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

На правах рукописи

ЛАТЫПОВА ГУЗЕЛЬ МИНУЛЛОВНА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ РОДА *PRIMULA* L. И РОДА *HUMULUS* L.

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
доктор фарм. наук, профессор
Бубенчикова В.Н.

Уфа – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. 6
ГЛАВА 1 Растения рода первоцвет и хмель обыкновенный – перспективные источники получения профилактических и лечебных средств 18
1.1. Ботанико-морфологическая, химическая, фармакологическая характеристика представителей рода первоцвет. 18
1.1.1 Ботаническая характеристика представителей рода первоцвет. . . 18
1.1.2 Химический состав представителей рода первоцвет. 24
1.1.3 Фармакологическая активность, применение представителей рода первоцвет в научной и народной медицине. 33
1.2 Ботанико-морфологическая, химическая, фармакологическая характеристика хмеля обыкновенного. 41
1.2.1 Ботаническая характеристика хмеля обыкновенного. 41
1.2.2 Химический состав хмеля обыкновенного. 45
1.2.3 Фармакологическая активность, применение хмеля обыкновенного в научной и народной медицине. 50
ГЛАВА 2 Объекты и методы исследования. 63
2.1 Характеристика объектов исследования 63
2.2 Методы исследований. 64
2.2.1 Морфолого-анатомический анализ. 64
2.2.2 Фитохимический анализ. 64
2.2.3 Методы исследования фенольных соединений 70
2.2.4 Методы изучения тритерпеновых сапонинов. 76
2.2.5 Методы изучения производных ацилфлороглюцидов. 78
2.2.6 Выделение и идентификация основных групп биологически активных веществ. 81
2.2.7 Методы стандартизации сырья. 84

2.2.8 Методы токсико-фармакологических исследований. 85
2.3 Статистическая обработка данных. 94
ГЛАВА 3 Исследование химического состава, выделение, идентификация биологически активных веществ представителей рода первоцвет и рода хмеля. 95
3.1 Исследование фенольных соединений растений рода первоцвет и рода хмель. 96
3.2 Выделение основных групп биологически активных веществ. . . . 103
3.3 Идентификация выделенных веществ. 114
3.4 Сравнительное изучение состава основных групп биологически активных веществ растений рода первоцвет. 154
3.5 Сравнительное изучение содержания основных групп биологически активных веществ дикорастущего вида и культивируемых сортов хмеля обыкновенного. 166
Выводы по главе 3. 196
ГЛАВА 4 Ресурсно-биологические исследования растений рода первоцвет и рода хмель. 200
4.1 Сравнительное морфолого-анатомическое изучение первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного. 201
4.2 Ресурсные исследования первоцвета крупночашечного в Республике Башкортостан. 217
4.3 Морфолого-анатомическое изучение листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида. 219
Выводы по главе 4. 240
ГЛАВА 5 Стандартизация и разработка нормативной документации на сырье первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного. 242
5.1 Стандартизация и разработка нормативной документации на сырье «Первоцвета весеннего трава» 242
5.1.1 Разработка методик качественного и количественного определения суммы флавоноидов в траве первоцвета весеннего. 243

5.1.2 Разработка методики качественного и количественного определения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего. 252
5.1.3 Установление числовых показателей качества и сроков годности травы первоцвета весеннего. 259
5.2. Стандартизация и разработка нормативной документации на сырье «Хмеля обыкновенного листья» 263
5.2.1 Разработка методик качественного и количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного. 264
5.2.2 Разработка методик качественного и количественного определения производных ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного 271
5.2.3 Установление числовых показателей качества и сроков годности листьев хмеля обыкновенного. 274
Выводы по главе 5. 277
ГЛАВА 6 Экспериментальное обоснование рационального использования сырья первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного. 280
6.1 Разработка технологии и стандартизация лекарственных форм густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 281
6.1.1 Разработка технологии густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного. 281
6.1.2 Стандартизация густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 290
6.2 Разработка технологии получения и стандартизация лекарственной формы гранул на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 293
6.2.1 Разработка технологии получения гранул на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного 293
6.2.2 Стандартизация гранул на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 296

6.3 Исследование фармакологических свойств экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 299
6.3.1 Исследование острой токсичности густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 300
6.3.2 Изучение антигипоксантного действия густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 301
6.3.3 Изучение антиоксидантных свойств густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. 303
6.3.4 Изучение влияния на проницаемость капилляров густого экстракта из травы первоцвета весеннего. 309
6.3.5 Изучение эндотелиопротекторной активности густого экстракта из травы первоцвета весеннего. 311
6.3.6 Изучение влияния густых экстрактов из листьев и соплодий хмеля обыкновенного на ориентировочно-исследовательское поведение крыс. 313
6.3.7 Исследование ноотропной активности густых экстрактов из листьев и соплодий хмеля обыкновенного. 315
Выводы по главе 6. 317
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. 319
ВЫВОДЫ. 323
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ. 326
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. 328
ПРИЛОЖЕНИЕ. 367

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. По данным ВОЗ, 80% населения применяют лекарственные препараты растительного происхождения (ВОЗ, Женева, 2003). Для большинства фитопрепаратов в отличие от синтетических средств характерны поливалентное воздействие на организм человека, минимальное количество побочных эффектов при рациональном применении, возможность длительного приема. В связи с ростом потребности в фитопрепаратах важное место занимает расширение ассортимента лекарственного растительного сырья (ЛРС) за счет комплексного использования растений, отходов производства ивнедрения в медицинскую практику малоизученных видов растений. С этой точки зрения значительный интерес представляют растения рода первоцвет и рода хмель, как источники гидрофильных и липофильных веществ, широко распространенные на территории РФ.

Немаловажной задачей является рациональное использование растительных ресурсов РФ. Поэтому исследование отходов фармацевтической промышленности и аграрного сектора (надземной части первоцвета весеннего, листьев культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного) как доступных источников биологически активных веществ (БАВ), возможности использования их в медицине и иных отраслях народного хозяйства представляет практический интерес и имеет социально-экономическое значение.

В частности, в РФ в качестве пищевого поливитаминного растительного сырья разрешены только листья первоцвета весеннего (ГОСТ 3166-76 «Листья первоцвета весеннего»), тогда как корневища с корнями первоцвета весеннего входят в Европейскую, Немецкую и другие фармакопеи. Согласно Европейской фармакопее официнальным сырьем являются корневища с корнями *Primula veris* L., *Primula elatior* (L.) Hill., на их основе созданы биологически активные добавки (БАД) к пище и, что особенно важно, отхаркивающие ле-

карственные препараты зарубежного производства («Бронхипрет ТП», «Синупрет», «Бронхикум эликсир» и др.), включенные в Государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения (ГРЛС). При этом надземная часть первоцвета весеннего недостаточно изучена в отношении химического состава, фармакологических свойств и используется лишь как пищевое поливитаминное сырье.

Кроме того, перспективными представляются изучение и внедрение в медицинскую практику в качестве дополнительных источников первоцвета весеннего малоизученных близкородственных видов с достаточной сырьевой базой на территории РФ.

Хмель обыкновенный в нашей стране и за рубежом нашел широкое применение в медицинской практике и пищевой промышленности. Во многих странах хмель издавна культивируется в промышленных масштабах для нужд пищевой и фармацевтической промышленности. Основное товарное производство хмеля в РФ расположено в Чувашской Республике, Республике Марий Эл, Алтайском крае, хмельники были заложены в Республике Башкортостан (РБ).

В РФ разрешены к применению «Хмеля соплодия», «Экстракт шишек хмеля», «Хмеля экстракт жидкий», «Хмеля масло». В пищевой промышленности используются хмель-сырец, молотый гранулированный, брикетированный, прессованный, лупулиновые препараты, различные хмелевые экстракты.

Всесторонняя изученность соплодий хмеля обыкновенного (Самылина И.А., Горошко О.А., 2005; Арзамасцев А.П., Алексеева М.А., Эллер К.И., 2006; Киселева Т.Л., 1993, 2010; Зузук Б.М., 2004) определяет их широкое применение в медицинской практике, пищевой и пивоваренной промышленностях. В фармацевтическом производстве используются соплодия хмеля дикорастущего вида и культивируемых сортов. Листья хмеля, имеющие большую вегетативную массу, ввиду недостаточной изученности их химического состава и фармакологических свойств используются нерационально, ограниченно – в народной медицине как седативное средство и салатное растение,

причем листья хмеля являются отходами хмелепроизводства, требующими затраты на утилизацию.

В этой связи целесообразным и перспективным направлением является детальное изучение химического состава, биологических и фармакологических свойств рассматриваемых растений рода *Primula* L. и рода *Humulus* L. и возможность разработки на их основе фитопрепаратов, обладающих профилактическими и лечебными действиями.

Не менее важными являются вопросы стандартизации ЛРС. Существующая отечественная нормативная документация (НД) на листья первоцвета весеннего (ГОСТ 3166-76) не позволяет объективно оценивать качество ЛРС. Возможность внедрения травы первоцветов и листьев хмеля обыкновенного в медицинскую практику делает актуальным разработку современной НД на указанные виды сырья.

Таким образом, изучение химического состава, фармакологических свойств, стандартизация сырья растений рода первоцвет и рода хмель с целью рационального использования, обоснования путей применения в медицинской практике являются актуальными задачами.

Степень разработанности темы исследования. Растения рода первоцвет известны как источники тритерпеновых сапонинов, органических кислот, витамина С, углеводов и других БАВ. Наиболее изучены в отношении химического состава корневища с корнями *Primula veris* L., *Primula elatior* (L.) Hill. Исследованию сапонинов посвящены зарубежные и отечественные работы Paris R., 1957; Мичник О.В., 1976; Muller A., 2006; Poracova J., 2009; Coran S.A., Mulas S., 2012; Борисова Д.А., Попов Д.М., 2013. Согласно Европейской Фармакопее их стандартизация проводится по содержанию эсцина. Ряд работ посвящены изучению состава фенольных соединений надземных частей различных видов первоцветов. Так, в первоцвете весеннем были определены флавоноидные соединения кемпферол, кверцетин, мирицетин, рутин и др.; антоцианы цианидин, дельфинидин Paris R., 1957; Richards, J., 1993; Мичник О.В., 1976; Романова З.Р., 2010; Борисова Д.А., 2013. Известны рабо-

ты по определению производных флавонов и флавонолов в различных видах *Primula* L. (Huck C.W., 2000; Budzianowski J., 2005; Косенкова Ю.С., 2008; Vitalini S., 2011). Однако другие классы БАВ надземных частей изучены недостаточно, что ограничивает их область применения.

Исследованию соплодий хмеля обыкновенного посвящено большое количество отечественных и зарубежных работ Самылина И.А., Горошко О.А., 2005; Арзамасцев А.П., Алексеева М.А., Эллер К.И., 2006; Киселева Т.Л., 1993; 2010; Зузук Б.М., 2004; Schwekendiek A., 2007; Zhang W.K., 2013. Листья и побеги хмеля обыкновенного изучались как источники каротиноидов (Garcia-Herrera P., 2013).

Цель и задачи исследования. Целью работы является комплексное фармакогностическое и фармакологическое изучение растений рода первоцвет и рода хмель как перспективных сырьевых источников биологически активных веществ.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи:**

– проанализировать современное состояние исследований по химическому составу, биологическим и фармакологическим свойствам представителей рода первоцвет и рода хмель, дать теоретическое обоснование расширения их сырьевой базы и области применения;

– провести сравнительное изучение химического состава травы первоцвета весеннего (лекарственного) (*Primula veris* L., или *P. officinalis* (L.) Hill.) и первоцвета крупночашечного (*Primula macrocalyx* Bunge.); листьев и соплодий хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) дикорастущего вида и культивируемых сортов «Ранний», «Крылатский» и «Подвязный»;

– провести выделение индивидуальных БАВ из исследуемых видов ЛРС, установить их структуру;

– провести сравнительное морфолого-анатомическое изучение сырья растений рода первоцвет, хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов, определить диагностически значимые их признаки;

– разработать методики качественного анализа и количественного определения основных групп БАВ для исследуемых видов сырья;

– обосновать показатели качества ЛРС и разработать проекты НД ФС «Первоцвета листья», ТУ «Трава первоцвета весеннего», ФСП «Хмеля обыкновенного листья»;

– разработать технологию получения густых экстрактов из травы первоцвета весеннего, листьев хмеля обыкновенного, гранул на их основе; методы их стандартизации;

– изучить специфическую фармакологическую активность густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного;

– выявить дополнительные источники БАВ (по отношению к сырью официнальных видов первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного) во флоре Башкортостана.

