья индивидуальных веществ – пиноцембрина, генистеина, изоглабранина.

9. Разработка проекта фармакопейных статей (ФС) на перспективный вид ЛРС «Солодки голой трава» и стандартного образца (СО) пиноцембрина.

Научная новизна. По результатам анатомо-гистологического исследования травы солодки голой позволило выявить впервые диагностические признаки, характерные для данного растения. В ходе изучения сравнительного морфологического анализа представителей рода *Glycyrrhiza* L., были выявлены особенные признаки травы солодки голой, позволяющие отличить от других примесных видов.

В процессе изучения химического состава травы солодки голой были выделены пиноцембрин (5,7-дигидроксифлаванон), генистеин (5,7,4'-тригидроксиизофлаванон), изоглабранин (5,7-дигидрокси-6-пренилфлаванон). Генистеин и изоглабранин ранее впервые выделены из травы данного растения. Пиноцембрин впервые выделен из травы солодки голой, культивируемой на территории Российской Федерации. Идентификация осуществлялась с

использованием УФ-, ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

Впервые разработаны методики проведения ТСХ-анализа травы солодки голой, количественного анализа суммы флавоноидов в траве солодки голой в пересчете на пиноцембрин методом дифференциальной спектрофотометрии. Научно обоснована целесообразность определения содержания пиноцембрина в траве солодке голой методом ВЭЖХ.

Изучена динамика накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой на протяжении всего вегетационного периода. Установлено, что оптимальное время сбора сырья данного растения является период плодоношения.

Обнаружена диуретическая и нейротропная активность густого экстракта солодки голой, а также индивидуальных веществ – пиноцембрина, генистеина. Проведено исследование острой токсичности густого экстракта травы солодки голой.

Разработаны проекты фармакопейных статей на ЛРС «Солодки голой трава» и стандартный образец (СО) пиноцембрина. Усовершенствована методика качественного анализа методом ТСХ с учетом химического состава. Также научно обосновано использование ГСО глицирама и СО ликуразида в методике количественного анализа методом ВЭЖХ корней солодки.

Патент Российской Федерации на изобретение № 2806047 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой» – подтверждение научной новизны диссертационной работы.

Теоретическая и практическая значимость. В ходе исследования из травы солодки голой выделен и описан доминирующий, диагностически значимый флавоноид – пиноцембрин. Также были выделены ранее не описанные флавоноиды для данного растения: генистеин и изоглабрин. Разработаны методики качественного и количественного анализа БАС в траве солодки голой. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой (в пересчете на пиноцембрин) методом дифференциальной

спектрофотометрии, а также методика количественного определения пиноцембрина с использованием метода ВЭЖХ.

Разработана технология получения стандартного образца пиноцембрина. Установлены предельные значения показателей качества СО пиноцембрина (ФС «Пиноцембрин – стандартный образец»).

Проведена исследовательская работа по совершенствованию методик качественного и количественного анализа ЛРС корня солодки с учетом химического состава.

Установлена диуретическая активность для выделенных веществ из травы солодки голой – пиноцембрина, генистеина. Густой экстракт травы солодки голой обладает антидепрессантом действием, что было определено в ходе фармакологического исследования.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследовательской работы интегрированы в образовательные и научно-исследовательские процессы в Институте фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: на кафедре фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедре управления и экономики фармации – базовой кафедры «Аптеки Плюс», кафедре химии Института фармации, а также Научно-образовательного центра «Фармация».

Разработанные методики анализа травы солодки голой апробированы на предприятиях ЗАО «Самаралектравы», ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Личный вклад автора. Все результаты исследования, описанные в диссертационной работе, получены автором. По результатам анатомо-гистологического и сравнительного морфологического анализа установлены диагностические признаки сырья травы солодки голой. Проведено сравнительное фитохимическое исследование представителей рода Солодка. Выделены и идентифицированы 3 индивидуальных вещества из травы солодки голой – пиноцембрин, генистеин, изоглабринин.

Изучен химический состав травы солодки голой, выявлен диагностически значимый флавоноид – пиноцембрин. Разработаны методики качественного и количественного анализа БАС травы солодки, а именно: ТСХ-анализ, спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов (в пересчете на пиноцембрин). Научно обоснована целесообразность определения содержания пиноцембрина в траве солодке голой методом ВЭЖХ.

Проведена работа по разработке технологии получения стандартного образца пиноцембрина. Изучения динамика накопления флавоноидов в траве солодки голой в период вегетации.

Усовершенствованы методики качественного анализа ликуразида и глицирризиновой кислоты, разработана методика количественного определения методом ВЭЖХ БАС в корнях солодки с использованием ГСО глицирама и СО ликуразида

Изучена диуретическая и нейротропная активность густого экстракта травы солодки голой и индивидуальных веществ – пиноцембрина, генистеина, изоглабранина. Проведено исследование по острой токсичности густого экстракта.

Разработаны проекты ФС на новый вид ЛРС «Травы солодки голой» и СО пиноцембрина.

Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ. Исследовательская работа была осуществлена с учетом плана научно-исследовательских работ Самарского государственного медицинского университета, а именно в рамках выполнения темы НИОКР: «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (регистрационный номер: АААА-А19-119051490148-7, дата регистрации: 14.05.2019 г.)

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы базируется на углубленном и детальном изучении, а также систематизации

литературных данных о фармакогностических исследованиях различных морфологических органов солодки голой и солодки уральской, а также и других примесных видов рода Солодка, оценке актуальности и степени разработанности выбранной темы исследования.

Была определена цель работы, сформулированы необходимые для ее выполнения задачи, а также составлен план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами данного исследования являлись трава и корни солодки голой и солодки уральской, собранные на территории Самарской области, Оренбургской области, Республики Казахстан, промышленные образцы корней солодки, а также примесные виды рода Солодка. Исследование проводилось с применением методов цифровой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии, УФ-спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, колоночной хроматографии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, цветных пробирочных и гистохимических реакций, фармакологических и микробиологических методов.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» ГФ РФ XV издания и ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» ГФ РФ XIV издания.

Степень достоверности научных положений основана на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования, корректностью обработки информации, использованием актуальных и проверенных источников информации. Обработка результатов исследований проведена с использованием математических методов анализа данных в соответствии с ГФ РФ XV издания и ГФ РФ XIV издания.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, описанные в диссертационном исследовании, соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по следующим направлениям исследования:

2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»;

3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»;

5 – «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье»;

6 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты анатомо-гистологического исследования травы солодки голой.

2. Результаты сравнительного морфологического исследования травы солодки голой и солодки уральской, а также и других примесных видов рода Солодка.

3. Результаты исследования химического состава травы солодки голой, в том числе выделение и идентификация индивидуальных соединений.

4. Результаты сравнительного фитохимического исследования травы солодки голой и ее примесных видов.

5. Данные исследования по разработке подходов к качественному анализу травы солодки голой методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии.

6. Результаты разработки методики количественного содержания суммы флавоноидов в траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) в пересчете на пиноцембрин.

7. Результаты разработки методики количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

8. Результаты качественного и количественного определения БАВ в ЛРС «Солодки корни».

9. Разработанные проекты фармакопейных статей «Солодки голой трава» и стандартного образца «Пиноцембрин – стандартный образец».

Публикации. По теме диссертационного исследования автором 11 печатных работ, 5 статей в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, и 3 статьи в журналах, индексируемых в МБД. Получен 1 патент РФ на изобретение № 2806047.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на научных конференциях различных уровней: XI Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения» (Москва, 2023); Научно-практическая конференция «Гаммермановские чтения» (Пермь, 2023); Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Инновации в медицине и фармации 2021» (Минск, 2021); XI международный симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2022); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы» (Самара, 2021,

2022, 2023); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2021; 2022, 2023).

Объем и структура работы. Общий объем диссертационной работы составляет 195 страниц машинописного текста, на которых изложены ход и результаты исследования. В диссертационной работе содержатся 33 таблицы и 66 рисунков. Работа включает в себя введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, 5 глав, представляющих результаты исследования, вывод и заключение, список литературы, состоящий из 139 источников, из них 79 зарубежных, а также приложения.

Во введении содержится описание актуальности тема диссертационного исследования, цель, задачи, научная новизна и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях по теме исследования и апробации работы.

Глава 1 представляет собой обзор литературы в области фармакогностических исследований солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.). В главе подробно рассматриваются ботаническое описание видов, химический состав, также данные о фармакологических свойствах корней и травы данных видов. Также приведена информация о стандартизации сырья, а также о методах количественного анализа корней солодки.

Глава 2 содержит описание объектов и методов исследования.

Глава 3 данного исследования посвящена результатам анатомо-гистологического исследования травы солодки голой. Кроме того, данная глава содержит сведения сравнительного морфологического анализа травы солодки голой, солодки уральской и примесных видов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.)

В **главе 4** приведены результаты выделения индивидуальных веществ из травы солодки голой. Они включают в себя данные о химическом строении и структуре выделенных соединений. Отражены результаты фитохимического

анализа травы солодки голой, солодки уральской и примесных видов рода Солодка.

В главе 5 рассматривается разработка методик качественного и количественного анализа травы солодки голой, а также разработке новой технологии получения СО пиноцембрина. Приведены результаты исследования динамики накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой и рекомендуемые числовые показатели сырья, включенные в проект ФС на новый вид ЛРС «Солодки голой трава».

Глава 6 содержит результаты исследований по разработке методик качественного и количественного определения БАВ – ликуразида, глицирризиновой кислоты в корнях солодки.

В главе 7 отражены результаты исследования диуретической и нейротропной активности густого экстракта травы солодки голой, а также индивидуальных веществ – пиноцембрина, генистеина, изоглабранина. Проведенные результаты острой токсичности густого экстракта травы солодки голой.

Диссертационная работа завершается выводами, заключением, практическими рекомендациями, описанием перспектив дальнейших исследований и списком литературы, а также приложениями.

ГЛАВА 1. РОД *GLYCYRRHIZA* L. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Представители рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.), а именно официальные виды – солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) используются в медицинской практике. Корни солодки применяются при промышленном производстве густого и сухого экстракта, сиропа, растительных сборов и др. [17, 20, 23, 33]. Лекарственные препараты на основе корней солодки используют при комплексной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний дыхательных путей, хронических воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, гипофункции коры надпочечников [12, 21, 23, 25, 31, 42].

В настоящее время трава солодки голой и солодки уральской не являются фармакопейным ЛРС, несмотря на интерес зарубежных ученых к данным видам растительного сырья [39, 40, 59, 66, 73, 78, 138].

1.1. Ботаническая характеристика видов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.)

Согласно литературным данным ботанический род *Glycyrrhiza* L. включает в себя более 30 видов, из которых два являются фармакопейными: солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.) [2, 3, 18, 43]. Данные виды являются полиморфными видами, разновидности которого различаются по плодам [33].

Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) (рис. 1) – многолетнее корневищное травянистое растение с ограниченным ареалом произрастания. Оно преимущественно произрастает на Южном Урале, а также в северных, центральных и восточных районах Казахстана, Узбекистане, на юге Западной, Средней и Восточной Сибири, в Монголии, а также Турции, Испании, Греции, Ираке [4].

Отличительной особенностью солодки уральской является ее более крупные фиолетовые цветки, собранные в более плотные кисти. У данного растения можно

заметить волнистые, серповидно-изогнутые, поперечно-извилистые плоды, которые густо усажены железками и железистыми щетинками. Плоды скучены и переплетены в клубочек, который находится в конце цветоноса [33].



Рисунок 1 – Гербарный образец солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.)

Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.) (рис. 2) – дикорастущее многолетнее, травянистое растение, высотой 50-150 см. Данное растение встречается на территории Евразии, Северной Африки и Западной Азии [56, 103]. У солодки голой стебли многочисленные, прямостоячие, которые могут быть простыми или ветвистыми и связаны обширной корневой системой [38].

Листья солодки голой являются непарноперистыми и имеют ланцетовидную форму с цельнокрайними краями. Они также клейкие из-за обильных железок. Цветки растения бледно-фиолетовые, имеют форму мотыльков и собраны в негустые пазушные кисти. Плод солодки голой представляет собой продолговатый, сжатый с боков боб, прямой или слегка изогнутый боб, длиной 2-4 см. После высыхания боб открывается. Семена данного растения являются почковидными, зеленовато-серого цвета, блестящими и имеют длину 2 мм.

Цветение солодки голой происходит в июне-августе, а плоды созревают в августе и сентябре [2, 4, 18, 33].



Рисунок 2 – Гербарный образец солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.)

1.2. Химический состав надземной части *Glycyrrhiza glabra* L. и *Glycyrrhiza uralensis* Fish.

На территории Российской Федерации фармакопейный статус присвоен только подземным органам (корни) солодки голой и солодки уральской [17]. Лакричное растение образует достаточно обширные солодковые заросли. Надземная часть не подвергается заготовке в виду того, что она не зарегистрирована в качестве официального растительного сырья. При этом химический состав, исследованный зарубежными учеными и представлен различными группами БАВ, что свидетельствует о перспективности использования надземной части в качестве источника получения лекарственных препаратов.

Химический состав надземной части солодки уральской недостаточно изучен. По литературным источникам основной группой БАВ в стебле и листьях являются флавоноиды, содержание которых составляет до 5,64% [105]. Из спиртового экстракта листьев были идентифицированы впервые флавоноиды и названы как, ураленол, неоураленол и ураленин [94, 95]. Также были выделены и другие известные флавоноиды – лютеолин, кемпферол, нарциссин, никотифлорин, астрагалин, рутин и кверцетин, пуэрарин и др. [92, 104]. С помощью спектроскопии были обнаружены новые соединения из листьев солодки 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3'-метокси-6-изопренилфлавонон, а другое соединение было идентифицировано как 8-С-пренилэриодиктиол [93].

Из этанольного экстракта листьев солодки уральской были выделены три новых дигидростильбена – глиципитилбен А, глицидипитилбен и глиципитилбен [81]. Кроме этого, в надземной части содержатся в минимальном количестве пренилированные изофлавоны, изофлаваны [79].

В таблице 1 представлены основные БАС надземной части солодки уральской.

По сведениям научной литературы химический состав травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) также недостаточно изучен и представлен флавоноидами (до 2,5 %), полисахаридами, органическими кислотами (1,5 %), эфирными маслами (0,02%), смолами, кумаринами, дубильными веществами, витаминами, аминокислоты [10, 28, 65, 66] (табл. 1.).

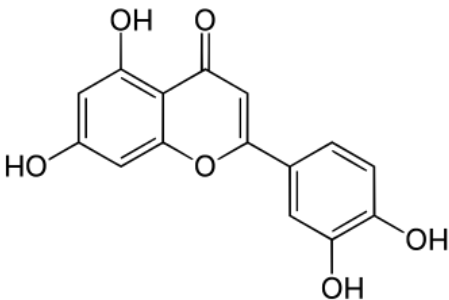
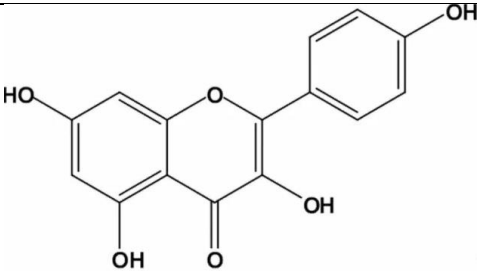
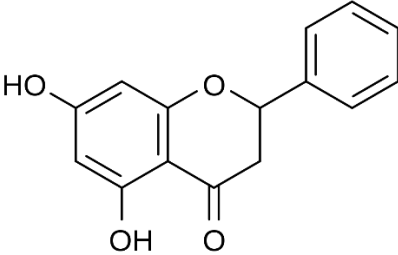
Флавоноидный состав травы солодки голой весьма разнообразен, причем доминирующим флавоноидом является пиноцембрин. Также описаны и другие флавоноиды – глабранин, ликофлавонон, вигтеон, 7-О-метилглабранин [11, 39, 40, 45, 61, 65, 66, 76, 135]. Впервые был выделен новый изофлавоноид, который идентифицировали как глабризофлавонон [11, 40, 45, 61, 76, 135].

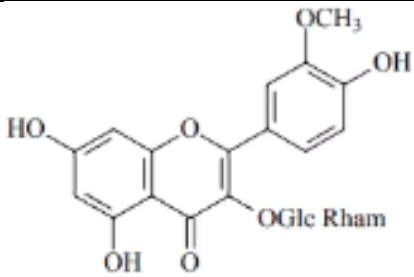
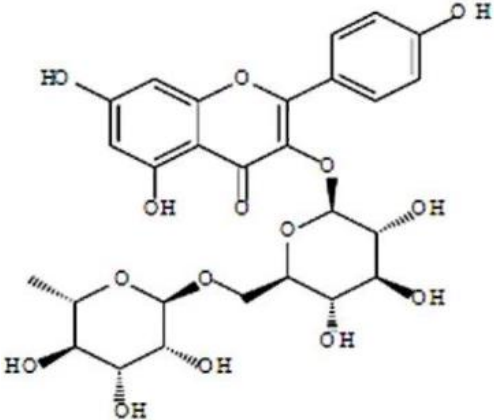
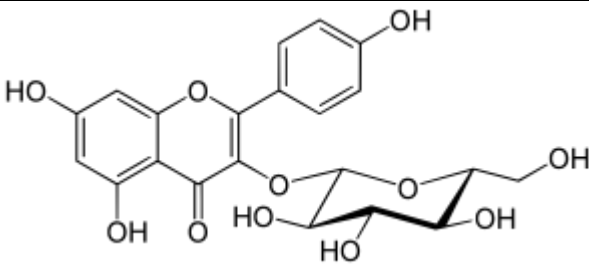
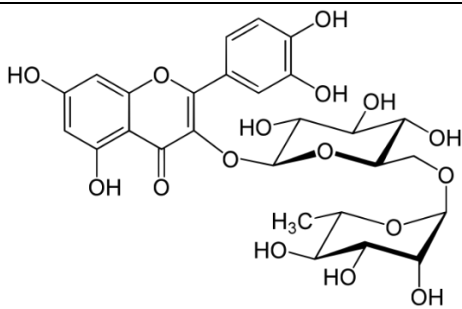
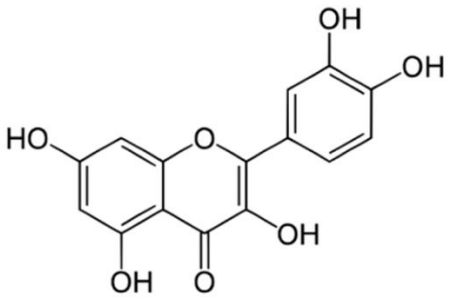
Группой ученых из ВолгГМУ был изучен аминокислотный состав надземной части солодки голой [44, 60]. Исследования показали, что в количественном отношении доминируют заменимые аминокислоты глутаминовая

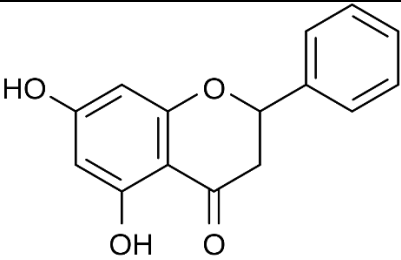
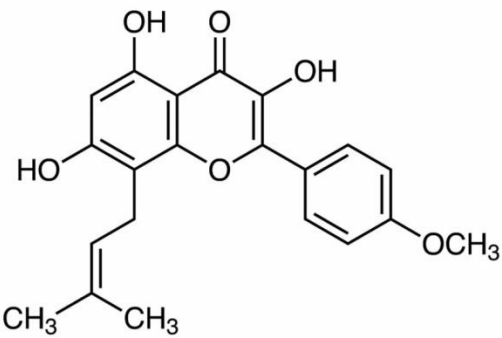
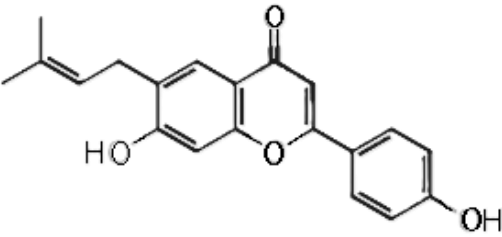
кислота (1,84%), аспарагиновая кислота (1,74%) и аргинин (1,03%). В меньшем количестве присутствовали лейцин (1,41%), лизин (1,02%), валин (0,92%), фенилаланин (0,86%), изолейцин (0,76%), треонин (0,77%). Содержание сырого протеина составило 18,2% [44, 60].

В минимальных количествах в данном виде содержатся пренилированные дигидростильбены [39, 65, 66].

Таблица 1 – Основные БАС надземной части солодки уральской и солодки голой

№ п/п	Соединение	Структурная формула	Брутто-формула
Основные химические соединения надземной части <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fish.			
1	Лютеолин		$C_{15}H_{10}O_6$
2	Кемпферол		$C_{15}H_{10}O_6$
3	Пиноцембрин		$C_{15}H_{12}O_4$

4	Нарциссин		$C_{28}H_{32}O_{16}$
5	Никотифлорин		$C_{27}H_{30}O_{15}$
6	Астрагалин		$C_{12}H_{20}O_{11}$
7	Рутин		$C_{27}H_{30}O_{16}$
8	Кверцетин		$C_{15}H_{10}O_7$
Основные химические соединения надземной части <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.			

1	Пиноцембрин		$C_{15}H_{12}O_4$
2	Глабранин		$C_{20}H_{20}O_4$
3	Ликофлавон		$C_{20}H_{18}O_4$

1.3. Химический состав корней солодки уральской и солодки голой

Химический состав корней солодки достаточно хорошо изучен. Основную группу БАВ составляют соединения тритерпеновой (2-19%) и фенольной (1-3%) природы [29, 128, 138]. Также в значительных количествах содержатся и другие БАВ, которые относятся к разным классам химических соединений [97].

В корнях солодки голой и солодки уральской содержатся тритерпеновые соединения, они представлены глицирризиновой кислотой и ее агликоном глицерритиновой кислотой, которая имеет структурную схожесть со строением стероидных гормонов [33, 36]. В незначительном количестве присутствуют и другие тритерпеновые соединения: глабровая, 11-дезоксиглицирретовая, ликвиритиновая, ликвидиоловая, 24-гидроксиглицирретовая, 18 α -гидроксиглицирретовая, гидроксиглицирретовая, глабролоновая, ликвориковая,

28-гидроксиглицирретовая кислоты, глабролид, дезоксоглабролид, изоглабролид, глицирретол и др. [98].

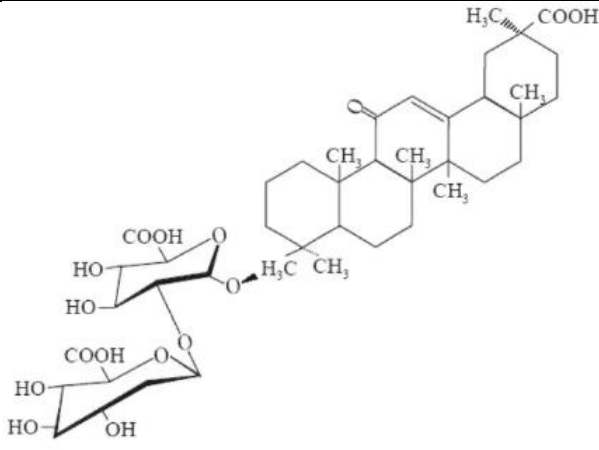
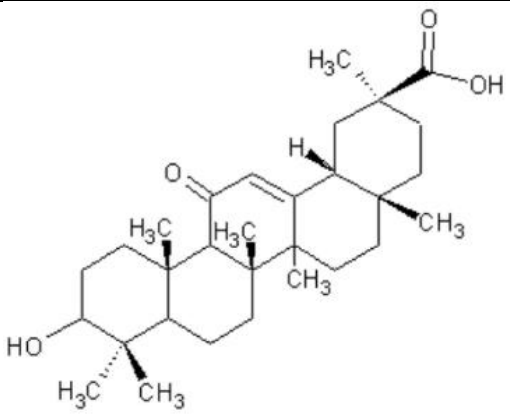
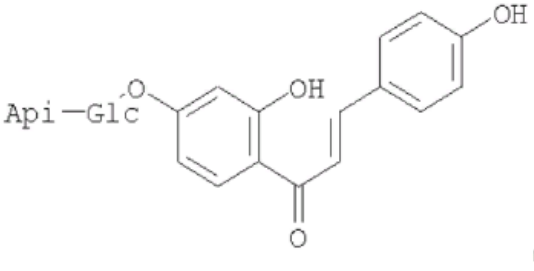
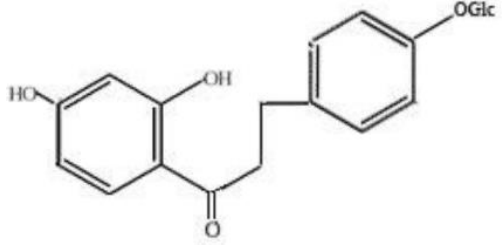
Второй ведущей группой БАВ по значимости являются фенольные соединения [29, 33, 53]. Фенольный состав корней солодки голой представлен различными химическими структурами, такими как халконы (ликуразид, изоликвиритином, ликвиритигенин), изофлавоны (глицирризифлавоном), флавоны (ликофлавоны), изофлавоны (глабридин, глабрен) [29, 53].

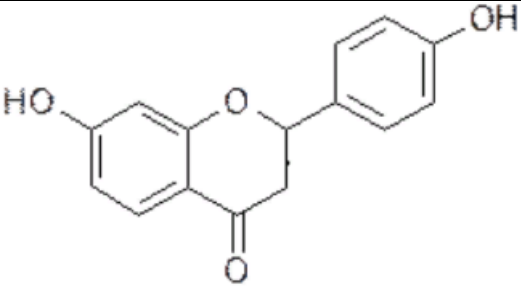
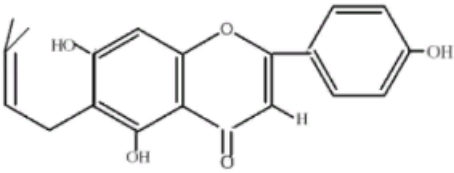
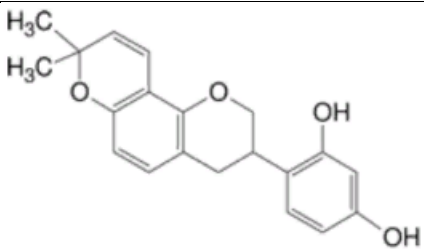
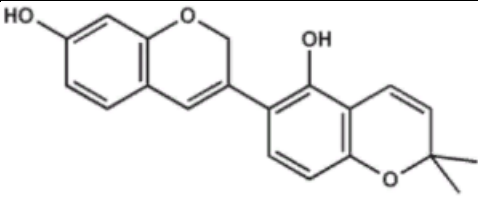
Кроме основных БАВ в подземных частях солодки голой и солодки уральской, в минимальных количествах (> 1%) содержатся минорные соединения: витамины, эфирные масла (0,03 %), полисахариды, органические кислоты, ароматические соединения, высшие алифатические углеводороды, эфиры высших жирных кислот, высшие жирные кислоты (в гидролизате), аминокислоты, смолистые вещества и др. [1, 41, 112, 118, 123, 127].

Основные БАВ корней солодки голой и солодки уральской представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные химические соединения корней *Glycyrrhiza glabra* L. и *Glycyrrhiza uralensis* Fish.

№ п/п	Соединение	Структурная формула	Брутто- формула
<i>Тритерпеновые соединения</i>			
1	Глицирризиновая кислота		C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆

			
2	Глицерретиновая кислота		$C_{30}H_{46}O_4$
<i>Фенольные соединения</i>			
3	Ликуразид		$C_{26}H_{30}O_{13}$
4	Изоликвиритин		$C_{21}H_{20}O_{12}$

5	Ликвиритигенин		$C_{15}H_{12}O_4$
6	Ликофлавонон		$C_{20}H_{18}O_4$
7	Глабридин		$C_{20}H_{20}O_4$
8	Глабрен		$C_{20}H_{18}O_4$

1.4. Изучение фармакологической активности надземной части солодки голой и солодки уральской

В исследованиях *in vivo* D-пинитол, выделенный из метанольного экстракта листьев *Glycyrrhiza glabra* L., показал защитное действие против связанных с липотоксичностью изменений пути инсулина в эндотелиальных клетках человека [113, 122]. Также экстракт обладает антигенотоксической активностью в отношении индуцированного метамицином C повреждения ДНК при хромосомных aberrациях, который широко используется в химиотерапии против рака [136].

Пиноцембрин, выделенный из надземной части *Glycyrrhiza glabra* L., оказывал влияние на жизнеспособность пяти линий раковых клеток HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, Caco-2 и PC3 человека при значениях в концентрации ниже 25

мкг/мл. Дигидростельбин, структурно связанный с флавоноидами из экстрактов листьев, проявил антипролиферативную, антиоксидантную, антибактериальную активность [62]. Также пиноцембрин оказывает антиоксидантную активность и способность поглощать нитриты и проявляет умеренное ингибирующее действие на грибную тирозиназу [77].

На основе пиноцембрина, выделенного из надземной части, были синтезированы три бензоатных производных флаванона солодки голой: 5-гидрокси-4-оксо-2-фенилхроман-7-ил 3,4,5-триметоксибензоат (*a1*), 5-гидрокси-4-оксо-2-фенилхроман-7-ил 4-метоксибензоат (*a2*), 5-гидрокси-4-оксо-фенилхроман-7-ил бензоат (*a3*) [125]. Соединение *a1* продемонстрировал высокую антипролиферативную активность в отношении раковых клеток, а также низкое токсическое действие на клетки молочной железы, также проявил ингибирующее действие на размножение *Staphylococcus aureus* [69, 125].

Этанольный экстракт травы солодки голой при внутривенном введении децеребрированным кошкам, оказывал стимулирующее действие на работу сердца и увеличение амплитуды дыхательных движений [9]. В экспериментах *in vitro* на крысах с «каолиновым артритом» при внутрижелудочном введении экстракта травы, было отмечено выраженное противовоспалительное действие [9].

Водный экстракт травы солодки голой показал благоприятные результаты в лечении узелков голосовых складок свиньи [101].

В патентной литературе описаны способы получения средств на основе надземной части солодки голой, обладающие фармакологической активностью (табл. 3).

Таблица 3 – Способы получения средств на основе надземной части солодки голой, обладающих фармакологической активностью

Название патента, источник литературы	Сущность способа
Способ получения	Траву солодки голой экстрагируют хлористым

фунгицидного средство [48]	метиленом, упаривают и сушат, затем полученную субстанцию обрабатывают водным раствором гидроксида натрия при pH 9-10 и соотношении массы субстанции и объема растворителя 1:10.
Способ получения средства, обладающего антианафилактическим действием [49]	Измельченную до 0,3-1,0 мм травы солодки голой экстрагировали водой путем настаивания в течение 28 ч с последующим сгущением до густого экстракта.
Способ получения средства, обладающего антимикробным действием [50]	Экстракция травы солодки голой хлороформом, очистке упаренного концентрата обработкой 2,5 -3,5%-ым гидроксидом натрия с последующим осаждением нейтрализацией до pH 7,0.
Способ получения антибактериального и антифунгального средства из солодки [51]	Измельченную до 0,3-1,0 мм траву солодки голой экстрагируют ацетоном в течение 60-70 мин. Затем упаривают и высушивают извлечение.

Зарубежными учеными был разработан лекарственный препарат Глацембрин на основе суммы флавоноидов надземной части солодки голой [39]. При проведении фармакологических исследования было выявлено, что Глацембрин обладает выраженным противовоспалительным действием [39].

Водно-этанольный экстракт солодки уральской при внутрижелудочном введении самцам крыс линии Sprague-Dawley, оказывал ингибирующее действие на патологические изменения ткани предстательной железы, экспрессию факторов воспаления, в том числе подавлял уровни воспалительных факторов и ингибировал транскрипцию провоспалительных генов, снижал реакцию окислительного стресса, ингибировал пути выживания клеток, регулировало

уровни половых гормонов, предотвращал иммунностимуляцию и ослаблял воспаление [106].

Этанольный экстракт надземных частей солодки уральской показал противодиабетический эффект на мышах, снижал уровень глюкозы в крови на 30,3% и повышал уровень инсулина в сыворотке крови на 41,8% по сравнению с контрольной группой [80].

1.5. Фармакологическая активность корней солодки голой и солодки уральской

В мировой научной литературе опубликовано более двух тысяч научных исследований, посвященных солодке и ее БАС. Это свидетельствует о высоком интересе фармакологов к растениям этого рода во многих странах мира, а также их значимости для медицинской практики [16, 58, 23, 20].

Вклад в фармакологическую активность вносят преимущественно тритерпеновые и флавоноидные соединения [5, 6, 26, 27, 35, 57, 63, 64, 82, 124]. Тритерпеновые сапонины – глицирризиновая кислота и ее агликон глицирретовая кислота широко известны своей противовоспалительной, противоязвенной, антиаллергической, гепатопротекторной, противогрибковой, противовирусной, антитромбической и другими видами биологической активности [1, 30, 42, 82, 111, 114, 124, 126] (табл. 4).

Таблица 4 – Основные фармакологические свойства и механизмы действия БАС корней солодки

Фармакологическая активность	Действующее вещество	Фармакодинамика
Влияние на иммунную систему	18 β -глицирретовая кислота	Ингибирующее действие в отношении резистентных к метициллину штаммов <i>Staphylococcus</i>

		<i>aureus</i> как <i>in vitro</i> , так и <i>in vivo</i> .
	Изоликвиритигенин, ликвиритигенин	Проявление бактерицидной активности, в результате влияния на систему регуляции синтеза фактора вирулентности SaeR <i>S. aureus</i> (exoprotein expression) [88].
	Глицирризиновая кислота, 18 β - и 18 α -глицирретиновая кислота	Антимутагенная активность в отношении рибозы-лизина [137].
	Глицирризиновая кислота	Иммуностимулирующий эффект, обусловлен подавлением репродукции вируса за счет стимуляции продукции гамма-интерферона, повышением фагоцитоза и увеличением активности нормальных киллеров [74, 84, 131, 132].
	Глицирризиновая кислота	Изменение экспрессии антигенов, связанных с антигеном вируса гепатита В (HBV) на гепатоцитах и подавление сиалирования HBV [120].
	Глицирризиновая кислота	Изменение экспрессии гена вируса простого герпеса [117].
	Глицирризиновая кислота	Дозозависимое ингибирование репликации вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) [90, 71].
	Глицирризиновая кислота	Проявление свойств антагонистов H ₁ -гистаминовых рецепторов [109].

Влияние на дыхательную систему	Изоликвиритигенин	Ингибирующее действие на секрецию эотаксина-1, ключевого хемокина, участвующего в миграции эозинофилов в легкие при астме [73].
	Ликвиритин	Уменьшение, вызванное липополисахаридами, воспаление легких, подавление инфильтрации воспалительных клеток, окислительный стресс и экспрессию провоспалительных медиаторов в легких [134].
Гепатопротекторное свойства	Глицирризиновая кислота	Снижение содержания ферментов трансаминаз в крови и печени, вызванной тетрахлорметаном [130].
	Глицирризиновая кислота	Восстановление проницаемости мембран гепацитов в исследовании <i>in vitro</i> [115].
	Глицирризиновая кислота, глабридин	Ингибирование образования супероксидного радикала и перекиси водорода, а также подавление синтеза тромбоксана [24, 89].
	Изоликвиритигенин	Уменьшение окислительного стресса в эксперименте на мышах, протекторное свойство от токсичного воздействия арахидоновой кислоты с железом, которые производят активные формы кислорода и являются причиной митохондриальной дисфункции [24].

Онкопротекторные свойства	Экстракт солодки голой	Проявление противоопухолевой активности при раке молочной и предстательной железы [75, 110].
	Ликохалкон А, изоликвиритигенин	Подавление индуцированного RANKL образования остеокластов в макрофагах, полученных из костного мозга [116].
	Экстракт солодки голой	Блокирование роста опухоли и разрушение кости у мышей, привитых клетками рака молочной железы в области большеберцовой кости [102].
Гормональные эффекты	Глицирретовая кислота	Пролонгирование и усиление действия кортикостероидов [53].
	Отвар солодки голой с пионом	Снижение уровня прогестерона в сыворотке до уровня контроля в моделях гиперпролактинемии <i>in vitro</i> , так и <i>in vivo</i> в результате подавления синтеза и секреции пролактина [129].
Влияние на холинергическую систему и функцию памяти	Водный экстракт корня солодки	Стимулирование роста нервных дендритов гиппокампа [70].
	Ликвиритигенин	Ингибирование астроцитоза в гиппокампе на модели болезни Альцгеймера у мышей [45].
	Ликвиритигенин	Уменьшение когнитивных нарушений, вызванных скополамином в поведенческих тестах [99].
	Глицирризиновая кислота	Стимулирование активности протеинкиназы А [121].
	Изоликвиритигенин	Облегчение когнитивных нарушений

	ин	и ослабление периферической резистентности к инсулину, а также снижения уровня L-1 β , TNF- α [108].
Влияние на ГАМК-ергическую систему	Экстракт солодки голой	Оказывает положительное влияние на аллостерическую модуляцию ГАМК _A -бензодиазепиновых рецепторов [72].
	Глабридин	Усиление ГАМК-рецепторной функции в работе нейронов дорсального ядра шва среднего мозга.

1.6. Современные подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья «Солодки корни»

Как упоминалось ранее, корни солодки являются ценным ЛРС, использование которых находят широкое применение в производстве ЛП. Корни солодки используются для создания экстрактов в густой и сухой форме, сиропов, многокомпонентных растительных сборов, а также препаратов и др. Главной целью назначения препаратов на основе корней солодки – подавление воспалительных процессов, способствование более легкому отхождению мокроты при влажном кашле, поддержание иммунной системы [20, 21, 22, 31, 64]. Тритерпеновый гликозид, такой как глицирризиновая кислота содержится в корнях солодки, обладающий широким спектром фармакологической активности. Являясь одним из основных БАС, она вносит существенный вклад в фармакологическую активность [20, 21, 22, 31, 64, 100, 133]. Также диагностически значимым и доминирующим флавоноидом в корнях солодки является ликуразид. По классификации фенольных соединений профессора В.А. Куркина, ликуразид является по химической структуре халконом [20, 33].

В соответствии с ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни» количественное определение глицирризиновой кислоты в ЛРС и ЛП обычно осуществляют

методом спектрофотометрии. Определена минимальная норма содержания глицирризиновой кислоты не менее 6% [17].

Внедрение химических и физико-химических методов (ТСХ, ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопии и др.) в анализ лекарственных растений и фитопрепаратов, позволяет усовершенствовать процессы стандартизации [20, 21, 31]. В ряде научных публикаций содержатся описание нефармакопейных подходов к определению ГК в сырье и ЛП. Данные подходы включают методы спектрофотометрии, ВЭЖХ и капиллярного электрофореза [13, 15, 22, 46, 47, 100, 119, 133, 139].

Гаврилиным М.В. и с его соавторами был проведен ряд исследований, направленных на усовершенствование методов оценки качества сырья солодки [15].

При исследовании образцов корней солодки с помощью ВЭЖХ-анализа и капиллярного электрофореза (КЭ) содержание ГК составило 3,72% и 3,64%, соответственно. Авторами был сделан вывод, что оба метода дают достоверные результаты. Спектрофотометрическим методом было установлено, что содержание ГК в исследуемых образцах превышает 6% [15].

В сравнительном исследовании содержания ГК в промышленных образцах корней солодки методами ВЭЖХ и спектрофотометрии, авторы пришли к выводу о низкой селективности метода УФ-спектрофотометрии. Результаты определения ГК методом спектрофотометрии оказались в 4-5 раз выше, чем результаты, полученные с использованием методики ВЭЖХ (10, 85% и 2,06%, соответственно) [12, 13].

Вопросы стандартизации ЛРС корней солодки направлены на количественное определение доминирующего БАВ – глицирризиновой кислоты. Однако методики стандартизации имеют свои недостатки. В корнях солодки голой также содержится доминирующий и диагностически значимый флавоноид – ликуразид, хотя вопрос проведения стандартизации по данному флавоноиду остается не полностью изученным.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Данные научных источников подтверждают эффективность комплексной переработки и применение растительного сырья – травы солодки голой в качестве перспективного лекарственного сырья.

2. Солодка уральская характеризуется разнообразным химическим составом, в котором преобладают флавоноиды, такие как ураленол, неоураленол и ураленол и др., а также в минимальных количествах присутствуют пренилированные изофлавоны, изофлаваны.

3. Химический состав травы солодки голой мало изучен и представлен также в основном флавоноидами – пиноцембрин, глабринин, вигтеон и др. В минорных количествах содержатся полисахариды, эфирные масла, аминокислоты.

4. В спектре фармакологических активностей травы солодки голой и солодки уральской описаны антипролиферативные, антиоксидантные, антибактериальные, противовоспалительные, гепатопротекторные активности.

5. Показана необходимость совершенствовать подходы к стандартизации корней солодки, научно обосновать выбор метода и веществ-стандартов, разработать методики количественного и качественного анализа БАС.

6. Научно обоснована целесообразность разработки проекта фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Солодки голой трава». Это необходимо для того, чтобы обеспечить возможность использования данного сырья солодки голой в фармацевтической практике.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы следующие образцы сырья: солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.), солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), собранные в период с 2015 по 2023 гг. Исследуемые образцы растительного сырья представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Исследуемые образцы сырья видов рода *Glycyrrhiza* L.

№ п/п	Вид солодки	Заготовлен ная часть растения	Территория сбора	Год сбора
1.	Солодка голая	Трава	Оренбургская область (Сакмарский район, с. Татарская Каргала)	Июль 2017 г.
2.	Солодка голая	Трава	Республика Казахстан, г. Державинск	Июнь 2018 г.
3.	Солодка голая	Трава	Самарская область (Большечерниговский район, с. Большая Черниговка)	Август 2019 г.
4.	Солодка голая	Трава	Самарская область (Кинельский район, пгт. Алексеевка)	Июнь- Сентябрь 2020-2023 гг.
5.	Солодка уральская	Трава	г. Самара, Ботанический сад Самарского университета	Июнь- Сентябрь 2021-2023 гг.
6.	Солодка зловонная	Трава	г. Самара, Ботанический сад Самарского университета	Июнь-Август 2022 г.
7.	Солодка	Трава	г. Самара, Ботанический сад	Июнь-Август

	щетилистая		Самарского университета	2022 гг.
8.	Солодка голая	Корни	г. Самара, Ботанический сад Самарского университета	Август 2018 г.
9.	Солодка (<i>Glycyrrhiza</i> sp.)	Корни	Промышленные образцы АО «Красногорсклексредства»	2018-2019 гг.
10.	Солодка (<i>Glycyrrhiza</i> sp.)	Корни	Биологически активная добавка, серия «Травы Алтай», ООО «АЛСУ»	20197

Исследованы также: густой экстракт травы солодки голой; индивидуальные вещества – пиноцембрин, генистеин, изоглабринин, ликвиритигенин, глицирам, глицирризиновая кислота, ликуразид, пиностробин.

В исследовательской работе использовалась инструментальная база:

- весы электронные марки «САРТО ГОСМ ЛВ 210-А»;
- весы аналитические «Mettler Toledo XS 204»; - термостат суховоздушный «ТС-1/80»;
- спектрометры моделей «BrukerAM-300» и «Bruker AV 600» (150,90 МГц);
- масс-спектрометр модели «KratosMS-30»;
- спектрофотометры «Specord 40» (Analytik Jena) и «СФ-2000»;
- жидкостной микроколоночный хроматограф «Милихром-6» («НПАО Научприбор»), хроматографическая колонка стальная «Эликсо» Kromasil C18 (5) (2мм × 80 мм);
- цифровые микроскопы «Motic» DM-111 и DM-39C-N9GO-A;
- цифровой люминесцентный микроскоп Альтами-ЛЮМ-2.

Также в ходе диссертационного исследования использовались химические реактивы, сорбенты и материалы:

- хлороформ (марки ХЧ) по СТП ТУ COMP 2-028-06, ООО «Компонент-Реактив», Россия;
- спирт этиловый 96 % марки ХЧ (ООО «Гиппократ», Россия);
- ацетон ХЧ по ТУ 2633-018-44493179-98 (АО «Экос-1», Россия);
- гексан ХЧ по СТП ТУ КЛМП 2-557-13 (ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии по ТУ COMP 3-074-06 (ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- сефадекс LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden);
- силикагель L 40/100 мкм и L 100/250 мкм по ТУ 6-09-39-23-86 (ООО «ИМИД»);
- полиамид For Column Chromatography (CAS 63428-83-1, Sigma-Aldrich, MERK);
- хроматографические пластины марки «Sorbfil» типа ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «ИМИД», Россия).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы микроскопического анализа

В ходе диссертационной работы исследовалась высушенная определенным методом трава солодки голой (сушка проводилась естественным путем). Пробоподготовка микропрепаратов и сырья осуществлялась в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания [17, 32].

2.2.2. Методы химического анализа

В процессе фитохимического исследования проводился предварительный скрининг флавоноидов и сапонинов с использованием цветных пробирочных

реакций, специфичных для этой группы соединений. [33, 34]. Аналитические эффекты данных реакций представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Химические реакции характерные для фенольных соединений и флавоноидов

№ п/п	Наименование реакции	Группа БАС	Аналитический эффект
1.	3% раствор алюминия (III) хлорида	<i>Фенольные соединения</i>	Желтая окраска раствора, люминесценция раствора при длине волны 365 нм
2.	Цианидиновая проба	<i>Флавоноиды</i>	Розовый цвет раствора
3.	Цианидиновая пробам по Брианту	<i>Флавоноиды</i>	Коричневое окрашивание раствора
4.	Щелочной раствор диазобензлосульфокислоты (ДСК)	<i>Фенольные соединения</i>	Темно-желтая окраска раствора
5.	Реакция пенообразования	<i>Сапонины</i>	Устойчивая пена при в взбалтывании водных растворов
6.	Реакция Санье	<i>Сапонины</i>	Желтое окрашивание раствора
7.	Реакция с реактивом Эрлиха	<i>Сапонины</i>	Малиновая окраска раствора
8.	Реакция Лафона	<i>Сапонины</i>	Сине-зеленое окрашивание раствора

2.2.3. Хроматографические методы анализа

Хроматография в тонком слое сорбента

Для проведения качественной оценки химического состава водно-спиртовых извлечений корней солодки и травы солодки голой и солодки уральской. Кроме того, этот метод использовался для контроля процесса колоночной хроматографии при выделении индивидуальных веществ [17, 33, 34].

Для проведения анализа использовались хроматографические пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» предварительно высушенные в термостате при температуре 95-105°C для удаления влаги из слоя сорбента, чтобы обеспечить точные результаты анализа.

Используя метод восходящего хроматографирования при комнатной температуре, испытуемые образцы и стандартные растворы были размещены на стартовую линию с помощью капилляра. Когда фронт растворителя достигает примерно 7-8 см, пластинки были извлечены из системы (хроматографической камеры) и проверены при естественном дневном освещении и в ультрафиолетовом свете с длинами волн 254 и 365 нм. Также для обнаружения фенольных соединений, включая флавоноиды, пластинки обрабатывали растворами $AlCl_3$ (с концентрацией 3%) и щелочным раствором ДСК.

Жидкостная адсорбционная хроматография (колоночная хроматография)

Этот метод применялся для более углубленного исследования химического состава травы солодки голой. Характеристики колоночного хроматографирования определяются размерами колонки, которые составляют 6 см в высоту и 8 см в диаметре. В данном процессе используется силикагель марки L с размером частиц 50/100 мкм, который служит в качестве неподвижной фазы. Подвижной фазой, или элюентами, выступают хлороформ, 96% этиловый спирт, очищенная вода, а также смеси этилового спирта и хлороформа в различных концентрациях [19, 33, 54].

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Данный метод (ВЭЖХ-анализ) применялся для исследования компонентного состава водно-спиртовых извлечений из травы солодки голой и солодки уральской, а также для количественного анализа содержания БАС в водно-спиртовом извлечении из травы солодки голой и степени чистоты полученного стандартного образца пиноцембрина [17].

В работе использовали микроколоночный жидкостной хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с последующим УФ-детектированием в установленном нами условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента - 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 290 нм. Объемы инжестируемых проб 2 мкл.

2.2.4. Спектральные методы анализа

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса и масс-спектроскопия [17]

Данные методы использовали для определения спектральных характеристик выделенных веществ методом колоночной хроматографии путем регистрации ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектров с помощью прибора JNM-ECX 400 (399,78 и 100,52 МГц, соответственно).

Масс-спектры были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II методом электрораспылительной ионизации (ESI) с данными параметрами:

- измерение на положительных ионах (с напряжением на капилляре – 4500 V);
- газ-распылитель – азот (4 л/мин);
- проба: ввод вещества в метанольном растворе шприцевым методом, скорость потока – 3 мкл/мин;
- температура интерфейса – 180 °C;
- диапазон сканирования: 50-3000 (m/z).

Прямая и дифференциальная УФ-спектрофотометрия [17, 34]

Использовали данный метод для определения содержания суммарных БАС (флавоноидов) в образцах водно-спиртового извлечения из травы солодки голой и анализа индивидуальных соединений, полученных в процессе колоночной хроматографии. Для проведения анализа использовались спектрофотометры – СФ-2000 и Spesord 40, кюветы – 10 мм. Диапазон длин волн, в котором мы определяли значения, составлял 190-1000 нм [7]. Определение пиков поглощения было проведено с помощью метода прямой спектрофотометрии, после добавления 3% спиртового раствора алюминия хлорида (комплексообразователь с флавоноидами) методом дифференциальной спектрофотометрии.

Оценку результатов анализа проводили с помощью приборных и статистических программ [14].

2.2.5. Технологические методы

Густой экстракт из травы солодки голой получали с помощью 70% этилового спирта методом модифицированной дробной мацерации в течение 6 дней в соотношении «сырье-экстрагент» 1:5 с включением завершающей термической стадии при температуре 70°C в течение 30 минут [7]. Очистку вытяжки 34 осуществляли методом отстаивания в температурном режиме не выше 10 °C в течение двух суток с последующей фильтрацией. Конечный продукт получали из жидкого экстракта путем упаривания под вакуумом при температуре 55 °C.

2.2.6. Фармакологические методы исследования

На кафедре фармакологии, названной в честь и з.д.н. РФ проф. А.А. Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России было проведено исследование фармакологических свойств (нейротропная и диуретическая активность) густого

экстракта травы солодки голой, также в ходе эксперимента были изучены выделенные флавоноиды из травы солодки голой – пиноцембрин, генистеин и изоглабранин. Кроме того, проводился анализ густого экстракта травы солодки на наличие острой токсичности.

Исследование нейротропной активности

Исследование нейротропной активности было проведено в специальных условиях: белые беспородные крысы различных полов – самки и самцы, массой 200 ± 20 г. Распределение животных было произведено между контрольной и опытной группами, каждая группа состояла из 10 особей. Все животные были содержаны в специальных условиях, в виварии.

Индивидуальные вещества, пиноцембрин, генистеин и изоглабранин, были введены внутрижелудочно через зонд в дозе 1 мг/кг, и исследован густой экстракт травы солодки в дозе 10 мг/кг. В качестве контроля использовалась очищенная вода. Опытная группа была предварительно подвергнута водной нагрузке. После однократного введения объектов исследования проводилась оценка нейротропной активности с использованием теста Порсолта [55]. В течение пяти минут фиксировалось время, в течение которого животные пытались выбраться из воды. Результаты исследования были обработаны статистически по критерию Манна-Уитни.

Исследование диуретической активности

Для проведения исследования диуретической активности были выбраны белые беспородные крысы обоих полов с массой 200 ± 20 г. Животные были разделены на две группы – контрольную и опытную, состоящие из 10 особей каждая.

За день до начала эксперимента, крысы получали водную нагрузку, объем которой составлял 3% от их массы тела. В день опыта, животным из контрольной группы вводили внутрижелудочно водную нагрузку.

Конкретно, крысам вводили густой экстракт в дозе 10 мг/кг, а также пиноцембрин, генистеин, изоглабринин в дозе 1 мг/кг.

Крыс помещали в специальные клетки (обменные) на 24 часа.. По истечению двух периодов времени, собранная моча подвергалась исследованию. Определяли почечную экскрецию воды, а также концентрацию креатинина с использованием колориметрического метода на фотоколориметре КФК-3.

Исследование острой токсичности

Исследование острой токсичности проводилось для густого экстракта травы солодки голой в дозе 10 мг/кг. Для этого были сформированы две группы, состоящие из 10 беспородных половозрелых самцов массой 200 ± 20 г. Все крысы находились в условиях вивария.

Эксперимент состоял из двух этапов. Опытная группа, предварительно получала водную нагрузку, вводили густой экстракт травы солодки голой в дозе 10 мг/кг внутрижелудочно при помощи зонда. Контрольная группа, находящаяся в аналогичных условиях, получала очищенную воду. Наблюдение за животными было непрерывным в течении первого дня эксперимента. Длительность всего исследования составила 14 дней. Основываясь на результаты наблюдения, густой экстракт травы солодки голой был отнесен к одному из классов токсичности.

2.2.7. Статистическая обработка результатов исследования

При обработке статистических данных количественного определения использовались методы статистики согласно ОФС.1.1.0013 ГФ РФ XV издания «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» [17]. Для оценки однородности выборки были рассчитаны показатели среднего значения, стандартного отклонения, полуширины доверительного интервала и другие основные параметры [14].

В соответствии с ОФС.1.1.0013 ГФ РФ XV издания «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических

испытаний» проведена валидационная оценка по следующим показателями: специфичность, линейность, правильность, прецизионность [17].

1. Валидационная оценка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин в траве солодки голой методом дифференциальной спектрофотометрии.

Специфичность методики определяли по соответствию максимумов поглощения электронных спектров извлечений травы солодки голой и стандартного образца пиностробина методом дифференциальной УФ-спектроскопии после реакции с комплексообразующим элементом.

Линейность результатов определяли на 4 растворах различной концентрации стандартного образца пиностробина. По результатам полученных данных построили график в координатах «концентрация пиностробина, мг/мл – оптическая плотность» и рассчитали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), коэффициент детерминации (R^2), стандартное отклонение с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2019.

Прецизионность оценивали путем анализа исследуемого образца растительного сырья в 11-кратной повторности.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности анализ испытуемого образца производил другой аналитик в другие дни с использованием того же оборудования.

Правильность методики определяли методом добавок стандартного образца пиностробина с известной концентрацией (25, 50 и 75%) к испытуемому раствору водно-спиртового извлечения травы солодки голой. Для каждой концентрации проводили три определения.

2. Валидационная оценка ВЭЖХ методики определения содержания пиноцембрина в траве солодки голой.

Специфичность методики определяли по соответствию времен удерживания стандартных образцов и пиков, соответствующих этим стандартам на ВЭЖХ-

хроматограмме испытуемого раствора, а также по разрешению между наиболее близкими пиками и фактору асимметрии пиков анализируемых веществ.

Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов стандартных образцов. На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» или «концентрация, мг/мл – площадь пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (R^2), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2019.

Правильность методики подтверждали на образце извлечения травы солодки голой введением аликвоты образца раствора стандартного образца пиноцембрина в количестве от 80% до 120% от исходного содержания.

С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 2 мкл раствора извлечения травы солодки голой. В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии.

3. Валидационная оценка методики количественного определения БАС в корнях солодки.

Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов стандартных образцов. На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» или «концентрация, мг/мл – площадь пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (R^2), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2019.

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления растворов глицирризиновой кислоты и ликуразида с известной концентрацией (80 %, 100 % и 120 %) к испытуемому раствору.

С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 4 мкл раствора извлечения корней солодки. В

дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии.

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (*GLYCYRRHIZA GLABRA* L.)

Проблема определения видовой специфичности растений становится все более актуальной в области ботаники и фармакогнозии. Из-за огромного разнообразия представителей рода *Glycyrrhiza* L., требуется проведение дифференциальной диагностики и стандартизации видов внутри таксономической группы [52].

В ГФ РФ XIV издания на данный момент включена ФС на корни солодки [17]. Кроме корней, перспективным исследовательским объектом является трава солодки голой, что подтверждается научными публикациями отечественных и зарубежных ученых [11, 44, 60, 68, 87, 91, 94, 97, 104].

В данной главе описаны морфологические особенности строения нефармакопейных видов сырья – травы солодки голой и солодки уральской, а также ее примесных видов. Отражены анатомо-гистологические признаки травы солодки голой с использованием световой микроскопии.

3.1. Сравнительный морфологический анализ надземных частей видов рода *Glycyrrhiza* L.

Согласно литературным данным на территории средней Волги произрастает пять видов рода *Glycyrrhiza* L. В виду близкого родства, они являются примесными для фармакопейных видов солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). Поэтому важно в процессе разработки раздела «Внешние признаки» и «Микроскопические признаки» использовать узко специфические в видовом плане признаки, позволяющие селективно определять принадлежность сырья к конкретному виду солодки.

Для проведения сравнительного анализа нами было отобрано пять видов солодки, а именно: солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.), солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*), солодка щетинистая (*Glycyrrhiza echinata* L.), солодка зловонная (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.), солодка

уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). Указанные образцы надземной части различных видов рода Солодка предоставлены в рамках научного сотрудничества Ботанического сада Самарского университета, г. Самара (табл. 5, глава 2).



Рисунок 3 – Образцы представителей рода солодка *Glycyrrhiza* L.: А – солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.); Б – солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L., подвиd *grandulifera*)); В – солодка щетинистая (*Glycyrrhiza echinata* L.); Г – солодка зловонная (солодка македонская) (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.); Д – солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.).

Видовая специфичность гербарных образцов уточнялась по морфологическим признакам, при этом руководствовались определителями цветковых растений. Кроме того, проводили сравнение с достоверными образцами гербарного фонда Самарского университета. Гербарные образцы, используемые в эксперименте, представлены на рисунке 3.

Ориентируясь на результаты фитохимического анализа о содержании накопления суммы флавоноидов в надземной части солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.), сделан вывод о том, что фаза плодоношения – является наиболее оптимальной для сбора сырья. Следовательно, наличие цветков в сырье, будет признаком недоброкачественного сырья, собранного не в ту фазу вегетации.

Морфология плодовой части является значительно более весомым отличительным признаком, позволяющим селективно отличить примесные виды рода *Glycyrrhiza* L.

3.1.1. Сравнительная морфология листьев видов рода *Glycyrrhiza* L.

При визуальном осмотре было видно, что листья непарно-перистосложные для каждого вида имеют характерные морфологические особенности (рис. 4).



Рисунок 4 – Внешний вид листьев рода *Glycyrrhiza* L.: А – листья солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.); Б – листья солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*)); В – листья солодки щетинистой (*Glycyrrhiza echinata* L.); Г – листья солодки зловонной (солодка македонская) (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.); Д – листья солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

Было выявлено, что некоторые из представителей видов обладают схожими признаками: все виды кроме солодки уральской имеют край листовой пластинки – цельный; край листовой пластинки солодки уральской волнистый, с короткопушистыми с густо усаженными клейкими, точечными железками, блестящие от обильных выделений; у всех видов центральная жилка с верхней стороны

листочка без опушения. Центральная жилка с нижней стороны листочка у солодки голой густо опушена, у остальных видов без опушения. Имеются схожие особенности строения верхушки листочка у солодки голой и солодки уральской – с «насаженным» остроконечием. Результаты сравнительного анализа морфологии листочков отражены в приложении 1 (табл. 1, рис. 1).

Исходя из проведенного сравнительного морфологического анализа нами был сделан вывод. Диагностически значимым признаком для листочков солодки голой являются: верхняя и нижняя поверхности усажены точечными железкам, клейкими от обильных выделений (рис. 5 А-2, рис. 5 Б-2); центральная жилка с нижней стороны листочка густо опушена (рис. 5 Б-3); поверхность черешка густоопушенная и скудно-железистая см (рис. 5 А-4, рис. 5 Б-4).



Рисунок 5 – Макрофотография листочка солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.):

А – верхняя сторона листочка; Б – нижняя сторона листочка: 1 – верхушка листочка; 2 – край листочка; 3 – центральная жилка; 4 – основание листочка.

Важным этапом проведения морфолого-анатомического анализа является выявление особенностей строения листочков представителей рода *Glycyrrhiza* L.

3.1.2. Сравнительная морфология плодов видов рода *Glycyrrhiza* L.

При осмотре внешних морфологических признаков были определены схожие признаки у некоторых видов: для солодки голой, солодки голой (подвид *grandulifera*) и солодки уральской отмечается идентичное строение соплодий, которые собраны густые плотные соплодия (рис. 5А, 5Б, 5Г). Строение соплодия солодки щетинистой весьма отличается от остальных изучаемых нами видов, форма шарообразная (головка), плоды собраны густо (рис. 5В). Семя всех видов характерно для семейства Бобовых.



Рисунок 6 – Внешний вид соплодий рода *Glycyrrhiza* L.: А – соплодие солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.); Б – соплодие солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*); В – соплодие солодки щетинистой (*Glycyrrhiza echinata* L.); Г – соплодие солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

Было выявлено, что все представители видов имеют один схожий признак – это поверхность чашелистика с опушением. Верхушка стручка у солодки голой и солодки голой (подвид *grandulifera*) с оттянуто-тупым концом. Все остальные морфологические признаки различаются. Результаты сравнительного анализа морфологии плодов отражены в приложении 1 (табл. 2, рис. 2).

Исходя из проведенного сравнительного морфологического анализа нами был сделан вывод. Диагностически значимым признаком для плодов солодки голой являются: плод прямой слегка извилистый (рис. 7.1); поверхность голая без опушения (рис. 7.3)

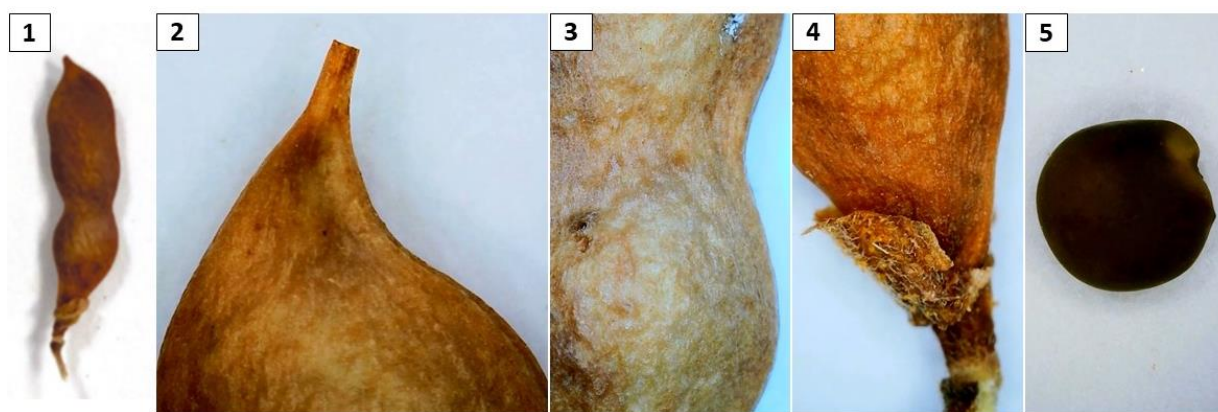


Рисунок 7 – Макрофотография плода солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.):

1 – плод (стручок); 2 – верхушка стручка; 3 – поверхность стручка; 4 – основание стручка; 5 – семя.

Как говорилось ранее, морфология плодовой части является значительно более весомым отличительным признаком, позволяющим селективно отличить примесные виды рода *Glycyrrhiza* L.

3.1.3. Сравнительная морфология цветков видов рода *Glycyrrhiza* L.

Для соцветия видов рода *Glycyrrhiza* L. выявлена общая характерная черта: цветок собран в простое соцветие – ботриодная кисть. Соцветия густые, плотные, продолговатые (рис. 8). Цветки мотылькового типа, что характерно для семейства

Бобовых. Чашечка сростнолистная, пятизубчатая (зигоморфная двугубая). Поверхность чашечки покрыта желтоватыми железками. Венчик представлен тремя крыльями и 2 парусами. Результаты сравнительного анализа морфологии цветков отражены в приложении 1 (табл. 3, рис. 3).



Рисунок 8 – Внешний вид соцветий рода *Glycyrrhiza* L.: А – соцветие солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.); Б – соцветие солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*); В – соцветие солодки зловонная (солодка македонская) (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.); Г – соцветие солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.).

Исходя из проведенного сравнительного морфологического анализа нами был сделан вывод. Диагностически значимым признаком для цветков солодки голой являются: три фиолетовых крыла (рис. 9.2), два сросшихся зеленоватые парусы с фиолетовым оттенком, вдовое короче, чем крыло. Парус ярко выражен морфологически (рис. 9.3).

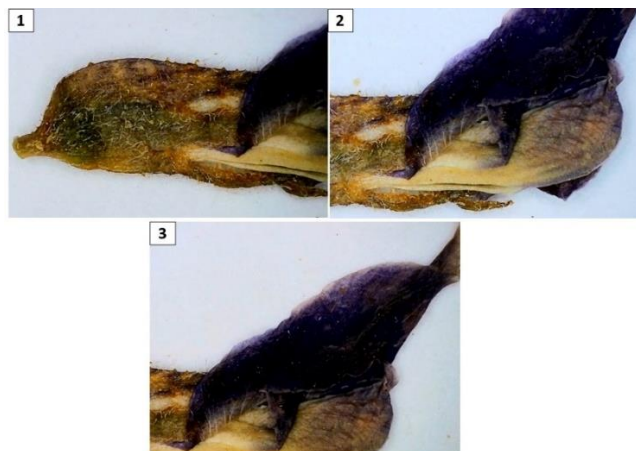


Рисунок 9 – Макрофотография цветка солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.):

1 – чашечка; 2 – венчик (крыло); 3 – венчик (парус).

Наличие цветков в сырье, будет признаком недоброкачественного сырья, собранного не в ту фазу вегетации.

3.2. Сравнительный анатомо-гистологический анализ надземных частей видов рода *Glycyrrhiza* L.

Однако известно, что морфологические особенности ЛРС в значительной части теряются при измельчении сырья, вследствие чего наиболее устойчивыми и селективными признаками являются особенности анатомии и гистологии.

3.2.1. Анатомо-гистологический анализ листьев *Glycyrrhiza glabra* L.

В связи со сложностью морфологического строения листа солодки голой исследование его анатомических особенностей строения разделили на два блока: листовая пластинка; рахис и черешочки листочков сложного листа.

3.2.1.1. Анатомия листовой пластинки *Glycyrrhiza glabra* L.

Анатомически листья солодки голой дорзовентрального типа строения. Столбчатый мезофилл представлен мелкими клетками овальной формы с тёмно-зелёным протопластом. Клетки столбчатого мезофилла плотно расположены в один или два ряда непосредственно под верхним эпидермисом листовой пластинки.

Одной из значимых особенностей надземной части солодки голой является наличие во всех органах клеток с бурым пигментом. В частности, в листовой пластинке такие пигментированные клетки присутствуют в столбчатом мезофиле, выделяясь в ткани не только пигментацией, но и значительно большим размером относительно клеток основного мезофилла (рис. 10Б). Кроме того, пигментированные клетки встречаются и в тканях центральной жилки, как во флоэмной, так и ксилемной ее части (рис. 10В).

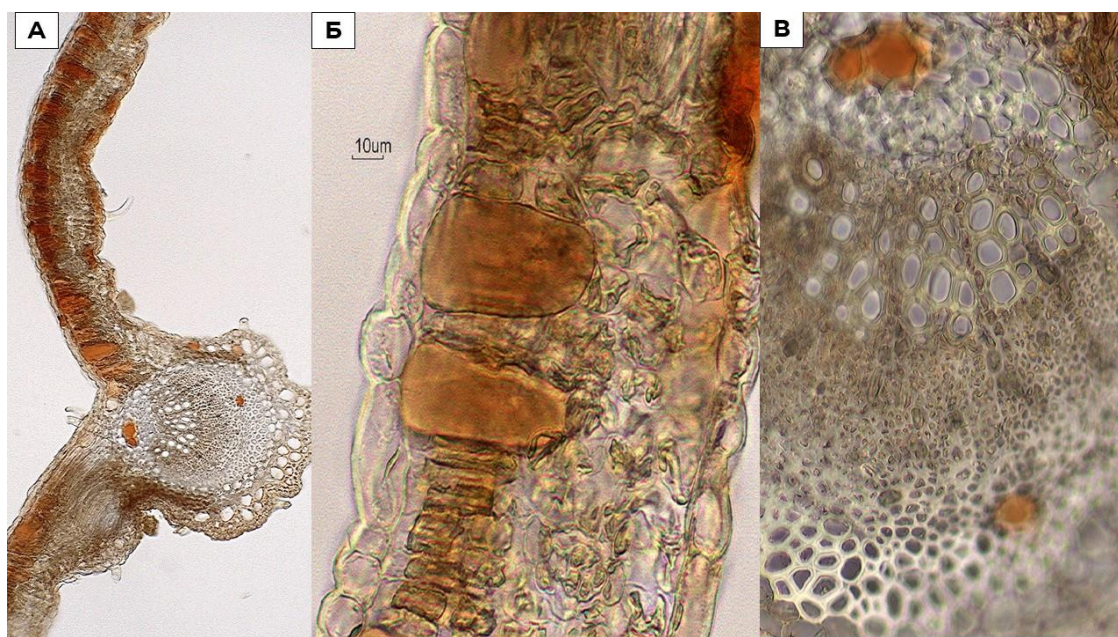


Рисунок 10 – Анатомические особенности листа солодки голой: А – поперечный срез листа (x40); Б – столбчатый мезофилл (x400); В – центральная жилка (x400).

Эпидермис листовой пластинки, при рассмотрении на поперечном сечении, сложен из тонкостенных клеток округлой или слабо овальной формы. Клеточные

стенки целлюлозные. С поверхности покрыты слабым кутикулярным слоем (рис. 10Б).

При рассмотрении с поверхности эпидермальные клетки верхней стороны листовой пластинки слабо извилистые. Лист солодки голой амфистоматический, в следствии чего на верхней стороне листовой пластинки встречаются устьичные аппараты. Частота встречаемости с верхней стороны не высока и составляет порядка 5-9 устьичных аппаратов на 1 мм². Устьичные аппараты анамоцитного типа. Околоустьичных клеток как правило от четырёх до пяти (рис. 11А).

На просвет эпидермиса видны пигментированные клетки столбчатого мезофилла, часто собранные в малые группы по две или три клетки (рис. 11Б).

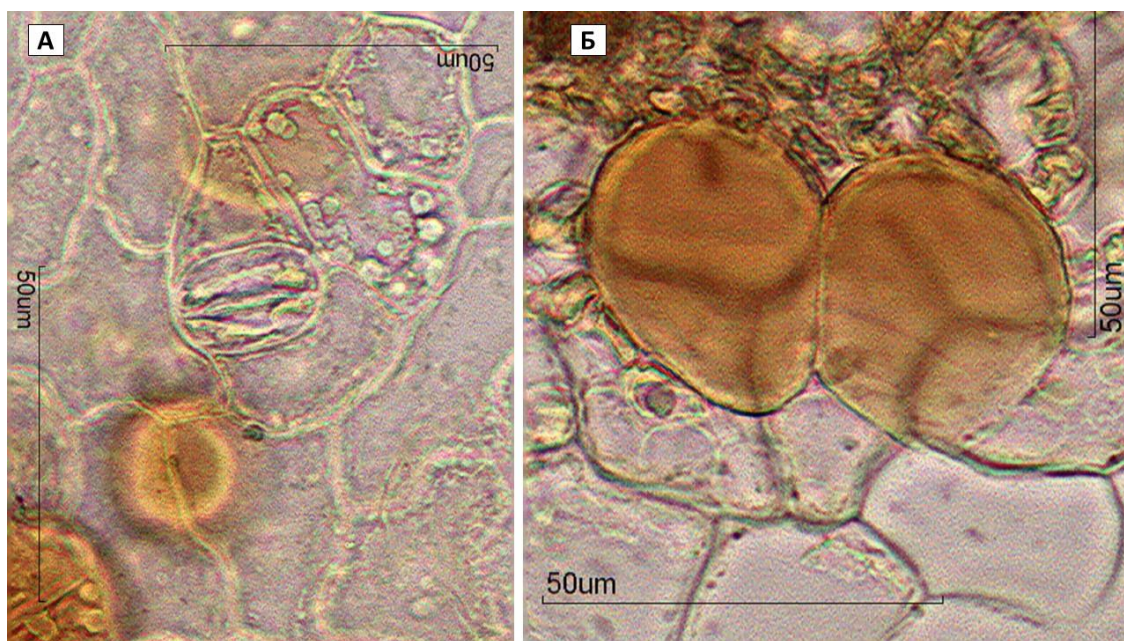


Рисунок 11 – Эпидермис листа солодки голой: А – устьичный аппарат (x400); Б – пигментированная клетка (x400).

На поверхности верхнего эпидермиса локализованы железистые трихомы, представленные желёзками с крупной многоклеточной головкой.

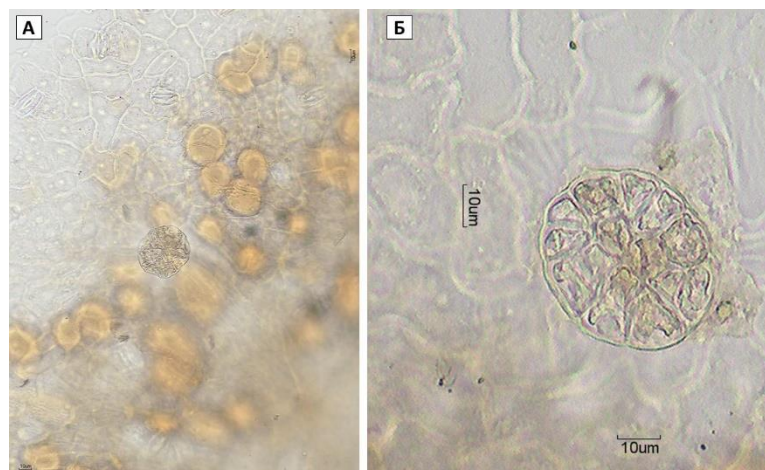


Рисунок 12 – Железистые трихомы верхнего эпидермиса: А – Общий вид верхней эпидермы с желёзкой (x100); Б – Фокус на головку желёзки (x400).

Головка железистой трихомы имеет овальное очертание и насчитывает до 10-ти клеток. У клеток головки заметно утолщена клеточная стенка. Их протопласты имеют зернистое строения и слабо желтую пигментацию (рис. 12Б).

В ряде случаев желёзка отпадает и на её месте заметно место прикрепления с характерной воронкообразной структурой расположения клеток (рис. 13А, В).

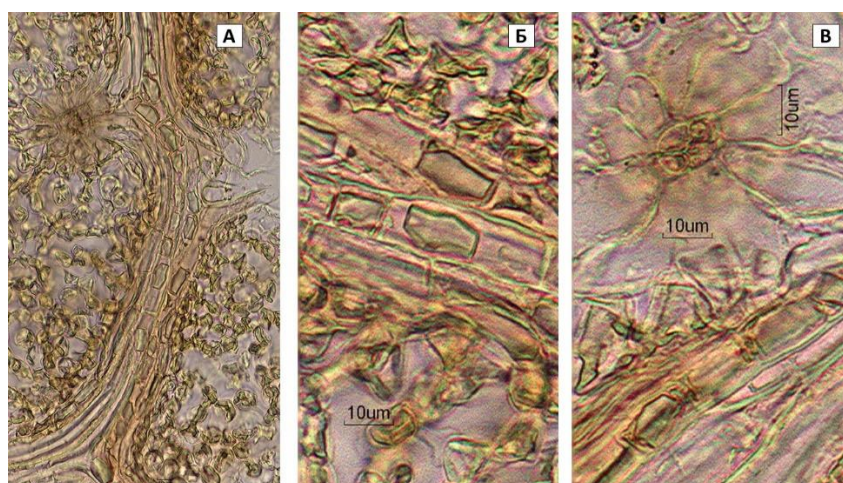


Рисунок 13 – Клетки жилки листовой пластинки: А – клетки жилки (x100); Б – призматические кристаллы в клетках жилки (x400); В – место прикрепления железистой трихомы (x400).

Клетки эпидермиса над жилкой с верхней стороны листовой пластинки прозенхимной формы. При фокусировке на нижележащие слои клеток видны

клетки с кристаллическими включениями. Кристаллические включения представлены монокристаллами призматической или, реже, прямоугольной формы (Рис. 13А, Б).

При рассечении жилки в тангентальной плоскости видны спиральные сосуды с косыми стенками множественных перфораций (рис. 13А, В).

По периферии жилка окружена губчатым мезофиллом, состоящим из мелких клеток округлой формы. Межклетники губчатого мезофилла значительно больше самих клеток и имеют неправильную сильно разветвлённую форму (рис. 14Б).

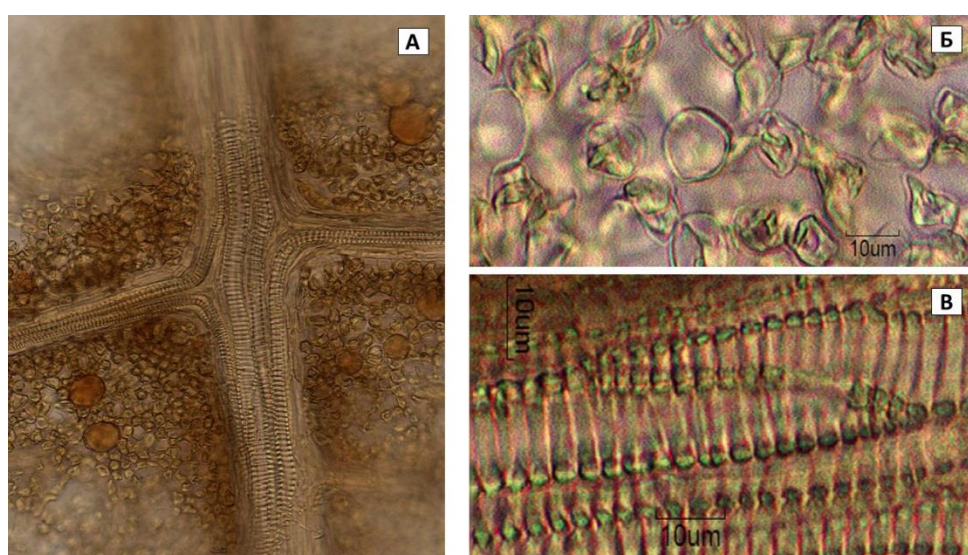


Рисунок 14 –Ткани жилки листовой пластинки с нижней стороны листа: А – иннервация листовой пластинки на тангентальном сечении (x100); Б – губчатый мезофилл (x400); В – спиральные сосуды жилки (x400).

Клетки нижнего эпидермиса имеют волнисто-извилистые стенки. Встречаемость устьичных аппаратов значительно выше и составляет порядка 20-25 устьичных аппаратов на 1 мм². Тип устьичных аппаратов и особенности строения замыкающих клеток аналогичны таковым для устьичных аппаратов с верхней стороны (рис. 14А).