Научная новизна. Результаты проведенных исследований теоретически обосновывают и экспериментально доказывают целесообразность комплексного использования представителей рода первоцвет и рода хмель в качестве источников лекарственного растительного сырья.

Различными методами хроматографии [бумажной (БХ), тонкослойной (ТСХ), ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС)] в исследуемых растениях идентифицировано 41 фенольное соединение, из них впервые в траве первоцвета весеннего – 10 соединений, в траве первоцвета крупночашечного – 23, в листьях хмеля обыкновенного – 18. Выделено в индивидуальном состоянии 31 соединение: 30 веществ фенольной природы и 1 – из группы стеринов. С использованием методов ЯМР ^{1}H-, ЯМР ^{13}C-спектроскопии; корреляционной спектроскопии ЯМР ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQCED, HMBC, хромато-масс-спектрометрии установлено, что в состав фенольных соединений входят флавоноидные соединения, в том числе флавоны (апигенин, лютеолин и их гликозиды), полиметоксилированные флавоны, флавонолы (кверцетин, кемпферол и их гликозиды), флаванонолы (дигидрокверцетин), изофлавоноиды (генистин, даидзеин, генистеин), простые фенолы (арбутин), дубильные вещества (танин,

катехин, эпикатехин, эпигалокатехиногаллат), кумарины (умбеллиферон, кумарин), фенолокислоты (галловая, салициловая кислоты), гидроксикоричые кислоты (коричная, кофейная, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая кислоты), стильбены (ресвератрол).

Результаты исследований показали, что общим и доминирующим флавоноидным соединением среди исследуемых видов растений, имеющим значение для целей стандартизации, является рутин.

Разработаны методические приемы выделения специфических для рода первоцвет полиметоксилированных флавоноидов и разделения их на отдельные компоненты, в частности 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона.

Применение 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона в качестве маркера для стандартизации надземной части первоцвета весеннего позволит расширить перечень специфических веществ-маркеров для стандартизации ЛРС.

В сравнительном плане исследован состав тритерпеновых сапонинов. Методами ТСХ, УФ-спектроскопии в сырье двух видов первоцветов впервые идентифицирована урсоловая кислота, определено ее количественное содержание.

Впервые методами ТСХ, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрии в сырье исследуемых видов первоцветов проведено сравнительное изучение состава липофильных веществ (полиметоксилированных флавоноидов, производных жирных кислот), органических и аминокислот.

Впервые проведено сравнительное исследование состава основных групп БАВ листьев и соплодий хмеля обыкновенного. В листьях хмеля обыкновенного впервые идентифицированы специфичные для соплодий изофлавоноиды: генистин, генистеин, дайдзеин; стильбен ресвератрол; в эфирном масле – α-гумулен, α-кубебен, кариофиллен и α-кариофиллен.

Впервые проведено морфолого-анатомическое изучение травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов, определены диагностически значимые признаки.

Изучена динамика накопления основных групп БАВ в зависимости от фазы вегетации травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов, определены сроки заготовки сырья.

Впервые разработаны технология получения густых экстрактов на основе травы первоцвета весеннего (ГЭТПВ) и листьев хмеля обыкновенного (ГЭЛХО), гранул на их основе, а также методы стандартизации. Установлено, что разработанные фитопрепараты являются практически нетоксичными веществами, обладают антиоксидантным, антигипоксантным, ангиопротекторным, эндотелипротекторным действиями.

Новизна исследований подтверждена патентами РФ на изобретения: «Средство растительного происхождения, обладающее антиоксидантной активностью» (патент № 2342942 от 10.01.2009); «Антиоксидантное средство растительного происхождения» (патент № 2372931 от 20.11.2009); «Способ лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний с использованием экстракта травы первоцвета весеннего» (патент № 2353378 от 27.04.2009), «Новое природное вещество из травы первоцвета весеннего» (патент № 2532999 от 20.01.15), «Применение густого экстракта травы первоцвета весеннего (*Primula veris* L.) в качестве гепатозащитного средства» (решение о выдаче патента на изобретение от 12.01.2015 по заявке № 2014114957/15 (023446)).

Таким образом, теоретически обоснована и экспериментально подтверждена возможность комплексного использования растений рода первоцвет, хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты проведенных фитохимических, фармакологических исследований доказали перспективность введения в отечественную номенклатуру официнального растительного сырья – травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного, что существенно расширит сырьевую базу растительного сырья РФ.

Результаты исследований химического состава представителей рода первоцвет и рода хмель добавят данные о содержании в них БАВ.

Разработаны и апробированы методики анализа: определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин для травы первоцвета весеннего, листьев хмеля обыкновенного; содержания кислоты аскорбиновой для травы первоцвета весеннего; содержания ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного.

Предложена стандартизация цельного, измельченного и порошкованного сырья травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного.

Впервые установлены макро- и микродиагностические признаки для определения подлинности цельного, измельченного и порошкованного сырья, включенные в проекты фармакопейных статей.

Разработана технология получения густых экстрактов на основе травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного, гранул на их основе, определены показатели качества и методы стандартизации.

Доказана перспективность комплексного использования хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов, что позволит оптимизировать процесс переработки сырья.

Внедрение в практику. На основании проведенных исследований разработаны и утверждены:

– ТУ «Трава первоцвета весеннего», утверждены в установленном порядке и включены в ТУ «Сырье растительное» № 9700-014-26795008-2005 (ООО «Травы Башкирии», г. Уфа);

– подготовлен проект ФС «Первоцвета листья» для включения в Государственную Фармакопею XII изд. (проходит экспертизу в ФГУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России);

– разработан проект фармакопейной статьи предприятия «Хмеля обыкновенного листья» (согласован с ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г. Чебоксары).

Разработанные методики анализа сырья внедрены в работу ОКК ООО «Травы Башкирии», ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств», ОАО «Агрофирма «Ресурсы».

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии Башкирского государственного медицинского университета, кафедры фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета, кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета.

Результаты исследований включены в монографию Г.М. Латыповой, В.Н. Бубенчиковой [и др.] «Растения рода Первоцвет как перспективные источники профилактических и лекарственных средств» (2012), в учебное пособие Г.М. Латыповой, Г.В. Аюповой [и др.] «Биологически активные добавки к пище: состав и применение», рекомендованное УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России (2008); а также в методических рекомендациях для врачей МЗ РБ «Применение антиоксидантов в коррекции оксидантного стресса у больных ишемическим инсультом» (2008).

Методология и методы исследований. Методологическая основа построена на информационном поиске и анализе литературных данных по выбору перспективных объектов лекарственных и пищевых растений малоизученных, требующих рационального использования и комплексной переработки на примере растений рода первоцвет и рода хмель; оценке изученности их химического состава, ресурсного потенциала, использования в научной и народной медицине; постановке цели и задач по экспериментальному обоснованию их рационального использования; целенаправленном изучении химического состава и фармакологических свойств; разработке НД на ЛРС; разработке фитопрепаратов и параметров их стандартизации; формулировании выводов, определяющих теоретические и практические рекомендации материалов диссертационной работы.

В качестве основных методов физического, химического и физико-химического анализа использованы методы БХ, ТСХ, ВЭЖХ, ЯМР-, УФ-, хромато-масс-спектроскопии, спектрофотометрии, титриметрии, гравиметрии, кондуктометрии. Анатомические исследования проводились с применением микроско-

пов «Биолам», «Минимед-501», «Axio Imager 1» («Carl Zeiss», Jena) с вмонтированной цифровой камерой «AxioCam MRc 5» с программным управлением.

Положения, выносимые на защиту:

– теоретическое и экспериментальное обоснование использования новых отечественных сырьевых источников первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного;

– результаты исследования химического состава растений рода первоцвет и рода хмель;

– методы выделения и разделения фенольных соединений, результаты установления их структуры и физико-химические характеристики;

– данные сравнительного изучения химического состава первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев и соплодий хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов;

– результаты сравнительного морфолого-анатомического исследования травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов;

– результаты исследований по стандартизации травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного; обоснование показателей качества сырья первоцветов, хмеля обыкновенного;

– экспериментально-теоретическое обоснование целесообразности разработки лекарственных средств на основе первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного.

Степень достоверности и апробация результатов. Научные положения, выводы и рекомендации базируются на достаточном количестве экспериментальных исследований с использованием современных методов установления структуры выделенных соединений, подтверждается большим табличным материалом и рисунками спектров. Статистическая обработка результатов проводилась согласно требованиям ГФ XI с помощью программы «Microsoft Excel 2010» и «Statistica 8.0».

Основные материалы диссертационной работы были представлены и доложены на ежегодных итоговых научных сессиях Башкирского государственного медицинского университета, отделения медико-биологических наук Уфимского филиала НЦ РАМН «Химия и медицина» (Уфа, 2006–2012); на Всероссийской научно-практической конференции «Новые достижения в создании лекарственных средств растительного происхождения» (Томск, 2006); на 2- и 3-й международных конференциях «Краеведение в Курском крае: прошлое и современность» (Курск, 2007; 2008); на V и VI Всероссийских конференциях «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар-Уфа, 2008; 2009); на Всероссийской конференции «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты» (Самара, 2011); на II международном конгрессе «Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации» (Москва, 2012); на международной конференции «Кластерные подходы фармацевтического союза: образование, наука и бизнес» (Белгород, 2012); на VIII международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2012); на международных конференциях «Экобиотех» (Уфа, 2011; 2013).

Связь темы с планом научных работ. Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по проблеме «Изыскание и изучение новых лекарственных средств» (государственная регистрация № 01200707996).

Публикации. Основные результаты исследования отражены в 61 научной работе, в том числе в 28 статьях в журналах, включенных в Перечень ВАК Министерства образования и науки РФ. Имеются 5 патентов РФ на изобретение, 1 монография, 1 учебно-методическое пособие, рекомендованное УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России, 1 методические рекомендации МЗ РБ.

Личный вклад автора. Направление исследования, постановка целей и задач, объекты исследования выбраны самим автором. Результаты экспериментальных исследований, представленных в диссертационной работе, получены автором лично. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведены научное обоснование и обобщение полученных результатов. Доля автора в сборе, анализе и обобщении информации является определяющей.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует форме специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Работа представляет итог исследований, выполненных автором в творческом сотрудничестве с кафедрами послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования ИПО, фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, с лабораторией ЦНИЛ ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, ФГБУ РАН «Институт органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук», ФГБУ РАН «Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 366 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, четырех глав экспериментальной части, общих выводов, списка литературы и приложений. В тексте содержится 72 таблицы, 55 рисунков. Список цитируемой литературы включает 348 источников, из них 132 – на иностранных языках.

ГЛАВА 1 РАСТЕНИЯ РОДА ПЕРВОЦВЕТ И ХМЕЛЬ ОБЫКНОВЕННЫЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВ

1.1. Ботанико-морфологическая, химическая, фармакологическая характеристика представителей рода первоцвет

1.1.1 Ботаническая характеристика представителей рода первоцвет

Порядок первоцветные (*Primulales*) относится к отделу цветковых (*Magnoliophyta*) растений, классу двудольных (*Magnoliopsida*), подклассу диллениидов (*Dilleniidae*). Порядок первоцветные *(Primulales)* включает 4 семейства, наиболее известное из которых семейство первоцветные [11].

Семейство первоцветные – *Primalaceae* Vent.

Представители семейства первоцветных распространены в горных, равнинных местностях северного полушария, включают 30 родов и более 1000 видов. В РФ и странах СНГ отмечено 167 видов, принадлежащих к 18 родам [10, 147, 194].

Растения данного семейства представляют собой корневищные или розеткообразующие травянистые растения, могут встречаться однолетники, клубнеобразующие эфемероиды, погруженные в воду, подушковидные кустарничковые формы.

Название «первоцветные» произошло из-за ранневесеннего цветения большинства представителей наиболее известного крупнейшего рода примула, или первоцвет *(Primula* L.*)*. Прежде всего, это декоративные цветочные растения открытого грунта, зацветающие сразу после таяния снегов, требующие охраны в некоторых регионах [194].

Род *Primula* L. самый крупный род семейства *Primalaceae* Vent

По оценкам различных специалистов, он насчитывает до 600 видов [194, 195]. Растения рода первоцвет характеризует привязанность видов к экологическим условиям ареала распространения. Они могут встречаться от равнинных зон до верхних высотных поясов гор, на основе некоторых из них создаются современные декоративные гибриды и сорта. Многие современные селекционные работы направлены на создание сортов, адаптированных в сверокликматических условиях обитания.