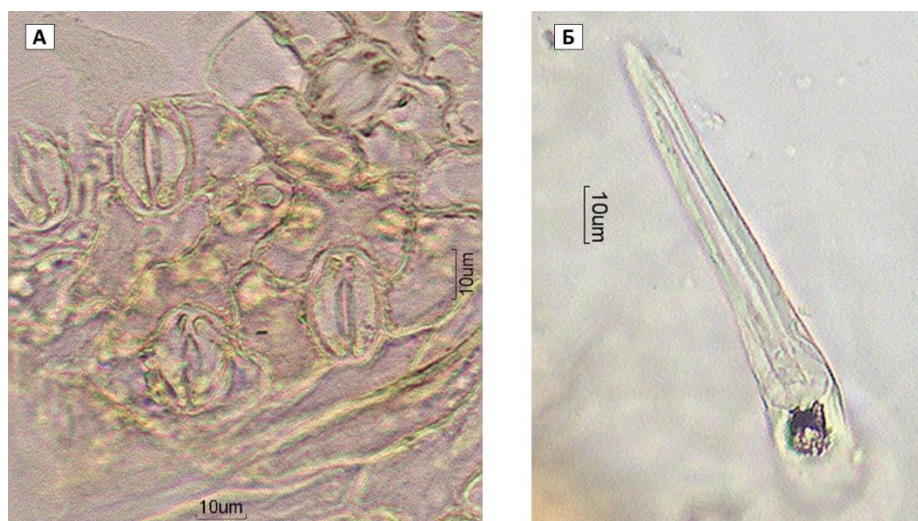


Рисунок 15 – Строение нижнего эпидермиса листовой пластинки: А – устьичные аппараты нижней стороны эпидермиса; Б – бичевидные волоски.

Помимо железистых трихом лист солодки голой покрыт простыми бичевидными волосками. В основании бичевидных волосков от двух до трёх мелких прямоугольных клеток с заметно утолщенной клеточной стенкой. Конечная клетка трихомы длинная с заострённой вершиной. Клеточная стенка трихом ровная без бородавок (Рис. 15Б).

3.2.1.2. Петиолярная анатомия листа *Glycyrrhiza glabra* L.

Как известно, значительной селективностью при таксации обладают петиолярные признаки, в частности, особенности строения рахиса непарноперистого сложного листа. Анализ научной периодической литературы не выявил ранее описанных анатомо-гистологических особенностей рахисов солодки голой.

Нами изучены поперечные сечения рахисов на различных уровнях среза от базальной до апикальной части. Кроме того, исследовалась анатомия черешочков листочков сложного листа. Топография срезов представлена на схеме (рис. 16).

Базальная часть рахиса значительно крупнее остальной его части. Она имеет почти округлую форму с усечением по бортам. Строение проводящей системы в

базальной части пучкового строения. Пучки при этом отличаются по размеру, что является следствием слияния мелких коллатеральных пучков в более крупные (рис. 16А). С поверхности базальная часть рахиса опушена аналогичными трихомами, описанными ранее для листовой пластинки.

Выше от базальной части поперечные сечения рахиса имеют значительно меньшие размеры. Форма поперечного сечения рахиса в медиальной части ромбовидная с V-образной выемкой с адаксиальной стороны (рис. 16, Б4; 24В).

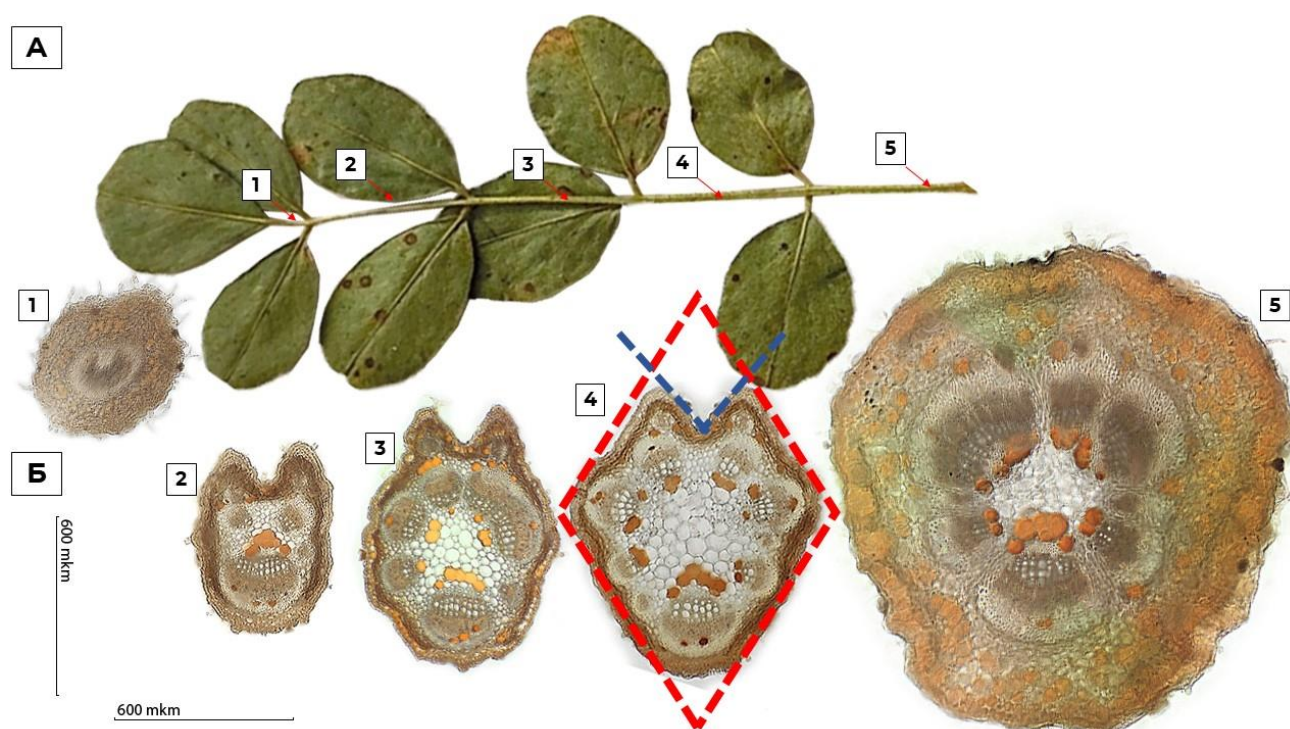


Рисунок 16 – Топография поперечных сечений рахиса листа солодки голой: А – фрагмент гербарного листа с рахисом; Б – поперечные сечения рахиса: 1 – черешочек листочка; 2, 3, 4 – промежуточные сегменты рахиса ; 5 – базальная часть рахиса.

В целом выявлена тенденция к уменьшению размера поперечного сечения от базальной части к апексу рахиса. С этим связано уменьшение числа коллатеральных пучков (рис. 17).

На протяжении всего рахиса наблюдается постоянство центральной жилки, которая относительно других пучков увеличивается в размерах (рис. 17).

Дополнительной особенностью поперечных сечений рахисов является V-образный вырез с адаксиальной стороны. Он наиболее выражен в медиальной части рахиса к верхушке уменьшается и менее диагностичен (рис. 17Д, В, Ж).

Апикальная часть рахиса теряет ромбовидное очертание и имеет овальную форму (рис. 17Ж).

Весь рахис по всей его длине слабо опушен бичевидными и железистыми трихомами, описанными ранее для листовой пластинки.

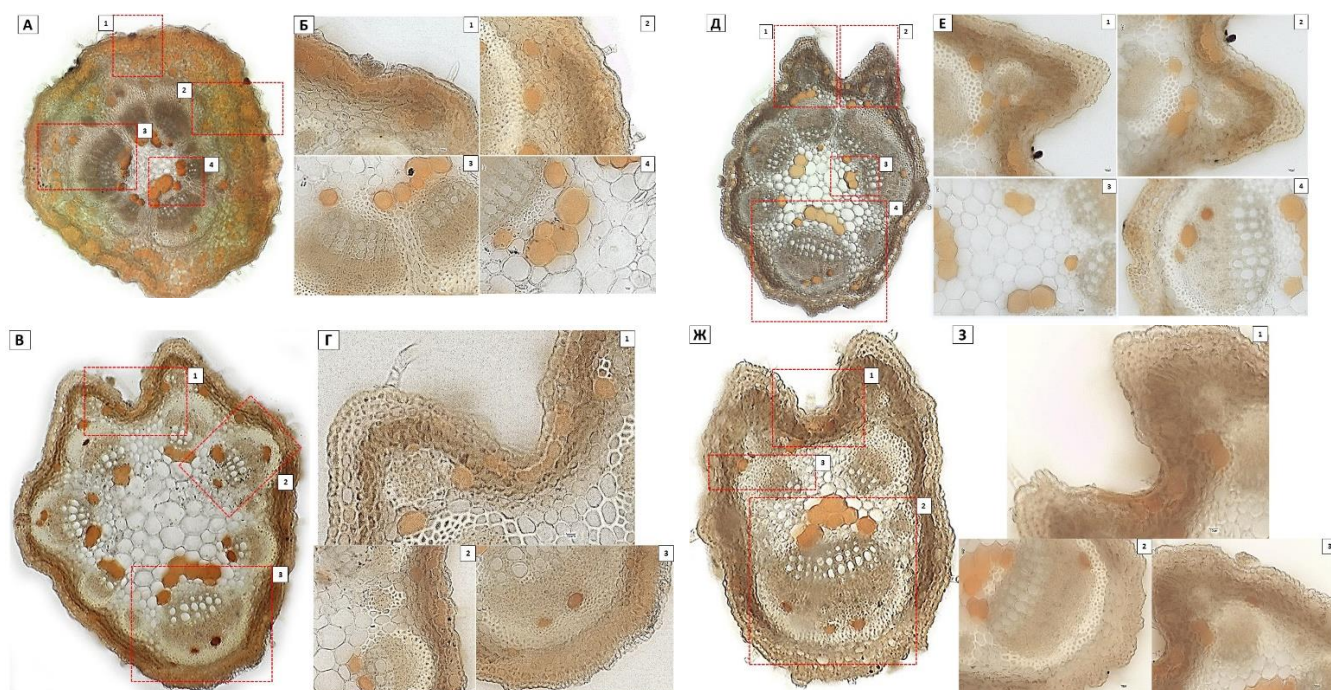


Рисунок 17 – Особенности очертаний поперечных сечений рахиса: А – поперечное сечение базальной части рахиса; Б – особенности базальной части; В – Ромбовидная форма поперечного сечения; Г – особенности ромбовидного сечения; Д – срез медиальной части рахиса; Е – особенности медиального среза; Ж – форма апикального среза рахиса; З – особенности апикального сечения.

Обозначения: 1 – адаксиальная часть; 2 – абаксиальная часть; 3 – борт.

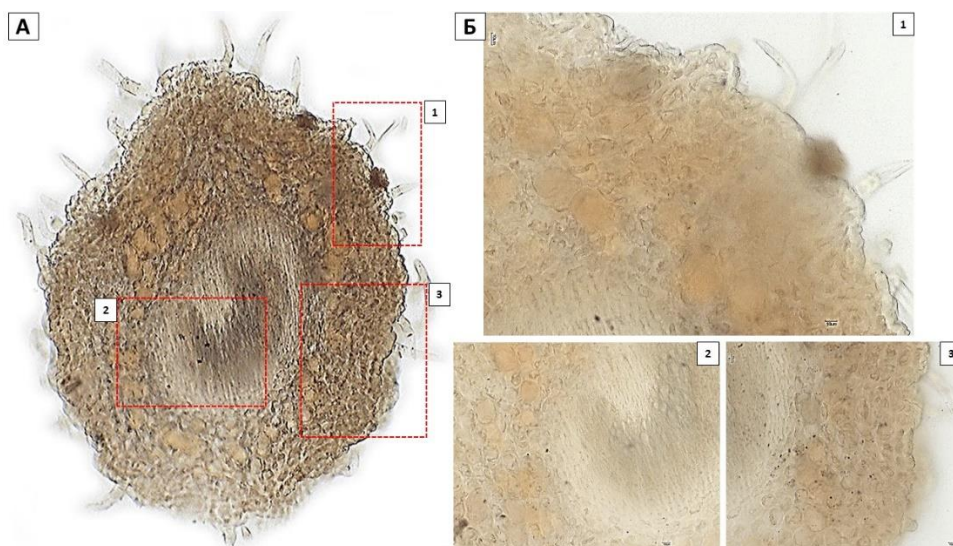


Рисунок 18 – Поперечное сечение черешочка листочка сложного листа: А – общий вид черешочка (x100); Б – фрагменты поперечного сечения (x400).

Обозначения: 1 – адаксиальная сторона; 2 – центральная жилка; 3 – абаксиальная сторона.

Черешочек листочка сложного листа на поперечном сечении имеет округлую форму. Мезофилл однороден имеются пигментированные клетки. С поверхности черешочек сильно опушен бичевидными волосками. Проводящая системе представлена одним подковообразным коллатеральным пучком. Армированные ткани в черешочке слабо выражены (рис. 18).

Нами сделан вывод, что для листа солодки голой наиболее значимым селективным видовым признаком является строение рахиса в медиальной части, имеющее ромбовидные очертания.

3.2.2. Анатомо-гистологический анализ стеблей *Glycyrrhiza glabra* L.

Стебли солодки голой в зависимости от толщины могут отличаться по развитости ксилемной части центрального цилиндра. Наиболее важными в диагностическом отношении является переходный тип строения у тонких веток, диаметром до 5 мм их выраженная ребристость. Напротив, основной стебель солодки голой имеет непучковый тип строения (рис. 19, 20).



Рисунок 19 – Фрагменты стеблей солодки голой: А – 5-6 мм; Б – 2-4 мм; В – 1-2 мм.

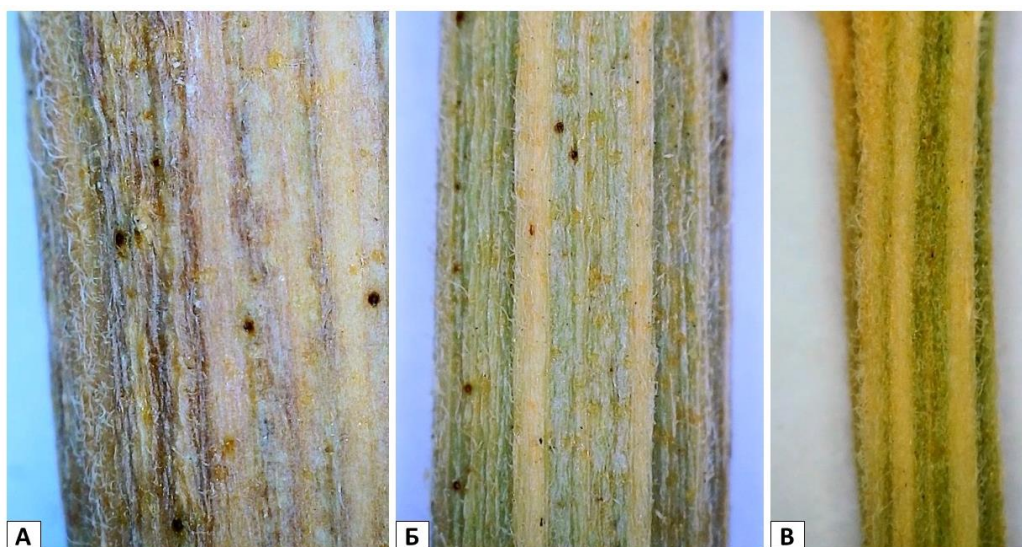


Рисунок 20 – Поверхность стеблей, их ребристость и опушение: А – стебель $\varnothing=6$ мм; Б – стебель $\varnothing=4$ мм; В – стебель $\varnothing=2$ мм.

Необходимо отметить, что клетки с бурым протопластом, описанные для листовой пластинки, встречаются и в стеблях. Локализация пигментитрованных

клеток присуща в основном флоэмной части стебля (рис. 21Б), а также перимедулярной зоне центрального цилиндра (рис. 21А).

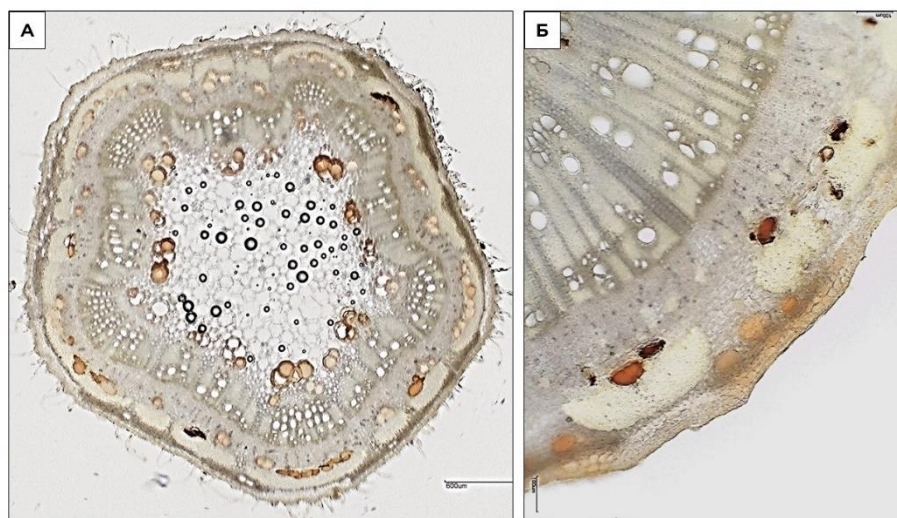


Рисунок 21 – Поперечное сечение стебля солодки голой: А – поперечное сечение (x40); Б – пигментированные клетки во флоэме (x100)

Вся поверхность растения покрыта двумя типами трихом (рис. 22А). Первый тип трихом – желёзки, обильно покрывающие листовую пластинку и стебель (рис. 22Б). Они имеют крупную желто-коричневую головку, видимую на поверхности при помощи лупы x10. Головка мелкоклеточная с липофильным содержимым в протопластах клеток, что заметно по розовому окрашиванию при обработке раствором Судана III (рис. 22В).

Второй тип – кроющие бичевидные волоски, имеющие многоклеточное основание, сложенное из мелких клеток с заметно утолщенной лигнифицированной клеточной стенкой и длинной конечной клеткой с целлюлозной клеточной оболочкой (рис. 22Г, 22Д).

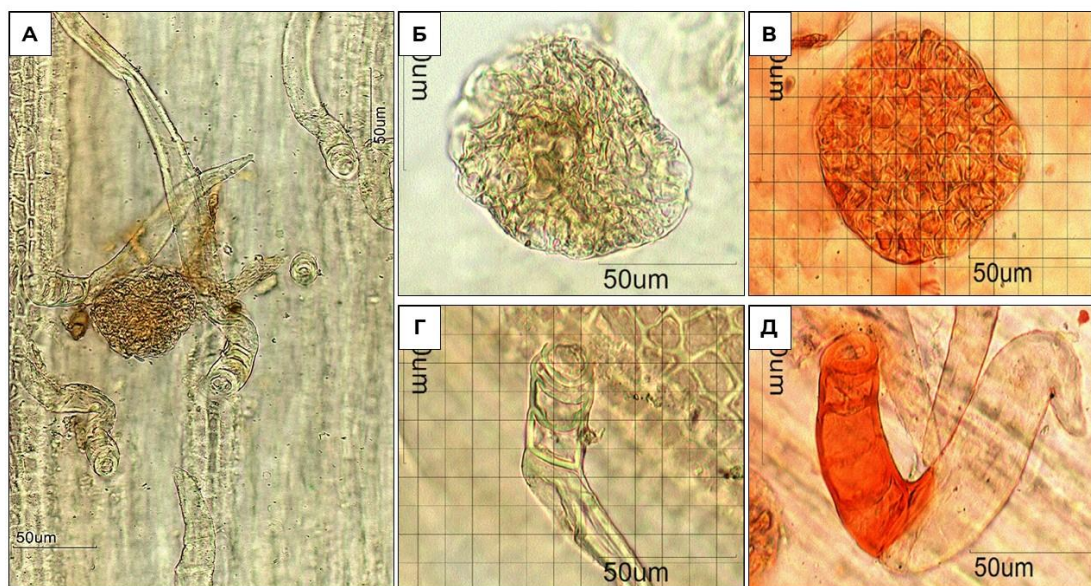


Рисунок 22 – Особенности строения эпидермиса стебля солодки голой: А – эпидермис верхней стороны (x400); Б – многоклеточная железка (x400); В – окраска многоклеточной железки раствором Судана III (x400); Г – бичевидный волосок (x400); Д – окраска бичевидного волоска раствором Судана III (x400).

Необходимо отметить, что данный тип трихом является типичным для многих представителей семейства *Fabaceae* таких, как донник лекарственный (*Melilotus officinalis* L.), что делает этот признак менее значимым для видовой специфичности [17].

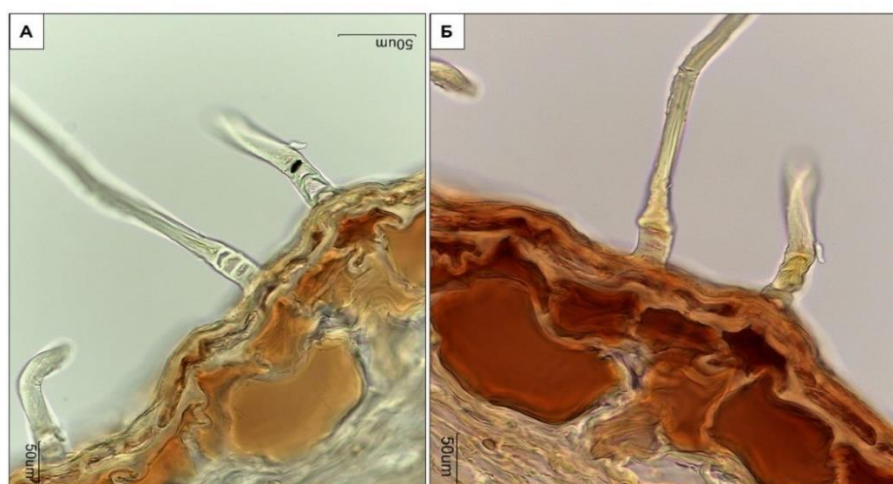


Рисунок 23 – Эпидермис стебля солодки голой: А – пигментированные клетки (x400); Б – окраска раствором сернокислого анилина пигментированных клеток (x400).

Описанные ранее для листьев и стеблей признаки, пигментированные клетки с бурым содержимым протопласта, реагируют на раствор NaOH с резким потемнением окраски. Кроме того, с раствором сернокислого анилина аморфный пигмент окрашивается в тёмно-бурый цвет, иногда до черного в зависимости от концентрации реагента (рис. 23). Характер окраски пигмента, реагирующего на сернокислый анилин, позволяет предполагать, что основным компонентом протопласта являются сапонины тритерпенового ряда.

3.2.3. Анатомо-гистологический анализ плодов *Glycyrrhiza glabra* L.

Основной особенностью строения створок бобов солодки голой на поперечном сечении является наличие пигментированных клеток с бурым протопластом по периферии эпидермиса в гиподермальном слое. По периферии эндокарпия пигментированные клетки имеют больший размер. Пигментные клетки также локализованы во флоэмной части проводящих пучков (рис. 24).



Рисунок 24 – Поперечное сечение стручка *Glycyrrhiza glabra* L.: А – плодоножка (x20); Б – боб (x20).

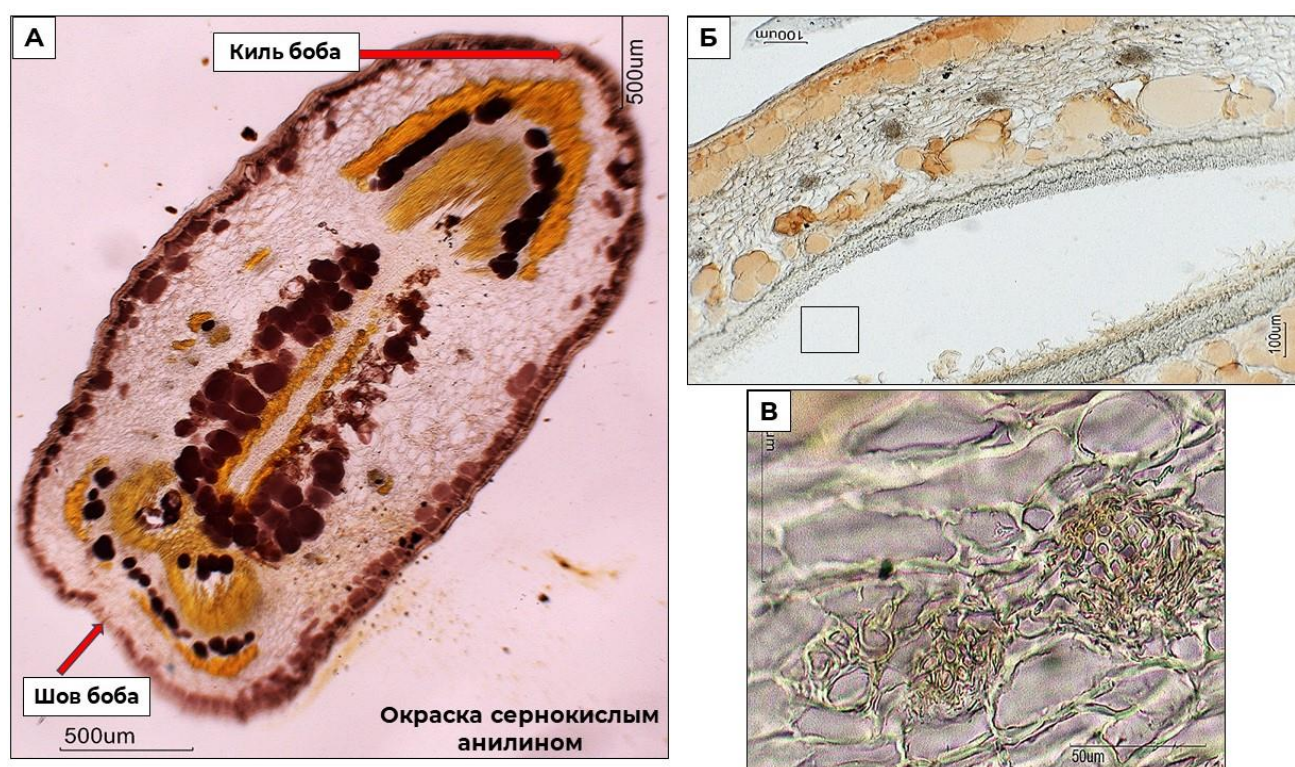


Рисунок 25 – Плод солодки голой: А – поперечный срез боба (x40) после окраски серноокислым анилином; Б – створка боба (x100); В – коллатеральный пучок (x400).

Проводящие ткани створок бобов солодки голой собраны в коллатеральные пучки (рис. 25Б). При этом крупные пучки локализованы в ребрах: два округлых пучка со стороны шва и один пучок со стороны кия (рис. 25А). По остальной уплощенной части створок пучки мелкие, расположенные в один ряд.

3.2.4. Анатомо-гистологический анализ семян *Glycyrrhiza glabra* L.

Семена в гистологическом отношении имеют особенности строения семенной кожуры, заключающиеся в наличии плотного слоя из уплощенных склерифицированных клеток, расположенных под мелкоклеточным эпидермисом (рис. 26А). Клеточные стенки и протопласт клеток семенной кожуры сильно пигментированы в бурый или оранжево-желтый цвет (рис. 26Б).



Рисунок 26 – Семенная кожура солодки голой: А – поперечный срез (x100); Б – фрагмент кожуры (x400).

Все выявленные диагностические признаки были использованы для разработки разделом «Внешние признаки» и «Микроскопические признаки» проекта ФС «Солодки голой трава».

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Проведен сравнительный морфологический анализ надземных частей представителей рода *Glycyrrhiza* L., в ходе которого были выявлены диагностические признаки для травы солодки голой. Было выявлено, что именно морфология плодовой части является отличительным признаком, позволяющим отличить примесные виды рода *Glycyrrhiza* L.

2. Морфологическими диагностическими признаками для травы солодки голой являются: верхняя и нижняя поверхности усажены точечными железками, клейкими от обильных выделений; центральная жилка с нижней стороны листочка густо опушена; поверхность черешка густоопушенная и скудно-железистая. Плод прямой слегка извилистый; поверхность голая без опушения. Цветок с тремя фиолетовыми крылами, двумя сросшимся зеленоватыми парусами с фиолетовым оттенком, вдвое короче, чем крыло. Парус ярко выражен морфологически.

3. Для листа солодки голой наиболее значимым селективным видовым признаком является строение рахиса непарноперистого сложного листа. Отличительной чертой солодки голой является ромбообразная форма поперечного сечения рахиса в медиальной части с V-образной выемкой с адаксиальной стороны.

4. Дополнительные диагностические признаки, присутствующие в всех частях травы солодки голой и дающие селективную диагностику таксона являются: бичевидные волоски с мелкоклеточным основанием и длинной остроконечной клеткой; железки с крупной многоклеточной головкой; пигментированные клетки с оранжевым пигментом, реагирующим на раствор NaOH с потемнением окраски и с раствором сернокислого анилина с окрашиванием в тёмно-бурый до черного цвет, что предполагает о тритерпеновой природе пигмента.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (*GLYCYRRHIZA GLABRA* L.)

Обзор научных исследований выявил, что объем работ по изучению химического состава на территории Российской Федерации надземной части солодки голой достаточно мал [44]. Однако исследования зарубежных ученых были опубликованы данные о химическом составе травы солодки голой [11, 59, 91, 96].

В данной главе представлены результаты исследования химического состава травы солодки голой, а также сравнительный фитохимический анализ надземной части некоторых видов рода Солодка.

4.1. Выделение индивидуальных веществ из изучаемого вида сырья

В таблице 7 представлена информация о процессе пробоподготовки, необходимого для проведения хроматографического разделения.

Таблица 7 – Пробоподготовка для проведения колоночной хроматографии сырья
травы солодки голой

№	Основные этапы пробоподготовки	Процесс пробоподготовки
1	<i>Подготовка растительного сырья</i>	Траву солодки голой, культивируемой на территории Самарской области, п.г.т. Алексеевка и заготовленную в августе 2022 г., измельчили до размера частиц 2-3 мм. Навеска сырья составила 210 г.
2	<i>Получение извлечения</i>	Методом дробной мацерации с термическим окончанием в соотношении «сырье-экстрагент» 1:5 на 70% этиловом спирте было получено

		извлечение травы с. голый объемом около 1000 мл. В проведенном нами исследовании установили, что полное извлечение суммы флавоноидов происходит путем экстрагирования 90% этиловым спиртом [7, 8]. Шрот экстрагировали 90% этиловым спиртом при нагревании на водяной бане. Общий объем извлечения составил около 1500 мл.
3	<i>Упаривание извлечения</i>	С помощью ротационно-вакуумной установки извлечение было упарено объёма 50 мл.
4	<i>Нанесение извлечения на сорбент</i>	Упаренное извлечение наносили на силикагель и смешивал до однородного состояния (примерно 55% от массы навески), затем высушили в естественных условиях
5	<i>Подготовка хроматографической колонки</i>	В хроматографическую колонку объемом 1 литр был внесен чистый силикагель (в количестве равном силикагелю с нанесенным извлечением). После этого был сформирован слой сорбента в хлороформе, затем в колонку был внесен силикагель с извлечением и начали процесс хроматографирования.

В процессе эксперимента были использованы элюенты – хлороформ и смесь хлороформа с 96% этиловым спиртом в определенных пропорциях, очищенная вода. Элюирование проводилось в градиентном режиме, что подразумевает постепенное изменение состава элюента. Последовательное применение элюентов позволило добиться эффективного разделения компонентов смеси. Полученные элюаты разделялись на фракции объемом 200 мл, далее упаривали на

ротационном испарителе до объема в 10 мл. Схема элюирования была разработана таким способом, чтобы эффективно разделить вещества (табл. 8).

Таблица 8 – Схема элюирования фракций из извлечения травы солодки голой

Объем элюента, об. %		Объем элюента, мл	№ фракций
Хлороформ, %	Спирт этиловый, %		
100	-	1000	1-5
99	1	1000	6-10 (3)
97	3	1000	11-15 (1)
95	5	1000	16-20 (2)
93	7	1000	21-26
90	10	1500	27-33
85	15	500	34-36
80	20	500	37-41
70	30	500	42-26
60	40	500	47-51
50	50	500	52-56
40	60	500	57-61
-	100	500	62-65
Вода очищенная		500	66-68

Во время проведения исследования (элюирования) и получения фракций, оценку результатов осуществлялась визуально путем анализа изменений окраски по изменению окраски растворов и ее яркости). Состав фракций идентифицировали с использованием метода ТСХ в системе растворителей хлороформ-96% этиловый спирт (4:1), кроме того, использовался внутренний

стандарт – извлечение травы солодки голой. Фракции, в которых содержались кристаллические осадки, подвергались процессу перекристаллизации в различных растворителях. Также применялась рехроматография на полиамиде и силикагеле.

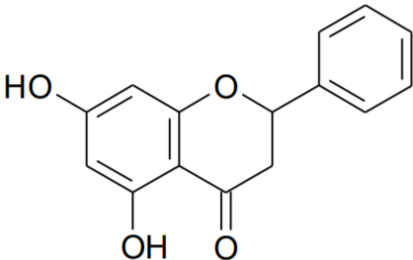
4.2. Изучение и идентификация индивидуальных веществ травы солодки голой

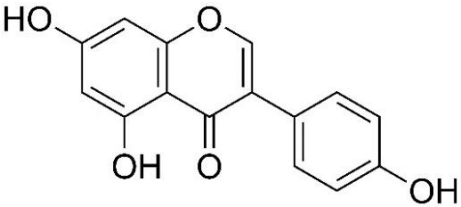
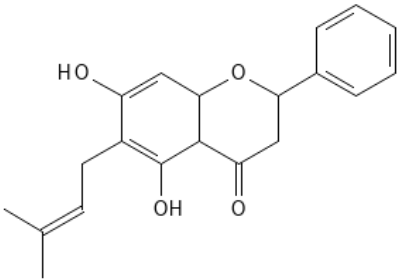
Для идентификации веществ из травы солодки голой были отобраны наиболее значимые, по-нашему мнению, фракции:

1. Фракции 11-15 [*пиноцембрин*] (**1**). Соединение (**1**) было получено при элюировании смеси хлороформа и 96% этилового спирта в соотношении 97:3.
2. Фракции 18-20 [*генистеин*] (**2**). Соединение (**2**) было получено при элюировании смеси хлороформа и 96% этилового спирта в соотношении 95:5.
3. Фракции 6-10 [*изоглабринин*] (**3**). Соединение (**3**) было получено при элюировании смеси хлороформа и 96% этилового спирта в соотношении 99:1.

Соединения **1**, **2**, **3** определены нами на основании данных УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР- и масс-спектров как пиноцембрин, генистеин, изоглабринин. Характеристики выделенных веществ из травы с. голой представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристики веществ, выделенных из травы солодки голой методом колоночной хроматографии

№ п/п	Название соединения, брутто формула	Структурная формула	Физико- химические характеристики
1.	<i>Пиноцембрин</i> (5,7-дигидроксифлаванон) C ₁₅ H ₁₂ O ₄		Кристаллы белого цвета состава, т. пл. 193-195 °С (из смеси хлороформ- <i>n</i> -

			гексан). $\lambda_{\max}$ EtOH 290, 325 (пл.) нм
2.	<i>Генистеин</i> (5,7,4'- тригидроксиизофлаванон) $C_{15}H_{10}O_5$		Кристаллы светло-желтого цвета состава, т. пл. 296-298 °C (из смеси хлороформ- этанол). $\lambda_{\max}$ EtOH 280 нм
3.	<i>Изоглабрин</i> (5,7- дигидрокси-6- пренилфлаванон) $C_{20}H_{20}O_4$		Кристаллы белого цвета состава т. пл. 193-195 °C (из смеси хлороформ- <i>n</i> - гексан). $\lambda_{\max}$ EtOH 290, 325 (пл.) нм

Описание физико-химических свойств для веществ, выделенных из травы солодки голой и используемых в процессе их идентификации, приводятся ниже:

Пиноцембрин (1) (5,7-дигидроксифлаванон) - кристаллы белого цвета состава $C_{15}H_{12}O_4$, т. пл. 193-195 °C (из смеси хлороформ-*n*-гексан). $\lambda_{\max}$ EtOH 290, 325 (пл.) нм.

1H -ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.10 (1H, с, 5-OH), 10.79 (1H, с, 7-OH), 7.37-7.47 (5H-Ar, м), 5.90 (1H, д, J = 2.5, H-8), 5.88 (1H, д, J =

2.5, H-6), 5.53 (дд, $J = 4.0$ и 12.0 , H-2ax), 3.23 (1H, дд, $J = 12.0$ и 17.0 , H-3ax), 2.75 (1H, дд, $J = 4$ и 17 Гц, H-3-eq) (Приложение 1, рис. 1).

^{13}C -ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO- d_6 , δ_{C} , м.д.): 199.47 (C-4), 167.25 (C-7), 164.04 (C-5), 163.23 (C-9), 148.24 (C-4'), 139.22 (C-1'), 129.07 (C-3', C-4', C-5'), 127.14 (C-2', C-6'), 102.32 (C-10), 96.48 (C-6), 95.59 (C-8), 78.92 (C-2), 42.64 (C-3) (Приложение 1, рис. 2).

Масс-спектр: (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 255,0490 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 257,0807 $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 279,0628 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Приложение 1, рис. 3).

Генистеин (2) (5,7,4'-тригидроксиизофлавонон) - кристаллы светло-желтого цвета состава $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, т. пл. 296-298 °C (из смеси хлороформ-этанол). λ_{max} EtOH 280 нм.

^1H -ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.91 (1H, с, 5-OH), 10.83 (1H, с, 7-OH), 9.55 (1H, с, 4'-OH), 7.33 (1H, д, $J = 9.0$, H-2',6'), 6.78 (1H, д, $J = 9.0$, H-3',5'), 6.33 (1H, д, $J = 2.5$, H-8), 6.18 (1H, д, $J = 2.5$, H-6) (Приложение 1, рис. 4).

^{13}C -ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO- d_6 , δ_{C} , м.д.): 180.73 (C-4), 164.78 (C-7), 162.52 (C-5), 158.69 (C-9), 157.93 (C-4'), 154.46 (C-2'), 130.67 (C-2, C-6'), 122.80 (C-3), 121.74 (C-1'), 115.58 (C-3', C-5'), 104.99 (C-10), 99.48 (C-6), 94.18 (C-8) (Приложение 1, рис. 5).

Масс-спектр: (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 269,0355 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 271,0748 $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 455,0950 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, m/z 485,0552 $[\text{M} + \text{K}]$ (Приложение 1, рис. 6).

Изоглабринин (3) (5,7-дигидрогидроксиф-6-прениллаванон) - кристаллы белого цвета состава $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$, т. пл. 193-195 °C (из смеси хлороформ-*n*-гексан). λ_{max} EtOH 290, 325 (пл.) нм.

^1H -ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.36 (1H, с, 5-OH), 10.74 (1H, с, 7-OH), 7.39-7.47 (5H-Ar, м), 5.97 (1H, с, H-8), 5.50 (1H, дд, $J = 4.0$ и 12.0 , H-2ax), 5.10 (1H, т, $J = 7.0$, H-2''), 3.16 (1H, дд, $J = 12.0$ и 17.0 , H-3ax), 2.74 (1H, дд, $J = 4.0$ и 17.0 , H-3-eq), 1.66 (3H, с, H-5''), 1.57 (3H, с, H-4'') (Приложение 1, рис. 7).

^{13}C -ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO- d_6 , δ_C , м.д.): 196.58 (C-4), 164.81 (C-7), 161.10 (C-5), 160.82 (C-9), 139.22 (C-1'), 130.79 (C-3''), 129.06 (C-3', C-4', C-5'), 127.09 (C-2', C-6'), 123.17 (C-2''), 108.21 (C-6), 102.15 (C-10), 94.98 (C-8), 25.99 (C-4''), 21.16 (C-1''), 18.17 (C-5'') (Приложение 1, рис. 8).

Масс-спектр: (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 323,1284 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 325,1434 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Приложение 1, рис. 9).

Хроматографические исследования были проведены для определения химического состава травы солодки голой. Для этого использовался метод адсорбционной колоночной хроматографии, в результате чего были выделены вещества флавоноидной природы с установлением их химической структуры.

4.2. Сравнительный ТСХ-анализ надземных органов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.)

В ходе исследования были обнаружены несколько характерных хроматографических особенностей пяти видов надземной части рода Солодка (рис. 27). В качестве веществ свидетелей использовали спиртовые растворы выделенных веществ из травы солодки голой – пиноцембрин, генистеин, изоглабранин.

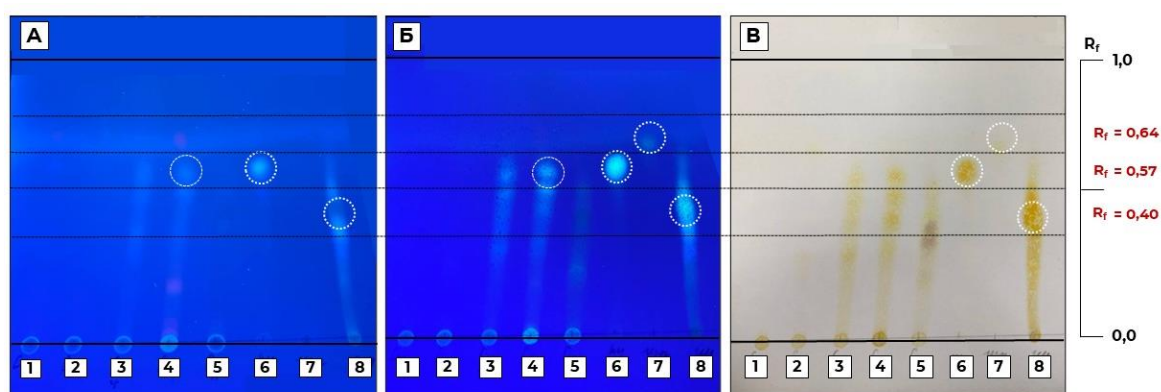


Рисунок 27 – Хроматограммы 70% водно-спиртовых извлечений надземных частей пяти видов рода Солодка в системе растворителей хлороформ-этанол (16:1): А – в УФ-свете $\lambda=365$ нм; Б – в УФ-свете $\lambda=365$ нм (после обработки спиртовым раствором AlCl_3); В – в видимом свете (после обработки ДСК).

Обозначения: 1 – Солодка щетинистая (*Glycyrrhiza echinata* L.); 2 – Солодка зловонная (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.); 3 – Солодки голая (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*); 4 – Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.); 5 – Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.); 6 – СО пиноцембрина; 7 – СО изоглабранина; 8 – СО генистеина.

В траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) обнаруживаются, выделенные флавоноиды – пиноцембрин, изоглабрин, генистеин. Величина R_f СО пиноцембрина = 0,57, R_f СО изоглабранина = 0,64. Генистеин (R_f = 0,40) содержится в минимальном количестве, поэтому не обнаружен методом ТСХ, т.к. он менее чувствительный (обнаруживаются только следы).

В траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*) обнаруживается пиноцембрин. Величина R_f СО пиноцембрина = 0,57.

4.3. Исследование компонентного состава травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) методом ВЭЖХ

Было проведено исследование компонентного состава водно-спиртовых извлечений травы солодки голой и солодки уральской методом ВЭЖХ при детекции длины волны 290 нм. При проведении качественного анализа методом ВЭЖХ, исследование извлечений проводились с использованием стандартных образцов ликвиритигенина (1), генистеина (2), пиноцембрина (3), изоглабранина (4).

Объем инжестируемых проб для извлечений из травы солодки голой и солодки уральской, а также растворов образцов ликвиритигенина, генистеина, пиноцембрина изоглабранина – 2 мкл.

По результатам проведенного хроматографического исследования в градиентном режиме (табл. 10) для извлечения травы солодки голой было установлено, что возможно идентифицировать диагностически значимый флавоноид – пиноцембрин, а также ликвиритигенин, генистеин, изоглабрин (рис. 28).

Таблица 10 – Профиль градиента хроматографического разделения

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0-5	30	70
5-15	50	50
15-20	60	40
20-25	80	20

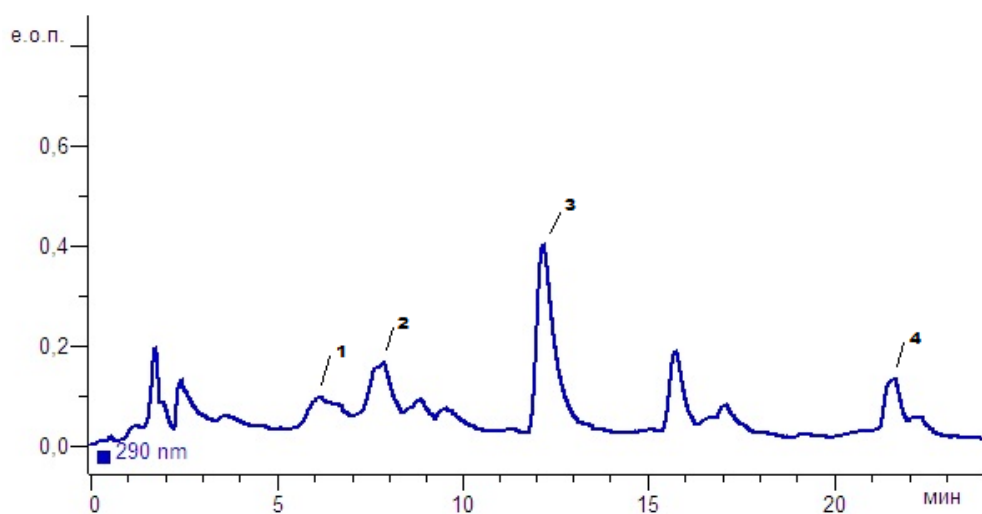


Рисунок 28 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы солодки голой: 1 – ликвиритигенин; 2 – генистеин; 3 – пиноцембрин; 4 – изоглабрин.

В таблице 11 представлено сравнение время удерживания пиков на хроматограммах между извлечением и стандартных образцов.

Таблица 11 – Время удерживания пиков на хроматограммах извлечения и стандартных образцов

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Извлечение
Ликвиритигенин (пик 1)	6,57	6,52
Генистеин (пик 2)	7,43	7,64
Пиноцембрин (пик 3)	12,22	12,34
Изоглабринин (пик 4)	21,60	21,54

При добавлении раствора стандартного образца пиноцембрина в извлечение травы солодки голой наблюдается увеличение интенсивности пика пиноцембрина, что свидетельствует о наличии вещества в объекте (рис. 29).

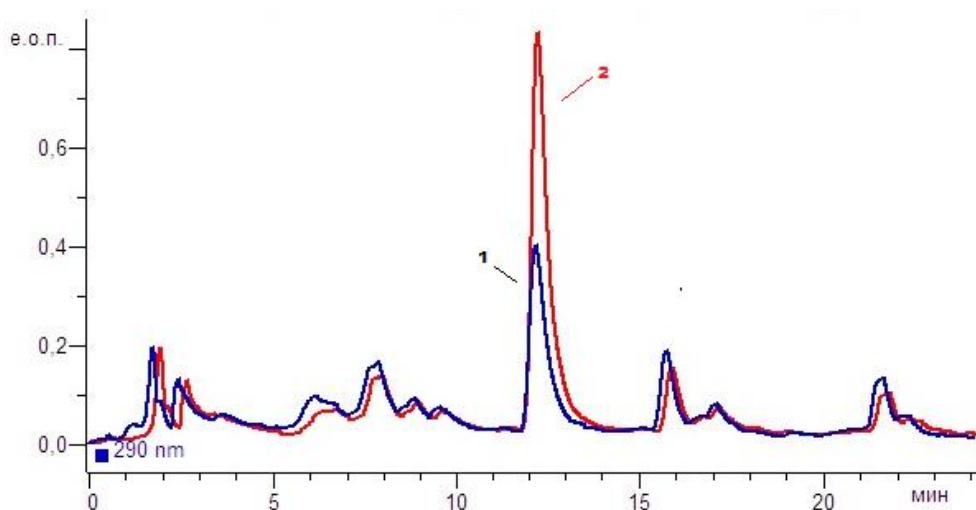


Рисунок 29 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы солодки голой с добавлением пиноцембрина: 1 – извлечение травы солодки голой; 2 – извлечение травы солодки голой после добавления СО пиноцембрина.

При сравнении двух хроматограмм извлечений травы солодки голой и солодки уральской наблюдаем, что компонентный состав различен (рис. 32).

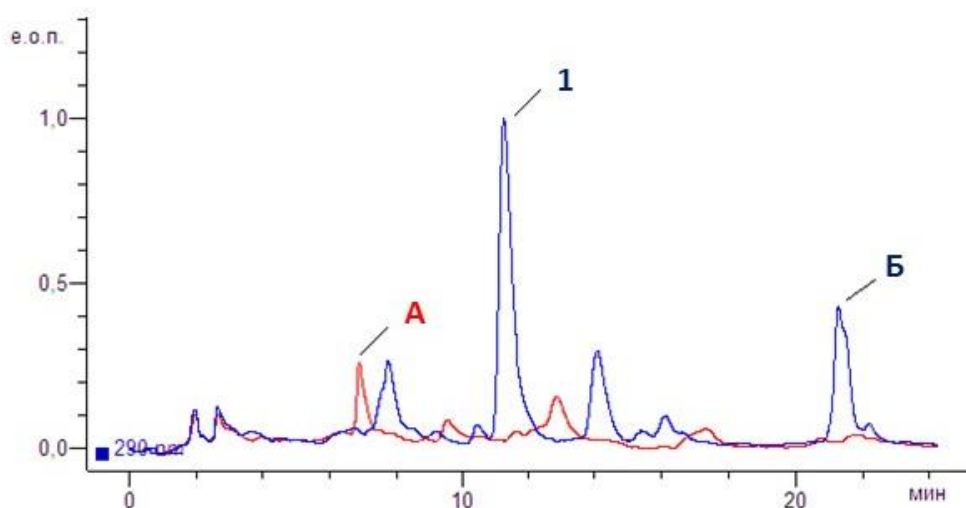


Рисунок 32 – Сравнительная ВЭЖХ-хроматограмма извлечения травы солодки голой и солодки уральской: А – солодка уральская; Б – солодка голая; 1 – СО пиноцембрина.

По результатам сравнительного ВЭЖХ-анализа были установлены особенности компонентного состава травы солодки голой и солодки уральской. Диагностически значимым флавоноидом для травы солодки голой является пиноцембрин.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Из травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) впервые выделены и идентифицированы *генистеин* (5,7,4'-тригидроксиизофлаванон) и *изоглабринин* (5,7-дигидрокси-6-пренилфлаванон).
2. Впервые из травы солодки голой, культивируемой и произрастающей на территории РФ был выделен флаванон – *пиноцембрин* (5,7-дигидроксифлаванон).
3. В ходе сравнительного ТСХ-анализа в траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) были обнаружены выделенные флавоноиды – пиноцембрин, изоглабринин. В траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*) был выявлен флавоноид – пиноцембрин.
4. Исследование травы солодки голой методом ВЭЖХ позволил выявить диагностически значимый флавоноид – пиноцембрин.
5. Изучение химического состава травы солодки голой имеет важной практическое значение для разработки методов стандартизации и определения числовых показателей качества растительного сырья «Солодки голой трава».

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (*GLYCYRRHIZA GLABRA* L.)

Для внедрения перспективных лекарственных препаратов на основе травы солодки голой в практику медицины и фармации, необходима разработка новой фармакопейной статьи в Государственную фармакопею РФ на соответствующее растительное сырье. Для этого потребуются проведение комплекса мероприятий, включающих в себя фармакогностическое и химические исследования. На данный момент в Государственной фармакопее РФ XIV издания отсутствует этот вид растительного сырья.

Глава посвящена разработке методик качественного и количественного анализа флавоноидов в траве солодки голой с использованием химических и физико-химических методов анализа.

5.1. Качественный анализ травы солодки голой химическими методами

При проведении хроматографического исследования выделен из травы солодки голой диагностическое соединение – пиноцембрин, которое относится к классу фенольных соединений флавоноиды. В целях подтверждения установленного химического состава извлечения травы солодки голой были проведены качественные химические реакции, результаты которых представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Качественные пробирочные химические реакции

№ п/п	Наименование реакции	Группа БАС	Аналитический эффект
1.	3% раствор алюминия (III) хлорида	<i>Фенольные соединения</i>	Желтая окраска раствора, люминесценция раствора при длине волны 365 нм

2.	Цианидиновая проба	<i>Флавоноиды</i>	Розовый цвет раствора
3.	Цианидиновая проба по Брианту	<i>Флавоноиды</i>	Коричневое окрашивание раствора
4.	Щелочной раствор диазобензлосульфокислоты (ДСК)	<i>Фенольные соединения</i>	Темно-желтая окраска раствора
5.	Реакция пенообразования	<i>Сапонины</i>	Устойчивая пена при взбалтывании водных растворов
6.	Реакция Санье	<i>Сапонины</i>	Желтое окрашивание раствора
7.	Реакция с реактивом Эрлиха	<i>Сапонины</i>	Малиновая окраска раствора
8.	Реакция Лафона	<i>Сапонины</i>	Сине-зеленое окрашивание раствора

В ходе проведения химических пробирочных реакций, нами были получены первичные данные ожидаемых аналитических эффекты для водно-спиртовых извлечений травы солодки голой.

5.2. Качественный анализ травы солодки голой методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии

Полученные результаты хроматографического исследования химического состава, позволили выявить из травы солодки голой вещества флавоноидной природы – *пиноцембрин*, *генистеин*, *изоглабрин* (см. глава 4).

Проведенное исследование по изучению компонентного состава травы солодки, позволило выявить диагностически значимое соединение – *пиноцембрин*. Поэтому в качестве вещества-свидетеля предлагаем использовать СО пиноцембрина (рис. 30)

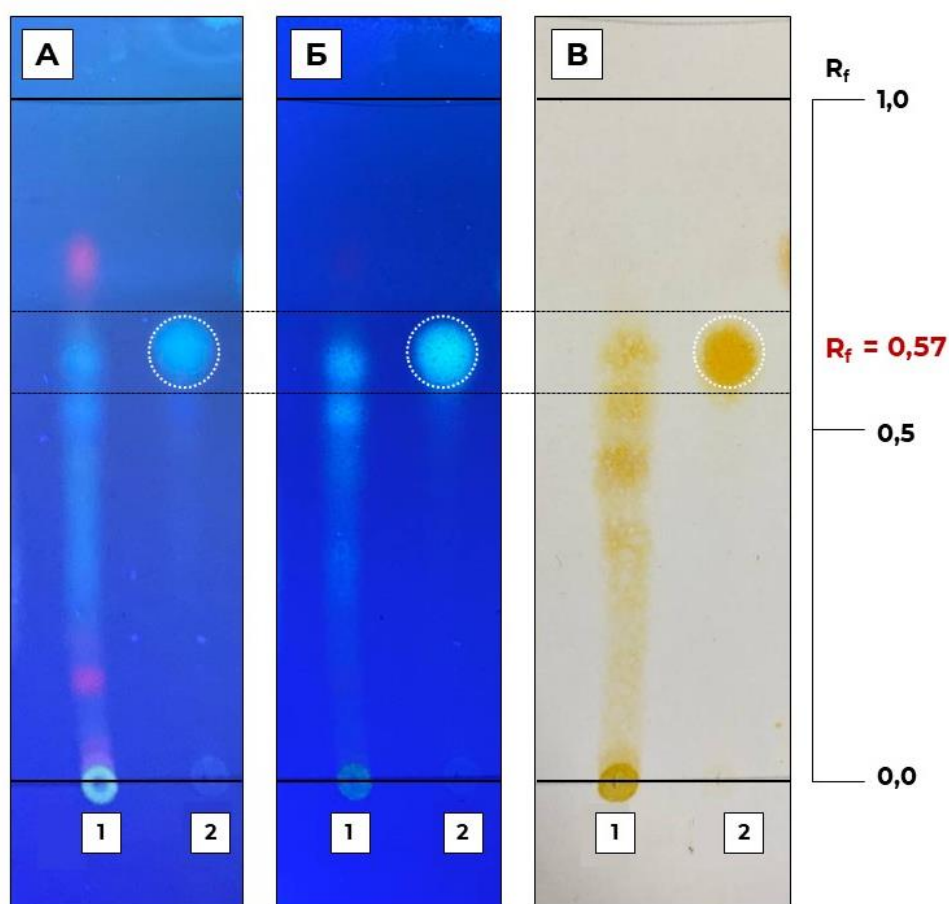


Рисунок 30 – Схемы хроматограмм водно-спиртового извлечения травы солодки голой в системе растворителей: хлороформ – этанол (16:1): А – детекций в УФ-свете (365 нм); Б – детекция после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида в УФ-свете (365 нм); В – детекция в видимом свете после обработки щелочным раствором ДСК

Обозначения: 1 – 70% водно-спиртовое извлечение; 2 – СО пиноцембрина.

При осмотре хроматограммы извлечения травы солодки голой были обнаружены хроматографические области, соответствующие данной системе растворителей хлороформ – этанол (16:1), для вещества-свидетеля – СО пиноцембрина со значением R_f равным 0,57 (табл. 13).

Таблица 13 – Варианты детекции в ТСХ-анализе

Способы детекции	Описание аналитического эффекта
<i>Детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм</i>	<u>До проявления:</u> Зона адсорбции светло-голубого цвета на уровне <i>СО пиноцембрина</i>. <u>После проявления спиртовым раствором $AlCl_3$:</u> Зона адсорбции ярко-голубого цвета на уровне <i>СО пиноцембрина</i>.
<i>Детекция в видимом свете</i>	<u>После проявление раствором ДСК:</u> Зона адсорбции темно-рыжего цвета на уровне <i>СО пиноцембрина</i>.

Методика определения пиноцембрина в сырье и экстракционных препаратах на основе сырья травы солодки голой. Исследуемое извлечение травы солодки голой, спиртовые растворы объемом 20 мкл, наносят на линию старта аналитической хроматографической пластинки с сорбентом, используя стеклянную микропипетку.

Хроматографическую пластину с нанесенными образцами просушивают, помещают в хроматографическую камеру, где система растворителей хлороформ – этанол (16:1), хроматография происходит восходящим способом. После достижения фронтом элюентной системы 85-90% длины пластинки, она извлекается и высушивается, а затем подвергается детекции в УФ-свете при длине волны 365 нм.

Потом пластину обрабатывают 3% спиртовым раствором $AlCl_3$ и проводят детекцию в УФ-свете при длине волны 365 нм. Затем ТСХ-пластину обрабатывают щелочным раствором диазобензосульфокислоты и проводят детекцию в видимом свете.

Разработанная методика качественного определения методом ТСХ пригодна для определения подлинности травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и для оценки качества препаратов на основе травы с. голой.

Также для качественного определения сырья и препаратов нами рекомендовано проведение дифференциальной спектрофотометрии. Растворы извлечения травы с. голой после проведения дифференциальной спектрофотометрии имеют максимум поглощения 310 ± 2 нм, характерны для веществ группы флавононов.

Таким образом, результаты анализа характеристик поглощения извлечений травы солодки голой позволяют подтвердить данные, полученные с помощью метода ТСХ, а также целесообразность использования пиноцембрина в качестве стандартного образца. СО пиноцембрина использован нами при разработке методик количественного определения БАС сырья и препаратов из травы солодки голой.

5.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой

Для разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой было проведено спектрофотометрическое исследование и анализ УФ-спектров из полученных водно-спиртовых извлечений данного сырья [7, 8]. В результате которого были выявлены характерные максимумы поглощения для веществ фенольной природы – флавоноидов [25, 34]. В траве солодки голой доминирующим флавоноидом является пиноцембрин (рис. 31), имеющий максимум поглощения в УФ-спектре при длине 290 ± 2 нм (рис. 32).

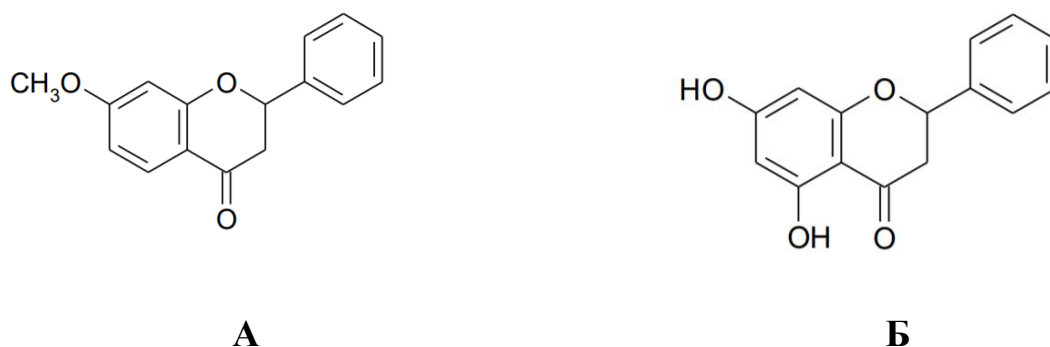


Рисунок 31 – Структурные формулы пиностробина (А) и пиноцембрина (Б)

По-нашему мнению, именно пиноцембрин в основном вносит вклад в характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из травы солодке голой (рис. 33). Данный вывод согласуется с литературными данными [11]. В связи с тем, что пиноцембрин как стандартный образец не зарегистрирован в РФ, нами была изучена возможность использования СО пиностробина (ФС 42-0073-01), близкого по химическому строению и спектральным характеристикам пиноцембрину (рис. 31) [34]. Определено, что как пиноцембрин, так и пиностробин имеют максимум поглощения при длине волны 290 нм (прямая спектрофотометрия) (рис. 32 и 34). Принимая во внимание то обстоятельство, что в случае определения содержания суммы флавоноидов методом прямой спектрофотометрии, имеет место быть завышение результатов эксперимента, нами была изучена возможность использования дифференциальной спектрофотометрии с использованием в качестве комплексообразующего реагента алюминия хлорида.

Было установлено, что при добавлении алюминия хлорида к испытуемому раствору и растворам пиноцембрина и пиностробина, наблюдается батохромный сдвиг в длинноволновом спектре поглощения (рис. 32-34). При этом определено, что в коротковолновой области спектра дифференциальной спектрофотометрии максимумы поглощения растворов пиностробина и пиноцембрина совпадают и находятся при длине волны 310 нм (рис. 35 и 36), тогда как в длинноволновой области спектра максимумы поглощения не совпадают. Это позволяет нам рекомендовать в качестве аналитической длины волны 310 нм. При использовании

СО пиностробина нами осуществляется пересчет содержания суммы флавоноидов на пиноцембрин путем введения в формулу расчета коэффициента перерасчета.

В случае отсутствия СО пиностробина используется теоретическое значение удельного поглощения пиностробина, установленное нами экспериментально.

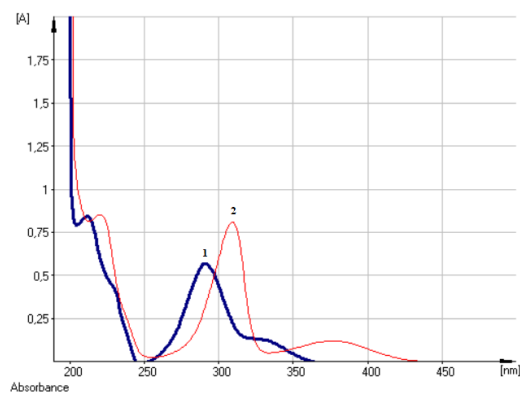


Рисунок 32 – Электронные спектры раствора пиноцембрина

Обозначения: 1 – раствор пиноцембрина (прямая спектрофотометрия); 2 – раствор пиноцембрина с добавлением алюминия хлорида

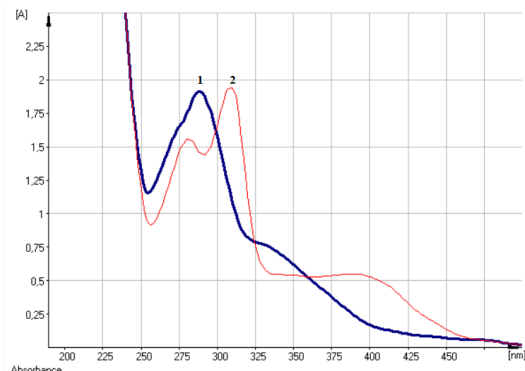


Рисунок 33 – Электронные спектры растворов водно-спиртового

извлечения из травы солодки голой

Обозначения: 1 – раствор извлечения (прямая спектрофотометрия); 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

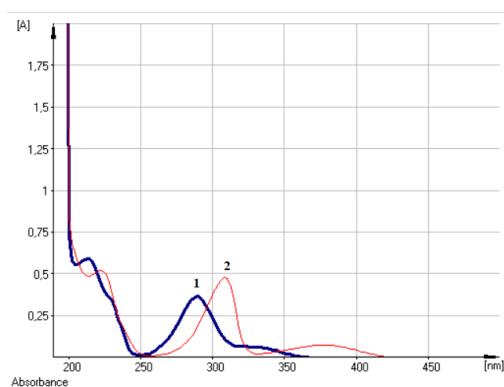


Рисунок 34 – Электронные спектры раствора пиностробина

Обозначения: 1 – раствор пиностробина (прямая

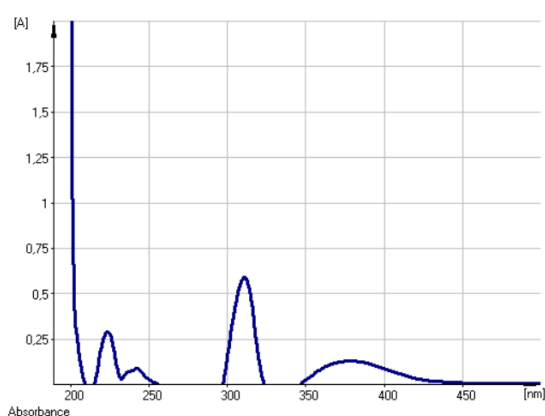


Рисунок 35 – Электронный спектр раствора пиноцембрина (дифференциальный спектр)

спектрофотометрия); 2 – раствор
пиностробина с добавлением
алюминия хлорида

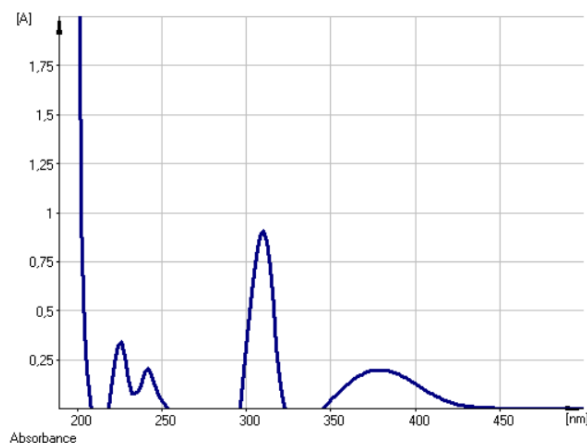


Рисунок 36 – Электронный спектр
раствора пиностробина
(дифференциальный спектр)

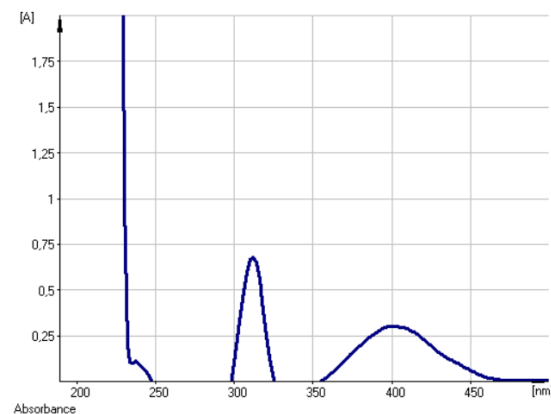


Рисунок 37 – Электронный спектр
раствора водно-спиртового
извлечения из травы солодки голой
(дифференциальный спектр)

Экспериментально было установлено, что наиболее полное извлечение флавоноидов из травы солодки голой достигается при экстракции 90% этиловым спиртом. Следующим этапом было проведение эксперимента по определению оптимального соотношения «сырье-экстрагент», оно составляет 1:50. Затем были определены временные параметры экстракции. Обнаружено, что в течение 60 мин происходит максимальное извлечение флавоноидов из сырья. Заключительным этапом являлось определение оптимального размера частиц (2 мм), влияющие на полноту извлечения флавоноидов (табл. 14) [8].

Таблица 14 – Оптимальные показатели экстрагирования суммы флавоноидов из
травы солодки голой при длине волны 310 нм

№	Экстрагент	Соотно- шение сырье- экстраг- ент	Время экстрак- ции, мин	Степень измельче- ния, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин и абсолютно сухое сырье (в %)
---	------------	---	----------------------------------	---------------------------------	--

I. Экстрагент					
1	этиловый спирт 50%	1:50	60	2	1,50±0,006
2	этиловый спирт 60%				1,19±0,005
3	этиловый спирт 70%				1,21±0,031
4	этиловый спирт 80%				1,86±0,005
5	этиловый спирт 90%				2,28±0,001
6	этиловый спирт 96%				1,59±0,007
II. Время экстракции					
7	этиловый спирт 90%	1:50	30	2	2,02±0,008
8			45		2,31±0,001
9			60		2,76±0,012
10			120		2,39±0,010
II. Степень измельчения					
11	этиловый спирт 90%	1:50	60	1	3,10±0,013
12				2	3,41±0,015
13				3	2,52±0,011
IV. Соотношение «сырье–экстрагент»					
16	этиловый спирт 90%	1:30	60	2	2,18±0,009
17		1:50			3,41±0,015
18		1:100			3,21±0,014

Зависимость оптической плотности от концентрации пиностробина описывалась графиком линейной регрессии в диапазоне концентраций от 0,016 до 0,16 мг/мл: 0,016; 0,032; 0,08; 0,16 с алюминием хлорида при длине волны 310 нм (рис. 28).

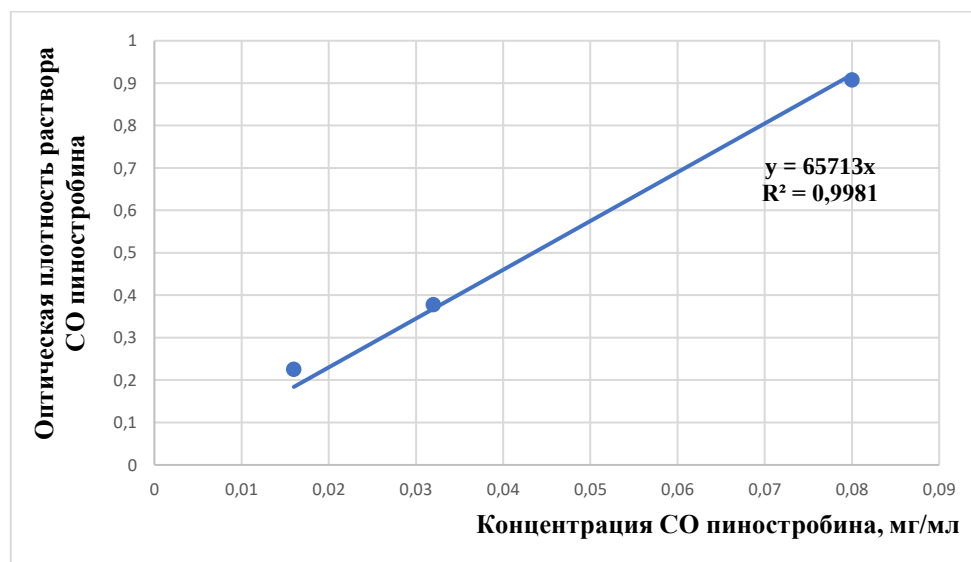


Рисунок 38 – Зависимость значений оптической плотности раствора пиностробина с алюминием хлоридом от концентрации пиностробина (дифференциальный вариант)

Методика количественного определения суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении травы солодки голой. Около 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор А), перемешивают и оставляют на некоторое время (40 минут) для образования комплекса флавоноидов с алюминием. Затем измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 310 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 96%.

Примечание: *Приготовление растворов СО пиностробина.* Около 0,02 г (точная навеска) пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта этилового 96% при нагревании на водяной бане. Использование спирта этилового 96% позволяет обеспечить наилучшее растворение СО пиностробина. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры, его объем доводят спиртом этиловым 96% до метки (раствор А СО пиностробина). Затем 1 мл раствора А СО пиностробина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора

алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б СО пиностробина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 310 нм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D * m_0 * 50 * 50 * 1,05 * 100}{D_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора СО пиностробина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО пиностробина, г;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

$1,05$ – коэффициент пересчета

В случае отсутствия стандартного образца пиноцембрина целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 310 нм – 680 [8].

$$x = \frac{D * 50 * 50 * 100}{m * 680 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

680 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО пиноцембрина при 310 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики предлагаемой методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой описаны в таблице 14. Относительная погрешность определения среднего значения составляет $\pm 0,73$ % при доверительной вероятности равной 95 % (табл. 15) [8].

Таблица 15 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой

n	f	$\bar{X},\%$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P,%	t (P, f)	$\pm\Delta X$	$\pm\Delta\bar{X}$	E,%	$\bar{E},\%$
11	10	3,41	0,0014	0,0369	0,011	95	2,23	0,0823	0,0248	$\pm 2,41$	$\pm 0,73$

Критерием оценки аналитической методики является валидационная оценка. Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания [17].

Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы солодки голой и раствора СО пиностробина с алюминием хлоридом и дифференциального пика СО пиностробина [8].

Линейность методики определяли для серии растворов пиностробина (с концентрациями в диапазоне от 0,016 до 0,16 мг/мл: 0,016; 0,032; 0,08; 0,16) с алюминием хлоридом при длине волны 310 нм. На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности растворов пиностробина с алюминием хлоридом от концентрации пиностробина и затем рассчитывали уравнение линейной регрессии (рис. 38). Коэффициент детерминации при этом составил 0,9981 [8].

Метрологические характеристики методик количественного определения содержания суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении травы солодки голой представлены в таблице 3. Результаты оценки промежуточной прецизионности результатов проведенных опытов свидетельствует об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 0,73\%$ [8].

Правильность методики определяли методом добавок раствора стандартного образца пиностробина с известной концентрацией (25%, 50% и 75%) к испытуемому раствору водно-спиртового извлечения травы солодки голой. Относительная ошибка анализа составила $\pm 0,27\%$. Опыты с добавками СО пиностробина к навеске сырья показали, что ошибка анализа находится в

пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики [8].

С использованием этой методики было проанализировано пять образцов травы солодки голой, заготовленных в летний период в разных местах произрастания (табл. 16).

Таблица 16 – Содержание суммы флавоноидов в образцах травы солодки голой (в %) в пересчете на пиноцембрин

№	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на пиноцембрин	Содержание влаги в растительном сырье (в %)
1.	Самарская область (Кинельский район, п. Алексеевка), август 2021 г.	3,38±0,015	9,97±0,003
2.	г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, август 2021 г.	0,48±0,002	9,96±0,003
3.	Оренбургская область, (Сакмарский район, с. Татарская Каргала), июль 2017 г.	0,39±0,002	9,99±0,003
4.	Республика Казахстан, г. Державинск, июнь 2018 г.	1,34±0,006	10,01±0,002
5.	Самарская область (Большечерниговский район, с. Большая Черниговка), август 2019 г.	1,19±0,005	10,03±0,003

Определено, что содержание суммы флавоноидов в анализируемых образцах варьирует от $0,39\% \pm 0,002$ до $3,41\% \pm 0,015$ в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья (табл. 13).

5.4. Разработка методики количественного определения пиноцембрин в траве солодке голой

Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента - 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 290 нм. Объемы инжестируемых проб 2 мкл. Профиль градиента представлен в таблице 17.

Таблица 17 – Профиль градиента хроматографического разделения

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0-5	30	70
5-15	50	50
15-20	60	40
20-25	80	20

С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили пятикратное хроматографирование 2 мкл раствора извлечения травы солодки голой. В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии. В результате расчетов были получены следующие результаты (табл. 18).

Таблица 18 – Определение пригодности хроматографической колонки

Параметр хроматографической колонки	Формула расчета	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	$N = 16 * \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$, где t_R – время удерживания; W – ширина пиков у основания.	5954	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	$R_S = \frac{2*(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$, где t_R – время удерживания; W – ширина пиков у основания.	1,77	Не менее 1,5
Фактор асимметрии пика	$A_x = \frac{W_{0,05}}{2f}$, где $W_{0,05}$ – ширина пика на 5% (1/20) его высоты; f – расстояние между перпендикуляром, опущенным из вершины пика, и восходящей стороной пика на 5% его высоты.	1,48	Не более 1,5

Полученные нами данные при хроматографировании позволяют оценить пригодность данной хроматографической системы, а также сделать вывод о том, что данная система может быть использована для количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой.

Ранее нами были определены оптимальные параметры экстракции суммы флавоноидов из травы солодки голой [8], которые нами использованы в методике количественного определения пиноцембрина в сырье данного растения методом ВЭЖХ.

В результате проведения ВЭЖХ-анализа выявлено, что в указанных условиях хроматографирования раствор стандартного образца пиноцембрина имеет время удерживания $12,22 \pm 0,04$ мин (рис. 39). В водно-спиртовом извлечении травы солодки голой время удерживания пиноцембрина составляет $12,34 \pm 0,04$ мин (рис. 40).

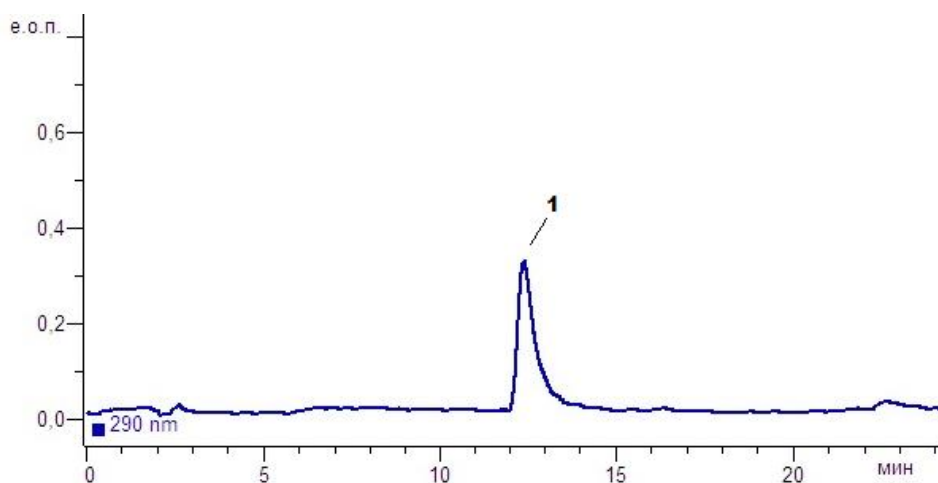


Рисунок 39 – ВЭЖХ-хроматограмма пиноцембрина: 1 – пиноцембрин.