Исследованию некоторых видов *Primula* L. и рода в целом посвящено большое количество исследований. Разнообразен спектр проблем и вопросов, освещаемых в них.

Известны региональные исследования таксона в масштабах естественноисторических географических областей, общих закономерностей их географической дифференциации.

В РФ отмечен высокий уровень биологического разнообразия *Primula* L. на ценотическом, экосистемном и популяционно-видовом уровнях. Так, для горных видов *Primula* L. характерны повышенные темпы эволюции и более высокая скорость образования новых видовых форм по сравнению с равнинами. Горные экосистемы являются центрами происхождения многих декоративных сортов этого рода, широко культивируемых человеком [10].

Сегодня выявлены перспективные виды *Primula* L. для хозяйственного использования: это лекарственные и декоративные, а также виды, подлежащие охране.

Так, некоторые виды природной флоры Северо-Западного Закавказья, такие как *P. Ruprechtii*, *P. acaulis*, *P. juliae*, *P. meyerii* и др., давно используются в селекции. В ГНУ ВНИИЦ и СК Россельхозакадемия (г. Сочи) с 1998 г. проводятся работы по созданию сортов первоцвета, устойчивых к условиям влажных субтропиков, с высоким декоративным эффектом в зимние и ранневесенние месяцы, что было актуальным в связи с зимней олимпиадой 2014 г. в г. Сочи [61].

Растения рода первоцвет представляют собой многолетние растения розеточной формы с множественными одиночными цветками. Произрастают на склонах и откосах, в лесу или в кустарниках, преимущественно в полутени, цветут в марте-апреле месяце. У них очень много общих морфологических признаков, и подчас сложно определить видовую принадлежность экземпляра, но все же они отличимы по окраске цветочной части и другим малозаметным признакам. Так для первоцвета (п.) Комарова характерна белая с жёлтым глазком и оранжевыми полосками окраска венчика. Для п. Воронова свойственна розовая окраска. П. обыкновенный имеет светло-жёлтую окраску венчика. Окраска венчика п. Сибторпа – от светло-сиреневой до лилово-красной. Данные близкие виды представляют интерес как декоративные растения [194].

Два других вида *P. meyer* и *P. ruprechtii* встречаются ограниченно, обитают в альпийском поясе, принадлежат к тем же ботаническим группам, но цветут в июне-июле, а в условиях ex situ, на черноморском побережье – в апреле. Для п. Мейера характерен фиолетовый венчик цветка, листья овальной формы, почти голые, черешок длиннее листовой пластинки, цветки собраны в малоцветковое соцветие. У п. Рупрехта цветки с розовым венчиком, листья продолговатые, постепенно суженные в черешок, снизу серовойлочные.

Все виды первоцвета неустойчивы к воздействию прямых солнечных лучей, требуют богатых перегноем суглинистых почв, увлажнение которых должно быть повышенным в начале роста и во время цветения. Среди видов первоцвета, устойчивых к условиям влажных субтропиков, отмечен первоцвет Сибторпа [61].

Широко распространенным видом является первоцвет обыкновенный (примула обыкновенная, п. бесстебельная) *Primula acaulis (P.vulgaris* Huds.*)*. Ареал его естественного распространения охватывает Европейскую часть РФ, Крым, Закавказье, Карпаты, почти всю Западную часть Европы (на севере от Норвегии до Испании, Португалии и Италии на юге), северную Африку, Ближний Восток и Центральную Азию [194].

По окраске венчика п. обыкновенный разделяется на подвиды, отмечают – желтый, белый, розовый или тёмно-розовый подвиды [316]. Выведенные из него сорта и гибриды широко используются в Средней части РФ.

Исследованиями по распространению данного вида в Средней части РФ занимались И.А. Фадеева, Т.В. Богомолова, А.В. Шапурко и др. (2007). В ходе флористических обследований первоцвет был обнаружен в большом количестве в широколиственных лесах на территориях Калужской и Брянской областей [72, 186]. Для иных регионов Средней России в естественных условиях данный вид не отмечался [111]. Указанный вид был описан в западной части Украины [109, 195].

В 2012 г. А.В. Шапурко выполнено обследование лесных массивов в Брянской области (северной, западной частях), где отмечено, что первоцвет обыкновенный встречается достаточно часто, местами с покрытием от 1 до 5%. Встречается данный вид в основном в осиново-липовых, берёзово-липовых и липовых с дубом лесах. Автором отмечено, что фитоценотические позиции и возможности сохранения вида в описанных сообществах являются высокими.

Фенотипическая нестабильность некоторых представителей рода *Primula* может привести к угрозе исчезновения.

Так, методом генной инженерии проводятся молекулярно-генетические исследования с целью объяснения флористических особенностей *Primula vulgaris*, выявления генов, ответственных за адаптацию вида [267].

Из других видов первоцвета широко встречается первоцвет весенний (лекарственный) *(Primula veris* L., *или P. officinalis* (L.) Hill.*)* Данный вид произрастает на территории европейской части РФ: Калининградской, Ладожско-Ильменской, Верхне-Волжской, Верхне-Днепровской, Волжско-Донской, Нижне-Донской областях, на Урале, Кавказе, в Западной Сибири, в Средней Азии. Произрастает на полянах, на опушках лесов, в лугах, степях, в лиственных и смешанных лесах, а также среди зарослей кустарников по берегам рек [6, 12, 149, 202].

Представляет собой небольшое (высотой 15–35 см) многолетнее травянистое растение. Не ветвистое корневище с усаженными шнуровидными корня-

ми длиной 6–8 см. Листья яйцевиднопродолговатой или яйцевидной формы, суженные в крылатый черешок, собраны в прикорневую розетку (рисунок 1). Листовые пластинки морщинистые, с выступающими снизу жилками, опушенные или почти голые с верхней стороны, край листа городчатый.

Цветоносные стрелки, выходящие из розетки листьев, несут поникающие в одну сторону зонтиковидные соцветия. Цветки крупные, воронковидные, правильные имеют душистый медовый запах. Венчик правильной опадающей формы имеет пятираздельный отгиб, ярко-желтой окраски, в зеве – оранжевое пятно. Чашечка трубчатоколокольчатая, неопадающая с пятью зубцами.

Плод представлен многосемянной, яйцевидной коробочкой, бурого цвета, заключен в разросшуюся чашечку. Семена неправильно многогранные, почти шаровидные, мелкие, темно-коричневого цвета. Цветет со второй половины апреля до июня месяца [12, 13, 202].

На территории Республики Башкортостан первоцвет весенний встречается ограниченно, на границе с Республикой Татарстан, но зато широко распространен близкородственный вид первоцвет крупночашечный.

Первоцвет крупночашечный – *Primula macrocalyx* Bunge. Данный вид встречается в европейской части: Волжско-Камской, Заволжской областях; Кавказ – все районы; Западаная Сибирь: Обская, Верхне-Тобольская, Иртышская области; Восточная Сибирь – Ангаро-Саянская область [16, 149].

Primula macrocalyx является подвидом первоцвета весеннего, внешне очень похож на европейские виды указанного растения (рисунок 1). Является эндемичным на Кавказе, в Иране, хорошо поддается культивированию и является перспективным видом для внедрения [324].

Согласно литературным данным указанный вид отмечен в восточных и западных районах предгорий, в центральной части Южного Урала. В северо-западных районах Республики Башкортостан и некоторых районах Зауралья первоцвет крупночашечный встречается реже.

На территории РБ первоцвет крупночашечный имеет достаточные сырьевые запасы [95, 157].

Произрастает он на лесных опушках, суходольных лугах, в светлых лесах, между кустарниками. Особенно часто встречается в сосновых и лиственных, березово-осиновых, осиновых лесах [4, 6, 150].

Это многолетнее травянистое растение высотой от 20 до 45 см. Листовые пластинки городчатые по краю, продолговато-яйцевидной формы, постепенно сужены в крылатый черешок и собираются в прикорневую розетку. Листья крупные, шириной более 1 см, опушенные.

В центре розетки располагаются одна и более цветоносных стрелок, заканчивающихся поникающими в одну сторону зонтиковидными соцветиями. Цветки воронковидной формы ярко-желтого цвета, в зеве имеется оранжевое пятно. Венчик цветка имеет лопасти тупой формы с плоским отгибом. Тычинки скрыты в трубочке венчика. Чашечка крупная (длина 10–20 мм), вздутая до цветения, колокольчатой формы.

Плод – многосемянная коробочка яйцевидной формы бурого цвета [96, 97].

А

Б

Рисунок 1 – Первоцвет весенний (А), первоцвет крупночашечный (Б)

1.1.2 Химический состав представителей рода первоцвет

Растения рода первоцвет известны как источники тритерпеновых сапонинов, витамина С, органических кислот, углеводов и др. групп БАВ [51, 98, 127].

Согласно литературным данным тритерпеновые сапонины преимущественно содержатся в корневищах с корнями растений рода первоцвет.

В подземных органах первоцвета весеннего идентифицированы примуловая кислота, примверозид, примакросапонин, примверосапонин В, в гидролизате: примулагенин А, 28-дегидропримулагенин А, приверогенин-А-16-моноацетат, приверогенин-В-18-моноацетат, примуласапонин I и II [149, 151, 323].

Muller A. с соавторами (2006) методами хроматографии, ЯМР-спектроскопии в *Primula elatior и Primula veris* были определены сапонины и фенольные гликозиды примулаверин и примверин, высокое содержание сапонинов было отмечено в подземных органах *Primula veris* (макс. 14.9%), в надземных частях и *Primula elatior* содержание сапонинов было значительно ниже. Примверин (0.64–1.42%) оказался самым доминирующим фенольным гликозидом [297, 303].

Coran S.A., Mulas S. (2012) разработан денситометрический метод разделения и количественного определения примулосапонина I и II в корнях первоцвета весеннего. Метод валидирован и протестирован на коммерческих растительных лекарственных препаратах [252].

В подземных органах *Primula macrocalyx* Bunge. определен примверозид, отмечено высокое содержание тритерпеновых сапонинов до 10% [95, 300].

Стандартизация корневищ с корнями первоцвета весеннего согласно Европейской Фармакопее проводится по содержанию тритерпенового сапонина эсцина [261].

Наличие сапонина β-эсцина было определено в цветках, траве первоцвета весеннего, собранного в районе Levocske гор в восточной Словакии. Качественное обнаружение и количественное определение β-эсцина проводили, используя методы денситометрии и спектрофотометрии.

Poracova J. с соавторами (2009) установили, что содержание β-эсцина в исследуемых образцах первоцвета весеннего колебалось в диапазоне 1.2–1.7±0,1% [309].

Ряд работ посвящены изучению состава полифенольных соединений.

Так, в листьях первоцвета весеннего идентифицированы флавоноидный гликозид кемпферола дирамнозид, в гидролизате извлечений – кемпферол, кверцетин, мирицетин; антоцианы – цианидин, дельфинидин [148, 149, 151, 307].

Huck C.W. с соавторами (2000) методами препаративной тонкослойной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии из *Primula veris* были выделены и идентифицированы 3’,4’,5’-триметоксифлавон и еще пять моно-, ди -, три – и пентаметоксифлавоны [291].

Budzianowski J.с соавторами (2005) из листьев первоцвета весеннего, культивируемого в ботаническом саду сельскохозяйственного университета г. Познань, выделены десять липофильных флавоноидов. Методами ЯМР-, УФ-спектроскопии были идентифицированы впервые выделенные 3’-гидрокси-4’,5’- диметоксифлавон и 3’-метокси-4’,5’-метилендиоксифлавон, и ранее известные 3’,4’-диметоксифлавон, 2’,5’-диметоксифлавон, 2’-гидроксифлавон,2’-метоксифлавон, 3’-метоксифлавон, 3’,4’,5’-триметоксифлавон и 5,6,2’, 6’-тетраметоксифлавон (запотин). Те же флавоны были идентифицированы в листьях первоцвета весеннего, полученного методом культуры клеток [241].

Флавоноиды примулафлавонолозид (дирамнозида кемпферол), метиловый эфир кверцетагетингликозида, 3-генциобиозид кверцетина были идентифицированы в цветочной части первоцвета весеннего [148, 149, 151, 217, 319].

Качественный состав фенолкарбоновых кислот и их производных в цветках первоцвета весеннего представлен 4-метоксиметилсалицилатом, 5-метоксиметилсалицилатом; фенольными гликозидами – примверином, примулаверином. В подземных органах указанного вида идентифицированы примверозид 4-метоксиметилсалицилат (примверин), 4-, 5- метоксиметилсалицилат, примверозид 5-метоксиметилсалицилат (примулаверин), 2-глюкозил-5-метоксиацетофенон, метиловый эфир 2-примверозил-4-метоксибензойной кислоты [148, 149, 151].