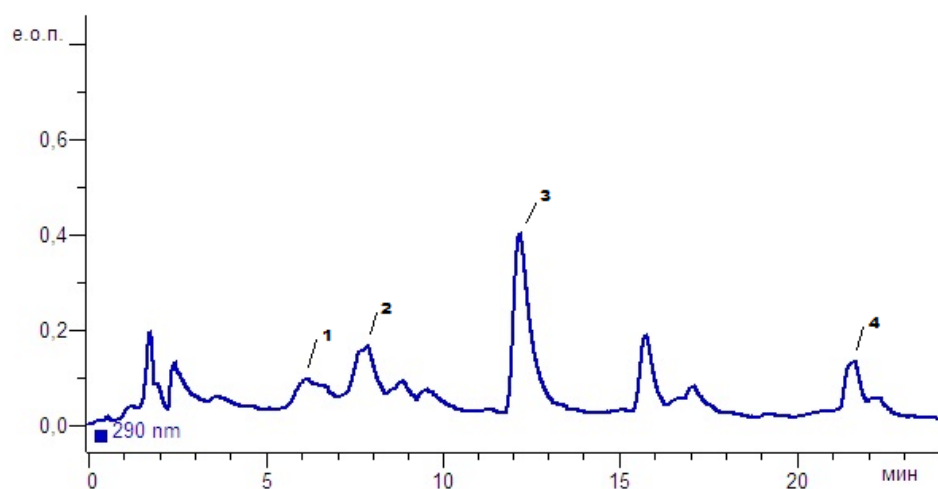


Рисунок 40 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы солодки голой: 1 – ликвиритигенин; 2 – генистеин; 3 – пиноцембрин; 4 – изоглабринин.

В работе использовали стандартный образец ликвиритигенина (7,4'-дигидроксифлаванон), выделенный нами из корня солодки голой [20].

В таблице 19 представлено сравнение времени удерживания пиков на хроматограммах извлечения и стандартных образцов.

Таблица 19 – Время удерживания пиков на хроматограммах извлечения и стандартных образцов

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Извлечение
Ликвиритигенин (пик 1)	6,57	6,52
Генистеин (пик 2)	7,43	7,64
Пиноцембрин (пик 3)	12,22	12,34
Изоглабрин (пик 4)	21,60	21,54

Также проводили ВЭЖХ-анализ водно-спиртового извлечения из травы солодки голой и хроматограмма водно-спиртового извлечения с добавкой стандартного раствора пиноцембрина (рис. 41).

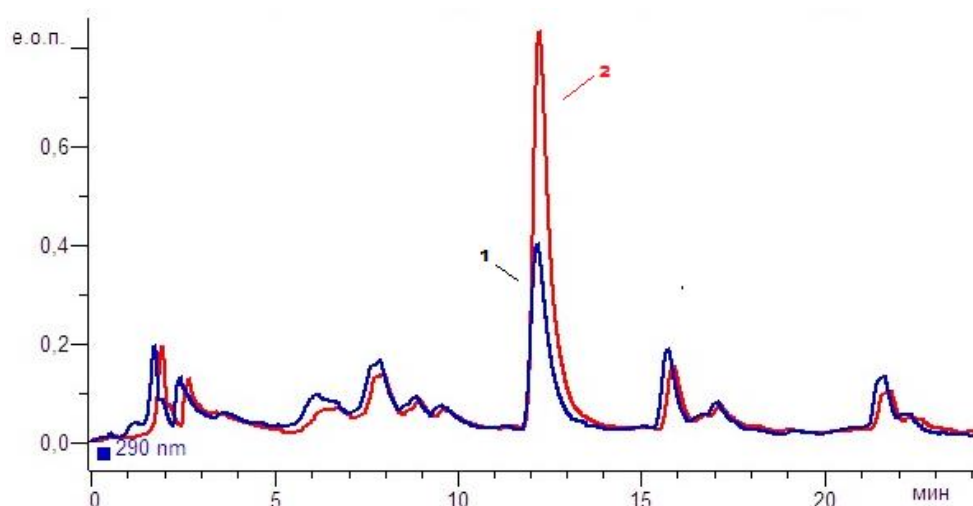


Рисунок 41 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы солодки голой с добавлением пиноцембрина: 1 – извлечение травы солодки голой; 2 – извлечение травы солодки голой после добавления СО пиноцембрина.

Валидационный анализ

Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации пиноцембрина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,4 мг/мл (рис. 42), однако коэффициент корреляции для зависимости высоты пика от концентрации пиноцембрина составил 0,9873, для зависимости площади пика от концентрации – 0,9975. Поэтому определение содержания пиноцембрина проводили с использованием площади пика.

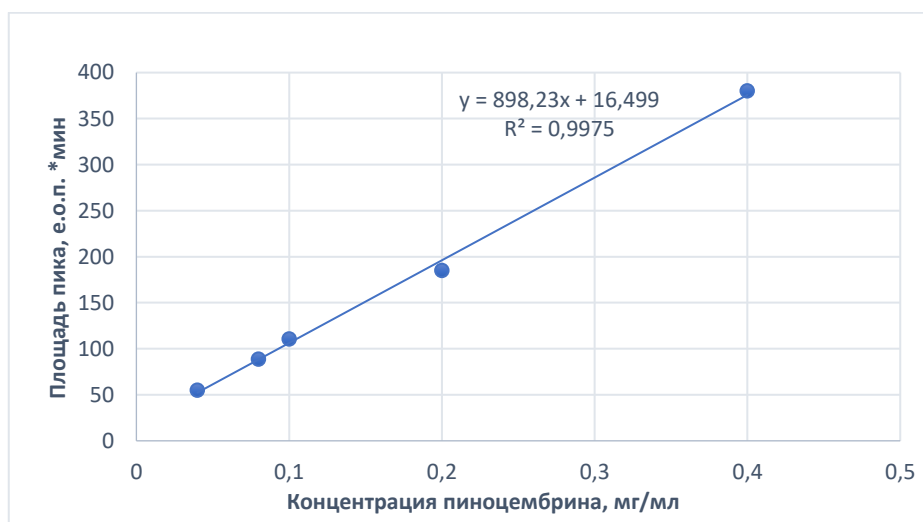


Рисунок 42 – График зависимости площади пика от концентрации пиноцембрина в пробе и уравнение линейной регрессии

Правильность методики подтверждали на образце извлечения травы солодки голой введением аликвоты образца раствора стандартного образца пиноцембрина в количестве от 80% до 120% от исходного содержания, результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты определения правильности методики

Исходное содержание пиноцембрина, мг/мл водно- спиртового извлечения	Добавлено пиноцембрина, мг/мл	Содержание		Ошибка	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
0,23	0,18	0,41	0,43	-0,02	-4,88
0,23	0,23	0,46	0,47	0,01	2,17
0,23	0,28	0,51	0,49	0,02	-3,92

Методика количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 90% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («Красная лента»). Перед хроматографическим анализом дополнительно фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

В жидкостной хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 2 мкл полученного раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в градиентном режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм х 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем пробы испытуемого раствора – 2 мкл. Профиль градиента представлен в таблице 15.

Проводят УФ-детектирование при длине волны 290 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 2 мкл раствора пиноцембрина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Определяют время удерживания и идентифицируют пик пиноцембрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика пиноцембрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание пиноцембрина в траве солодки голой в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

Где S – среднее значение площади пика пиноцембрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца;

S_0 – среднее значение площади пика раствора СО пиноцембрина, вычисленное из хроматограмм раствора СО пиноцембрина;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_0 – объем раствора СО пиноцембрина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора СО пиноцембрина, мкл;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО пиноцембрина г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приготовление стандартного раствора пиноцембрина. Точную навеску (0,005 г) предварительно высушенного пиноцембрина (содержание основного вещества ≥ 98 %) переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 96% этиловом спирте и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Таблица 21 – Количественное содержание пиноцембрина в траве солодки
голой

№ п/п	Характеристика сырья	Содержание пиноцембрина (%)
1	Место культивирования: Самарская область (Кинельский район, пгт. Алексеевка), август 2021 г.	1,28±0,022
2	Оренбургская область, (Сакмарский район, с. Татарская Каргала), июль 2017 г.	0,65±0,011
3	Республика Казахстан, округ г. Державинск, июнь 2018 г.	0,43±0,007
4	Самарская область (Большечерниговский район, с. Большая Черниговка), август 2019 г.	0,39±0,007

Таблица 22 – Метрологические характеристики методики количественного
определения пиноцембрина в траве солодки голой

n	f	$\bar{X}, \%$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	t (P, f)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %	$\bar{E}, \%$
11	10	1,27	0,0014	0,037	0,011	95	2,23	0,08	0,02	±6,30	±1,57

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания пиноцембрина в траве солодки голой с доверительной вероятностью 95% составляет ±6,30% (табл. 22).

5.5. Обоснование способа получения стандартного образца пиноцембрина из травы солодки голой

Как уже упоминалось ранее, пиноцембрин имеет широкий спектр биологической активности, включающие в себя противовоспалительное и

противомикробное действие [11, 59, 85, 135]. Зарубежом пиноцембрин получают из сердцевин сосны обыкновенной, прополиса. С точки зрения ресурсосбережения, целесообразно получать пиноцембрин из травы солодки голой, т.к. данное растение образует большие солодковые заросли [3, 4, 18, 33, 38].

Получение стандартного образца пиноцембрина из травы солодки голой проводился зарубежными учеными [40]. Однако данный метод имел низкий выход основного продукта – 0,35%.

В данном исследовании приводится разработка технологии производства субстанции «Пиноцембрин» из травы солодки голой.

Получение технического образца пиноцембрина был разделен на два этапа: *технологический* и *хроматографический (колоночная хроматография)* (табл. 23).

Таблица 23 – Метод получения технического образца пиноцембрина из травы солодки голой

<i>Технологический этап</i>		
№	Основные этапы	Описание рабочего процесса
1	<i>Подготовка растительного сырья</i>	Траву с. голой, измельчили до размера частиц 2-3 мм. Навеска сырья составила 210 г.
2	<i>Получение извлечения</i>	Методом дробной мацерации с термическим окончанием в соотношении «сырье-экстрагент» 1:5 на 70% этиловом спирте было получено извлечение травы с. голой объемом около 1000 мл. В проведенном нами исследовании установили, что полное извлечение суммы флавоноидов происходит путем экстрагирования 90% этиловым спиртом [7, 8]. Шрот извлекали 90% этиловым спиртом из шрота при нагревании. В общем

		объеме извлечение составило около 1500 мл.
3	<i>Упаривание извлечения</i>	С помощью ротационно-вакуумной установки извлечение было упарено до примерного объёма в 50 мл.
4	<i>Нанесение извлечения на сорбент</i>	Упаренное извлечение наносили на силикагель (L 40/100 КСК) и смешивал до однородного состояния (примерно 55% от массы навески), затем высушили в естественных условиях
5	<i>Подготовка хроматографической колонки</i>	В хроматографическую колонку объемом 1 литр был внесен чистый силикагель (в количестве равному силикагелю с нанесенным извлечением). После этого был сформирован слой сорбента в хлороформе, затем в колонку был внесен силикагель с извлечением и начали процесс хроматографирования.
<i>Хроматографический (колоночная хроматография)</i>		
1	<i>Процесс элюирования</i>	Элюирование проводили смесью хлороформа и 96% этилового спирта 97:3.
2	<i>Получение фракций пиноцембрина</i>	После элюирования, полученные фракции объемом 200 мл, сгущали на роторно-вакуумном аппарате до минимального объема около 10 мл.

С целью получения чистой субстанции пиноцембрина, проводится дополнительная очистка технического образца на полиамиде, после чего осуществляется перекристаллизация. При помощи метода ВЭЖХ при детекции длины волны 290 нм исследуется степень чистоты пиноцембрина, которая составила не менее 95% по данным (рис. 43).

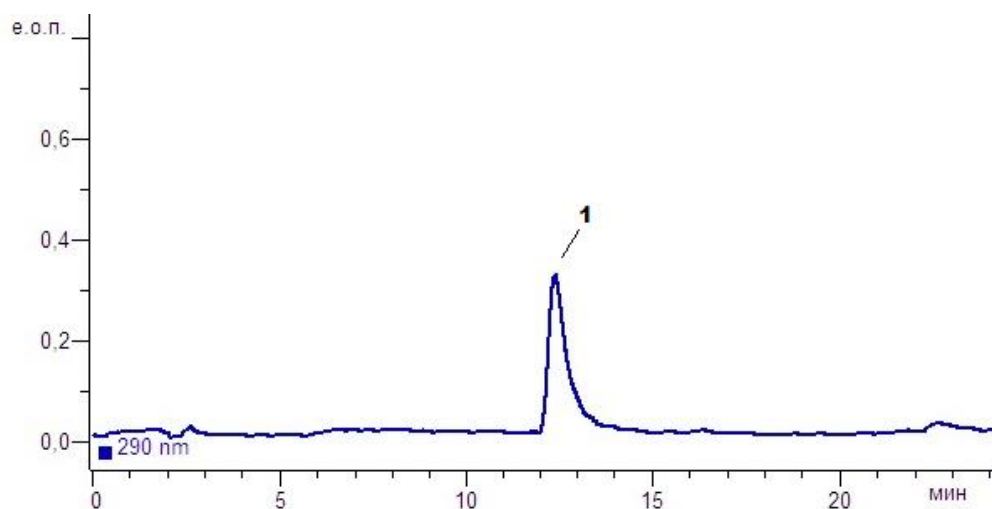


Рисунок 43 – ВЭЖХ-хроматограмма пиноцембрина: 1 – пиноцембрин

Получили субстанцию пиноцембрина высокой степени очистки. Выход пиноцембрина составил 1–1,5% от массы воздушно-сухого сырья.

5.6. Исследование динамики накопления флавоноидов в траве солодке голой

Под влиянием условий окружающей среды уровень содержания БАВ в растениях меняется в течение вегетационного периода. Это связано с многочисленными факторами, такими как температура, влажность, количество солнечного света, состав почвы и т.д. Исследование накопления БАВ в ЛРС имеет большое значение для определения оптимальных сроков заготовки сырья.

В ходе исследования были изучены образцы травы солодки голой, собранной во время вегетативного периода с мая по сентябрь 2021 – 2023 гг. в пгт. Алексеевка Самарской области, сырье. Для проведения анализа были получены водно-спиртовые извлечения травы солодки голой, а также СО пиностробина. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин осуществлялась методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 310 нм по уже разработанной нами методике [7].

По результатам анализа динамики накопления флавоноидов в траве солодке голой было отмечено, что их содержание варьирует в течение всего вегетативного периода (рис. 44). Максимальное содержание суммы флавоноидов наблюдали в середине августа.

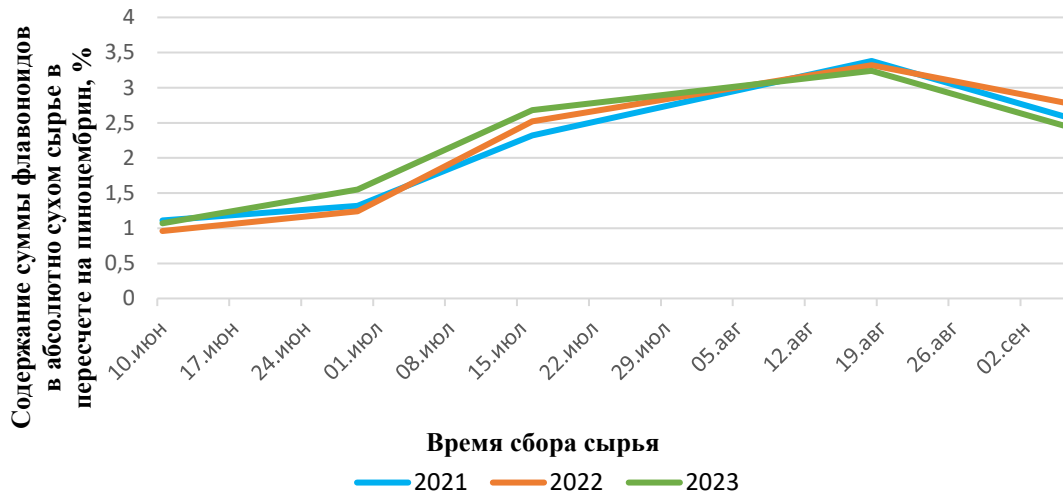


Рисунок 44 – Динамика накопления флавоноидов в траве солодки голой за весь вегетационный период

Таким образом, наиболее оптимальным временем для заготовки сырья травы солодки голой, является период плодоношения – середина августа.

Таблица 24 – Динамика накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой (2021 – 2023 гг.)

2021		2022		2023	
Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на пиноцембрин, %	Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на пиноцембрин, %	Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчете на пиноцембрин, %
10.06	1,11±0,008	02.06	0,96±0,007	17.06	1,07±0,008
29.06	1,32±0,001	23.06	1,24±0,009	15.07	1,55±0,011
16.07	2,32±0,017	15.07	2,52±0,019	22.07	2,68±0,018
18.08	3,38±0,025	22.08	3,32±0,024	15.08	3,24±0,024
06.09	2,58±0,019	10.09	2,78±0,020	18.09	2,45±0,018

5.7. Определение общих показателей нового лекарственного растительного сырья «Солодки голой трава»

Для проведения исследования по разработке проекта фармакопейной статьи на новый вид растительного сырья «Солодки голой трава» (цельное и измельченное сырье) были определены количественные показатели качества данного сырья согласно методикам ГФ РФ XIV издания [17].

В ходе исследования были проанализированы соответствующие нормативные показатели качества сырья, которые представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты определения числовых показателей качества цельного и измельченного сырья травы солодки голой

Испытания	Показатели для цельного сырья	Показатели для измельченного сырья
Влажность	не более 11 %	не более 12 %
Зола общая	не более 13 %	не более 13 %
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	не более 3 %	не более 3 %
<i>Измельченность сырья</i>		
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями с размером 1 мм	не более 5 %	-
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями с размером 7 мм	-	не более 5 %
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями с размером 0,5 мм	-	не более 5 %
<i>Посторонние примеси</i>		
Стеблей	не более 60 %	не более 60 %
Частиц, изменившие окраску	не более 3 %	не более 3 %

(пожелтевшие или потемневшие)		
Органическая примесь	не более 3 %	не более 2 %
Минеральная примесь	не более 1,5 %	не более 1,5 %
<i>Количественное определение</i>		
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин	не менее 2,0 %	не менее 2,0 %
Экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70%	не менее 15 %	не менее 15 %

Проведённые исследования позволили получить результаты анализа показателей качества сырья травы солодки голой, которые были включены в новый проект ФС «Солодки голой трава». Важно отметить, что рекомендуется соблюдать срок хранения данного сырья, который не должен превышать двух лет с момента его сбора. Для сырья травы *Glycyrrhiza glabra* L. рекомендуется как оптимальное значение нижнего предела содержания суммы флавоноидов – не менее 2,0 % (в пересчёте на пиноцембрин).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработаны методики качественного определения флавоноидов в траве солодки голой с помощью химических и физико-химических методов: качественных пробирочных реакций, ТСХ-анализа в системе растворителей «хлороформ – этанол» (16:1) с стандартного образца пиноцембрина, дифференциальной УФ-спектрофотометрии.

2. Установлены характерные максимумы поглощения извлечений травы солодки голой: при дифференциальной спектрофотометрии – $\lambda_{\text{max}} = 310 \pm 2$ нм (что соответствует максимуму раствора СО пиноцембрина и СО пиностробина).

3. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 310 нм (в пересчете на пиноцембрин). Содержание суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин может варьировать от $0,39\% \pm 0,002$ до $3,41\% \pm 0,015$ в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья.

4. Разработана методика количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой методом ВЭЖХ при детекции длины волны 290 нм. Содержание пиноцембрина может варьировать от $0,39\% \pm 0,007$ до $1,28\% \pm 0,022$ в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья.

5. Обосновано использование в методике качественного и количественного анализа травы солодки голой стандартного образца пиноцембрина, для которого разработан способ получения стандартного образца пиноцембрина из травы солодки голой, позволяющий достичь выхода целевого вещества с выходом в 0,5 – 1,0% от массы воздушно-сухого сырья.

6. Проанализирован процесс накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой. Наблюдается плавное повышение уровня суммы флавоноидов в процессе развития растения. Для рационального использования травы солодки голой, рекомендуется проводить сбор растительного сырья в фазе активного плодоношения в середине августа.

7. Изучены числовые показатели, предложены методики качественного и количественного анализа в рамках создания проекта ФС на новый вид ЛРС «Солодки голой трава».

ГЛАВА 6. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ КОРНЕЙ СОЛОДКИ

Одной из ведущих групп БАС корней солодки являются тритерпеновые гликозиды. Глицирризиновая кислота обладает широким спектром фармакологической активности. Помимо тритерпеновых гликозидов, к основным БАС так относят флавоноиды, из которых доминирующим и диагностическим значимым является ликуразид [20, 23, 34].

В современной фармацевтической практике усовершенствование методик качественного и количественного анализа становятся все более актуальными. Согласно ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни» ГФ РФ XIV издания, определение БАС методом ТСХ, проводится с использованием стандартных образцов 18β-глицирризиновой кислоты и кверцетина. ТСХ-исследование проводится в системе растворителей бутанол-уксусная кислота ледяная-вода (7:1:2). Кверцетин не содержится в корнях солодки, следовательно актуальным является усовершенствование методики качественного анализа. Принимая во внимание, что помимо глицирризиновой кислоты в корнях солодки, содержится флавоноид ликуразид [17].

Количественное содержание глицирризиновой кислоты в корнях солодки определяется методом спектрофотометрии. Однако с учетом значимого вклада в биологическую активность сырья и препаратов солодки флавоноидов, целесообразно рассмотреть возможность включения в фармакопейную статью на корни солодки ВЭЖХ-анализа для определения как глицирризиновой кислоты, так и диагностически значимого флавоноида – ликуразида [17].

6.1. Разработка методики качественного анализа БАС растительного сырья корней солодки

Нами были изучены условия хроматографического разделения, позволяющие обнаруживать ведущие группы БАС – глицирризиновую кислоту и

ликуразид (рис. 45). Для определения веществ были использованы СО ликуразид и ГСО глицирам, система растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2).

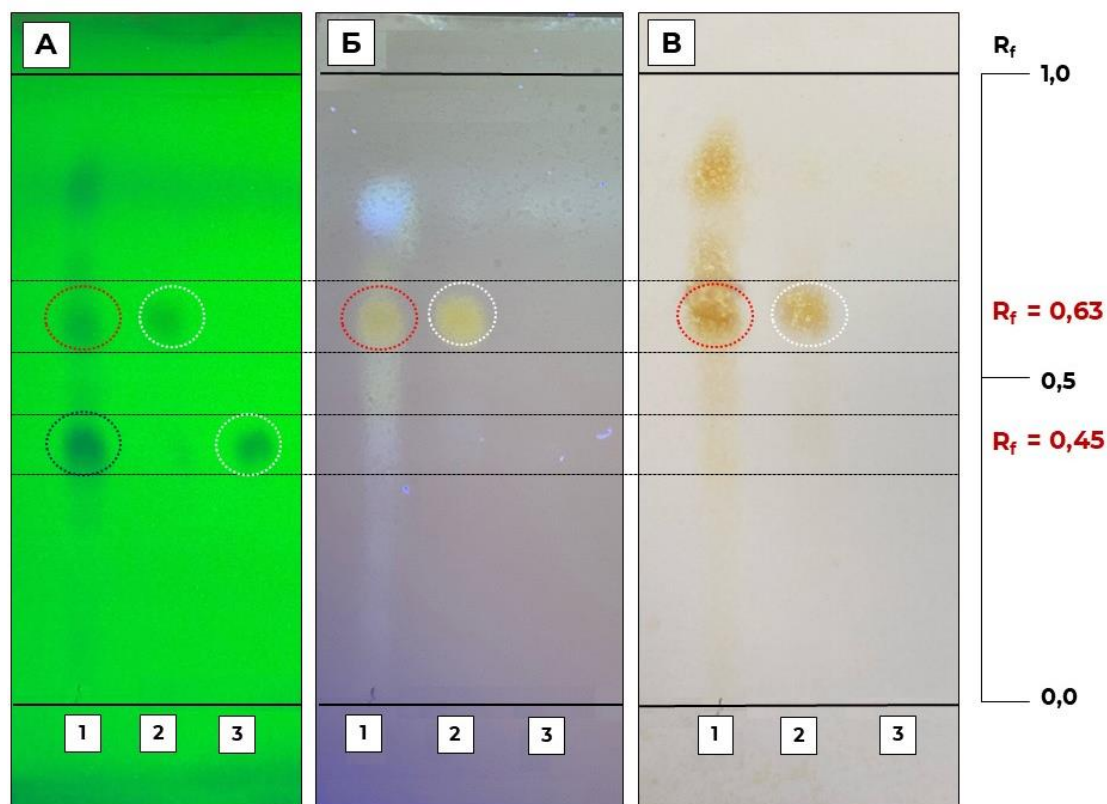


Рисунок 45 – Хроматограммы водно-спиртового извлечения корней солодки: А – детекция при длине волны 254 нм; Б – детекция при длине волны 365 нм после обработки $AlCl_3$; Б – детекция в видимом свете после обработки ДСК.
Обозначения: 1 – извлечение корней солодки; 2 – СО ликуразида; 3 – ГСО глицирама.

На хроматограмме водно-спиртового извлечения при длине волны 365 нм после обработки $AlCl_3$ обнаруживается желто-оранжевое пятно с величиной R_f около 0,63 (на уровне СО ликуразида) (рис. 45Б), а глицирризиновая кислота – в виде темного синего флуоресцирующего пятна (254 нм) с величиной R_f около 0,45 (на уровне ГСО глицирама) (рис. 45А).

6.2. Разработка методики количественного анализа БАС растительного сырья корней солодки

Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (2 мм х 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил: 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 4:6 (при определении содержания глицирризиновой кислоты) или 2:8 (при определении содержания ликуразида), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длинах волны 256 нм (глицирризиновая кислота) и 360 нм (ликуразид). Объемы инжестируемых проб извлечений из корней солодки и стандартных образцов: 3 мкл (глицирризиновая кислота) и 5 мкл (ликуразид).

Для проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 4 мкл раствора извлечения корней солодки. В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии (табл. 26). В результате расчетов были получены следующие результаты (табл. 27).

Таблица 26 – Формулы расчетов

Параметр хроматографической колонки	Формула расчета
Эффективность колонки	$N = 16 * \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$, где t_R – время удерживания; W – ширина пиков у основания.
Разрешение между наиболее близкими	$R_S = \frac{2*(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$, где

пиками	t_R – время удерживания; W – ширина пиков у основания.
Фактор асимметрии	$A_x = \frac{W_{0,05}}{2f}$, где $W_{0,05}$ – ширина пика на 5% (1/20) его высоты; f – расстояние между перпендикуляром, опущенным из вершины пика, и восходящей стороной пика на 5% его высоты.

Таблица 27 – Определение пригодности хроматографической системы

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
<i>Глицирризиновая кислота</i>		
Эффективность колонки	5477	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	2,89	Не менее 1,5
Фактор асимметрии пика	1,11	Не более 1,5
<i>Ликуразид</i>		
Эффективность колонки	5577	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	2,19	Не более 1,5
Фактор асимметрии пика	1,26	Не более 1,5

Полученные данные позволяют сделать вывод, что данная система может быть использована для количественного определения глицирризиновой кислоты и ликуразида в корнях солодки.

На рисунке 46-49 представлены ВЭЖХ-хроматограммы стандартного раствора глицирризиновой кислоты и ликуразида, а также извлечений корней солодки.

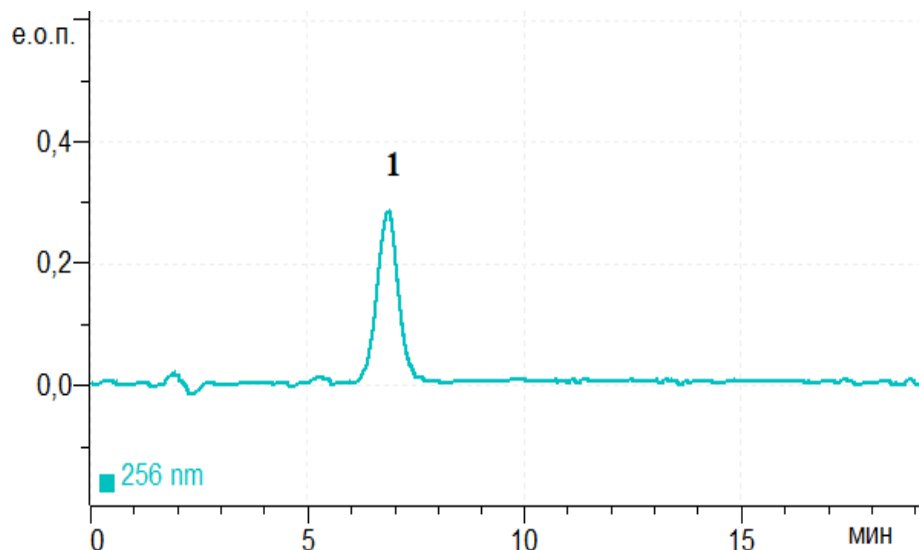


Рисунок 46 – ВЭЖХ-хроматограмма стандартного раствора глицирризиновой кислоты: 1 – глицирризиновая кислота

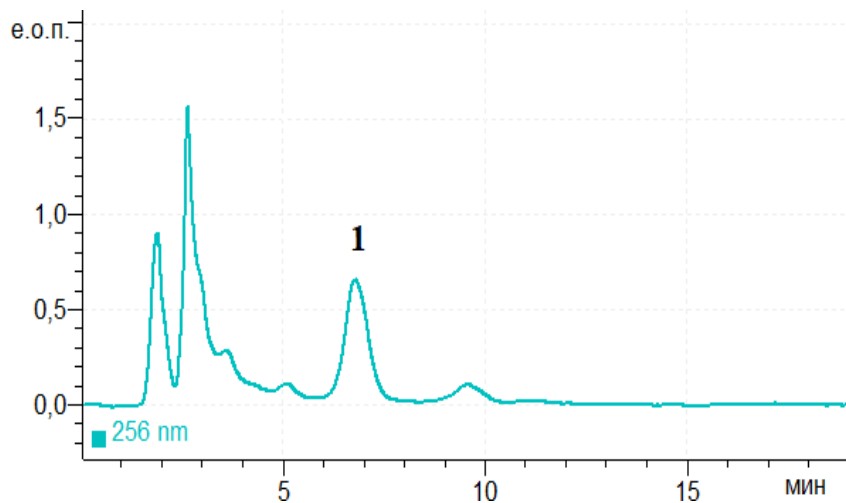


Рисунок 47 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения корней солодки: 1 – глицирризиновая кислота

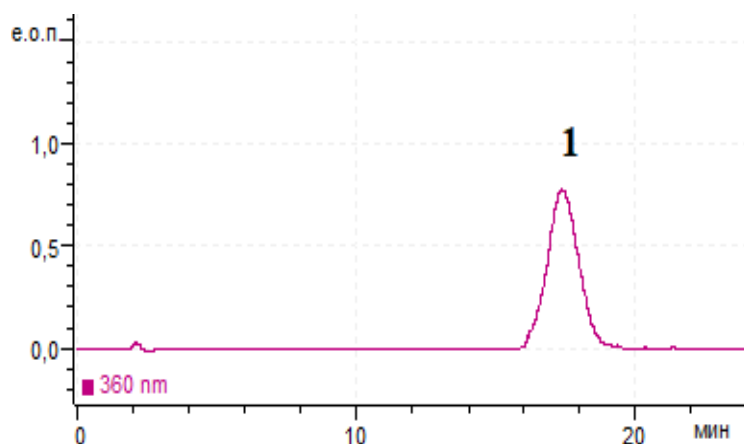


Рисунок 48 – ВЭЖХ-хроматограмма стандартного раствора ликуразида: 1 – ликуразид

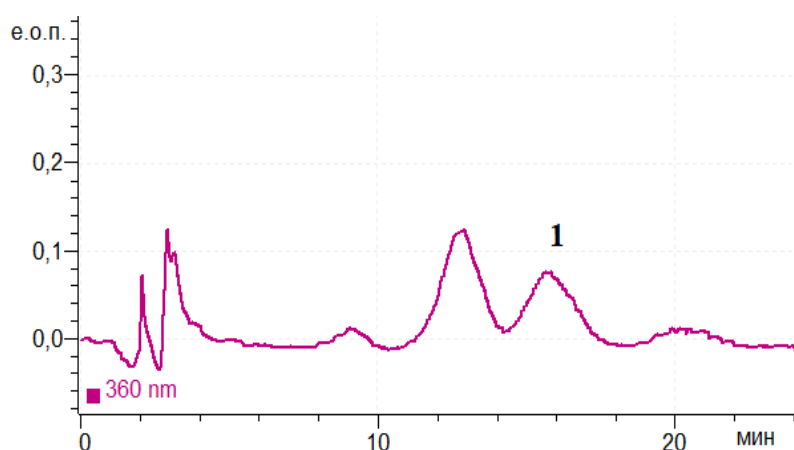


Рисунок 49 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения корней солодки: 1 – ликуразид

Добавление стандартных растворов глицирама и ликуразида в извлечение проявляется на хроматограмме увеличением интенсивности соответствующих пиков по сравнению с исходными растворами (рис. 50 и 51).

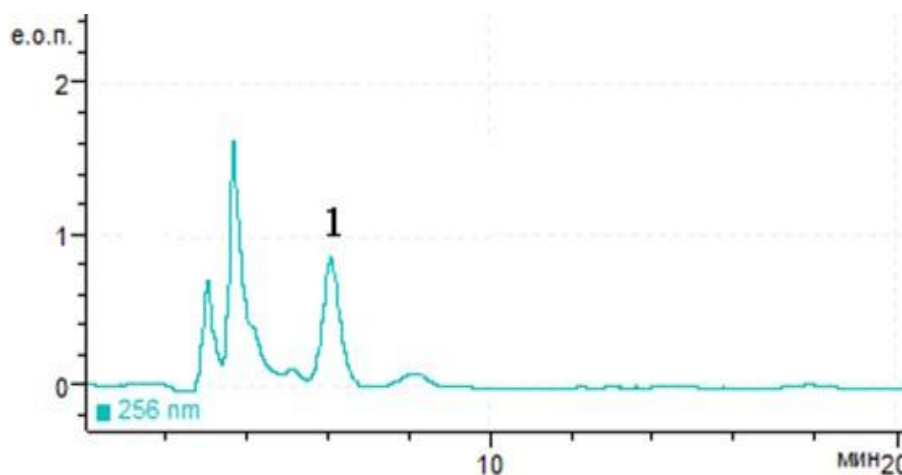


Рисунок 50 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из корней солодки с добавлением глицирризиновой кислоты: 1 – глицирризиновая кислота

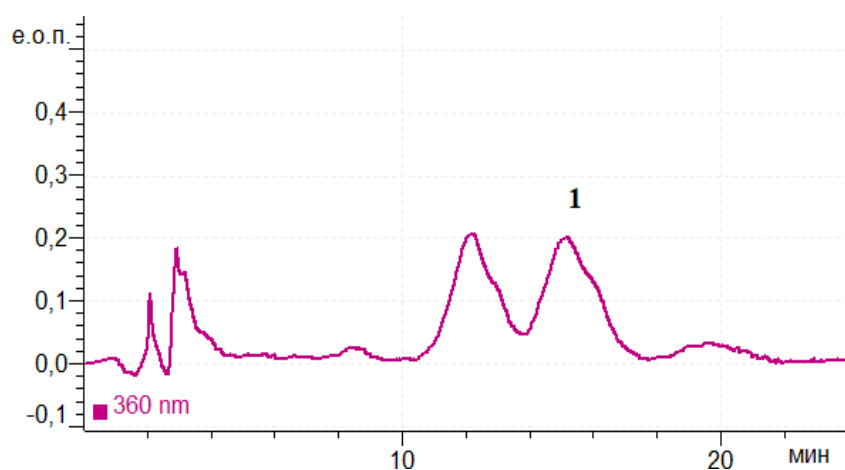


Рисунок 51 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения корней солодки с добавлением ликуразида: 1 – ликуразид

Времена удерживания пиков веществ на хроматограммах стандартных образцов, а также извлечения из корней солодки представлены в табл. 28.

Таблица 28 – Времена удерживания на хроматограмме глицирризиновой кислоты и ликуразида

Биологически активное соединение	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Извлечение
Глицирам (глицирризиновая кислота)	$6,56 \pm 0,120$	$6,66 \pm 0,129$
Ликуразид	$15,81 \pm 0,090$	$15,83 \pm 0,101$

Валидационный анализ

Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации глицирама описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,1840 до 1,4720 мг/мл, коэффициент детерминации – 0,9994 (рис. 52).

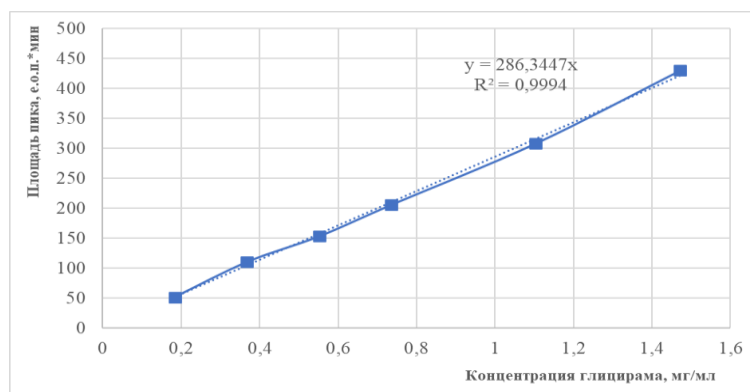


Рисунок 52 – График зависимости площади пика от концентрации глицирама в пробе и уравнение линейной регрессии

Для ликуразида зависимость высоты и площади хроматографического пика описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,1424 до 0,7120 мг/ мл, коэффициент детерминации – 0,9990 (рис. 53).

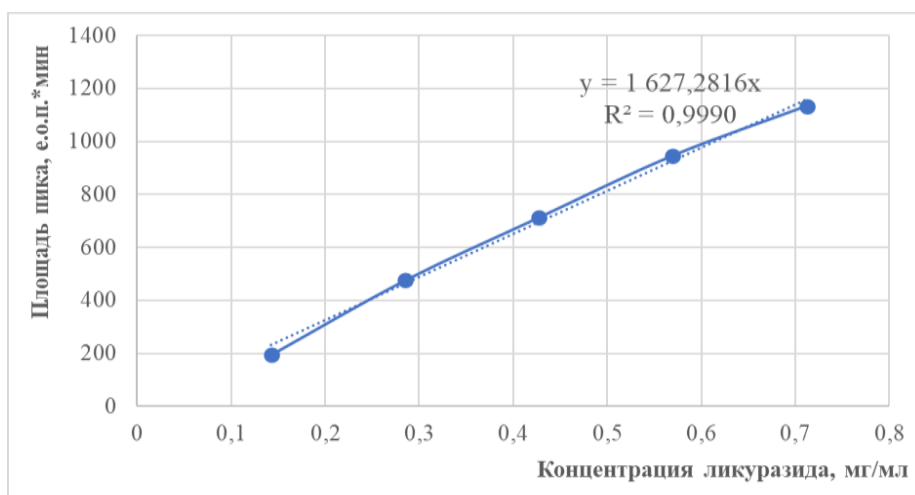


Рисунок 53 – График зависимости площади пика от концентрации ликуразида в пробе и уравнение линейной регрессии

Метрологические характеристики предлагаемых ВЭЖХ-методик свидетельствуют о том, что относительная ошибка определения среднего арифметического результата содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,11$ %, ликуразида – $\pm 4,76$ % (табл. 29).