Борисовой Д.А. (2013) методом ВЭЖХ-хромато-масс-спектроскопии в надземной части первоцвета лекарственного, собранного на территории Кавказа, идентифицированы производные кверцетина [28].

Имеются данные о химическом составе первоцвета обыкновенного. В цветках идентифицированы 3-генциобиозид кверцетагетина, в подземных органах – фенолкарбоновые кислоты: метиловый эфир 2-примверозил-4-метоксибензойной кислоты, метиловый эфир 2-гидрокси-5-метоксибензойной кислоты [149].

Проводятся исследования по накоплению полифенольных соединений в конкретных органах растений, биосинтезу и хемосистематике представителей рода *Primula*.

В Институте ботаники (Венский университет) Valant-Vetschera KM. с соавторами (2009) проведены исследования по изучению флавоноидов новых сортообразцов рода *Primula* и их близкородственных видов *matthioli Cortusa*. Исследования показали, что основными флавоноидными соединениями явились производные незамещенных флавонов, 5-гидрокси-, 2’-гидроксифлавона и 5,2’- игидроксифлавона. Также было выяснено, что 8-О-замещенные флавоны накапливаются чаще, чем 6-О-замещенные продукты. Из других производных полифенольных соединений отмечено наличие халконов. Авторами отмечено, что халконовые соединения распространены рассеянно по всем структурам листовых пластинок. В то время как, флавоноиды ограниченно встречаются в экссудатах листовых пластинок. Данные исследования имеют значение в изучении родственных таксонов *Primula* [336].

Bhutia T.D. с соавторами (2011) были исследованы экссудаты на поверхности листьев, стеблей, чашечек и цветков, являющиеся характерными признаками этого рода. В них же в основном и локализованы незамещенные флавоны и другие флавоны с необычными замещениями, неопознанными биогенетически. С помощью ВЭЖХ, ТСХ, УФ-, ЯМР-спектроскопии, используя флуоресцентные свойства некоторых флавоноидов, был идентифицирован флавоноидный профиль железистых волосков *Primula vulgaris Huds*. и *Primula*

vialii Delavay ex Franch. Флавоноиды указанных видов имели разные показатели флуоресценции, что может быть использовано при описании морфологических и микроморфологических характеристик названных видов [219].

Bhutia T.D. с соавторами (2012) провели комбинированное микроморфологические и химические исследования железистых трихом листовых пластинок *Primula vialii* и *Primua vulgaris*. Эпифлуоресцентной микроскопией исследованы люминесцентные свойства флавоноидов, определена их локализация в железистых трихомах. Недавно выделенный кемпферол 3-O-(2"'-рамнозил l)-робинобиозид) был получен из экссудата листа п. *vialii* [266].

Bhutia T.D. с соавторами (2012) провели исследование флавоноидных профилей 22 новых присоединенных к роду *Primula* L. подродов. Состав флавоноидных соединений изучался методами ТСХ, ВЭЖХ, УФ-спектроскопии с использованием достоверных маркерных соединений. Исследование показало, что большинство изученных видов содержат типичные для рода *Primula* флавоноиды, производные незамещенного флавона, 5,8- или 5,6-гидроксифлавона, включая частично замещенные кислородом флавоны, вместе с 2,2'-дио-халконами. Флавоноидный профиль *P. Edelbergii*, принадлежащий к подроду *Sphondylia*, отличался в значительной степени от изученных до сих пор большинства видов *Primula*. Состав флавоноидных соединений данного вида оказался близким к тесно связанному роду *Dionysia*. Данные исследования объясняют диверсификационные отличия представителей рода *Primula* и имеют филогенетическое значение [231].

Австрийские исследователи Bhutia T.D. с соавторами (2013) из экссудатов листьев *Primula cortusoides* выделили два производных дигидрохалконовой природы, названные как примкортузин и 3'-OH-примкортузин, ранее неизвестные для рода *Primula*. Структуры данных соединений были определены методами 2D ЯМР и масс-спектрометрии [232].

В работе Fico G. с соавторами (2007) предложены морфологические и фитохимические маркеры для *Primula auricula*, *Primula daonensis и Primula hirsute*. В качестве таксономических фитохимических маркеров авторы пред-

лагают флавоноидный состав эпикутикулярных и вакуолярных частей листовых пластинок. Авторами сообщается о выделении и идентификации двух новых флавоноидных гликозидов, изорамнетина 3-O-(2,6-ди-O-β-D-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозид) и кемпферола 3-O-(2-O-α-L-рамнопиранозил-6-O-β-D-xylopyranosyl-β -D-глюкопиранозид) [249].

Vitalini S. с соавторами (2011) исследовали состав вакуолярных и эпикутикулярных флавоноидов и летучих веществ в листьях и цветках *P. Spectabilis Tratt.*, эндемичного вида в восточных итальянских Альпах. В метанольных фракциях экстракта из листьев указанного растения выделены два флавоновых гликозида, 8-C-β-глюкопиранозиллютеолин-7-O-α-арабинофуранозид и 6-C-α-арабинофуранозилапигени, к дополнительно выделенным известным для видов *Primula* производным флавона и флавонолов. В этанольной фракции экстракта был выделен 7,3’,4’-три-O-метилкверцетин. Структуры выделенных веществ были определены на основе их 1D H-ЯМР и C данных и методов 2D ЯМР-спектроскопии [312].

В Китайской академии медицинских наук Qu G.-L., Zhang H.-M. с соавторами (2011) исследовали химический состав надземной части *Primula maximowiczii Regel*. Методами колоночной хроматографии были выделены девять соединений, структура которых была определена на основе физико-химических свойств и спектроскопических данных. Так, в указанном растении определены 2-примверозил-5-метокси-ацетофенона, пеонолид, 4-гидрокси-ацетофенона, пицеин, 2-O-β-D-глюкопиранозил-4-метокси-метилбензойная кислота, 4-примверозил-ацетофенон, кемпферол-3-O-(2-O-α-L-рамнопиранозила-6-O-β-D-ксилопиранозила)-β-D-глюкопиранозид, кемпферол 3-O-неогесперидозид, кверцетин и 3-O-генциобиозид. Перечисленные соединения *P. Maximowiczii* определены впервые [326].

Исследователями Fouad M.A. с соавторами (2009) из Минианского университета фармацевтического факультета (Египет) проведено изучение *Primula elatior L*, культивируемой в Египте. Фракционированием, очисткой метанольного экстракта из семян указанного растения было выделено шесть соединений,

структура которых была установлена методами ЯМР- и масс-спектрометрии. В ходе проведенных исследований были идентифицированы β-ситостерол-3-О-β-D-глюкозид, метиловый эфир галловой кислоты, кемпферол, (+) катехин, а также производные полигаллоглюкозы: 1,2,3,4,6-пента-О-галлоил-β-D-глюкопираноза и 1,2,3,6-тетра-О-галлоил-β-D- глюкопираноза [268].

Исследования, проводимые в Новосибирском институте органической химии Сибирского отделения РАН и Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН, показали наличие в надземной части *Primula macrocalyx* Bunge. (гексановый экстракт) липофильных соединений: метоксилированных флавонов, свободных и связанных жирных кислот, пигментов [199].

Косенковой Ю.С. с соавторами (2008) в надземной части *Primula macrocalyx* Bge. методами колоночной хроматографии, ВЭЖХ выделены и идентифицированы 2’,5’-диметоксифлавон, 3’-метокси-4’,5’-метилендиоксифлавон, 3’,4’-диметоксифлавон, 5,6,2’,3’,6’-пентаметоксифлавон, 5,6,2’,3’,5’,6’-гексаметоксифлавон, метил-4-метоксисалицилат, peonol, riccardin C, описаные ранее у *P. Veris* и *P. auricula* [218, 233, 241, 292].

Этими же авторами в гексановых и ацетоновых фракциях экстракта надземной части *Primula macrocalyx* Bunge. установлено значительное содержание свободных и связанных жирных кислот. Состав жирных кислот определяли с использованием ГХ, ГХ-МС, масс-спектрометрии. Преобладающими кислотами надземной части *Primula macrocalyx* Bunge. были пальмитиновая, октадекатетраеновая, линолевая, α-линоленовая кислоты. Содержание других кислот находилось в диапазоне 0.2–4.8%, некоторые из кислот присутствовали в следовых количествах. Фракция ненасыщенных кислот составила 38.8% от их общего содержания. Наличие в растении линоленовой кислоты (отн. содержание 4.8%) в сочетании с существенным количеством октадекатетраеновой (отн. содержание 10.7%) было отмечено таксономическим маркером рода *Primula* [318]. Кроме того, в анализируемых образцах идентифицированы α-токоферол, фитол и фитостеролы [264].

Имеются данные по изучению эфирных масел в цветках и листьях растений рода первоцвет.

Качественный состав эфирных масел цветков первоцвета весеннего представлен 4-метоксиметилсалицилатом, 5-метоксиметилсалицилатом, примверином, примулаверином. Отмечено содержание эфирного масла в листьях первоцвета весеннего до 0.08%. В подземных органах указанного вида идентифицированы примверозида 4-метоксиметилсалицилат (примверин), 4-,5-метоксиметилсалицилат, 5-метоксиметилсалицилат (примулаверин), 2-глюкозил-5-метоксиацетофенон, метиловый эфир 2-примверозил-4-метоксибензойной кислоты. Количественное содержание эфирных масел в корневищах с корнями составило 0.01% [148, 149, 151].

Gaskett A.C. с соавторами (2005) исследовали летучие вещества из *Primula elatior* и *P. farinose*. Методами газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией определено, что в составе эфирных масел *P. elatior* преимущественно находятся α-пинен, мирцен и сабинен. В *P. farinosa* вырабатываются бензальдегиды, 4-оксоизофороны (2,6,6-триметил-2-циклогексен-1,4-дион), бензиловый спирт, бензил и ацетат. Данные межвидовые различия могут играть важную роль в обеспечении цветочного постоянства и поддержании видовой целостности [269].

Vitalini S. с соавт. (2011) были определены летучие вещества в листьях и цветках *Primula spectabilis Tratt.*, эндемичного для итальянских Альп вида. Методами ВЭЖХ-МС-спектрометрии определено наличие нетерпеновых производных, а также в определенных пропорциях монотерпеновых и сесквитерпеновых углеводородов. В цветках преимущественно локализованы монотерпеновые, затем следуют производные нетерпеновых углеводородов. Авторами установлено, что чашечка содержит около 49.5% всех летучих веществ. Ими же определена локализация железистых волосков не только в венчике, чашечке, но и на листовых пластинках. Авторами также обсуждается корреляции фитохимических данных с морфологическими особенностями листьев, цветов и железистых волосков, выдвигается гипотеза об экологической роли флавоноидов и летучих соединений в подготовке видов и стратегии переопыления [312].

Имеются данные по изучению углеводного состава в корневищах первоцвета весеннего о наличии ксилозы, гептозы, примулита (D-волемит), ксилита, β-

седогептида, лактулозы, примверозы, мезоинозита, эритрита, D-манногептулозы, примверозы [23, 24, 37]. Романовой З.Р. с соавторами (2011) определено количественное содержание полисахаридов в траве первоцвета весеннего, собранного в Европейской части РФ, содержание которых составило 3.3% [157].

Борисовой Д.А. (2013) проведен сравнительный анализ содержания углеводов в первоцвете лекарственном, собранном в предгорьях Кавказа. Установлено наличие свободных сахаров галактозы, сахарозы и фруктозы только в цветочной части растения, количественное содержание которых составило 9.24%. Связанные сахара, характерные для цветков, листьев и корневищ, представлены глюкозой, галактозой, ксилозой, арабинозой. Максимальное содержание углеводов, накапливаемых в корневищах с корнями, достигало до 8.5% [28].

Согласно литературным данным в подземных органах первоцвета крупночашечного содержатся полисахариды (25.2%), дисахариды (3.4%), моносахариды (3.2%), гликозиды (4.45–12.66%). В листьях указанного растения содержание полисахаридов составило 3.1%, дисахаридов – 4.8%, моносахаридов – 4.4% [124, 125, 157].

Растения рода первоцвет рассматриваются как витаминоносное растительное сырье. Первоцвет весенний разрешен к применению как пищевое поливитаминное растение (ГОСТ 3166-76 «Листья первоцвета весеннего. Технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт»). Содержание кислоты аскорбиновой отмечено во всех органах растений, но наиболее богаты надземные органы.