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления растворов глицирама и ликуразида с известной концентрацией (80 %, 100 % и 120 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 97,2 % и 96,5 % соответственно. Ошибки определения глицирризиновой кислоты и ликуразида в пробах с добавками стандартных образцов находились в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

Таблица 29 – Метрологические характеристики методики количественного определения глицирама и ликуразида в корнях солодки

БАС	f	$\bar{X}$, %	S	P , %	$t(P, f)$	$\Delta \bar{X}$	$\bar{\varepsilon}$, %
Глицирризиновая кислота	10	4,44	0,27131	95	2,23	$\pm 0,18$	$\pm 4,11$
Ликсуразид	10	0,340	0,02408	95	2,23	$\pm 0,016$	$\pm 4,76$

В предлагаемых условиях ВЭЖХ-анализа нами проведено сравнительное изучение экстракционной способности водно-этанольных смесей с различной концентраций этанола (30 %, 40 %, 60%, 70 %, 80%) (табл. 30). Из исследованных концентраций 40% этанол показал более высокие значения степени извлечения глицирризиновой кислоты, несмотря на то что для ликуразида более высокий выход был продемонстрирован при использовании 70 % этилового спирт. Однако, с учетом того факта, что глицирризиновая кислота является БАС, определяющим основную фармакологическую активность корней солодки, нами для методики был выбран 40 % этанол.

Таблица 30 – Эффективность экстракции при использовании водно-спиртовых смесей с различной концентрацией этанола

№	Экстрагент	Содержание глицирризиновой кислоты, %	Содержание ликуразида, %
1.	Этиловый спирт 30%	$3,86 \pm 0,17$	$0,230 \pm 0,009$
2.	Этиловый спирт 40%	$4,50 \pm 0,16$	$0,331 \pm 0,011$
3.	Этиловый спирт 60%	$4,49 \pm 0,17$	$0,322 \pm 0,012$
4.	Этиловый спирт 70%	$4,21 \pm 0,15$	$0,368 \pm 0,015$
5.	Этиловый спирт 80%	$3,48 \pm 0,14$	$0,323 \pm 0,013$

Методика количественного определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки голой. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 40% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до 0,01. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр. Аликвоту полученного извлечения фильтруют через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм) (испытываемый раствор)

В жидкостной хроматограф «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 3 мкл испытуемого раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной

колонке «КАХ-6-80-4» (2 мм х 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил : 1% водный раствор уксусной кислоты в соотношении 4:6, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2000 мкл. Проводят УФ-детектирование при длине волны 256 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 3 мкл стандартного раствора глицирама вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади пика глицирама и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам 3 определений.

Определяют время удерживания и идентифицируют пик глицирризиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание глицирризиновой кислоты в корнях солодки в пересчете на глицирам и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

где S – среднее значение площади пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – среднее значение площади пика глицирама, вычисленное из хроматограмм стандартного раствора глицирама;

V – объем извлечения, мл;

V₁ – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V₀ – объем раствора ГСО глицирама, мл;

V₂ – объем вводимой пробы раствора ГСО глицирама, мкл;

m – масса сырья, г;

m₀ – масса ГСО глицирама, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Методика количественного определения ликуразида в корнях солодки.

Пробоподготовка схожа по описанию в «Методике количественного определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки».

В жидкостной хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 5 мкл полученного раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (2 мм х 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил : 1% водный раствор уксусной кислоты в соотношении 2:8, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Проводят УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 5 мкл стандартного раствора ликуразида вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади пика ликуразида и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам 3 определений.

Определяют время удерживания и идентифицируют пик ликуразида на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика ликуразида на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание ликуразида в корнях солодки в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)'}.$$

где S – среднее значение площади пика ликуразида на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – среднее значение площади пика ликуразида, вычисленное из хроматограмм стандартного раствора ликуразида;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_0 – объем раствора ГСО ликуразида, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора ГСО ликуразида, мкл;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса ГСО ликуразида, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

С использованием разработанных методик были проанализированы промышленные образцы сырья и заготовленного нами (табл. 31).

Таблица 31 – Количественное содержание глицирризиновой кислоты и ликуразида в корнях солодки

№	Образцы	Содержание ликуразида, %	Содержание глицирризиновой кислоты, %
1.	Корни солодки голой (пгт. Алексеевка Самарской области, август 2019 г.)	$0,212 \pm 0,008$	$3,42 \pm 0,16$
2.	Корни солодки голой (пгт. Алексеевка Самарской области, август 2019 г.)	$0,209 \pm 0,008$	$3,23 \pm 0,16$
3.	Корни солодки уральской (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, август 2021 г.)	$0,223 \pm 0,008$	$3,96 \pm 0,16$
4.	Солодки корни (АО «Красногорсклексредств а, серия 141222»)	$0,324 \pm 0,010$	$4,01 \pm 0,15$
5.	Солодки корни (АО «Красногорсклексредств а, серия 170620»)	$0,312 \pm 0,012$	$3,44 \pm 0,16$

Содержание глицирризиновой кислоты (в пересчете на глицирам) в корнях солодки варьировало от 3,23 % до 4,01 %, ликуразида – от 0,209 % до 0,324 % в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Разработана методика качественного анализа, основанная на использовании метода ТСХ в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2) с использованием стандартных образцов глицирризиновой кислоты и ликуразида.

2. Разработана методика количественного определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки методом ВЭЖХ при детекции длины волны 256 нм. Содержание глицирризиновой кислоты (в пересчете на глицирам) может варьировать от 3,23% до 4,01% в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья.

3. Разработана методика количественного определения ликуразида в корнях солодки методом ВЭЖХ при детекции длины волны 360 нм. Содержание ликуразида может варьировать от 0,209% до 0,324% в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья.

ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ТРАВЫ СОЛОДКИ ГОЛОЙ (*GLYCYRRHIZA GLABRA* L.) И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Для проведения фармакологического исследования нами был получен густой экстракт травы солодки голой методом дробной модифицированной мацерации.

Содержание действующих веществ (сумма флавоноидов) в густом экстракте составило $10,24 \pm 0,074$ % в пересчете на пиноцембрин [7]. Также были исследованы флавоноиды, выделенные из травы солодки голой – пиноцембрин, генистеин и изоглабранин (см. главу 4), с целью изучения влияния на экскреторную функцию почек и нейротропной активности, острой токсичности.

7.1. Изучение влияния на экскреторную функцию почек густого экстракта и флавоноидов травы солодки голой

В результате проведенного исследования была установлена взаимосвязь с внутрижелудочным введением флавоноидов и их влиянием на диурез и креатининуризу у экспериментальных животных.

При однократном внутрижелудочном введении пиноцембрина в дозе 1 мг/кг у подопытных животных отмечалось достоверное увеличение диуреза (на 25%) и креатининуризы (на 45%) по сравнению с контрольной группой, получавшей только воду за 4 ч эксперимента (табл. 32). В то же время, при однократном внутрижелудочном введении генистеина в дозе 1 мг/кг наблюдалось достоверное повышение диуреза на 33% в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой (табл. 32). Однако при однократном внутрижелудочном введении изоглабранина в дозе 1 мг/кг достоверных изменений в почечной экскреции воды и креатинина за 4 ч опыта обнаружено не было (табл. 32).

В суточных экспериментах достоверных изменений диуреза и креатининурина в опытных группах, получавших пиноцембрин, генистеин, изоглабринин в дозе 1 мг/кг, отмечено не было.

Таблица 32 – Влияние внутрижелудочного введения индивидуальных, выделенных веществ из травы солодки голой и густого экстракта на экскреторную функцию почек интактных крыс в 4 ч и 24 ч эксперименте ($M \pm m$, $n = 7$)

Время, ч	Опыт 1					Опыт 2	
	Показатели	Контроль	Пиноцембрин, 1 мг/кг	Генистеин, 1 мг/кг	Изоглабринин, 1 мг/кг	Контроль	Густой экстракт, 10 мг/кг
4	Диурез, мл/4 ч	1,61±0,07	2,01±0,17 *	2,14±0,20 *	1,70±0,07	2,58±0,22	3,02±0,55 3,02±0,55
	Соотношение в %	100%	125%	133%	106%	100%	89%
	О/К	-	p=0,048	p=0,028	p=0,387	-	p=0,470
	Экскреция креатинина, мг/4 ч	0,20±0,02	0,29±0,02 *	0,25±0,05	0,24±0,03	0,56±0,11	0,43±0,09
	Соотношение в %	100%	145%	125%	120%	100%	77%
	О/К	-	p=0,011	p=0,335	p=0,764	-	p=0,447
24	Диурез, мл/24 ч	2,57±0,23	2,94±0,21	2,91±0,19	2,51±0,18	3,55±0,20	4,34±0,63
	Соотношение в %	100%	114%	113%	98%	100%	122%
	О/К	-	p=0,263	p=0,279	p=0,832	-	p=0,252
	Экскреция креатинина, мг/24 ч	2,00±0,16	2,59±0,30	2,23±0,30	2,01±0,37	1,64±0,26	1,44±0,26
	Соотношение в %	100%	130%	112%	101%	100%	88%
	О/К	-	p=0,112	p=0,510	p=0,970	-	p=0,594
Примечание: здесь и далее * - $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы, ** - $p < 0,01$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы, *** - $p < 0,001$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы.							

В 4-х часовых и суточных экспериментах достоверных изменений диуреза и креатининурина в опытных группах, получавших густой экстракт

травы солодки голой в дозе 10 мг/кг, отмечено не было.

В результате проведенного исследования было обнаружено, что при применении пиноцембрина в дозе 1 мг/кг происходит значительное увеличение диуреза на 25% и крениниуреза на 45% в экспериментальной группе по сравнению с группой водного контроля в течение 4 ч эксперимента.

7.2. Изучение нейротропной активности густого экстракта и флавоноидов травы солодки голой

При изучении нейротропной активности исследуемые, образцы были подвергнуты однократному внутрижелудочному введению через зонд на фоне 1% водной нагрузки. В ходе исследования были изучены эффекты густого экстракта травы солодки голой в дозе 10 мг/кг и пиноцембрина, генистеина, изоглабринин в дозах 1 мг/кг.

Полученные результаты свидетельствуют о достоверном повышении двигательной активности у крыс после однократного внутрижелудочного введения густого экстракта травы солодки голой в дозе 10 мг/кг по сравнению с контрольной группой (на 170%, $p=0,037$) (табл. 33).

Таблица 33 – Изучение нейротропной активности густого экстракта
травы солодки голой и индивидуальных веществ

<i>Двигательная активность животных за 5 мин, с</i>					
<i>Контроль</i>	<i>Опыт 1</i>	<i>Опыт 2</i>	<i>Опыт 3</i>	<i>Контроль</i>	<i>Опыт 4</i>
<i>Вода</i>	<i>Пиноцембрин, 1 мг/кг</i>	<i>Генистеин, 1 мг/кг</i>	<i>Изоглабринин, 1 мг/кг</i>	<i>Вода</i>	<i>Густой экстракт, 10 мг/кг</i>
270,86±5,17	287,29±3,73 *	291,14±3,85 *	280,43±5,02	12,00±3,65	269,00±7,25
100%	106%	107%	104%	100%	270%
О/К	p=0,024	p=0,008	p=0,209	О/К	p=0,037
Примечание: здесь и далее * - p < 0,05 - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы, ** - p < 0,01 - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы, *** - p < 0,001 - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы.					

Аналогичным образом, пиноцембрин в дозе 1 мг/кг вызвал достоверное повышение двигательной активности (на 6%, p=0,024) (табл. 33), предполагая наличие антидепрессантной активности.

Кроме того, в исследовании было выявлено, что генистеин в дозе 1 мг/кг достоверно повышал двигательную активность опытных животных (на 7%, p=0,008). Таким образом, генистеин в дозе 1 мг/кг стимулирует ЦНС, проявляет антидепрессантные свойства.

Однако, в отличие от пиноцембрин и генистеина, изоглабринин в дозе 1 мг/кг не оказал значительного влияния на двигательную активность по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, результаты исследования подтверждают, что густой экстракт травы солодки голой, пиноцембрин и генистеин обладают антидепрессантными свойствами, проявляющимися в повышении двигательной активности у крыс в тесте Порсолта. Изоглабринин не продемонстрировал значительного влияния на двигательную активность в

этой экспериментальной модели, что предполагает наличие разной степени активности или специфики действия БАС травы солодки голой.

7.3. Изучение острой токсичности густого экстракта травы солодки голой

При проведении исследования острой токсичности густого экстракта травы солодки голой проводили по методике, описанной в главе 2.

Во время эксперимента было отмечено, что ни у одной среди крыс самцов не произошло летальных случаев или нарушений реакций в проведении. Эти результаты позволяют нам сделать вывод, что ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» густой экстракт травы солодки голой относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

Результаты наших исследований указывают на то, что густой экстракт травы солодки голой не содержит веществ, которые являются токсичными, и может быть использован для длительной терапии хронических заболеваний, включая профилактику.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7

1. Проведены исследования, в ходе которых было выявлено, что густой экстракт травы солодки голой, а также пиноцембрина и генистеина обладают диуретической активностью. Особенно значительное увеличение диуреза (на 25%) и кренинуреза (на 45%) было отмечено при использовании пиноцембрина в дозе 1 мг/кг у подопытных животных. диуретической активности густого экстракта травы солодки голой, а также БАВ пиноцембрина, генистеина и изоглабранина. Также при однократном внутрижелудочном введении генистеина в дозе 1 мг/кг наблюдалось достоверное повышение диуреза на 33% в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой.

2. Изучено действие густого экстракта травы солодки голой, а также пиноцембрина, изоглабранина и генистеина. Установлено, что густой экстракт в дозе 10 мг/кг, а при дозах 1 мг/кг пиноцембрин и генистеин в дозах 1 способствовали достоверному увлечению двигательной активности опытных животных относительно водного контроля, что свидетельствует об антидепрессантном действии исследуемых образцов.

3. По результатам исследования острой токсичности, было определено, что густой экстракт травы солодки голой относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

4. Определено, что трава солодки голой является перспективным видом лекарственного растительного сырья для получения безопасных и эффективных растительных лекарственных препаратов для длительной терапии хронических заболеваний, в том числе и для профилактики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование корней и травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) позволило сделать следующие общие выводы:

1. В результате сравнительного морфологического исследования травы солодки голой и солодки уральской, а также примесных видов рода Солодка определено, что морфологическими диагностическими признаками для травы солодки голой являются: верхняя и нижняя поверхности усажены точечными железкам, клейкими от обильных выделений; центральная жилка с нижней стороны листочка густо опушена; поверхность черешка густоопушенная и скудно-железистая. Плод прямой слегка извилистый; поверхность голая без опушения. Цветок с тремя фиолетовыми крылами, двумя сросшимся зеленоватыми парусами с фиолетовым оттенком, вдвое короче, чем крыло. Парус ярко выражен морфологически.

Отличительной чертой солодки голой является ромбообразная форма поперечного сечения рахиса в медиальной части с V-образной выемкой с адаксиальной стороны. Дополнительные диагностические признаки, присутствующие в всех частях травы солодки голой и дающие селективную диагностику таксона являются: бичевидные волоски с мелкоклеточным основанием и длинной остроконечной клеткой; желёзки с крупной многоклеточной головкой; пигментированные клетки с оранжевым пигментом, реагирующим на раствор NaOH с потемнением окраски и с раствором серноокислого анилина с окрашиванием в тёмно-бурый до черного цвета.

2. Впервые из травы солодки голой методом колоночной хроматографии были выделены флавоноидные вещества генистеин и изоглабрин, а из травы солодки голой культивируемой и произрастающей

на территории РФ был впервые выделен пиноцембрин. С помощью сравнительного ТСХ-анализа в траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) были обнаружены, выделенные флавоноиды – пиноцембрин, изоглабринин. В траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*) был выявлен флавоноид – пиноцембрин. Проведенное исследование компонентного состава травы солодки голой методом ВЭЖХ позволило установить, что диагностически значимым флавоноидом является пиноцембрин.

3. Разработаны методики качественного анализа определения флавоноидов в траве солодки голой с помощью ТСХ-анализа и дифференциальной спектрофотометрии. Для ТСХ-анализа была подобрана система растворителей хлороформ-этанол (16:1) со стандартным образцом пиноцембрина, с величиной $R_f = 0,57$). Установлены характерные максимумы поглощения извлечения травы солодки голой $\lambda_{max} = 310 \pm 2$ нм.

4. Разработана методика количественного содержания суммы флавоноидов (в пересчете на пиноцембрин) в траве солодки голой методом дифференциальной спектрофотометрии при детекции длине волны 310 нм. Определено, что содержание суммы флавоноидов в траве солодки голой варьирует от $0,39\% \pm 0,002$ до $3,41\% \pm 0,002$ с относительной ошибкой определения среднего значения $\pm 0,73\%$ с доверительной вероятностью 95%.

Впервые разработана методика количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой методом ВЭЖХ при детекции длины волны 290 нм. Содержание пиноцембрина варьирует от $0,39\% \pm 0,007$ до $1,28\% \pm 0,022$ с относительной ошибкой определения среднего значения $\pm 6,30\%$ с доверительной вероятностью 95%.

5. Обосновано использование в методике качественного и количественного анализа травы солодки голой стандартного образца пиноцембрина, для которого разработан способ получения стандартного образца «Пиноцембрин» из травы солодки голой, позволяющий получать целевое вещество с выходом 1,0-1,5% от массы воздушного сырья.

6. Проанализирован процесс накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой. Наблюдается плавное повышение уровня суммы флавоноидов в процессе развития растения. Для рационального использования травы солодки голой, рекомендуется проводить сбор растительного сырья в фазе активного плодоношения в середине августа.

7. Разработана методика качественного анализа методом ТСХ в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2) с использованием стандартных образцов глицирризиновой кислоты и ликуразида. Разработана методика количественного определения глицирризиновой кислоты и ликуразида в корнях солодки методом ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования. Содержание ликуразида в корнях солодки варьирует от $0,209\% \pm 0,008$ и до $0,324\% \pm 0,010$ с относительной ошибкой определения среднего значения $\pm 4,76\%$ с доверительной вероятностью 95%, глицирризиновой кислоты в корнях солодки варьирует от $3,23\% \pm 0,16$ и до $4,01\% \pm 0,15$ с относительной ошибкой определения среднего значения $\pm 4,11\%$ с доверительной вероятностью 95%.

8. В результате проведения исследования диуретической и нейротропной активности густого экстракта, а также выделенных флавоноидов пиноцембрина, генистеина и изоглабранина. Было установлено, что пиноцембрин в дозе 1 мг/кг у подопытных животных отмечалось достоверное увеличение диуреза (на 25%) и креатининуриза (на 45%). В тоже время, при однократном внутрижелудочном введении генистеина в дозе 1 мг/кг наблюдалось достоверное повышение диуреза на 33% в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой. Густой экстракт травы солодки голой в дозе 10 мг/кг, пиноцембрин и генистеин в дозах 1 мг/кг способствовали достоверному увеличению двигательной активности опытных животных, что свидетельствует об антидепрессантном действии исследуемых образцов. Определено, что трава солодки голой является перспективным видом ЛРС для получения безопасных и

эффективных растительных лекарственных препаратов для длительной терапии хронических заболеваний.

9. Разработаны проекты фармакопейных статей на новый вид ЛРС «Солодки голой трава» и стандартного образца пиноцембрин.

Практические рекомендации. Разработанные в ходе диссертационной работы методы стандартизации травы солодки голой представляют собой объективную и качественную оценку данного растительного объекта и эффективно решают вопросы его идентификации.

Были разработаны проекты фармакопейной статьи «Солодки голой трава» и «Пиноцембрин – стандартный образец», которые рекомендуются для включения в ГФ РФ. Полученные результаты исследования, проведенного в рамках диссертации, имеют практическое применение в центрах сертификации и контроля качества ЛС и на фармацевтических предприятиях, а также в учебных процессах по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия».

Перспективы дальнейшей разработки темы. Выполнение диссертационной работы играет важную роль в научно-практическом аспекте для достижения целей, связанных как с фармакогностическим, так и в целом фармацевтическим анализом. Это позволяет перспективным представителем рода Солодка внедрять в фармацевтическую практику и разрабатывать подходы к стандартизации других видов ЛРС и созданию новых ЛП. Таким образом, выполнение исследовательской работы имеет огромное значение для прогресса в фармации.

Список литературы

1. Аммосов, А.С. Тритерпеноиды растений родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey. / А.С. Аммосов, В.И. Литвиненко // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, № 2. – С. 31-42.
2. Асеева, Т.А. Лекарственные растения тибетской медицины. / Т.А. Асеева, К.Ф. Блинкова, Г.П. Яковлев. – Новосибирск: Издательство «Наука», 1985 – 160 с.
3. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Под ред. П.С. Чиков и [и др]. – М.: ГУГК. 1980 – 340 с.
4. Атлас лекарственных растений / Под ред. Н.И. Сидельникова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Наука, 2021. – 646 с.
5. Барнаулов, О.Д. Детоксикационная фитотерапия, или Противоядные свойства лекарственных растений / О.Д. Барнаулов. – Санкт-Петербург : Политехника, 2007. – 408 с.
6. Барнаулов, О.Д. Лекарственные растения пряностей / О.Д. Барнаулов, - СПб. : Изд-во Фонда рус. поэзии, 2001. – 239 с.
7. Белова, О.А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой / О.А. Белова, В.А. Куркин, М.В. Егоров // Фармация и фармакология. – 2023. – Т. 11, № 2. – С. 127-136.
8. Белова, О.А. Разработка подходов к стандартизации травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) / О.А. Белова, В.А. Куркин, Е.А. Смирнова, М.В. Егоров / Аспирантский вестник Поволжья. – 2023. – Т. 2, № 23. – С. 53-59.
9. Берестовская, Л.И. Потенциальные возможности солодки в производстве мягкого мороженого и фризерных десертов специального назначения / Л.И. Берестовская // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1999. – № 2. – С.31-35.
10. Большая иллюстрированная энциклопедия. Лекарственные растения. – Санкт-Петербург : ООО «СЗКЭО», 2014. – 224 с.

11. Ботиров, Э.Х. Флавоноиды надземной части *Glycyrrhiza glabra* / Э.Х. Ботиров, Ф. Киямитдинова, В.М. Маликов // Химия природных соединений. – 1986. – № 1. – С. 111-112.
12. Бровченко, Б.В. Оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки промышленного производства методом ВЭЖХ/ Б.В. Бровченко, В.А. Ермакова, Д.О. Боков и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8, № 2. – С. 87-91.
13. Бровченко Б.В., Ермакова В.А., Козин Д.А., Стручков П.А., Белобородов В.Л. Определение содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки различных способов переработки и оценка качества настоев из них. Сборник научных трудов Международной научной конференции, М., ВИЛАР, 2018 - с. 629-635.
14. Воронин, А.В. Использование компьютерной программы «ChemMetr 1.0» для метрологической оценки методик фармацевтического анализа / А. В. Воронин, И. В. Сынбулатов // Национальная ассоциация ученых. — 2020. — Т. 3, № 52. — С. 45-49.
15. Гаврилин, М.В. Совершенствование способов оценки качества корней и сиропа солодки / М.В. Гаврилин, С.П. Сенченко, А.М. Тамирян и др. // Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 147-145.
16. Гаммерман, А.Д. Словарь тибетско-латино-русских названий лекарственного растительного сырья, применяемого в тибетской медицине. Акад. наук СССР. Сиб. отд-ние. Бурят. комплексный науч.-исслед. ин-т, Улан-Удэ : [б. и.], 1963. – 70 с.
17. Государственная Фармакопея Российской Федерации. - Четырнадцатое издание. – М.: Министерство здравоохранения РФ, 2018. / URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
18. Григорьев, Ю.С. Род Солодка – *Glycyrrhiza* L. / Ю.С. Григорьев, И.Т. Васильченко // Флора СССР. – 1948. – Т. 13. – С. 230-242.

19. Дейл, З. Жидкостная колоночная хроматография (пер. с англ.) / З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака // Под ред. докт. хим. наук, профессора В.Г. Березкина. – М.: Мир. – 1978. – 544 с.
20. Егоров М. В. Стандартизация сырья и препаратов солодки: дис.....канд. фармац. наук: 15.00.02: защищена 31.05.2005 / Максим Валерьевич Егоров. – Самара, 2005. – 118 с.
21. Егоров, М. В. Качественный и количественный анализ сырья и препаратов солодки // М. В. Егоров [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 1. – С. 175-180.
22. Егоров, М. В. Совершенствование методов стандартизации корней солодки / М. В. Егоров, В. А. Куркин // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 1(8). – С. 1992-1995.
23. Ермакова, В.А. Корни солодки: анализ фармакопейных требований / В. А. Ермакова, И.А. Самылина, Т.Ю. Ковалева и др. // Фармация. – 2019. – Т. 6, № 68. – С. 16-19.
24. Захаренко, А.Г. Возможности и перспективы клинического применения отечественного лекарственного средства Эссенциглив / А. Г. Захаренко // Лечебное дело: научно-практический терапевтический журнал. – 2013. – Т. 29, № 1. – С. 9-12.
25. Зилфикаров, И. Н. Природные лекарственные препараты: химический анализ и стандартизация : справочное и научно-практическое издание / И. Н. Зилфикаров. – Москва : СЛОН ПО, 2021. – 712 с.
26. Ибрагимов, Ф.И. Основные лекарственные средства китайской медицины / Ф.И. Ибрагимов, В.С. Ибрагимова // Под ред. А.Ф. Гаммерман. – Москва : Медгиз, 1960. – 412 с.
27. Ибрагимова, В.С. Китайская медицина: Методы диагностики и лечения. Лекарственные средства. Чжень-цзю терапия / В.С. Ибрагимова. – Москва : ПКП «Антарес», 1994 – 637 с.

28. Ильина, Т.А. Лечебные травы. Иллюстрированный справочник-определитель / Т.А. Ильина. – Москва: Эксмо, 2022 – 347 с.
29. Кошкина, А.В. Солодка голая. Фитохимический состав и биологические эффекты / А.В. Кошкина, Ю.О. Федотова // Орбиталь. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 30-51.
30. Кузнецова, М.А. Сказания о лекарственных растениях / М.А. Кузнецова, А.С. Резникова, Москва: Высш. шк., 1992. – 272 с.
31. Куркин, В. А. Стандартизация корней солодки голой и лекарственного препарата «Солодки экстракт жидкий» / В. А. Куркин, М. В. Егоров // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 6 (часть 6). – С. 1232-1236.
32. Куркин, В.А. 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.
33. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин. – 5-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2020. – 1278 с.
34. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
35. Леднева, И.П. О теоретических основах тибетской медицины / И.П. Леднева // Вестник Бурятского государственного университета. – 2011. - №. 12. – С. 14-15.
36. Литвиненко, В.И. Солодка (систематика, химия, технология, стандартизация, фармакология, клиника). – Литвиненко В.И., Георгиевский В.П., Фурса Н.С., Аммосов А.С., Попова Т.П. – Ярославль: ООО «Аверс Плюс», 2014. – 466 с.

37. Литвиненко, В.И. Солодка: систематика, химия, технология, стандартизация, фармакология, клиника / В.И. Литвиненко, В.П. Георгиевский, А.С. Аммосов и др. – Ярославль : Аверс Плюс, 2014. – 464 с.
38. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 200 с.
39. Маматханова, М.А. Изучение надземной *Glycyrrhiza glabra* L. в качестве перспективного сырья для производства препаратов на основе флавоноидов / М.А. Маматханова, Б.А. Абдурахманов, Б.А. Нигматуллаев и др. // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 171-176.
40. Миртурсунова, И.М. Изучение процесса получения пиноцембрина-стандарта / И.М. Миртурсунова, Б.А. Абдурахманов, Г.Б. Сотимов и др. // Universum: Технические науки. – 2019. – Т. 62, № 5. – URL: <https://7universum.com/ru/tech/archive/item/7270>.
41. Муравьев, И.Л. Состояние и перспективы изучения и использования солодки в народном хозяйстве СССР / И.Л. Муравьев, В. Д. Пономарев // Вопросы изучения и использования солодки в СССР. – 1966. - №. 1. – С. 5-14.
42. Назаров-Рыгдылон, В. Э. Влияние многокомпонентных фитопрепаратов тибетской медицины на систему свертывания крови // Вторая республиканская конференция по медицинской ботанике (Тезисы докладов), Киев, 1988 – С. 387-388.
43. Нафанилова, И.И. Виды родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey. флоры Советского Союза: систематика, кариология, география, генезис: дис.....канд. биол. наук: 03.00.05. – Алмата, 1988 – 156 с.
44. Недилько, О.В. Изучение аминокислотного состава надземной и подземной частей солодки голой / О.В. Недилько, А.В. Яницкая // Химия растительного сырья. – 2020. - №. 1 – С. 251-256.
45. Ноздрачев, А.Д. Общий курс физиологии человека и животных : учебник для биологических и медицинских специальностей вузов / А.Д.

Ноздрачева, И.А. Баранникова, А.С. Батуев и др. // Под ред. проф. А.Д. Ноздрачева. – Москва : Высшая школа, 1991. – 511 с.

46. Оленников, Д. Н. Применение микроколоночной ВЭЖХ-УФ для анализа *Glycyrrhiza uralensis* и препаратов солодки / Д. Н. Оленников, И. Н. Зилфикаров, С. Vennos // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 12. – С. 24-29.

47. Павлова, Л. В. Определение глицирризиновой кислоты в корнях солодки методом ВЭЖХ с субкритической экстракцией / Л. В. Павлова [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22, № 3. – С. 229-235.

48. Пат. 16370800 Российская Федерация МПК А61К 35/78. Способ получения фунгицидного средства / Э.Ф. Степанова, А.Н. Виктор, Г.А. Шумилина, Н.Д. Новикова (РФ). – № 4494995/14; заявл. 15.08.1988; опубл. 15.11.1994. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.

49. Пат. 20274338 Российская Федерация МПК А61К 36/484, А61К 37/08 Способ получения средства, обладающего анафилактическим действием / Э.Ф. Степанова, А.С. Сараф, А.М. Сампиев (РФ). – № 5026101/14; заявл. 02.07.1992; опубл. 27.01.1995. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.

50. Пат. 2038090 Российская Федерация МПК А61К 36/484, А61Р 31/04 Способ получения средства, обладающего антимикробным действием / Э.Ф. Степанова, М.С. Околелова, Т.Н. Ващенко (РФ). – № 5019880/14; заявл. 28.08.1991; опубл. 27.06.1995. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.

51. Пат. 2141839 Российская Федерация МПК А61К 36/484, А61Р 31/04, А61Р 31/10, В01Д 11/02 Способ получения антибактериального и антифузального средства / Э.Ф. Степанова, А.М. Сампиев, Ж.В. Степанова (РФ). – № 97118734/14; заявл. 11.12.1997; опубл. 11.12.1999. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fips.ru>.

52. Потанина, О.Г. Совершенствование стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм из него на основе 173 микроскопического метода исследования: дисс. ... д. фармац. наук.: 15.00.02/ Потанина Ольга Георгиевна. – М. – 2004. – 424 с.
53. Резенькова О.В. Изучение влияния экстракта солодки голой на процессы адаптации организма: дис.....канд. биол. наук: 03.00.13: защищена 29.12.2003 / Резенькова Ольга Владимировна. – Ставрополь, 2003. – 175 с.
54. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / Под ред. С.Н. Быковского [и др.]. - М.: Изд-во Перо, 2014. - 656 с.
55. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. - 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО Издательство «Медицина», 2005. - 832 с.
56. Черепанов, С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) / С. К. Черепанов. - 2-е изд. - Санкт-Петербург : Мир и семья-95, 1995. – 990 с.
57. Чжома Дунчжи. Основы тибетской медицины: ознакомительный курс для системы последиplomного образование : учебное пособие / Чжома Дунчжи, С.Э. Баяндуров. – Москва : ВУНМЦ Росздрава, 2006. – 187 с.
58. Шретер. А.И, Методика установления научных названиях растений по описаниям, приводимым в древних рукописях / А. И. Шретер, Т.А. Асеева // Растительные ресурсы. – 1976. – Т. 12. - №. 4. – С. 609-614.
59. Юладшев, М.П. Изучение флавоноидов из надземной части солодки голой произрастающей в Узбекистане / М.П. Юладшев // Растительные ресурсы. – 2000. – Т. 36, №. 4. – С. 56-59.
60. Яницкая, А.В. Сравнительное изучение содержания отдельных аминокислот в надземной части *Glycyrrhiza glabra* L. и *Glycyrrhiza echinata* L. / А.В. Яницкая, О.В. Недилько, О.В. Овсянкина и др. // Вестник ВолгГМУ. – 2020. - №. 4(76) – С. 173-175.

61. Aiello, F. From Vegetable Waste to New Agents for Potential Health Applications: Antioxidant Properties and Effects of Extracts, Fractions and Pinocembrin from *Glycyrrhiza glabra* L. Aerial Parts on Viability of Five Human Cancer Cell Lines / F. Aiello, B. Armentano, N. Polera et al. // Journal of agricultural and food chemistry. – 2017. – No. 36(65). – P. 7944-7954.

62. Aiello, F. From Vegetable Waste to New Agents for Potential Health Applications: Antioxidant Properties and Effects of Extracts, Fractions and Pinocembrin from *Glycyrrhiza glabra* L. Aerial Parts on Viability of Five Human Cancer Cell Lines / F. Aiello, B. Armentano // Journal of agricultural and food chemistry. – 2017. – No. 36(65). – P. 7944-7954.

63. Alonso J. Tratado de Pitofarmacos y Nutraceuticos. Barcelona: Corpus, 2004; P.905-911

64. Armanini, D. Glycyrrhetic acid, the active principle of licorice, can reduce the thickness of subcutaneous thigh fat through topical application / D. Armanini, D. Nacamulli, F. Francini-Pesenti et al. / Steroids. – 2005. – No. 8(70). – P. 538-542.

65. Biondi, D.M. Dihydrostilbene derivatives from *Glycyrrhiza glabra* leaves / D.M. Biondi, C. Rocco, G. Ruberto // Journal of natural products. – 2005. – No. 7(68). – P. 1099-1102.

66. Biondi, D.M. New dihydrostilbene derivatives from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* and evaluation of their antioxidant activity / D.M. Biondi, C. Rocco, G. Ruberto // Journal of natural products. – 2003. – No. 4(66). – P. 477-480.

67. Boller, F. History of dementia and dementia in history: an overview / F. Boller, M. Forbes // Journal of the neurological sciences. – 1988. – No. 2(158). – P. 125-133.

68. Brookmeyer, R. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset / R. Brookmeyer, S.

Gray, C. Kavas // American journal of public health. – 1998. – No. 9(88). – P. 1337-1342.

69. Cappello, A.R. *In vitro* anti-proliferative and anti-bacterial properties of new C7 benzoate derivatives of pinocembrin / A.R. Cappello, F. Aiello, N. Polera et al. // Natural product research. – 2021. – No. 11(35). – P. 1783-1791.

70. Chakravarthi, K.K. Beneficial effect of aqueous root extract of *Glycyrrhiza glabra* on learning and memory using different behavioral models: An experimental study / K.K. Chakravarthi // Journal of Natural Science, Biology and Medicine. – 2013. – No. 2(4). – P. 420-425.

71. Cherng, J.M. A quantitative bioassay for HIV-1 gene expression based on UV activation: effect of glycyrrhizic acid / J.M. Cherng, H.J. Lin, Y.H. Hsu et. // Antiviral research. – 2004. – No. 1(62). – P. 27-36.

72. Cho, S. Hypnotic effects and GABAergic mechanism of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) ethanol extract and its major flavonoid constituent glabrol / S. Cho, J.H. Park, A.N. Pae // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2011. – No. 11(20). – P. 3493-3501.

73. Chu, X. Attenuation of allergic airway inflammation in a murine model of asthma by Licochalcone A / X. Chu, L. Jiang, M. Wei et al. // Immunopharmacology and immunotoxicology. – 2013. – No. 6(35). – P. 653-661.

74. Cinatl, J. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus / J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer et al. // Lancet. – 2003. – No. 9374(361). – P. 2045-2046.

75. Coulter, I.D. Evidence based complementary and alternative medicine: promises and problems / I.D. Coulter // Forschende Komplementarmedizin. 2016. – No. 2(14). – P. 102-108.

76. Dong, Y. Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins / Y. Dong, M. Zhao, D. Sun-Waterhouse et al. // Food chemistry. – 2015. – No. 68. – P. 538-545.

77. Dong, Y. Bioactive profiles, antioxidant activities, nitrite scavenging capacities and protective effects on H₂O₂-injured PC12 cells of *Glycyrrhiza glabra* L. leaf and root extracts / Y. Dong, M. Zhao, T. Zhao et al. // *Molecules*. – 2014. – No. 7(19). – P. 9101-9113.
78. Doogan, C. Supporting work for people with multiple sclerosis / C. Doogan, E.D. Playford // *Multiple sclerosis*. – 2014. – No. 6(20). – P. 646-650.
79. Fan, J. R. Prenylated Phenolic Compounds from the Aerial Parts of *Glycyrrhiza uralensis* as PTP1B and α -Glucosidase Inhibitors / J.R. Fan, Y. Kuang, Z. Y. Dong et al. // *Journal of natural products*. – 2020. – No. 4(83). – P. 814-824.
80. Fan, J.R. Prenylated Phenolic Compounds from the Aerial Parts of *Glycyrrhiza uralensis* as PTP1B and α -Glucosidase Inhibitors / J.R. Fan, Y. Kuang, Z.Y. Dong et al. // *Journal natural product*. – 2020. – No. 4(83). – P. 814-824.
81. Fan, Y. H. Structures and In Vitro Antihepatic Fibrosis Activities of Prenylated Dihydrostilbenes and Flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Leaves / Y.H. Fan, H.Y. Xu, X.H. Feng et al. // *Journal of Food Science*. – 2019. – No. 5(84). – P. 1224–1230.
82. Fatima, A. Antifungal activity of *Glycyrrhiza glabra* L. inn extracts and its active constituent glabridin / A. Fatima // *Phytotherapy research*. – 2001. – No. 8(23). – P. 1190-1203.
83. Ferri, C. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study / C.P. Ferri, M. Prince, C. Brayne et al. // *Lancet*. – 2005. – Vol. 366. – P. 2123-2117.
84. Fiore, C. Antiviral effects of *Glycyrrhiza* species / C. Fiore, M. Eisenhut, R. Krausse et al. / *Phytotherapy research*. – 2008. – No. 2(22). – P. 141-148.
85. Frattaruolo, L. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) Leaf Phytocomplexes: Identification of Licoflavanone as a Modulator of NF- κ B/MAPK Pathway / L.

Frattaruolo, G. Carullo, M. Brindisi et al. // *Antioxidants* (Basel). – 2019. – No. 60(8). – P. 186-192.

86. Frattini, C. Volatile flavor components of licorice / C. Frattini, G. Nano // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1977. – Vol. 25. – P. 1238-1241.

87. Giacobini, E. Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer' disease / E. Giacobini // *Journal of Neural Transmission. Supplementum*. – 2014. – Vol. 62. – P. 181-187.

88. Guar, R. Drug resistance reversal potential of isoliquiritigenin and liquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza glabra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / R. Gaur, V.K. Gupta, P. Singh et al. // *Phytotherapy research: PTR*. – 2016. – No. 10(30). – P. 1708-1715.

89. Hosseinzadeh, H. Pharmacological Effects of *Glycyrrhiza* spp. and it's Bioactive Constituents: Update and Review / H. Hosseinzadeh, M. Nassiri-Asl // *Phytotherapy research: PTR*. – 2015. – No. 12(12). – P. 1868-1886.

90. Ito, M. Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV) / M. Ito, A. Sato, K. Hirabayashi et al. // *Antiviral research*. – 1988. – No. 6(10). – P. 289-298.

91. Iuldashev, M.P. Glabrizoflavon-novyĭ izoflavon iz *Glycyrrhiza glabra* L. [Glabrizoflavone--a novel isoflavone from *Glycyrrhiza glabra* L.] / M. P. Iuldashev, E. Kh. Batirov et al. // *Bioorganicheskaia khimiia*. – 2000. – No. 11(26). – P. 873-876.