Романовой З.Р. (2011) проведено сравнительное определение количественного содержания кислоты аскорбиновой в первоцвете весеннем и крупночашечном методом окислительно-восстановительного титрования. Установлено, что в листьях первоцвета весеннего содержание аскорбиновой кислоты составляет до 3.6%, в листьях первоцвета крупночашечного – до 2.3% [157].

Латыповой Г.М., Бубенчиковой В.Н. с соавторами (2012) разработана методика спектрофотометрического определения кислоты аскорбиновой в сырье первоцвета весеннего [179].

Борисовой Д.А., Поповым Д.М. (2013) разработана методика количественного определения кислоты аскорбиновой в сырье первоцвета лекарственного методом ВЭЖХ. Сравнительный анализ количественного содержания витамина С, проведенного методом ВЭЖХ, в сырье первоцвета лекарственного, собранного на Кавказе, показал, что наибольшее содержание от 26.4 до 60.5 мг% определено в цветках, в листьях от 21.9 до 40.1 мг%, в корневищах с корнями минимум аскорбиновой кислоты – 2.0 мг% [27].

Из других витаминов в листьях первоцвета весеннего определены каротиноиды [23, 24, 58, 217].

В листьях первоцвета крупночашечного установлено наличие витаминов А, Е и В [45, 148, 151].

Романовой З.Р., Латыповой Г.М. (2011) проведены исследования аминокислотного состава травы первоцвета весеннего и крупночашечного. В исследуемых объектах определны 14 аминокислот: аргинин, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, тирозин, треонин, серин, фенилаланин, цистеин. Сравнительный анализ показал, что общее содержание аминокислот в надземной части первоцвета весеннего составило 6.2%, первоцвета крупночашечного – 8.2% [147, 157].

Имеются данные по сравнительному анализу качественного состава и количественного содержания аминокислот в цветках, листья и подземных органах первоцвета лекарственного, собранного на Кавказе. Показано, что аминокислотный состав изучаемых частей растений приблизительно одинаков [25, 32].

Минеральный состав растений рода первоцвет достаточно богат. Латыповой Г.М., Романовой З.Р. (2011) проведен сравнительный анализ качественного состава и количественного содержания основных макро- и микроэлементов в первоцвете весеннем и крупночашечном. Установлено, что растения накапливают калий, кальций, марганец, фосфор, железо, цинк и йод. Отмечено, что первоцвет крупночашечный больше накапливает марганец, йод, цинк, п. весенний – железо [147].

Содержание красящих пигментов и липофильных веществ найдено в первоцвете крупночашечном [199].

Согласно данным литературы химический состав первоцвета крупночашечного в настоящее время практически не изучен, имеются только общие данные о содержании отдельных классов БАВ суммы сапонинов, витаминов, углеводов, каротина [149, 244].

1.1.3 Фармакологическая активность, применение представителей рода первоцвет в научной и народной медицине

В настоящее время в зарубежной практике официнальными являются первоцвет весенний и первоцвет высокий.

В РФ разрешены к применению листья первоцвета весеннего в качестве пищевого поливитаминного растительного сырья (ГОСТ 3166-76 «Листья первоцвета весеннего. Технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт»). Ранее в СССР существовал ОСТ 4379 от 1932 г. «Цветы первоцвета (баранчики, ключики)».

Корневище с корнями первоцвета весеннего входят в Европейскую фармакопею V изд., Немецкую фармакопею 2008 г., Британскую фармакопею 2008 г., а также включены в фармакопеи Польши, Венгрии, Чехословакии [239, 247, 260, 337].

Согласно Европейской фармакопее официнальным сырьем являются корневища с корнями *Primula veris* L. или *Primula elatior* (L.) Hill.

В Румынии официнальными являются листья и корневища с корнями первоцвета весеннего. Во Французскую фармакопею X издания включены цветки и подземные органы первоцвета весеннего [76].

Официнальным лекарственным растением в Чехословакии и Польше является первоцвет высокий *Primula elatior* [239, 247, 337].

Благодаря тритерпеновым сапонинам первоцвет весенний проявляет отхаркивающее и противовоспалительное действие. На его основе разрешены к применению и включены в Государственный реестр лекарственных средств

отхаркивающие лекарственные препараты, преимущественно зарубежного производства («Бронхикум эликсир», «Бронхикум сироп от кашля» («Rhône-Poulenc Rorer», Германия); «Гербион сироп первоцвета» («KRKA» д.д/ЗАО Вектор-Медика, Словения); «Бронхипрет ТП», «Синупрет», «Синупрет капли для приема внутрь» («Bionorica AG», Германия); «Пекторал» («Мефа», Швейцария); «Гербион Ментомед» («KRKA», Словения) [55, 333].

Известно, что первоцвет весенний проявляет также противовоспалительное, спазмолитическое, жаропонижающее, противокашлевое свойства [58, 94, 130].

Отвар из корневищ с корнями названного растения обладает седативным, легким слабительным действиями. Чай на основе первоцвета проявляет потогонные и мочегонные свойства [239].

Чай из цветов пьют при простуде, головной боли, бессоннице, параличе, болезни сердца, ревматизме и заболеваниях почек [239].

Есть данные об использовании водных извлечений из травы первоцвета весеннего при лейкемии, циститах, хронических нефритах, анацидных гастритах [148, 149, 150].

Кроме того, первоцвет весенний используется для лечения мигрени, при неврозах, неврастении [95, 98, 99].

В эксперименте водный и этанольный экстракты листьев названного растения обладают противосудорожными свойствами. Экстракт проявляет антивирусную активность [149].

Ряд работ посвящены изучению биологической активности растений рода первоцвет. Tokalov S.V. с соавторами (2004) провели исследования по изучению биологических эффектов эпикутикулярных флавоноидов, выделенных из цветков *Primula denticulate*. Изучено их влияние на лейкозные клетки человека (миелоидные клетки лейкемии человека (HL-60). Установлено, что исследуемые объекты обладали достаточным антиоксидантным потенциалом и выраженными цитостатическими свойствами.

Некоторые из его известных компонентов (5-гидроксифлавон, 2’-гидроксифлавон, 5,2’-дигидроксифлавон и 5,8-дигидроксифлавон) были до-

полнительно испытаны на определение биологической активности. Методами цитометрии изучено их влияние на клеточный цикл, митохондриальный мембранный потенциал и активные формы кислорода.

В качестве эталонного соединения был выбран флавонол кверцетин из-за его известных цитостатических свойств и своей активности в качестве поглотителя радикалов. Флавоны из *Primula denticulate* проявили меньшее по сравнению с кверцетином влияние на апоптоз клеток (до 40 мкМ). Установлено, что флавоноиды примулы обладали сильными цитостатическими свойствами даже при низких концентрациях.

Антиокислительные свойства показали количественную корреляцию с числом гидроксильных групп в исследуемых соединениях. Говоря о митохондриальном мембранном потенциале, авторы отметили, что ни один из флавонов примулы не показали сопоставимый с кверцетином эффект [234].

Najmus-Saqib Q. с соавторами (2009) определили противомикробные и цитотоксические свойства *Primula macrophylla.* В исследованиях использовались свежевыжатый сок, бензольная и этилацетатная фракции надземной части указанного растения. Доказана противогрибковая активность в отношении *T. longifusis* и *M. canis*. Антилейшманиозную активность (IC50 50ug/mL) определялась в сравнении со стандартным препаратом амфотерицином B. Цитотоксическая активность (LD50 47,919 (MU) г/мл) была определена в хлороформной фракции. В то время, как чистое соединение 2-фенилхромон (Flavone), выделенный из хлороформной фракции, показал хорошую активность (LD50 25 (MU) г/мл) против лейшмании и цитотоксичность (LD50 2,0116 (MU) г/мл) [304].

Компанией «Bionorica AG» проведены исследования по определению механизма противовоспалительного, противомикробного и противовирусного действия экстракта из цветков *Primula veris L.* (PFE). Доказано, что экстракт PFE ингибирует выработку простагландина, биосинтез циклооксигеназ (ЦОГ-1 и -2), биосинтез лейкотриенов в полиморфноядерных лейкоцитов человека. Кроме того, исследования показали, что экстракт PFE значительно снижает опосредованное Т-клетками высвобождение провоспалительных цитокинов IFN-(гамма)

и секрецию GM-CSF из мононуклеарных клеток периферической крови человека. Эффект носит дозозависимый характер. Это говорит о доказательном противовоспалительном воздействии экстракта первоцвета весеннего.

Seifert S. с соавторами (2012) выявлена антимикробная активность экстракта из первоцвета весеннего, изученная *in vitro* в отношении *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumonia*. В этих же исследованиях была показана противовирусная активность экстракта PFE в отношении *human rhinovirus (HRV), respiratory syncytial virus (RSV).*

Таким образом, проведенные исследования показали, что экстракт из цветков первоцвета весеннего воздействует губительно на целевые вирусы и бактерии, вызывающие инфекции дыхательных путей, проявляет противовоспалительное действие, тем самым имеет широкий терапевтический потенциал в этой области [286, 334].

В работах иранских исследователей Alinezhad H. с соавторами (2012) с целью определения защитных свойств растительных полифенолов первоцвета определена антикоагулянтная активность различных фракций из экстракта *Primula heterochroma Stapf.* В эксперименте использовались водные, этилацетатные, гексановые фракции экстракта указанного растения. Гемолитическая активность определялась в крови крыс самцов, извлеченной пункцией из сердца животных, индуцированной NaF. Все экстракты показали умеренные на уровне 0.8 мг/мл защитные эффекты против NaF-индуцированного гемолиза эритроцитов [229].

Alinezhad H. с соавторами (2012) установлена антиоксидантная активность экстракта из *Primula heterochroma Stapf.*, для чего воздушно-сухое сырье обезжиривали, экстрагировали 60%-ным ацетоном с последующим фракционированием следующими растворителями: н-гексан, этилацетат и вода. Антиоксидантную активность определяли *in vitro* на моделях Fe (2+)-индуцированного перекисного окисления липидов и окислительного стресса в мозге крыс.

Результаты исследования показали, что водная фракция проявила наибольший защитный эффект за счет уменьшения реактивных соединений тиобарбитуровой кислоты и более высокую активность в отношении Fe (2+) хела-

тирующих и ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрил гидразил) радикалов, по сравнению с другими фракциями. Гексановая фракция продемонстрировала более высокий защитный эффект в гемоглобин-индуцированной модельной системе. Результаты данного исследования показали, что *Primula heterochroma Stapf.* является богатым источником природных антиоксидантов [226].

Вышеупомянутыми иранскими авторами (Alinezhad H. и др.) также определена мембраностабилизирующая и антигемолитическая активность экстрактов из *Primula heterochroma Stapf.* В исследованиях использованы колориметрические и биохимические методы *in vitro* и *ex vivo*.

Результаты исследований показали, что экстракты указанного растения ингибируют процессы ПОЛ мембран липидов, белков, эритроцитов. Исследуемые объекты обладают заметным антигемолитическим эффектом на модели гемолиза эритроцитов, индуцированного перекисью водорода. Экстракты *Primula heterochroma Stapf.* повышают целостность и стабильность клеточных мембран эритроцитов крыс, существенно тормозя ПОЛ, сохраняя от гемолиза и увеличивая их количество в крови [289].

Первоцвет весенний разрешен к применению в гомеопатии

Комбинированный препарат «Синупрет» («Bionorica AG», Германия) содержит экстракт из цветков первоцвета весеннего, применяется как противовоспалительное, противовирусное гомеопатическое средство. Оказывает муколитическое (секретолитическое), отхаркивающее, противовоспалительное действие. Восстанавливает защитные свойства и уменьшает отек слизистой оболочки дыхательных путей. Способствует оттоку экссудата из придаточных пазух носа. Обладает иммуностимулирующей и противовирусной активностью. Показан при острых и хронических синуситах.

Растения рода первоцвет используются как компоненты лекарственных средств, применяемых при заболеваниях верхних дыхательных путей

В состав комбинированного препарата «Бронхикум эликсир» («Rhône-Poulenc Rorer», Германия) входит настойка корня первоцвета весеннего, обла-

дающего отхаркивающим, бронходилатирующим и противомикробным действием. Усиливает секрецию бронхиальных желез, уменьшает отек слизистой бронхов, что в совокупности приводит к уменьшению вязкости бронхиального секрета и улучшает его отхождение, облегчает дыхание. Показан при инфекционно-воспалительных заболеваниях дыхательных путей, сопровождающихся трудноотделяемой мокротой и приступообразным кашлем.

Комбинированный «Бронхикум сироп от кашля» («Rhône-Poulenc Rorer», Германия) содержит также настойку корней первоцвета весеннего. Препарат оказывает отхаркивающее, противовоспалительное, противомикробное действие, способствует снижению вязкости мокроты и ускорению ее эвакуации. Используется в качестве отхаркивающего средства в комплексной терапии воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, сопровождающихся кашлем с трудноотделяемой мокротой.

Первоцвет весенний входит в состав других европейских препаратов.

Комбинированный фитопрепарат «Синупрет капли для приема внутрь» («Bionorica AG», Германия) содержит экстракт цветков первоцвета (*Primula veris*), обладает муколитическим, отхаркивающим, противовоспалительнам действиями. Уменьшает отек слизистой оболочки дыхательных путей, восстанавливает защитные свойства. Способствует оттоку экссудата из придаточных пазух носа. Обладает иммуностимулирующей и противовирусной активностью. Применяется при острых и хронических синуситах.

Широкое применение в медицинской практике нашел препарат «Бронхипрет ТП» («Bionorica AG», Германия) в состав которого входит сухой экстракт корня первоцвета. Оказывает отхаркивающее, противовоспалительное, секретолитическое, бронхолитическое действие, способствует снижению вязкости мокроты и ускорению ее эвакуации. Показан при острых и хронических воспалительных заболеваниях дыхательных путей, сопровождающихся кашлем и образованием мокроты: трахеит, трахеобронхит, бронхит.

Двухкомпонентный «Гербион сироп первоцвета» («KRKA д.д/ЗАО Вектор-Медика», Словения) содержит водные экстракты корня первоцвета и тра-

вы тимьяна. Оказывает отхаркивающее, противовоспалительное, противомикробное действие, способствует уменьшению вязкости мокроты и лучшему отхождению мокроты. Показан в качестве отхаркивающего препарата в комплексной терапии: воспалительных заболеваний верхних отделов дыхательных путей с трудно отделяемой мокротой (бронхит, трахеит, трахеобронхит); при острых респираторных заболеваниях, сопровождающихся сухим кашлем.

Экстракт примулы входит также в состав комбинированного препарата «Пекторал» («Мефа», Швейцария), используемого при инфекционно-воспалительных заболеваниях дыхательных путей, сопровождающиеся кашлем с затрудненным отхаркиванием мокроты.

Настойка, порошок, салат из листьев первоцвета используют как источник витаминов С, А, Е, каротиноидов при гипо- и авитаминозах [29, 95, 127, 239].

Во многих странах первоцвет весенний используется как пищевое салатное растение, культивируется и реализуется как приправа.

Растения рода первоцвет используется как компоненты БАД

Экстракт корней первоцвета входит в состав пастилок «Гербион Ментомед» (KRKA, Словения) обладает отхаркивающим и муколитическим эффектами. Показан в качестве БАД-дополнительного источника витамина С, эфирного масла. Может использоваться в качестве дополнения в составе комплексной терапии острых респираторных заболеваний верхних дыхательных путей, сопровождающихся кашлем, а также кашля, связанного с курением с целью улучшения функционального состояния органов дыхания.

Обогащенный растительными экстрактами, минералами и витаминами БАД ЛедиЎС формула «Предменструальный синдром» («PharmaMed», США) содержит масло первоцвета. Устраняет различные проявления предменструального симптомокомплекса: отечности и болезненности молочных желез, вздутия живота, неврастенических расстройств; нормализует гормональный фон, мягко стимулирует яичники, обладает общеукрепляющим действием. Помогает справиться с повышенной психоэмоциональной и физической на-

грузкой. Показан при выраженном предменструальном синдроме; при мастопатии; при нарушениях менструального цикла (дисменорее).

Масло первоцвета входит в состав обогащенного минералами, витаминами БАД Леди'С формула «Персональная месячная система» («PharmaMed», США). Нормализует цикл, уменьшает болезненность менструаций, нормализует гормональный фон, улучшает обмен веществ, укрепляет иммунную систему, способствует восстановлению сна. Может использоваться в комплексном лечении мастопатии.

Первоцвет крупночашечный используется в народной медицине наравне с первоцветом весенним в качестве отхаркивающего, поливитаминного, спазмолитического, успокаивающего, диуретического средства. Первоцвет крупночашечный похож на европейский вид первоцвета весеннего, широко встречается в Южной Европе, на Кавказе и Иране, хорошо растет в культуре, является перспективным видом для внедрения [95, 97, 324].

Известно использование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного как компонента лекарственных сборов, применяемых при заболеваниях органов дыхания, для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, при обменных и эндокринных нарушениях, при ревматических заболеваниях, артритах, артрозах, при функциональных нарушениях в период менопаузы, при заболеваниях нервной системы и психических заболеваниях.

Таким образом, проведенный информационный анализ показал достаточную изученность и широкое применение подземных органов первоцвета весеннего в качестве отхаркивающих средств. У корневищ первоцвета весеннего определены противовоспалительная, антимикробная, противовирусная виды активности.

Однако, надземная часть первоцвета весеннего недостаточно изучена в отношении химического состава и биологических свойств, в связи с чем используются нерационально: является отходами фармацевтического производства. Листья же первоцвета весеннего, разрешенные к применению в РФ, используются ограниченно, преимущественно как пищевое поливитаминное сырье.

Актуальной является проблема внедрения в медицинскую практику дополнительных малоизученных близкородственных видов сырья с достаточной сырьевой базой на территории РФ, в том числе РБ, каковым может быть первоцвет крупночашечный. Сравнительное фармакогностическое исследование официнального первоцвета весеннего и малоизученного первоцвета крупночашечного является актуальной задачей. Это позволит решить важнейшие на сегодняшний день задачи расширения сырьевой базы РФ и создания эффективных препаратов на основе растительного сырья.

1.2. Ботанико-морфологическая, химическая, фармакологическая характеристика хмеля обыкновенного

1.2.1 Ботаническая характеристика хмеля обыкновенного

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* L.) принадлежит к семейству Cannabaceae (коноплевые), относящемуся к порядку *Urticales* (крапивоцветные).

Род хмель (*Humulus*) включает в себя хмель обыкновенный (*H. lupulus* L.), хмель сердцевидный (*H. cordifolius* L.), хмель американский (*H. americanus* R.), хмель японский (лазающий) (*H. japonicus* Sieb. et Zucc или *H. scandens* (Lour.) Merr.). Однако, согласно мнению известных ученых ботаников сродство трех видов хмеля обыкновенного, сердцевидного и американского, позволяет отнести их к разновидностям хмеля обыкновенного. Согласно современной классификации к роду хмель определяют виды хмель обыкновенный (*H. lupulus* L.) и хмель лазающий (*H. scandens* (Lour.) Merr.) [200, 201].

Хмель лазающий – декоративный вид хмеля, представляет собой однолетнюю лиану, не образует цветков в форме шишек. Распространен в Приморском и Хабаровском краях РФ, Японии, Китае и др. восточных странах.

Для хмеля сердцевидного характерны нерассеченные цельные листья сердцевидной формы, мелкие соплодия, отмечено низкое содержание лупулина. У малооблиственного хмеля американского листья пальчаторассеченной, на концах побегов – сердцевидной формы. Американский хмель не используется в медицинской практике [58, 68, 76].

Для хмеля обыкновенного европейской разновидности характерны листовые пластинки с сердцевидной и пальчато-рассеченной формой с количеством долей от 3 до 7, шишковидные соплодия с лупулиновыми железками и характерный специфический запах.

В мировой практике культивируется хмель обыкновенный, иные виды используются в селекционных целях [68].

Хмель обыкновенный – вьющееся травянистое растение с отмирающими зимой одним и множественными побегами, с многолетними корнями и корневищами, проживающими более 20 лет. Эволюционным превосходством растения является ежегодное формирование травянистой лианы с большой листовой массой, что возможно благодаря высокому физиологическому потенциалу. Благодаря этому стеблевая часть растения может отрастать до 20 см в сутки, в целом дикорастущие формы хмеля обыкновенного хорошо приспособлены к существованию в условиях затененности и высокой влажности. Не менее важной особенностью изучаемого растения является глубина проникновения главного корневища в грунт (до 4 м) и ширина распространения боковых корней на поверхности грунтовой части (до 3 м) [4, 6].

Дикорастущие растения могут иметь многочисленные побеги. Культивируемые же сортотипы хмеля обыкновенного, благодаря селекционным мероприятиям, имеют минимальное число побегов, что повышает урожайность растений. Культивируемые сорта хмеля преимущественно одностебельные.

Стебли хмеля обыкновенного ребристые длиной 3–12 м, толщиной 14–19 мм с многочисленными узлами и выходящими из них листьями различной окраски от зеленоватой до фиолетовой. Стебли завершаются завитками, на поверхности имеются крючкообразные шипы, преимущественно по граням. [68, 77].

Листья простые с черешками, у основания с небольшими прилистниками, расположены супротивно. Форма листовых пластинок от сердцевидной до пальчато-рассеченной. Край листа неравномерно пильчато-зазубренный с сетчатым жилкованием. На поверхности листа характерны многочисленные волоски, преимущественно вдоль жилок. На поверхности черешков и жилок – многочисленны крючкообразные шипы [94, 101, 102].

Мужские и женские соцветия расположены на различных растениях. Мужские особи имеют соцветия метельчатой формы, женские – колосовидные, гроздевидные или единичные, овальной формы. Цветет хмель с раннего лета до ранней осени. Плод – яйцевидный орешек. Во внутренней части женских соцветий расположены лупулиновые железки золотистой окраски, определяющие пищевую ценность растения. В неопыленных железках содержание терпеноидов выше и разнообразнее их качественный состав, в связи с чем производители изолируют женские особи от мужских, препятствуя их опылению [101].

Немаловажным признаком культивируемых сортов растений определяется время дозревания соплодий. Поэтому селекционерами созданы ранние, средние и поздние сортотипы.

В настоящее время определить ареал распространения дикорастущего вида хмеля обыкновенного практически невозможно. В связи с массовым применением хмеля обыкновенного населением разных стран в пищевых целях, медицинской практике и других отраслях народного хозяйства, легкостью введения его в культуру, растение постепенно стало заносным [80, 152].

Дикорастущие растения отмечены в зонах умеренных климатических поясов: на территории лесных зон материков Евразия, Северная и Южная Америка, Австралия. Дикорастущее растение встречается в лесных и лесостепных зонах, в широколиственных лесах, на опушках, в оврагах, среди кустарников, по берегам рек и болот [4, 6, 80].

Во многих странах, в частности Англии, Франции, Чехии, Германии, Китае, США, хмель издавна введен в производство, возделывается как техническая культура для нужд пищевой и фармацевтической промышленности.

Современный рынок хмеля в большей степени определяют три крупнейшие страны: Китай, США и Германия. США и Германия производят свыше 70% мирового хмеля [73].

В последние годы в основных хмелепроизводящих странах в связи с интенсификацией технологии производства достигнута высокая продуктивность хмельников, что обеспечивает окупаемость инвестиции в производстве и конкурентоспособность на мировом рынке.

Товарное производство хмеля в РФ расположено в одиннадцати административных районах. Основное производство сосредоточено в Чувашии (83%), Республике Марий Эл (до 10%), Алтайском крае (до 5%). Иные регионы – Нижегородская, Брянская, Омская, Ульяновская области, Хабаровский край [91]. На территории Республики Башкортостан также были заложены хмельники [4, 95, 96, 98, 132].

Главным же производителем хмеля на территории РФ является Чувашия, именно там наиболее благоприятные природно-климатические условия. Из существующих на сегодняшний день хмельных плантаций на территории РФ (1808 Га), на территории Чувашии расположено 1520 га [73].

Важнейшим показателем качества, определяющим потребительские свойства хмеля для пищевой и особенно пивоваренной промышленности, является содержание горьких кислот, особенно α-кислоты. По количественному содержанию горьких кислот отмечают три сортотипа хмеля обыкновенного: ароматический, горько-ароматический и горький [68, 110, 208].

Ароматический сортотип (сорта «Ранний», «Михайловский», «Истринский», «Клон 18» и др.) имеет 3–6% содержания α-кислот, значительное содержание эфирных масел до 4%, характеризуется выраженным хмелевым ароматом.

В горько-ароматическом сортотипе (сорта «Крылатский», «Полесский», «Сумерь» и др.) имеется значительное содержание горьких кислот (6–10% α-кислот), достаточное содержание эфирных масел (0.5–2.65%), характерный хмелевой аромат. Эфирное масло указанного сортотипа содержит смолистые и бальзамические вещества.