92. Jia, S.S. Glycosides of phenolic acid and flavonoids from the leaves of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch / S.S. Jia, C.M. Ma, Y.H. Li et al. // *Yao Xue Xue Bao*. – 1992. – No. 6(274). – P. 441-444.

93. Jia, S.S. Isolation and identification of gancaonin P-3'-methylether from the leaves of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch / S.S. Jia, D. Liu, H. Q. Wang et al. // *Yao Xue Xue Bao*. – 1993. – No. 8(28). – P.623-625.

94. Jia, S.S. Studies on flavonoid constituents isolated from the leaves of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch / S.S. Jia, C.M. Ma, J.M. Wang // Yao Xue Xue Bao. – 1990. – No. 10(25). – P.758-762.
95. Jia, S.S. Two new isoprenyl flavonoids from the leaves of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch / S.S. Jia, D. Liu, X.P. Zheng et al. // Yao Xue Xue Bao. – 1993. – No.1(28). – P. 28-31.
96. Jin, Z. Potentiating effect of glabridin on GABAA receptor-mediated responses in dorsal raphe neurons / Z. Jin, S. Kim, S. Cho et al. // Planta Medica. – 2013 – No. 15(79). – P. 1408-1412.
97. Kinoshita, T. The isolation and structure elucidation of minor isoflavonoids from licorice of *Glycyrrhiza glabra* origin / T. Kinoshita, Y. Tamura, K. Mizutani // Chemical & pharmaceutical bulletin. – 2005. – Vol. 53. – P. 847-849.
98. Kitagawa, I. Saponin and Sapogenol.XLVII. On the constituents of the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer from northeastern China.(1). Licorice-saponins A3, B2 and C2 / I. Kitagawa, K. Hori, T. Taniyama et al. // // Chemical & pharmaceutical bulletin. – 1992. – No. 1(41). – P. 43-49.
99. Ko, Y.H. Liquiritigenin ameliorates memory and cognitive impairment through cholinergic and BDNF pathways in the mouse hippocampus / Y.H. Ko, S.H. Kwon, S.Y. Lee et al. // Archives of pharm research. – 2017. – No. 10(40). – P. 1209-1217.
100. Lauren, D. R. Efficient method for determining the glycyrrhizin content of fresh and dried roots, and root extracts, of *Glycyrrhiza* species / D. R. Lauren [et al.] // Phytochemical Analysis. – 2001. – No. 5(12). – P. 332-335.
101. Lee, I.Y. Clinical and Cellular Evidence of *Glycyrrhiza glabra* and *Platycodon grandiflorus* for Vocal Fold Nodules Complementary Treatment / I. Y. Lee, S.F. Chang, C.Y. Wu et al. // International journal of medical sciences. – 2022. – No. 5(19). – P. 813-820.

102. Lee, S.K. The inhibitory effect of roasted licorice extract on human metastatic breast cancer cell-induced bone destruction / S.K. Lee, K.K. Park, J.H. Park et al. // *Phytotherapy research: PTR.* – 2013. No. 12(27). – P. 1776-1783.

103. Lim, T.K. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Modified Stems, Roots, Bulbs* / T.K. Lim. Springer, 2016 – 1036 p.

104. Liu, H. Pharmacokinetics, Prostate Distribution and Metabolic Characteristics of Four Representative Flavones after Oral Administration of the Aerial Part of *Glycyrrhiza uralensis* in Rats / H. Liu, G. Chang, W. Wang et al. // *Molecules.* – 2022. – No. 10(10). – P. 3245-3249.

105. Liu, H. Screening of anti-chronic nonbacterial prostatitis activity of different extractions of the aerial part of *Glycyrrhiza uralensis*, and network pharmacology research / H. Liu, J. Cui, L. Zhang et al. // *Biomedical reports.* – 2021. – No. 10(24). – P. 99.

106. Liu, H. Screening of anti-chronic nonbacterial prostatitis activity of different extractions of the aerial part of *Glycyrrhiza uralensis*, and network pharmacology research / H. Liu, J. Cui, L. Chang et al. // *Biomedical reports.* – 2021. – No. 6(15). – P. 99-103.

107. Long, D.R. 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression / D. R. Long, J. Mead, J.M. Hedricks et al. // *Antimicrobial agents' chemotherapy.* – 2013. – No. 1(57). – P. 241-247.

108. Ma, X. The effect of isoliquiritigenin on learning and memory impairments induced by high-fat diet via inhibiting TNF- α /JNK/IRS signaling / X. Ma, F. Fang, M. Song et al. // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2015. – No. 4(464). – P. 1090-1095.

109. Mamedov, N. Medicinal plants used for the treatment of bronchial asthma in Russia and Central Asia. *J.Herbs* / N. Mamedov // *Spices and Medical plants.* – 2001. – No. 23(8). – P. 91-117.

110. Marquez, J. Ocoxin® oral solution slows down tumor growth in an experimental model of colorectal cancer metastasis to the liver in Balb/c mice / J. Marquez, J. Mena et al. // *Oncology Reports*. – 2016. – No. 3(35). – P. 1265-1272.

111. Mendes-Silva, W. Antithrombotic effect of glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor / W. Mendes-Silva, M. Assafim, B. Ruta et al. // *Thrombosis research*. – 2003. – No. 1-2(112). – P. 93-98.

112. Mitscher, L.A. Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. typical / L.A. Mitscher, Y.H. Park, D. Clark et al. // *Journal of natural products*. 1980 – No. 2(43). – P. 259-269.

113. Molonia, M.S. Effects of a pinitol-rich *Glycyrrhiza glabra* L. leaf extract on insulin and inflammatory signaling pathways in palmitate-induced hypertrophic adipocytes / M.S. Molonia, O. Occhiuto, C. Muscara // *Natural product research*. – 2021. – No. 1(29). – P. 4768-4775.

114. Muller, R.E. Preparation, properties, and uses licorice / R.E. Muller // *Forest Product Journal*. – 1966. – No. 3(1966). – P. 43-43.

115. Nakamura, T. Enzyme leakage due to change of membrane permeability of primary cultured rat hepatocytes treated with various hepatotoxins and its prevention by glycyrrhizin / T. Nakamura, T. Fujii, A. Ichihara // *Cell biology and toxicology*. – 1985. – No. 4(1). – P. 285-295.

116. Park, S.Y. Anti-carcinogenic effects of non-polar components containing licochalcone A in roasted licorice root / S.Y. Park, E.L. Lim, H.J. Choi // *Nutrition Research and Practice*. – 2014. – No. 3(8). – P. 257-266.

117. Pompei, R. Antiviral properties of glycyrrhizic acid and its semisynthetic derivatives / R. Pompei, S. Laconi, A. Ingiani // *Mini reviews in medical chemistry*. – 2009. – No. 8(9). – P. 996-1001.

118. Reiners, W. Cumarine und Hydroxyzimtsäuren aus Süßholzwurzel / W. Reiners // *Naturwissenschaften*. – No. 8(51). – P. 193-196.

119. Sabbioni, C. Simultaneous HPLC analysis, with isocratic elution, of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in liquorice roots and confectionery products / C. Sabbioni et al. // *Phytochemical analysis*. – 2006. – No. 1(17). – P. 25-31.

120. Sato, H. Therapeutic basis of glycyrrhizin on chronic hepatitis B / H. Sato, W. Goto, J. Yamamura et al. // *Antiviral research*. – 1996. – No. 2-3(30). – P. 171-177.

121. Shamsa, F. The *in vitro* effects of glycyrrhizin and the derivatives of glycyrrhetic acid on the activity of cAMP-dependent protein kinase and phosphorylation of cellular polypeptide by the kinase from ehrlich ascites tumor cells / F. Shamsa, N. Nagata, M. Oh-Ishi et al. // *The Tohoku journal of experimental medicine*. – 1991. – No. 4(165). – P. 594-604.

122. Siracusa, L. A pinitol-rich *Glycyrrhiza glabra* L. leaf extract as functional supplement with potential in the prevention of endothelial dysfunction through improving insulin signalling / L. Siracusa, C. Occhiuto, M.S. Molonia et al. // *Archives of physiology and biochemistry*. – 2020. – No. 1(1). – P. 1225-1234.

123. Toulemonde, B. Composition of the aroma of *Glycyrrhiza glabra* L. rhizome / B. Toulemonde // *Industries Alimentaires et Agricoles*. – 1977. – No. 11(94). – P. 1179-1182.

124. Trovato, A. In vitro anti-mycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids / A. Trovato, M.T. Monforte, A.M. Forestieri // *Bollettino chimico farmaceutico*. – 2000. – N. 5(139). – P. 225-227.

125. Tundis, R. An ancient remedial repurposing: synthesis of new pinocembrin fatty acid acyl derivatives as potential antimicrobial/anti-inflammatory agents / R. Tundis // *Natural product research*. – 2019. – No. 2(33). – P. 162-168.

126. Utsunomiya, T. Effects of glycyrrhizin, an active component of licorice roots, on *Candida albicans* infection in thermally injured mice / T. Utsunomiya, M. Kobayashi, D. Herndon // *Clinical experimental immunology*. – 1999. – No. 2(116). – P. 291-298.

127. Van Hulle, C. Über die östrogene Wirkung der Süssholzwurzel / C. Van Hulle // Pharmazie. – 1970. – No. 10(25). – P. 620-621.
128. Wang, C.L. Chemical studies of coumarins from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch / C.L. Wang, R.Y. Zhang, Y.S. Han // Yao Hsueh Hsueh Pao. – 1991. – No. 2(26). – P. 147-151.
129. Wang, D. Not only dopamine D2 receptors involved in Peony–Glycyrrhiza Decoction, an herbal preparation against antipsychotic-associated hyperprolactinemia / D. Wang, H.K. Wong, L. Zhang. // Progress in neuro-psychopharmacol and biological psychiatry. – 2012. – N. 2(39). – P. 332-338.
130. Wang, G.S. The protective action of glycyrrhiza flavonoids against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice / G.S. Wang. Z.W. Han // Yao Xue Xue Bao. – 1993. – No. 8(28). – P. 572-576.
131. Wang, X.Q. The anti-respiratory syncytial virus effect of active compound of Glycyrrhiza GD4 in vitro / X.Q. Wang, H.Y. Li, F.M. Zhang // Zhong Yao Cai. – 2006. – No. 7(29). – P. 692-694.
132. Wolkerstorfer, A. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell / A. Wolkerstorfer, H. Kurz, N. Bachhofner // Antiviral research. – 2009. – No. 2(83). – P. 171-178.
133. Xie, J. HPLC analysis of glycyrrhizin and licochalcone A in *Glycyrrhiza inflata* from Xinjiang (China) // J. Xie, Y. Zhang, W. Wang // Chemistry of Natural Compounds. – 2010. – Vol. 46. – P. 148-151.
134. Xie, Y.C. Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice / Y.C. Xie, X.W. Dong, X.M. Wu et al. // International immunopharmacology. – 2009. – No. 2(9). – P. 194-200.
135. Yang, X. Pinocembrin-Lecithin Complex: Characterization, Solubilization, and Antioxidant Activities / X. Yang, X. Wang, X.Y. Chen et al. // Biomolecules.- 2018. – No. 2(8). – P. 41-46.

136. Yavuz Kocaman, A. The genotoxic and antigenotoxic potential of the methanolic root extract of *Glycyrrhiza glabra* L. on human peripheral blood lymphocytes / A. Yavuz Kocaman // Drug Chemical Toxicology. – 2018. – No. 3(41). – P. 368-375.

137. Zani, F. Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* by *Glycyrrhiza glabra* extract, glycyrrhizinic acid, 18 alpha- and 18 beta-glycyrrhetinic acids / F. Zani, M.T. Cuzzoni, M. Dagila et al. // Planta medica. – 1993. – No. 6(59). – P. 502-507.

138. Zhang, Q. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) / Q. Zhang, M. Ye // Journal of Chromatography A. – 2009. – Vol. 1216, 11. – P. 1954-1969.

139. Zhang, Y. Simultaneous determination of glycyrrhizin and 15 flavonoids in licorice and blood by high performance liquid chromatography with ultraviolet detector / Y. Zhang et al. // ISRN Analytical Chemistry. – 2013. – Vol. 2013. – P. e786151.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Сравнительный морфологический анализ надземной части представителей рода *Glycyrrhiza* L.

Таблица 1 – Сравнительный морфологический анализ листочков представителей рода *Glycyrrhiza* L.

№ п/п	Диагностические признаки		<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L., подвид <i>grandulifera</i>	<i>Glycyrrhiza echinata</i> L.	<i>Glycyrrhiza foetidissima</i> Tausch.	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.
1.	Размер листоч ка	Длина, см	2-4	3-4	2,5-4	1,5-3	3
2.		Ширина, см	1-2,5	1,5 - 2	1-1,5	1,5-3	1-2
3.	Тип листа		Непарно-перистоложный				
4.	Форма листочка		Ланцетовидная	Широко- эпилептическая	Обратнойцевидная	Правильно эллиптические	Яйцевидная или эллиптическая
5.	Край листовой пластинки		Цельный	Цельный	Цельный	Цельный	Волнистый; Коротко-пушистые с густо усаженными клейкими, точечными железками, блестящие от обильных выделений
6.	Цвет листочка верхней стороны		Светло-зеленый	Зеленый	Желтовато- зеленый	Темно-зеленый	Желтовато-зеленый
7.	Поверхность верхней стороны листочка		Усажена точечными железками, клейкие от обильных выделений	Без железок	Без железок	Мелкие точечные железки	Точечные железки
8.	Центральная жилка с верхней стороны листочка		Без опушения	Без опушения	Без опушения	Без опушения	Без опушения
9.	Цвет листочка нижней стороны		Белёсо-зеленоватый	Светло-зеленоватый	Зеленый	Зеленый	Темно-зеленый
10.	Поверхность нижней стороны листочка		Усажена точечными железками, клейкие от обильных выделений	Без железок	Многочисленные железки	Мелкие точечные железки	Точечные железки
11.	Центральная жилка с нижней стороны листочка		Густо опушена	Без опушения, голая	Без опушения	Без опушения	Без опушения

12.	Тип жилкования	Сетчатое				
13.	Основание листочка	Округлое	Клиновидное	Узкоклиновидно е	Узкоклиновидное	Почти округлое
14.	Особенности строение верхушки листочка	С «насаженным» остроконечием	Оттянутая и согнутая, что хорошо видно с нижней стороны листочков	Короткое остроконечие	С коротким остроконечием	С «насаженным» остроконечием
15.	Длина черешка, см	0,2-0,5	0,2-0,5	0,2-0,5	0,5	0,5
16.	Поверхность черешка	Густоопушенная и скудно-железистая	Опушены короткими простыми волосками	Опушены железистыми волоками	Скудно-железистая	Скудно-железистая

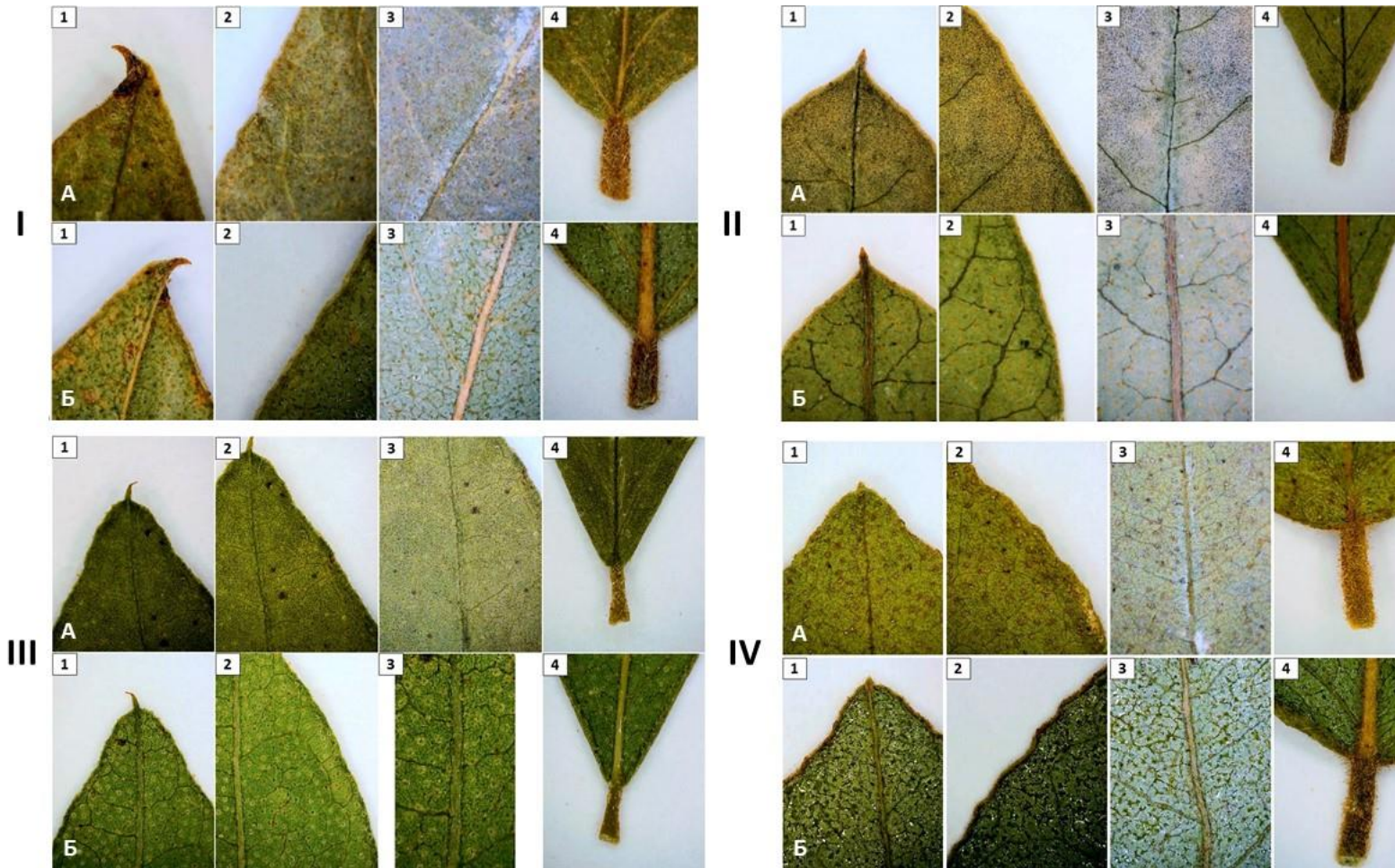


Рисунок 1 – Макрофотографии листочков представителей рода *Glycyrrhiza* L.: I – Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*); II – Солодка щетинистая (*Glycyrrhiza echinata* L.); III – Солодка зловонная (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.); IV – Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.).

А – верхняя сторона листочка; Б – нижняя сторона листочка: 1 – верхушка листочка; 2 – край листочка; 3 – центральная жилка; 4 – основание листочка.

Таблица 2 – Сравнительный морфологический анализ плодов представителей
рода *Glycyrrhiza* L.

№ п/п	Диагностические признаки	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L., подвид <i>grandulifera</i>	<i>Glycyrrhiza echinata</i> L.	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.
1.	Длина соплодия, см	13-16	7-10	6-9	7-10
2.	Соплодие	Плотные, густо собранные	Собраны в густую плотную скрученную кисть	Собраны в густое, плотное в шарообразное соплодие (головка)	Густые и плотные в кистях, плоды тесно скупенные
3.	Форма плода	Прямой, слегка изогнутый, с крепкими стенками	Слегка извилистый	Стручкообразный	Серповидно- изогнутые,
4.	Верхушка стручка	С оттянуто- тупым концом	С оттянуто-тупым концом	Слегка крючковатая	Округлая
5.	Поверхность стручка	Голая, без опушения	Покрыта головчатыми волосками	Покрыта трихомами	Покрыта железистыми шипиками
6.	Поверхность чашелистика	С опушением	С опушением	С опушением	С опушением

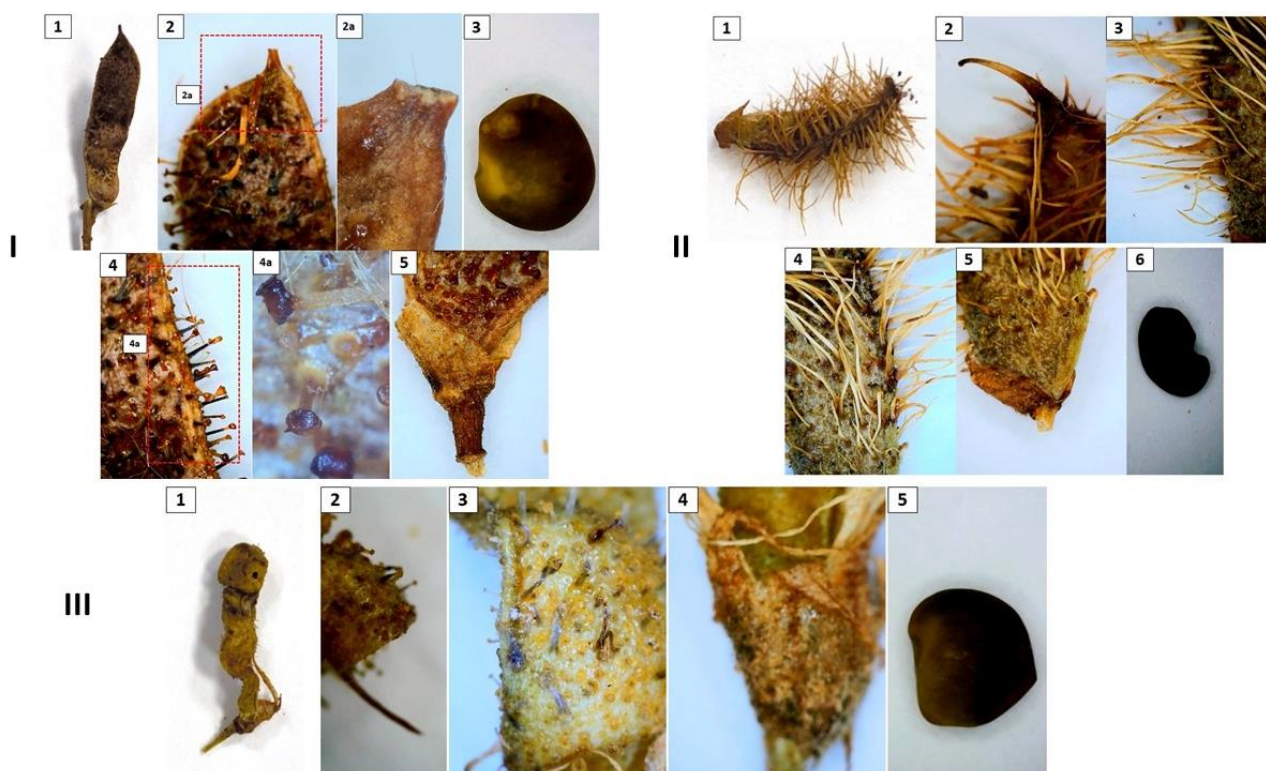


Рисунок 2 – Макрофотографии плодов представителей рода *Glycyrrhiza* L.: I – Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*): 1 – плод (стручок); 2, 2а – верхушка стручка; 3 – семя; 4, 4а – головчатые волоски на поверхности стручка; 5 – основание стручка; II – Солодка щетинистая (*Glycyrrhiza echinata* L.): 1 – плод (стручок); 2 – верхушка стручка; 3, 4 – трихомы; 5 – основание стручка; 6 – семя; III – Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.): 1 – плод (стручок); 2 – верхушка стручка ; 3 – железистые шипики на поверхности стручка ; 4 – основание стручка; 5 – семя.

Таблица 3 – Сравнительный морфологический анализ цветков
представителей рода *Glycyrrhiza* L.

№ п/ п	Диагностические признаки	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L., подвид <i>grandulifera</i>	<i>Glycyrrhiza foetidissima</i> Tausch.	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.
1.	Длина соцветия, см	10-12	5-7	3-6	10-12
2.	Тип соцветия	Простое соцветие – ботриоидная кисть			
3.	Тип цветка	Мотылькового типа			
4.	Чашечка	Сростнолистная, пятизубчатая, зигоморфная двугубая	Сростнолистная, пятизубчатая, зигоморфная двугубая	Сростнолистная, пятизубчатая, зигоморфная двугубая; при основании слегка вздутая	Сростнолистная, пятизубчатая, зигоморфная двугубая
5.	Поверхность чашечки	Коротко- опушена, покрыта желтоватыми железками	Покрыта желтоватыми железками	Покрыта желтоватыми железками	Покрыта желтоватыми железками
6.	Венчик	Крылья	3 фиолетовых крыла	3 крыльями светло- голубого оттенка, постепенно суженная в короткий ноготок	3 крыльями желтоватыми на концах с сине- фиолетовым оттенком
		Парус	2 сросшихся паруса с фиолетовым оттенком; парус морфологичес- ки выражена	Двумя синими парусами	Двумя маловыраженными парусами

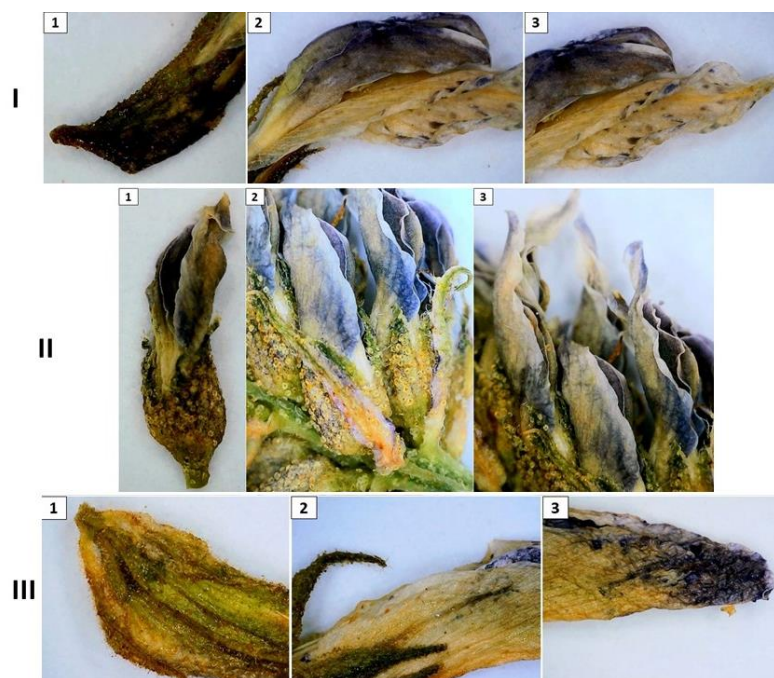


Рисунок 3 – Макрофотографии цветка представителей рода *Glycyrrhiza* L.: I – Солодка голая (подвид *grandulifera*); II - Солодки зловонная (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.); III – Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.).
1 – чашечка; 2 – венчик (парус); 3 – венчик (крыло).

Приложение 2. ЯМР- и масс-спектры индивидуальных веществ, выделенных из травы солодки голой

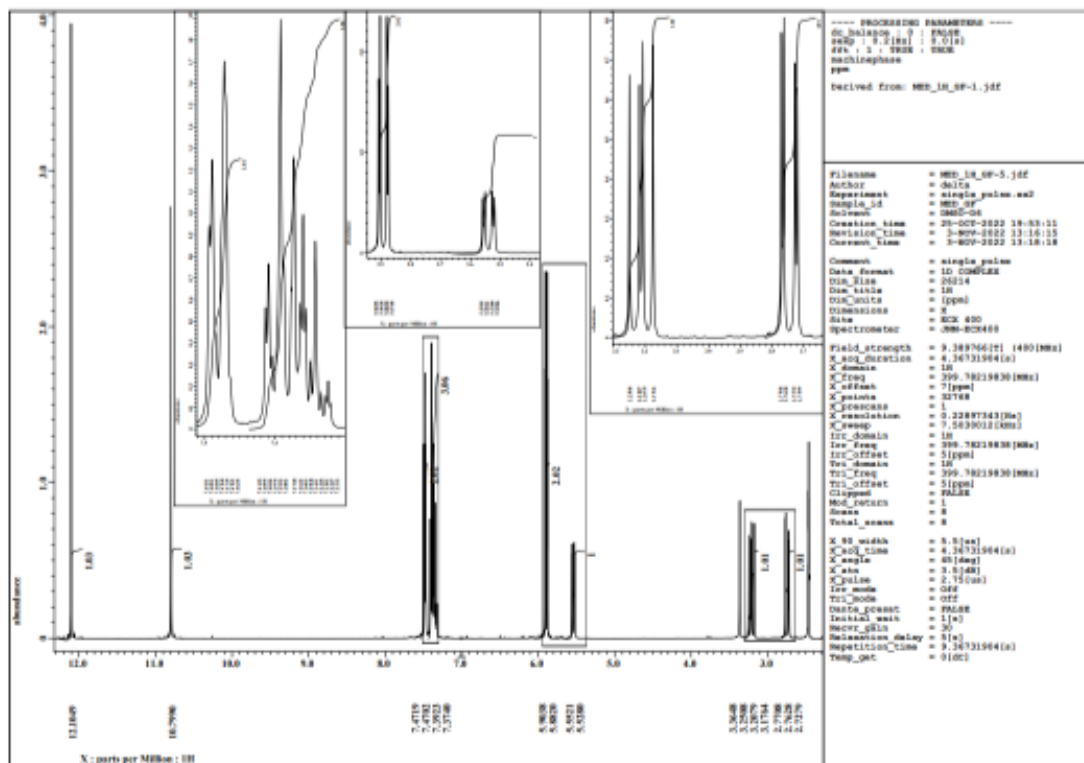


Рисунок 1 – ^1H -ЯМР спектр пиноцембрина (1) в $\text{DMSO}-d_6$

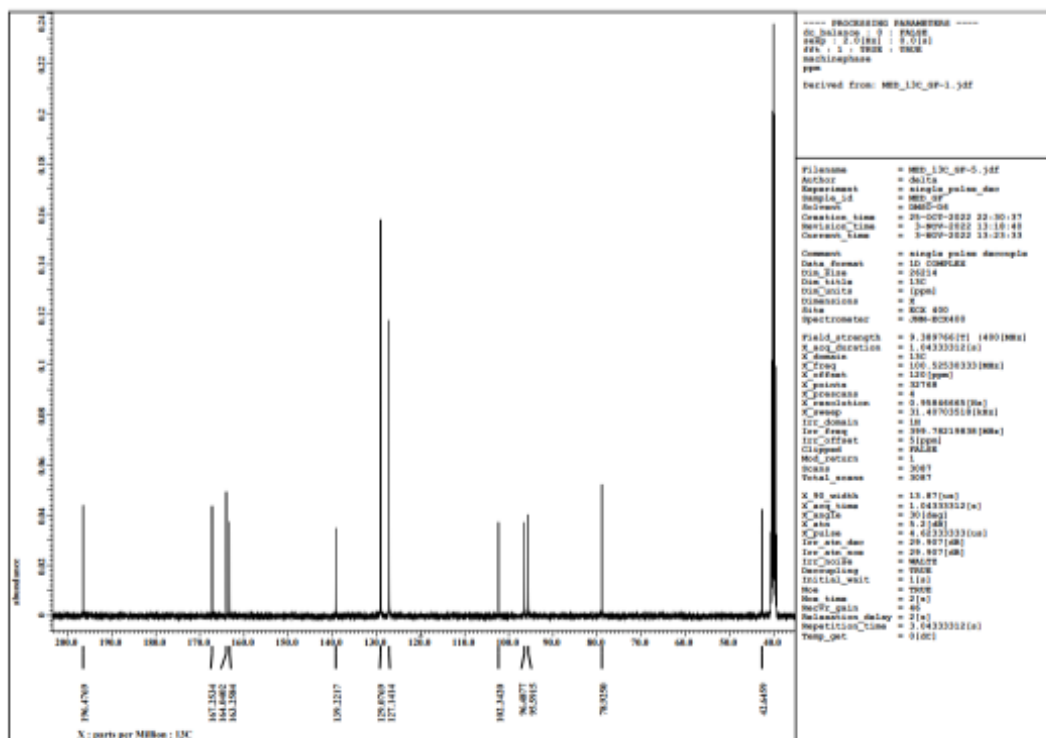


Рисунок 2 – ^{13}C -ЯМР спектр пиноцембрина (1) в $\text{DMSO}-d_6$

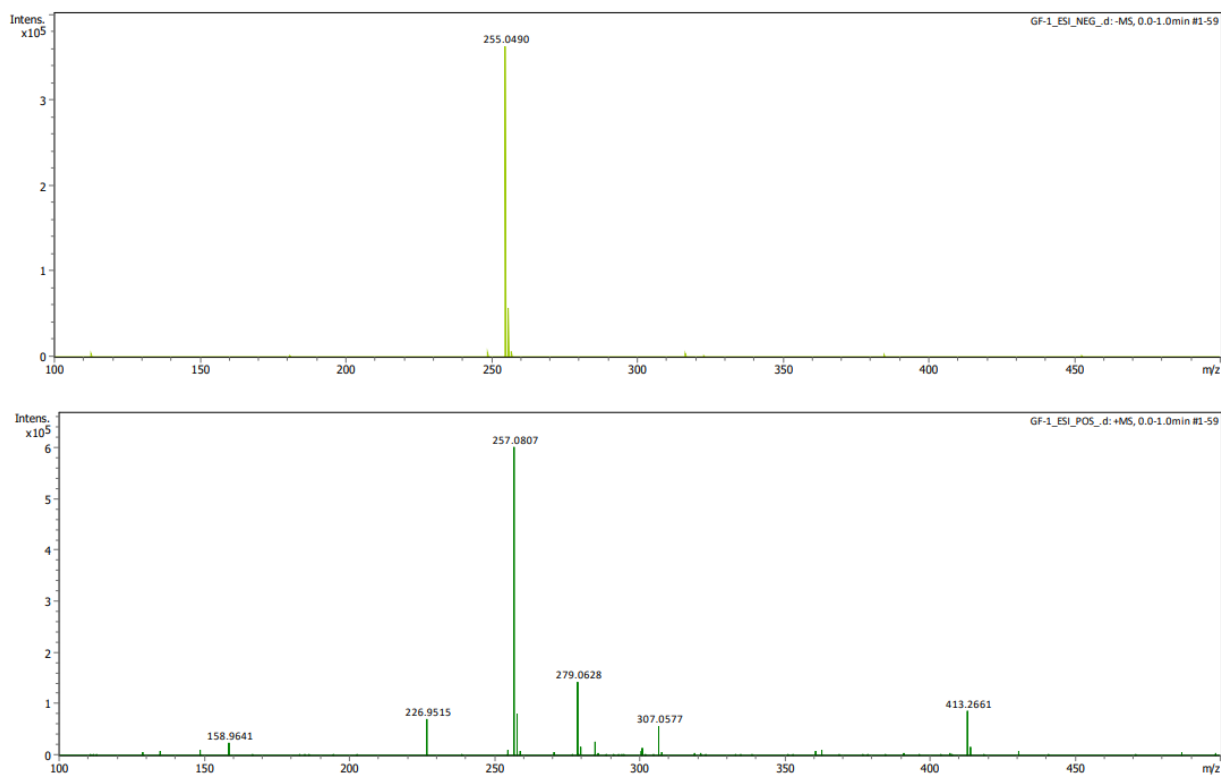


Рисунок 3 – Масс-спектр пиноцембрина (1)