Растения горького сортотипа (сорта «Подвязный», «Сильный», «Гранат») с содержанием α-кислот более 10%, обладают менее выраженным хмелевым ароматом, терпеноиды представлены в основном смолистыми веществами [177].

Не менее важным показателем качества является соотношение доли α-кислот к доле общих хмелевых смол. Для растений горького сортотипа он должен быть не менее 35%, для ароматического – не менее 20% [104, 177, 293].

Для нужд пивоваренной промышленности преимущественно используются растения горького сортотипа, для нужд пищевой промышленности – горько-ароматического [88, 177].

В фармацевтической промышленности применяют хмель обыкновенный независимо от сортотипа, в том числе и от дикорастущих растений.

1.2.2 Химический состав хмеля обыкновенного

Согласно данным литературы пищевые свойства и фармакологическую активность хмеля обыкновенного определяют горькие кислоты (производные ацилфлороглюцидов), эфирные масла, полифенольные соединения, аминокислоты, витамины и др. группы БАВ [68, 105].

Специфичной группой БАВ хмеля обыкновенного являются производные ацилфлороглюцидов (АФГ), представляющие собой смолистые вещества мягких и твердых фракций, сконцентрированных в лупулиновых железках соплодий.

Ацилфлороглюциды включают в себя α- и β- кислоты, имеющие 2 и 3 пренилированных остатка в своем составе соответственно. Из α-кислот для хмеля обыкновенного типичны гумулон, прегумулон, адгумулон, когумулон, 4-дезоксигумулон, постгумулон, из группы β-кислот – лупулон, прелупулон, адлупулон, колупулон, постлупулон [39, 150, 214, 238, 342].

Содержание АФГ зависит от условий произрастания, местообитания, фазы вегетации растения, определяет принадлежность к сортотипу. Их содержание в мужских особях незначительное.

Ключевое значение имеет содержание α-кислоты, определяющее ценность и товарные свойства сырья. По данному показателю производители определяют степень дозревания, точные сроки заготовки и хранения сырья [81, 85].

Одной из основных проблем производства и переработки хмеля является окисляемость α- и β-кислот в процессе хранения с образованием гулупонов, гумулиновых кислот и увеличением количества твердых смол. Это приводит к непригодности сырья.

Содержимое лупулиновых железок помимо АФГ представлено иными терпеноидными соединениями: сесквитерпенами, иридоидами и др.

Следующая по значимости группа БАВ, определяющая фармакологические и пищевые свойства хмеля обыкновенного, это эфирное масло, преимущественно локализованное в лупулиновых железках. В составе эфирного масла отмечены монотерпеноиды: α-пинен, борнеол, β-пинен, геранилацетат, линалилвалерианат, линалиацетат, цинеол; в соплодиях и соцветиях – мирцен, лимонен, гераниол, линалоол, эвгенол и др. Сесквитерпеноиды: гумулол, гумулен, гумуладиенон, гумуленон-II, α-кариофиллен, кариофиллен, 14-гидрокси-β-кариофиллен, β-элемен, α-кадинен, фарнезен, куркумен, кадинен и др. [34, 150, 263, 339].

Отмечено значительное содержание специфического для соплодий хмеля обыкновенного гумулена (16–27%), имеются селины, α- и β-селинены, пинен, γ-элемен, серусодержащий 4,5-эпикариофилен,1,2-эпи-тиогумулен, 8,9-эпи-тиогумулен [68, 104, 258, 314, 317].

Качественный и количественный состав эфирных масел зависит от местообитания, условий произрастания, фазы вегетации растения, определяет принадлежность к сортотипу. Качественный состав эфирных масел хмеля обыкновенного контролируется на уровне генотипа растения [104, 177, 293].

Перспективным классом БАВ хмеля обыкновенного являются полифенольные соединения, представленные флавоноидами, изофлавоноидами, пренилированными флавоноидами и халконами, лейкоантоцианидинами, фенолкарбоновыми кислотами, катехинами, стильбенами и др. соединениями. Содержание флавоноидов отмечено в соплодиях, соцветиях, листьях и стеблях растения.

Согласно литературным данным соплодия хмеля содержат флавоноиды (в пересчете на рутин) от 0,15 до 0,86% [47, 82].

Из флавоноидов в соплодиях отмечены: кверцетин, кверцитрин, гиперозид, рутин, астрагалин, 3-рамнозилглюкозид и 3-рамнозилдиглюкозид кемпферола, 3-рамнозилглюкозид кверцетина, 6-геранилнарингенин, 5,7-ди-О-метилнарингенин, 8- геранилнарингенин [5, 23, 46, 47, 48, 68, 238].

Zhang W.K. с соавторами (2013) выделили и идентифицировали дигидрокверцетин (таксифолин), нарингенин, халконаригенин, акацетин, кверцетин-3-О-β-D-галактопиранозид, 6-пренилнарингенин [265].

Лейкоантоцианидины представлены лейкодильфинидином, лейкоцианидином. Из антоцианов отмечены цианидин и дельфинидин (в листьях антоцианов до 17%) [150].

Отличительной особенностью хмеля обыкновенного является наличие особой группы БАВ пренилированных халконов и флавонов, секретируемых аналогично терпеноидам, лупулиновыми железами. Именно эта группа БАВ обусловливает эстрогеноподобные свойства хмеля обыкновенного.

Среди пренилированных халконов в соплодиях отмечены: ксантогумол (3´-пренил-6´-О-метилхалконарингенин), 5´-пренилксантогумол, 4´-О-метилксантогумол, α-, β-дигидроксантогумол, ксантогумолы B, C, D, E. Наличие ксантогумола, основного пренилированного халкона, в соплодиях хмеля может достигать в пересчете на сухое сырье до 1,0% [5, 23, 46, 68, 345].

В североамериканском *Humulus lupulus var.cordifolius* отмечены отсутствующие в европейских сортотипах 4,6-ди-О-метилхалконарингенин, ксантогаленол, 4-О-метилксантогумол [68].

Из пренилированных флавонов идентифицированы: 8-пренилнарингенин (хопеин), 6- пренилнарингенин, 6,8-дипренилнарингенин, изоксантогумол, 7-О-метил-6-пренилнарингенин, 7-О-метил-8- пренилнарингенин и др.

Stevens J.F. et al. (2000) изучив множественные образцы *H. lupulus var. cordifolius* из Японии, *H. lupulus* из Северной Америки и Европы, показали наличие 11 соединений пренилированной природы, 10 были идентифицированы как флаваноны. Во всех образцах сырья были идентифицированы 3´-пренил-4´-О-метилхалконарингенин (ксантогаленол), 4´-О-метилксантогумол, 4´,6´-ди-О-

метилхалконарингенин, ксантогумол был идентифицирован как основной халкон. По данным этих же авторов листья *H. japonicas* Sieb. et Zucc. флоры Восточной Азии, листья *H. lupulus* не содержали пренилированные флавоны [311].

Среди катехинов отмечены: катехин, галлокатехин, эпикатехин, (-)-эеикатехин [227, 311].

В хмеле обыкновенном имеются процианидины: эпикатехин-(4β→8)-катехин (процианидин B_1), эпикатехин-(4β→8)-эпикатехин (процианидин B_2), катехин-(4α→8)-катехин (процианидин B_3), катехин-(4α→8)-эпикатехин (процианидин B_4), галлокатехин-(4α→8)-галлокатехин и др. [347]. Методами масс-спектрометрии отмечено присутствие олигомерных процианидинов, октамеров и гептамеров. Taylor A.W. et al. (2003) в хмелевом экстракте определили наличие процианидинов с числом полимеризации 22.3 [68, 281].

О наличии стильбенов в соплодиях хмеля обыкновенного впервые было сообщено Callemien с соавторами (2003). Наличие транс- и цис-ресвератрола, транс- и цис-пицеида в хмеле может обусловить дальнейшее расширение области применения хмеля и хмелепродуктов. Schwekendiek A. с соавторами (2007) идентифицировали ресвератрол и пицеид в листьях и соцветиях хмеля обыкновенного [251].

Анализ различных образцов сырья хмеля обыкновенного, проведенный Jerkovic et al., показал, что содержание ресвератрола в сырье повышается с уменьшением в нем количества α-кислот, то еесть в сырье хмеля обыкновенного горьких сортотипах содержание ресвератрола меньше, чем в ароматических [255].

Из производных фенолкарбоновых кислот отмечены: кофейная, галловая, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая, оксикумаровая, кумаровая, пара-аминобензойная, ванилиновая, хинная кислоты [93, 150].

Содержание полифенольных соединений максимально в фазу начала формирования соплодий [47].

Имеются данные о наличии алкалоидов в соплодиях хмеля обыкновенного, но сведения об их локализации и структуре противоречивы. Некоторые

авторы указывают о содержании пирролизидиновых, пиридиновых и изохинолиновых алкалоидов в шишках хмеля обыкновенного [46, 272].

Есть данные о наличии в листовых пластинках хмеля незначительного количества каннабидиола с обезболивающим, седативным и противосудорожным действями [68]. Алкалоид гумулин идентифицирован в соплодиях, горпеин в плодах хмеля обыкновенного, азотистое вещество трибензиламин было также отмечено в указанном растении [150].

Горошко О.А. с соавторами (2000, 2005) в соплодиях хмеля идентифицированы аминокислоты: аланин, глутаминовая кислота, глицин, аспарагин, тирозин, триптофан, пролин, цистеин и др. [46, 47].

Из группы стеринов идентифицированы жирные кислоты: каприловая, изовалериановая, каприновая, пеларгоновая кислоты; (-)-2-метилбутиловые эфиры пеларгоновой, гераниевой, изомасляной кислот; в плодах – арахидоновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, бегеновая кислоты, а также ситостерин-3-О-бета-глюкопиранозид [259, 329].

Есть данные об идентификации эргостерола и эргокальциферола в хмеле обыкновенном [253].

В соплодиях хмеля определены витамины: группы В (B_1, B_3, B_6), Н, РР, С. В фазу формирования соплодий содержание аскорбиновой кислоты может достигать 63,6 мг%. Из жирорастворимых витаминов отмечено наличие витамина Е (20–70 мг%) и каротиноидов [46].

Из минеральных элементов отмечены: кальций, калий, натрий, железо; из группы микроэдементов: селен, цинк, марганец, хром, медь и др. [101].

Данные по исследованию химического состава стеблей и листьев хмеля обыкновенного незначительные. Есть данные о содержании отдельных классов БАВ. Так, стебли хмеля обыкновенного содержат полисахариды (лигнины, грубые пищевые волокна), растительные стерины [58, 75].

В листьях хмеля отмечены следы алкалоидов, углеводы, антоцианидины до 17%, лейкоантоцианидины (лейкодельфинидин, лейкоцианидин), квер-

цетин, кемпферол; фенолкарбоновые кислоты (кофейная, n-кумаровая), витамины С, B_1, B_2, каротиноиды [150].

В листьях *H. scandens* (Lourr.) Merr. (*H. japonicus* Siebold et Zucc.) идентифицированы 7-O-β-D-глюкозид лютеолина, витексин, космосеин [150].

Мазурец С.І. с соавторами (2012) исследовали липофильную фракцию из листьев хмеля обыкновенного. Количественное содержание липофильной фракции в растительном сырье составило 7%. Установлено наличие хлорофиллов и каротиноидов, исследован состав жирных кислот (лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, бегеновая, линолевая, линоленовая, олеиновая). Определен широкий спектр антимикробной активности липофильной фракции [112].

Garcia-Herrera P. С соавторами (2013) исследовали молодые побеги хмеля обыкновенного, употребляемого в составе средиземноморской диеты в Испании, на содержание питательных веществ. Определено содержание β-каротина, лютеина, неоксантина и виолаксантина. По содержанию указанных веществ побеги хмеля не уступают другим растениям, составляющим основу средиземноморской диеты (*Asparagus acutifolius* L., *Bryonia dioica* Jacq., *Tamus communis* L.). Исследования показали, что побеги дикорастущих растений по качественному и количественному составу указанных веществ не уступают культивируемым коммерческим овощным культурам [245].

1.2.3 Фармакологическая активность, применение хмеля обыкновенного в научной и народной медицине

Разнообразный богатый состав БАВ хмеля обыкновенного определяет его высокий лечебный и профилактический потенциал, широкое применение в медицинской практике [23, 36, 38, 44, 114, 165, 172, 196, 217].