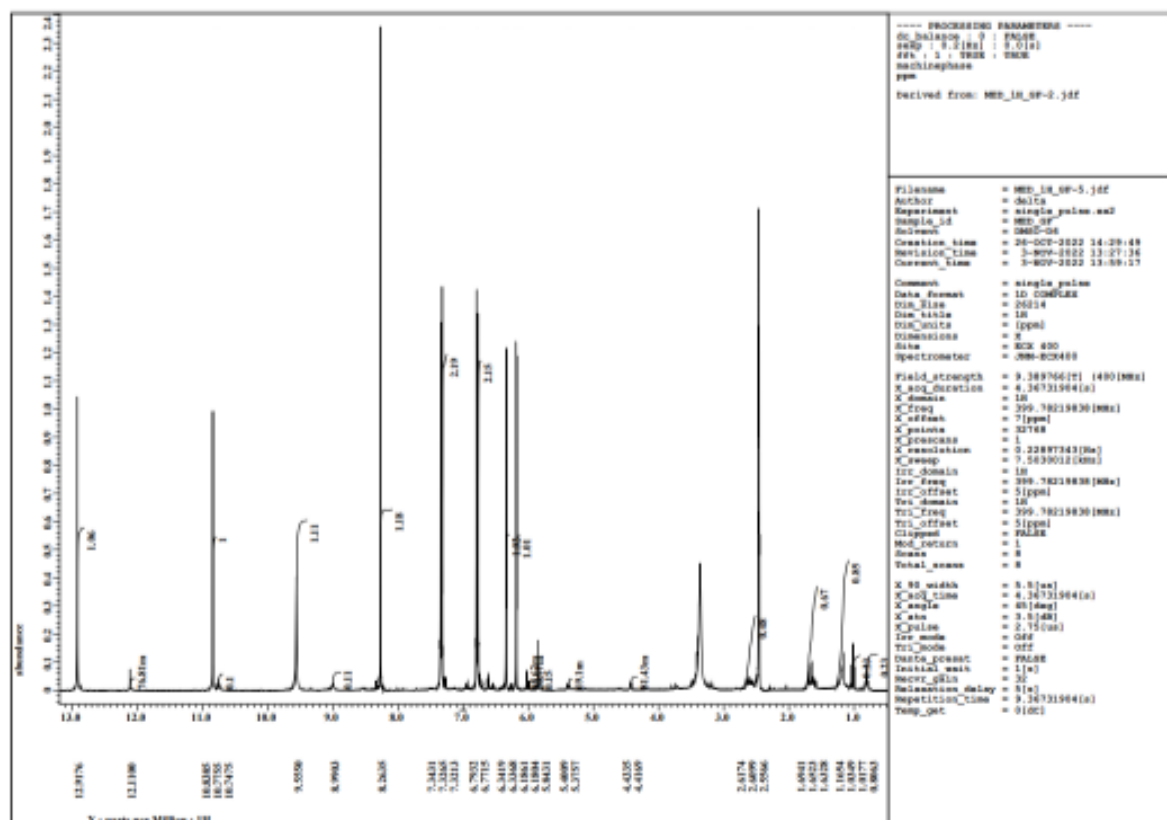


Рисунок 4 – ^1H -ЯМР спектр генистеина (**2**) в DMSO-d_6

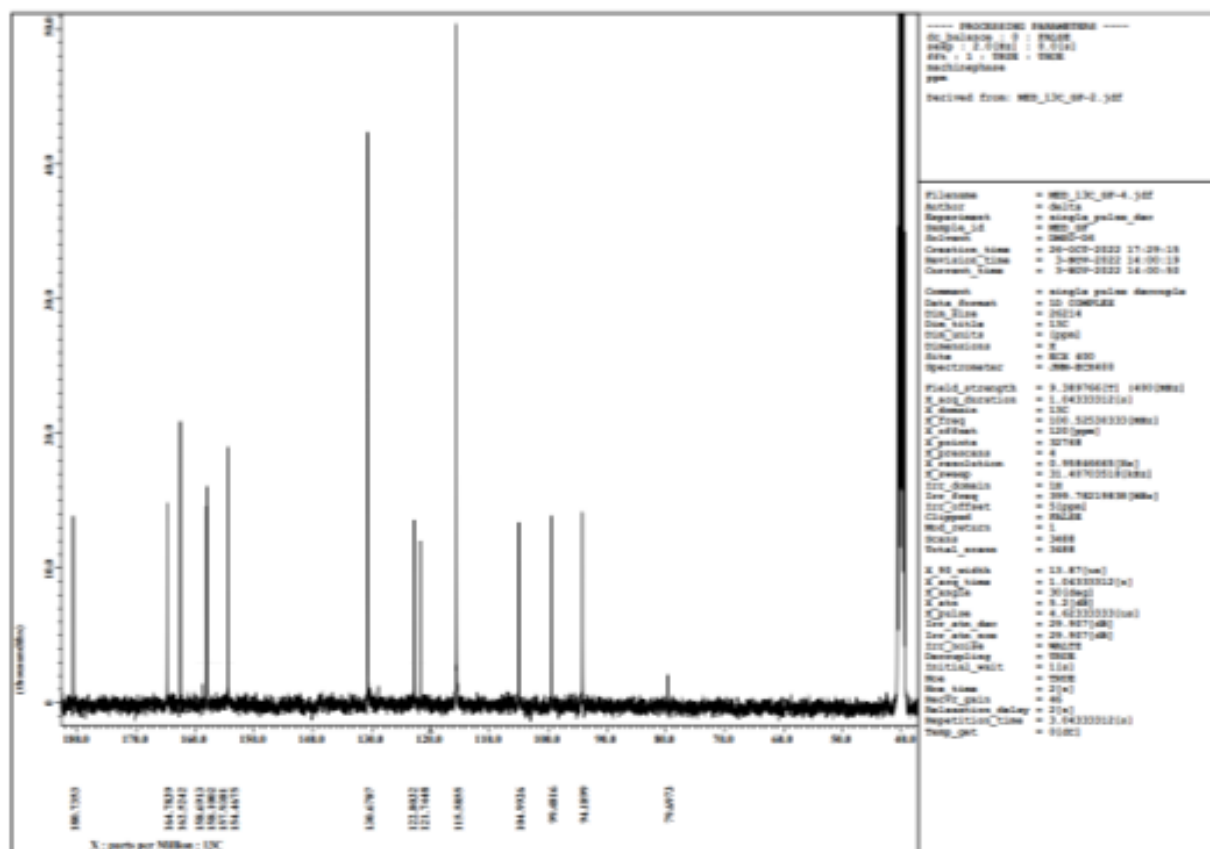


Рисунок 5 – ^{13}C -ЯМР спектр генистеина (**2**) в DMSO-d_6

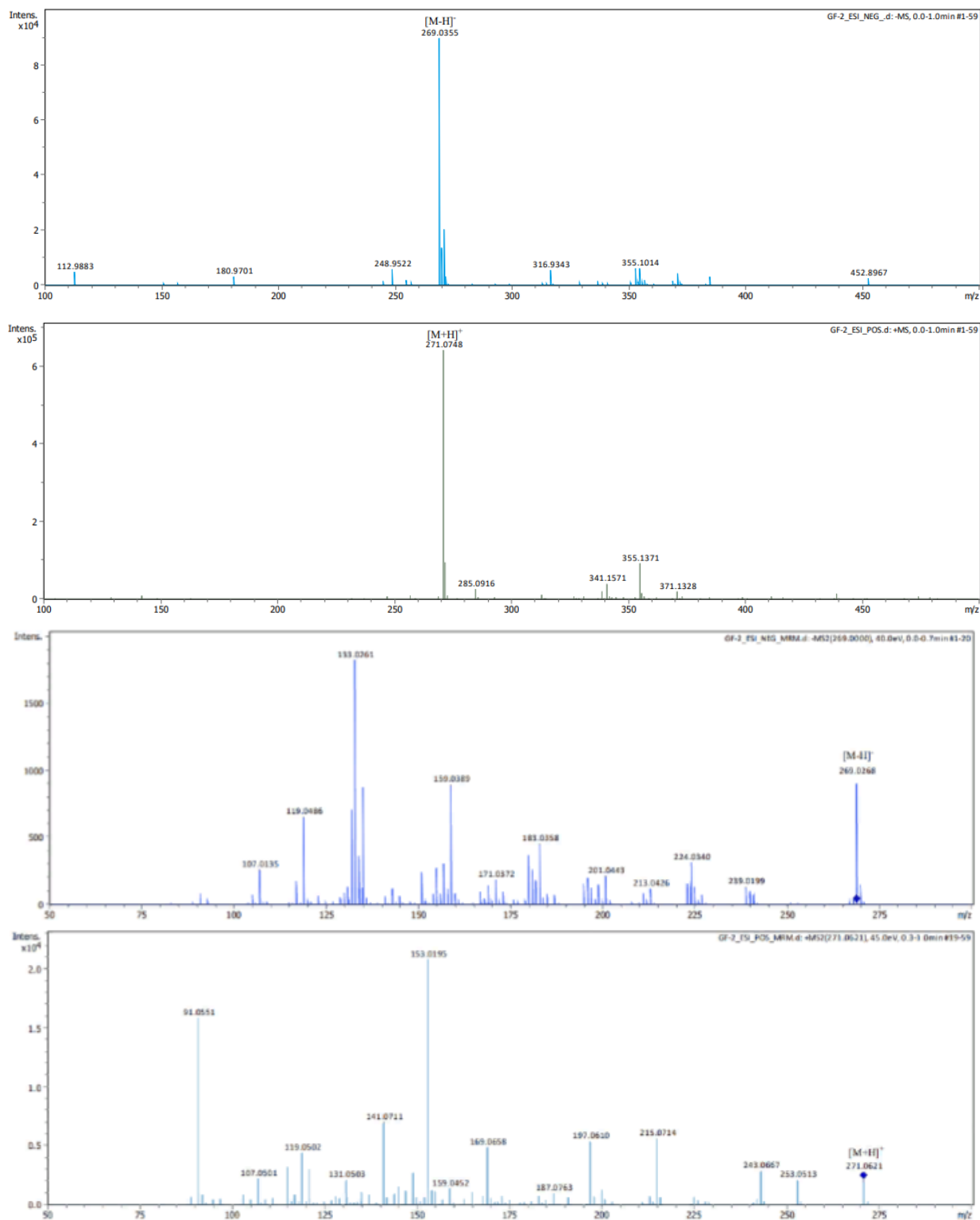
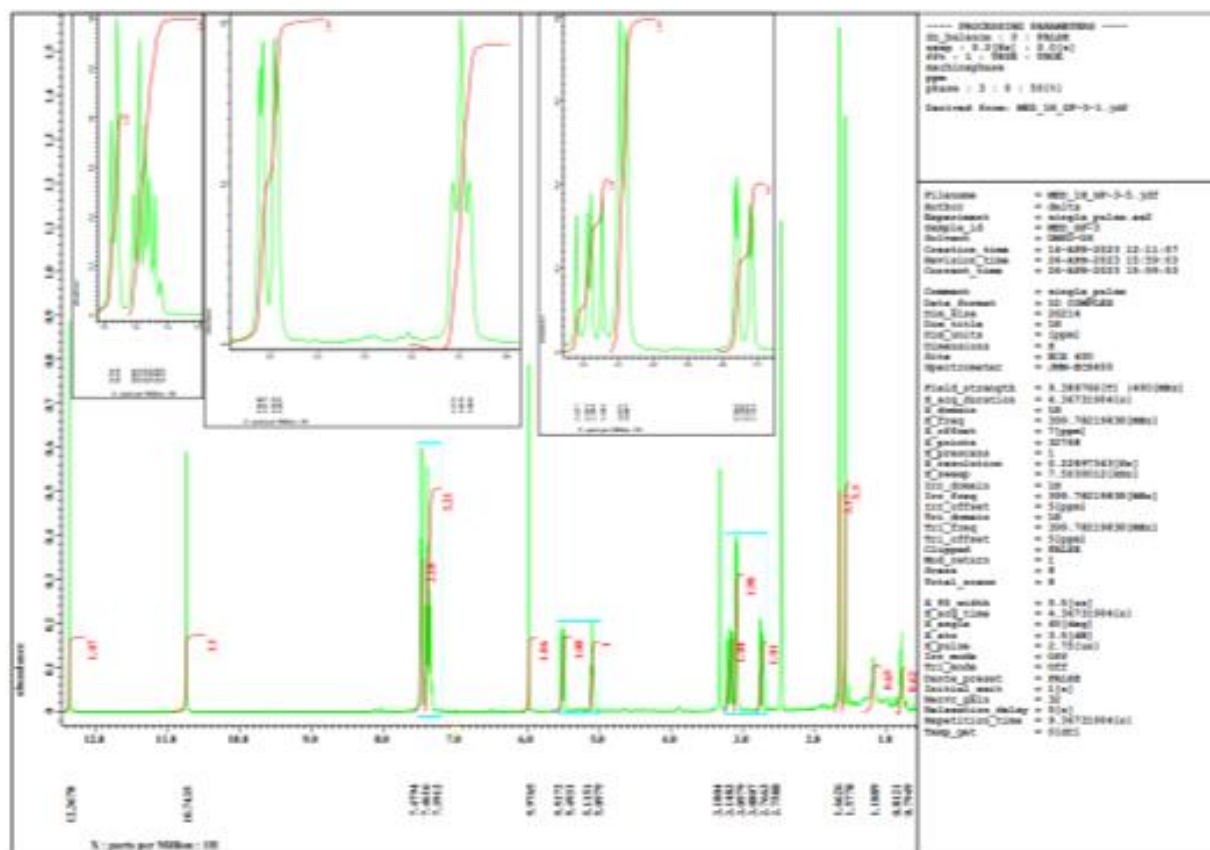
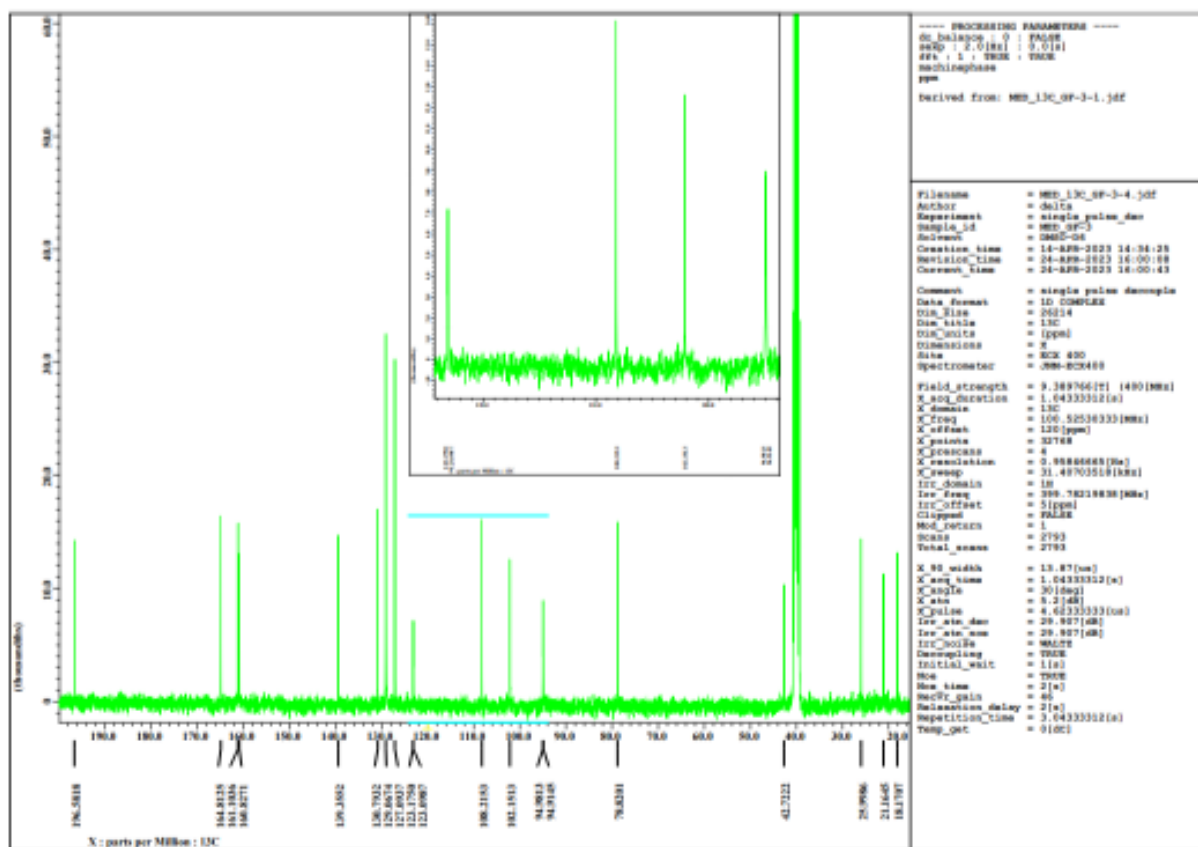


Рисунок 6 – Масс-спектр генистеина (2)

Рисунок 7 – ^1H -ЯМР спектр изоглабранина (3) в DMSO-d_6 Рисунок 8 – ^{13}C -ЯМР спектр изоглабранина (3) в DMSO-d_6

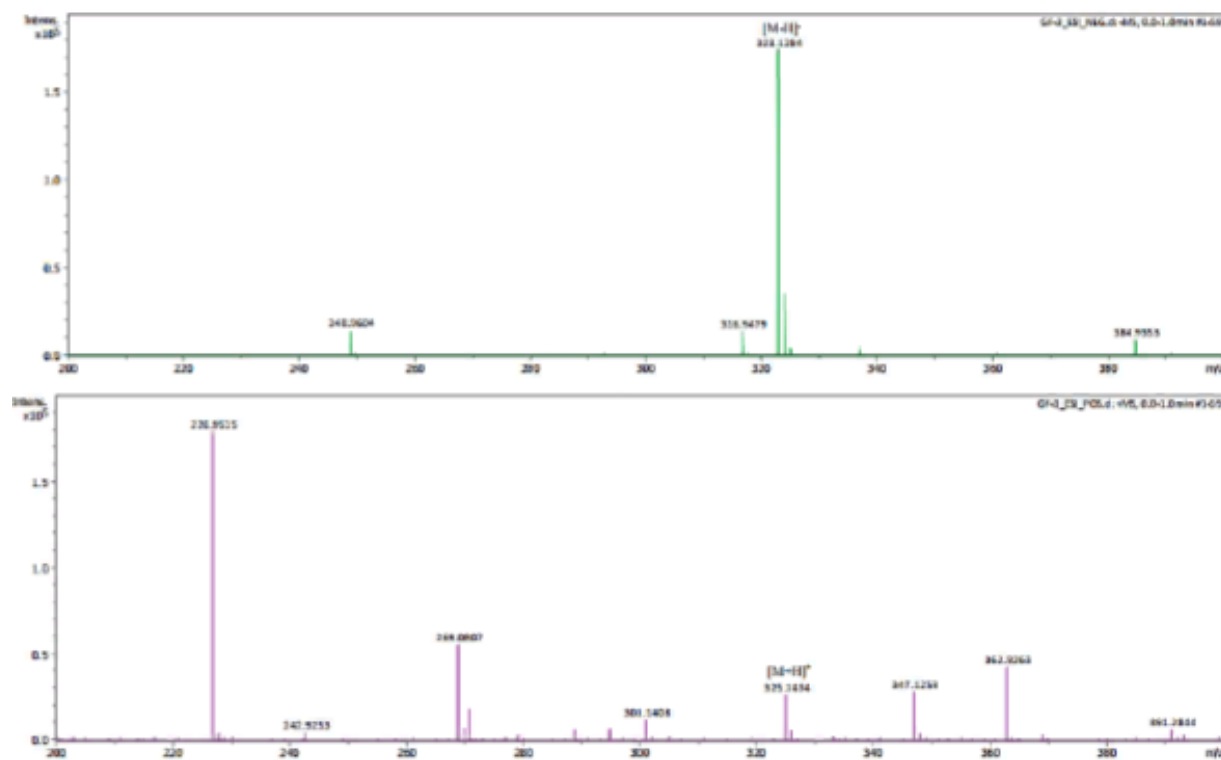


Рисунок 9 – Масс-спектр изоглабранина (3)

Приложение 3. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве солодке голой»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2806047

**СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ СОЛОДКИ
ГОЛОЙ**

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

Авторы: *Белова Ольга Александровна (RU), Куркин Владимир Александрович (RU), Егоров Максим Валерьевич (RU)*

Заявка № **2022131284**

Приоритет изобретения **30 ноября 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **25 октября 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **30 ноября 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат: 429b6a0fe3653164ba96f83b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.05.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов



Приложение 4. Акты внедрения результатов исследовательской работы

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор
И.Л. Давыдкин
« 25 » декабря 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Беловой Ольги Александровны «Фармакогностическое исследование корней и
травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza
uralensis* Fish.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук
по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия
(фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации –
базовая кафедра «Аптеки Плюс» ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации – базовая кафедра «Аптеки Плюс»: зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Петрухиной И.К., профессора кафедры, д.фарм.н., доцента Гладуновой Е.П., доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Абдулмановой Е.Л., подтверждает использование материалов исследования Беловой О.А., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами Института фармации, а также в научно-исследовательской работе.

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности создания конкурентоспособных лекарственных препаратов, обладающих противомикробным действием, в том числе импортозамещающих препаратов.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления и экономики фармации
– базовая кафедра «Аптеки Плюс»
д. фарм. н.

 И.К. Петрухина

Профессор кафедры управления и экономики фармации
– базовая кафедра «Аптеки Плюс»
д. фарм. н.

 Е.П. Гладунова

Доцент кафедре управления и экономики фармации
– базовая кафедра «Аптеки Плюс»
к. фарм. н.

 Е.Л. Абдулманова

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И. Л. Давыдкин
«_____» _____ 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы

Беловой Ольги Александровны «Фармакогностическое исследование корней и травы
солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.)»
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2.

Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре
фармацевтической технологии с курсом биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий: зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Куркиной А.В., профессора кафедры, д.фарм.н., профессора Первушкина С.В., доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Климовой Л.Д., подтверждает использование материалов научно-исследовательской работы Беловой О.А., посвященной изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе сырья солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.), 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 данного растения.

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

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д. фарм. н., доцент



А.В. Куркина

Профессор кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д. фарм. н., профессор



С.В. Первушкин

Доцент кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
к. фарм. н., доцент



Л.Д. Климова

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин

2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Беловой Ольги Александровны «Фармакогностическое исследование корней и
травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza
uralensis* Fish.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по
специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические
науки) на кафедре химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии Института фармации:
зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Воронина А.В., доцента кафедры, к.хим.н.,
доцента Шариповой С.Х., доцента кафедры, к.биол.н., доцента Расцветовой Н.В.
подтверждает использование материалов диссертационного исследования Беловой
О.А., посвященного изучению химического состава, определению диагностических
признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного
растительного сырья солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) в учебном процессе при
проведении практических занятий со студентами, а также в научно-
исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья,
содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности
стандартизации лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного
сырья солодки голой.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии Института фармации,
д. фарм. н., доцент

Доцент кафедры химии Института фармации,
к. хим. н., доцент

Доцент кафедры химии Института фармации,
к. биол. н., доцент

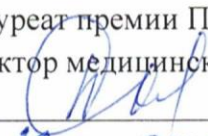
А.В. Воронин

С.Х. Шарипова

Н.В. Расцветова

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

 И.Л. Давыдкин
« 26 » декабря 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Беловой Ольги Александровны «Фармакогностическое исследование корней и
травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza
uralensis* Fish.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук
по специальности 3.4.2. 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 Куркина В.А.,
профессора кафедры, д.фарм.н., доцента Правдивцевой О.Е., доцента кафедры,
к.фарм.н., доцента Рыжова В.М. подтверждает использование материалов
диссертационного исследования Беловой О.А., посвященного изучению вопросов
фитохимической и морфолого-анатомической диагностики, обоснованию подходов
к стандартизации лекарственного сырья и препаратов на основе корней и травы
солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis*
Fish.) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и
ординаторами, а также в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты
способствуют повышению объективности стандартизации лекарственного
растительного сырья.

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., доцент

 О.Е. Правдивцева

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

 В.М. Рыжов

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин

« 16 » декабря 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационного работы
Беловой Ольги Александровны «Фармакогностическое исследование корней и
травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza
uralensis* Fish.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по
специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические
науки) в научно-образовательном центре «Фармация» ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников научно-образовательного центра «Фармация»
(НОЦ «Фармация»): директора, д.фарм.н. Рязановой Т.К., главного специалиста,
к.фарм.н. Жданова Д.А., главного специалиста Соколовой И.В. подтверждает
использование материалов диссертационного исследования Беловой Ольги
Александровны, посвященного определению диагностических признаков, изучению
химического состава с использованием современных инструментальных методов
анализа и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного
сырья солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza
uralensis* Fish.), в научно-исследовательской работе по изучению лекарственного
растительного сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности
стандартизации лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного
сырья солодки и солодки уральской.

Члены комиссии:

Директор НОЦ «Фармация»,
д. фарм. н.

Главный специалист НОЦ «Фармация»,
к. фарм. н.

Главный специалист НОЦ «Фармация»

Т.К. Рязанова

Д.А. Жданов

И.В. Соколова


«Утверждаю»
 Генеральный директор
 ЗАО «Самаралектравы»
 _____ Н.Д. ЛУЖНОВ
 «15» августа 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Беловой Ольги Александровны «Фармакогностическое исследование корней и травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. 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 О.А. Беловой, посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа сырья солодки голой и солодки уральской, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья – «Солодки голой трава», «Солодки уральской трава» в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа сырья солодки голой и солодки уральской апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе солодки голой и солодки уральской.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»  А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»  А.В. НИКИТЕНКОВ



«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ

«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

«11» сентября 2023 г.**АКТ**

о внедрении результатов диссертационной работы Беловой Ольги Александровны «Фармакогностическое исследование корней и травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. 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 Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Черняевой Н.А., провизора-аналитика Шарымовой О.А., подтверждает использование материалов диссертационного исследования Беловой О.А., посвященного фармакогностическому исследованию травы и корней солодки голой и солодки уральской при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы Центра. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ, ВЭЖХ и УФ-спектроскопии в присутствии стандартных образцов биологически активных соединений. Методики определения подлинности сырья и препаратов и количественного определения индивидуальных биологически активных соединений и суммы действующих компонентов воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Беловой О.А. будет способствовать повышению объективности стандартизации растительного сырья травы солодки голой и корней солодки, а также лекарственных растительных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

Заместитель начальника ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»,
кандидат фармацевтических наук

Л.Е. ЖНЯКИНА

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

Н.А. ЧЕРНЯЕВА

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

О.А. ШАРЫМОВА

**Приложение 5. Проект фармакопейной статьи на новый вид
лекарственного растительного сырья «Солодки голой трава»**

**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

Солодки голой
травы

ФС.2.5.
Вводится впервые

Glycyrrhizae glabrae herba

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

Собранная в фазу плодоношения высушенная трава культивируемого многолетнего травянистого растения солодки голой – *Glycyrrhiza glabra* L., сем. Бобовые – *Fabaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье изучается невооруженным глазом, с помощью лупы (x10) или под микроскопом (8х, 16х, 20х, 40х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье. Цельные или частично измельченные облиственный стебли 50-70 см. Стебли голые или негусто короткоопушенные. Листья непарно-перистосложные, форма листочков ланцетовидная. Листочки с верхней и нижней поверхности усажены точечными железками, клейкими от обильных выделений; центральная жилка с нижней стороны листочка густо опушена; поверхность черешка густоопушенная и скудно-железистая. Плод прямой слегка извилистый; поверхность голая без опушения.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, а также плодов, проходящие сквозь сито с отверстиями 2 мм.

Цвет от темно- и светло-зеленого до желто-зеленого цвета. Запах травянистый. Вкус водно-спиртового извлечения пряно-травянистый.

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

Анатомически листья дорзовентрального типа строения. Столбчатый мезофилл представлен мелкими клетками овальной формы с темно-зеленым протопластом. Клетки столбчатого мезофилла плотно расположены в один или два ряда непосредственно под верхним эпидермисом листовой пластинки.

Одной из значимых особенностей надземной части солодки голой является наличие во всех органах клеток с бурым пигментом. В частности, в листовой пластинке такие пигментированные клетки присутствуют в столбчатом мезофиле, выделяясь в ткани не только пигментацией, но и значительно большим размером относительно клеток основного мезофилла. Кроме того, пигментированные клетки встречаются и в тканях центральной жилки, как во

флоэмной, так и ксилемной ее части.

Эпидермис листовой пластинки, при рассмотрении на поперечном сечении, сложен из тонкостенных клеток округлой или слабо овальной формы. Клеточные стенки целлюлозные. С поверхности покрыты слабым кутикулярным слоем.

При рассмотрении с поверхности эпидермальные клетки верхней стороны листовой пластинки слабо извилистые. Лист амфистоматический, вследствие чего на верхней стороне листовой пластинки встречаются устьичные аппараты. Частота встречаемости с верхней стороны не высока и составляет порядка 5-9 устьичных аппаратов на 1 мм². Устьичные аппараты анамоцитного типа. Околоустьичных клеток как правило от четырёх до пяти.

На просвет эпидермиса видны пигментированные клетки столбчатого мезофилла, часто собранные в малые группы по две или три клетки.

На поверхности верхнего эпидермиса локализованы железистые трихомы, представленные желёзками с крупной многоклеточной головкой. Головка железистой трихомы имеет овальное очертание и насчитывает до 10-ти клеток. У клеток головки заметно утолщена клеточная стенка. Их протопласты имеют зернистое строение и слабо желтую пигментацию.

Базальная часть рахиса значительно крупнее остальной его части. Она имеет почти округлую форму с усечением по бортам. Строение проводящей системы в базальной части пучкового строения. Пучки при этом отличаются по размеру, что является следствием слияния мелких коллатеральных пучков в более крупные. Выше от базальной части поперечные сечения рахиса имеют значительно меньшие размеры. Форма поперечного сечения рахиса в медиальной части ромбовидная с V-образной выемкой с адаксиальной стороны.

Вся поверхность растения покрыта двумя типами трихом. Первый тип трихом – желёзки, обильно покрывающие листовую пластинку и стебель. Они имеют крупную желто-коричневую головку, видимую на поверхности при помощи лупы x10. Головка мелкоклеточная с липофильным содержимым в

ФС _____ с. 4

протопластах клеток, что заметно по розовому окрашиванию при обработке раствором Судана III.

Второй тип – кроющие бичевидные волоски, имеющие многоклеточное основание, сложенное из мелких клеток с заметно утолщенной лигнифицированной клеточной стенкой и длинной конечной клеткой с целлюлозной клеточной оболочкой

Основной особенностью строения створок бобов солодки голой на поперечном сечении является наличие пигментированных клеток с бурым протопластом по периферии эпидермиса в гиподермальном слое. По периферии эндокарпия пигментированные клетки имеют больший размер. Пигментные клетки также локализованы во флоэмной части проводящих пучков.

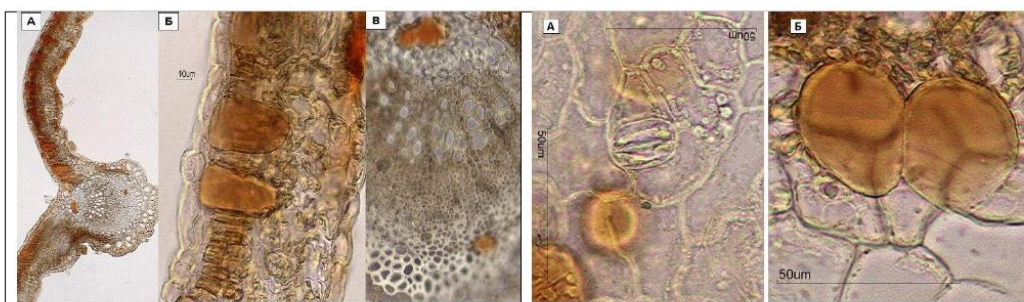


Рисунок 1 – Анатомические особенности листа: А – поперечный срез листа (x40); Б – столбчатый мезофилл (x400); В – центральная жилка (x400).

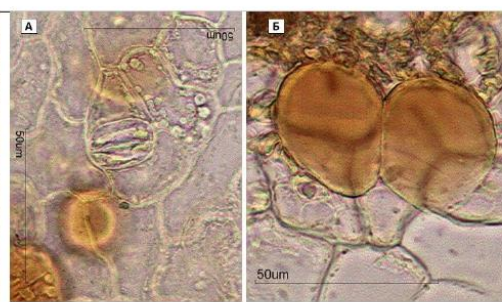
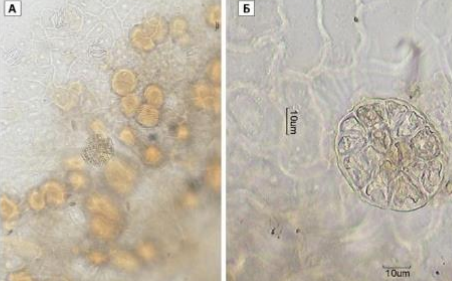
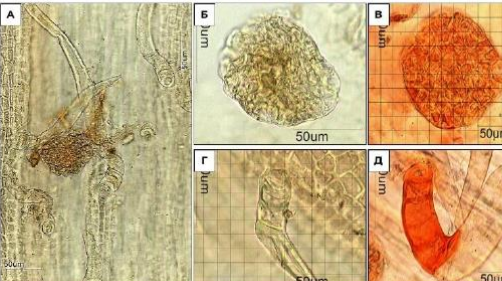


Рисунок 2 – Эпидермис листа: А – устьичный аппарат (x400); Б – пигментированная клетка (x400).

	
Рисунок 3 – Железистые трихомы верхнего эпидермиса: А – Общий вид верхней эпидермы с желёзкой (x100); Б – Фокус на головку желёзки (x400).	Рисунок 4 – Особенности строения эпидермиса стебля солодки голой: А – эпидермис верхней стороны (x400); Б – многоклеточная железка (x400); В – окраска многоклеточной железки раствором Судана III (x400); Г – бичевидный волосок (x400); Д – окраска бичевидного волоска раствором Судана III (x400).
	
Рисунок 5– Поперечное сечение стручка <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.: А – плодоножка (x20); Б – боб (x20).	Рисунок 6 – Топография поперечных сечений рахиса листа солодки голой: А – фрагмент гербарного листа с рахисом; Б – поперечные сечения рахиса: 1 – черешочек листочка; 2, 3, 4 – промежуточные сегменты рахиса ; 5 – базальная часть рахиса.

Определение основных групп биологически активных веществ:**1. Качественные реакции**

К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют 2 мл 3 % раствора алюминия (III) хлорида спиртового, через 20-30 минут появляется желтое окрашивание.

2. Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) пиноцембрина. Около 0,005 г СО пиноцембрина растворяют в 10 мл спирта 95% и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор СО пиностробина. Около 0,005 г СО пиностробина растворяют в 10 мл спирта 95% и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» заранее активируют в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 60 минут.

На линию старта аналитической хроматографической пластики со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора травы солодки голой и параллельно 20 мкл раствора СО пиноцембрина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 минут, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 60 минут смесью растворителей хлороформ – этиловый спирт (4:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80-90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителя, обрабатывают 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, сушат в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 3-5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции со светло-голубой флуоресценцией на уровне

ФС _____ с. 7

адсорбции СО пиноцембрина со значением R_f около 0,74, зона адсорбции с светло-голубой флуоресценцией со значением R_f около 0,75 (пиностробина).

2. УФ-спектроскопия

Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет максимум для дифференциальной кривой поглощения при длине волны 310 ± 2 нм (рис. 2, 3).

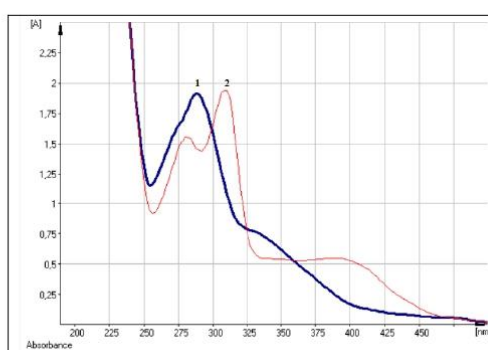


Рис. 1. Кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы солодки голой: 1 – исходный раствор; 2 – в присутствии $AlCl_3$

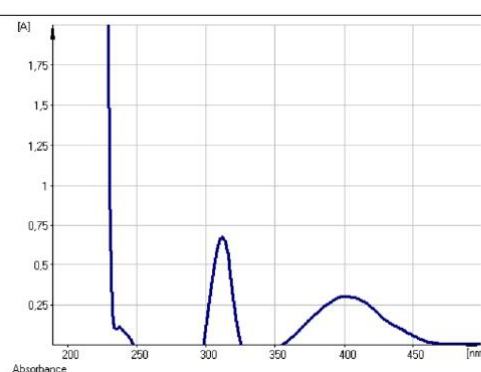


Рис. 2. Дифференциальная кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы солодки голой

ИСПЫТАНИЯ

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

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 13 %.

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

Измельченность сырья. Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, - не более 5%. Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито размером 7 мм - не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстием размером 0,5 мм, - не более 5%.

Посторонние примеси.

ФС _____ с. 8

Стеблей. Цельное, измельченное сырье – не более 60%.

Сырьё, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее). Цельное сырье – не более 3 %.

Органическая примесь. Цельное, измельчённое сырье – не более 3 %.

Минеральная примесь. Цельное, измельчённое сырье – не более 1,5 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. Цельное сырье, измельченное сырье: суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин - не менее 3%; содержание пиноцембрина не менее 1,5%.

Метод 1. Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на пиноцембрин методом дифференциальной спектрофотометрии

Приготовление раствора алюминия хлорида спиртового 3 %. 3 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же спиртом до метки. Срок годности раствора 3 мес.

Приготовление раствора СО пиностробина. Около 0,02 г (точная навеска) пиностробина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 96% при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого

ФС _____ с. 9

колбы до комнатной температуры доводят объем раствора спирта 96% до метки (раствор А СО пиностробина). 2 мл раствора А пиностробина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом 96 % (раствор Б СО пиностробина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 90 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных 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 ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр «красная полоса» (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом 96 % (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 минут после приготовления на спектрофотометре при длине волны 310 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 1 мл раствора А испытуемого раствора, доведенный спиртом 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО пиностробина в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 96.

Содержание суммы флавоноидов (X в процентах) в пересчете на пиноцембрин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

ФС _____ с.10

$$x = \frac{D * m_0 * 50 * 50 * 1,05 * 100}{D_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора СО пиностробина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО пиностробина, г;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

1,05 – коэффициент пересчета

В случае отсутствия стандартного образца пиноцембрина целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 310 нм – 680.

$$x = \frac{D * 50 * 50 * 100}{m * 680 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

680 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО пиноцембрина при 310 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метод 2. Количественное определение пиноцембрина методом ВЭЖХ

Раствор пиноцембрина-стандартного образца. Около 0,005 г (точная навеска предварительно высушенного – содержание основного вещества $\geq 98\%$) переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 96% этиловом спирте и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

На хроматограммах раствора СО число теоретических тарелок должно быть не менее 5000 для пиков пиноцембрина.

ФС _____ с. 11

На хроматограммах раствора СО разрешение между пиками пиноцембрина должно быть не менее 1,5.

На хроматограммах раствора СО фактор асимметрии для пиков пиноцембрина должен быть не более 1,5.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 90% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («Красная лента»). Перед хроматографическим анализом дополнительно фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

Хроматографические условия

<i>Колонка</i>	Стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм х 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм)		
<i>ПФ</i>	Ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ) Профиль градиента		
	Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
	0-5	30	70
	5-15	50	50
	15-20	60	40
	20-25	80	20
<i>Способ элюирования</i>	Градиентный		
<i>Скорость потока, мкл/мин</i>	100		
<i>Температура</i>	+23 $\pm$ 2		
<i>Детектор</i>	Многоволновый спектрофотометрический УФ 290 нм (определение пиноцембрина)		
<i>Объем вводимой пробы, мкл</i>	2		
<i>Время хроматографирования, мин</i>	25		

ФС _____ с. 12

Проводят УФ-детектирование при длине волны 290 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 2 мкл раствора пиноцембрина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Определяют время удерживания и идентифицируют пик пиноцембрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика пиноцембрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание пиноцембрина в траве солодки голой в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

Где S – среднее значение площади пика пиноцембрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца;

S_0 – среднее значение площади пика раствора СО пиноцембрина, вычисленное из хроматограмм раствора СО пиноцембрина;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_0 – объем раствора СО пиноцембрина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора СО пиноцембрина, мкл;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО пиноцембрина г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

ФС _____ с. 13

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

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, лауреат премии Правительства РФ, доктор медицинских наук, профессор



И.Л. Давыдкин
2023

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

 В.А. Куркин
«27» 12 2023

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

 О.А. Белова
«24» 12 2023

Приложение 6. Проект фармакопейной статьи на стандартный образец пиноцембрин

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

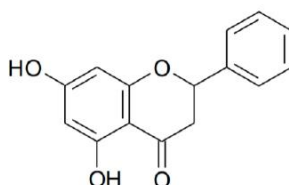
Пиноцембрин – стандартный образец

ФС 42-

Вводится впервые

5,7 - дигидроксифлаванон

Настоящая фармакопейная статья распространяется на стандартный образец (СО) пиноцембрин, применяемый при анализе растительного сырья и препаратов солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).



$C_{15}H_{12}O_4$

М.м. 256,25

Содержит не менее 95,0 % $C_{15}H_{12}O_4$ в пересчете на сухое вещество.

Описание. Белый кристаллический порошок.

Растворимость. Растворим в спирте 95 % и хлороформе, нерастворим в воде.

Подлинность.

Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,0008 % раствора в 95 % этаноле в области от 190 до 500 нм должен иметь максимум при 290 ± 2 нм.

К 0,1 мл 0,0008 % спиртового раствора добавляют 0,5 мл щелочной раствор диазобензолсульфокислоты; появляется оранжевое окрашивание.

ЯМР-спектр. 1H -ЯМР Спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.10 (1H, с, 5-OH), 10.79 (1H, с, 7-OH), 7.37-7.47 (5H-Ar, м), 5.90 (1H, д, J = 2.5, H-8),

5.88(1Н, д, J = 2.5, Н-6), 5.53 (дд, J = 4.0 и 12.0, Н-2ах), 3.23 (1Н, дд, J = 12.0 и 17.0, Н-3ах), 2.75 (1Н, дд, J = 4 и 17 Гц, Н-3-еа).

Температура плавления. От 193 до 195 °С (в пределах 3 °С, ОФС «Температура плавления»).

Посторонние примеси. *Испытуемый раствор.* 0,1 г образца помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл 95 % этанола и доводят объем раствора ацетонитрилом до метки.

Раствор сравнения. 0,025 г образца помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл 95 % этанола и доводят объем раствора подвижной фазой до метки.

Раствор для проверки пригодности системы: раствор сравнения.

Используют свежеприготовленные растворы.

Хроматографические условия

Колонка	- 80 × 2 мм с октадецилсилил силикагелем (C ₁₈), 7 мкм;
ПФ	- ацетонитрил – ледяная уксусная кислота 1% (50:50);
Скорость потока	- 100 мкл/мин;
Детектор	- спектрофотометрический, 290 нм.
Объем пробы	- 2 мкл.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Разрешение между пиками пиноцембрина и ближайшей примеси должно быть не менее 1,1.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора должно не менее чем в 4 раза превышать время удерживания пика пиноцембрина.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика любой примеси должна быть не более площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1 %); суммарная площадь пиков примесей должна быть не более двух с половиной кратной площади пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,25 %).

На хроматограмме испытуемого раствора площадь основного пика должна быть не менее 95 %.

Хранение. В защищенном от света месте.

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России, лауреат премии Правительства
РФ, доктор медицинских наук, профессор



И.Д. Давыдкин

2023

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

 В.А. Куркин

«27» 12 2023

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

 О.А. Белова

«27» 12 2023