Так, в РФ разрешены к применению «Хмеля соплодия» ФС 42-0147-05; «Экстракт шишек хмеля» ФС 42-2631-89; «Хмеля экстракт жидкий» ФСП 42-8271-06 (ООО «Фармстандарт-Фитофарм-НН»); «Хмеля масло» ВФС-42-2445-95. В пищевой промышленности разрешены к применению хмель-сырец,

хмель молотый гранулированный и брикетированный, хмель прессованный, лупулиновые препараты, хмель спиртовый и CO_2 экстракты. Активно используется хмель в хлебопекарном, кондитерском производствах.

Издавна хмель использовался в качестве седативного, антимикробного, антибиотического, желчегонного, противовоспалительного, гормоноподобного средства.

Производные АФГ (горькие кислоты) повышают секрецию желудочного сока, возбуждают аппетит, совместное присутствие с эфирными маслами и полифенольными соединениями, обусловливают спазмолитическое, противовоспалительное, антимикробное, седативное действия растения, в связи, с чем хмель обыкновенный включается в состав лекарственных средств для лечения заболеваний ЖКТ. Имеются данные, об антиульцерогенной активности хмеля обыкновенного [77, 189, 196, 248].

Широко известны антимикробные и антибиотические свойства хмеля обыкновенного. Терпеноиды (монотерпены, сесквитерпены и горькие кислоты) угнетают развитие грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Экспериментально доказано, что лупулиновый порошок подавляет активность *Streptococcus pneumoniae* и *Str. Faecalis*, *Bacillus cereus* и *Bac. Subtilis*, *Bac. Anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeicticus*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium dyphtheriae var. gravis*, *Sarcina lutea*. Антимикробная активность гумулона и его производных менее выражена [78, 305, 310, 325].

Yamaguchi N. с соавторами (2009) исследовали ксантогумол, гумулон, лупулон для лечения акне. В качестве основных бактерий, вызывающих акне, были выбраны *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* и *Staphylococcus pyogene*. Результаты показали умеренно-сильное ингибирующее действие на указанные штаммы. Кроме того, у названных веществ была определена антиоксидантная активность [344].

Известны данные об антимикобактериальной активности смеси насыщенных и ненасыщенных жирных кислот хмеля обыкновенного. Исследования

проводились с использованием быстрорастущих видов микобактерий *Mycobacterium fortuitum* [329].

Экстракт соплодий, лупулон, гумолупулон, ксантогумол проявляют антифунгальную и антибактериальную активность. Исследования показали, что лупулон (9–62 мкг/мл) и гумулон (20–800 мкг/мл) угнетают развитие дерматомицетов, но не действуют на грибы рода кандида; ксантогумол проявляет антипротозойную активность, жирные кислоты: линолевая, арахидоновая, пальмитиновая, бегеновая – антифунгинальную [329].

По данным литературы α- и β-кислоты хмеля проявляют антибиотические свойства.

Есть сведения о том, что ксантогумол обладает противовирусной активностью. Пренилированные халконы подавляют риновирус (TI = 4,0),
вирус диареи крупного рогатого скота (модификации вируса гепатита С человека HCV, TI = 6,0), вирус простого герпеса типа 2 HSV-2 (TI ≥ 5,3), в отношении вируса простого герпеса типа 1 HSV-1 (TI ≥ 1,9) активность указанных веществ менее выражена. У β-кислот и сесквитерпеноидов данный вид активности не выявлен. В связи с этим пренилированный халкон ксантогумол и пренилированный флавон изоксантогумол рассматриваются как источники создания новых противовирусных средств [68, 240, 271].

Akazawa H. с соавторами (2012) показали, что выделенные из хмеля обыкновенного флороглюцины, флаваноны, халконы и тритерепеноиды оказывают губительное воздействие на вирус Эпштейна-Барра [223].

Монотерпеноиды и сесквитерпеноиды эфирных масел хмеля обыкновенного обусловливают успокаивающие свойства растения, что позволяет широко использовать его в качестве седативного средства. Zanoli P. с соавторами (2005), изучая влияние CO_2 –экстракта хмеля обыкновенного на ЦНС, определили, что α-кислоты хмеля обыкновенного являются ответственными за усиление фенобарбиталового сна и антидепрессивные свойства хмеля [306].

Ceremuga T.E. с соавторами (2013) провели экспериментальное проспективное рандомизированное исследование, определили анксиолитическое действие ксантогумола, механизм которого изучается в настоящее время [290].

Разуваева Я.Г. с соавторами (2010) экспериментально определили стресспротективные свойства сухого экстракта шишек хмеля обыкновенного. Курсовое введение экстракта хмеля (300 мг/кг) оказывает стресспротективное действие на фоне иммобилизационного стресса, снижая проявления стрессорных отклонений во внутренних органах животных [180].

Вышеназванные авторы исследовали влияния сухого экстракта шишек хмеля обыкновенного на функциональное состояние нервной системы у белых крыс. Изучали влияние экстракта хмеля на спонтанную двигательную активность, на ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональность животных (тест «открытое поле»). Исследования показали, что экстракт (200 и 300 мг/кг) повышает ориентировочно-исследовательское поведение, ослабляет пассивно-оборонительную реакцию, снижает у животных уровень тревожности. Эффект сопоставим с эффектом экстракта валерианы. Введение экстракта в дозе 200 мг/кг стимулирует когнитивные функции у крыс (повысилась выработка условного рефлекса, сохранность памятного следа в отдаленные после обучения сроки в тесте УРПИ) [34].

Для полифенолов и терпеноидов хмеля обыкновенного характерны бактерицидные, противовоспалительные, спазмолитические, диуретические свойства, благодаря которым он используется для лечения почечных и мочекаменных заболеваний [77, 102, 248].

Имеются данные о противовоспалительной активности фенольных соединений хмеля обыкновенного. Глюкопиранозиды 1-(3-метилбутирил) флороглюцина и 5-(2-метилпропаноил) флороглюцина обладают противовоспалительными свойствами. Указанные вещества блокируют медиаторы воспаления циклооксигеназы-1 и -2 [222].

В исследованиях Hougee S. с соавторами (2006) доказана противовоспалительная активность CO_2 –экстракта хмеля обыкновенного, обусловленная подавлением активности ЦОГ-2 и продукции ПГЕ-2 [321].

Van Cleemput M. с соавторами (2009) показали, что пренилированные флавоноиды, горькие кислоты хмеля обыкновенного, ингибируя пролифера-

цию клеток кровеносных сосудов, путем индукции апоптоза и за счет активации цитохрома P450 детоксикационных ферментов, проявляя противовспалительные свойства, нормализуя метаболические процессы, могут быть предложены как средства для лечения сахарного диабета, сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома [282].

Yui K. с соавторами (2013) изучали влияние 70-дневной диеты, обогащенной полифенолами из хмеля обыкновенного, на состояние крыс популяции OLETF (OtsukaLong-EvansTokushimaFatty), отличающихся значительно большим потреблением пищи, склонных к диабету 2 типа. Исследования показали, что обогащенная диета снижала массу тела у животных испытуемой группы, по сравнению с контрольной, подавляла деятельность синтетазы печени, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и малеинового фермента. У животных, получавших полифенолы хмеля, снижался уровень глюкозы в крови (на 40-й день) и гликированного гемоглобина A1c, Hb_{A1c} (на 70-й день), по сравнению с контрольной группой. Таким образом, полифенолы хмеля улучшают функцию печеночного метаболизма, метаболизма жирных кислот, глюкозы и воспалительной реакции, сопровождающей увеличение массы жировой ткани у крыс популяции OLETF [256].

Выявлено важное свойство ксантоглумола ингибировать продуцируемую эндотелиоцитами и макрофагами NO-синтазу. В тестах с нейронной NO-синтазой доказано, что проантоцианидины хмеля блокируют выработку NO. Наибольшую активность проявил процианидин B_2, а катехин, эпикатехин и процианидин B_3 не оказали влияния на выработку NO [68, 220, 288].

Для хмеля обыкновенного характерна капилляропротективная активность.

Экспериментально доказано, что водный экстракт соплодий хмеля обладает противоаллергической активностью.

В последние годы активно исследуются антиоксидантные свойства хмеля и хмелепродуктов.

Yamaguchi N. с соавторами (2009), исследуя антиоксидантные свойства ксантогумола, гумулона и лупулона, показали, что ксантогумол обладает

более высоким антиоксидантным потенциалом по сравнению с производными АФГ [346].

Пренилированные халконы и флавоны хмеля обыкновенного угнетают окисление ЛПНП, инициируемое $CuSO_4$; а также в системе Fe^{2+}/ аскорбат (более выраженно, чем в системе Fe^{3+}-АДФ/НАДФН) [5, 48, 68, 114, 143, 242, 247].

Оказалось, что пренилированные халконы более активны, чем пренилированные флавоны нарингенин, гинестеин, а ксантогумол по величине антиокислительной активности эффективнее витамине Е. Есть данные о том, что пренилированные флавоноиды могут выступать как антиоксиданты в низких концентрациях 5–25 мкМ, по мере увеличения концентрации они могут проявлять прооксидантные свойства [114].

Антиоксидантные свойства изучаемого объекта определяет также ресвератрол – известный фитоалексин, повышающий резистентность организма к болезнетворным микроорганизмам, определяющий новые полезные свойства хмеля обыкновенного [251].

Olas B. с соавторами (2012) исследовали *in vitro* влияние экстракта хмеля обыкновенного на тромбоциты человека, индуцированные пероксинитритом ONOO (-). Исследования показали, что экстракт из шишек хмеля, так же как и ресвератрол, вызывает отчетливое снижение липидов тромбоцитов, индуцированной пероксидации ONOO (-) [331].

Пренилированные халконы (ксантогумол, 5-пренилксантогумол в дозе 5 мкМ), обладающие антиоксидантной активностью в отношении ПОЛ, проявляют гепатозащитные свойства у крыс при токсическом воздействии, другие же халконы, халконарингенин и десметилксантогумол, цитопротективной активности не проявили. Dietz B.M. с соавторами (2013) показали, что ксантогумол индуцирует фермент детоксикации NAD(P)H-хинон оксидоредуктазу (NQO1) *in vitro, in vivo.* Исследования показали, что соплодия хмеля и ксантогумол проявляют цитопротектрное действие на печень [196].

Настой соплодий хмеля обладает антигипоксическими свойствами [140]. Кабачук Н.В. с соавторами (2009) исследовали антигипоксическое действие

сухого экстракта из соплодий хмеля обыкновенного (200 и 300 мг/кг) при гемической и гистотоксической гипоксии [71].

Доказано положительное влияние препаратов из хмеля на обменные процессы организма человека.

Издавно было известно о гормональной активности хмеля обыкновенного. Благодаря пренилированным флавонам – 8-пренилнарингенин (хопеин) (8-ПН), 6-пренилнарингенин, 8-изопренилнарингенин (8-ИПН), 8-геранилнарингенин, 6,8-дипренилнарингенин, 6-изопренилнарингенин, хмель проявляет эстрогеноподобные свойства [162, 236, 279, 299, 320, 327, 328].

Наиболее активными и изученными в данном аспекте являются 8-ПН и 8-ИПН. Экспериментально установлено, что 8-ПН активнее взаимодействуют с α-рецепторами, чем с β-рецепторами матки крыс. Данные указывают, что 8-ПН превосходят по эстрогенной активности генистеин. Эстрогенная активность указанных веществ ингибируется антагонистом рецепторов эстрогенов C182.780 [162, 221]. Экспериментально *in vitro* показана антиандрогенная активность 8-ПН; в опытах отмечено угнетение полового поведения крыс [162, 250, 330, 348].

Имеются данные о клинических исследованиях применения препаратов хмеля в период менопаузы у женщин. Так, в плацебоконтролируемых исследованиях изучалась эффективность применения 8-ПН (капсулы по 100 и 250 мкг) у женщин (n=67) в течение 6–12 недель. Эффективность определяли по индексу Купермана, включающего в себя более 10 симптомов менопаузы (тахикардия, приливы, депрессия, сухость слизистой влагалища и др.). Результаты показали, что применение капсул с 8-ПН существенно ослабляло симптомы менопаузы, отмечался дозозависимый эффект. Эффективность препарата с дозой 250 мкг 8-ПН была выше препарата с дозой 100 мкг на 5–10% [162, 246].

В тесте изучения влияния на проницаемость сосудов матки *in vivo* доказано, что большей активностью обладает 8-ИПН [299]. Введение мышам с удаленными яичниками в питьевую воду 8-ИПН привело к стимуляции влагалищного эпителия. Отмечено наличие эффекта в дозе 100 мкг/мл, что в 500 раз превышает концентрацию 8-ИПН в пиве [68].

Figard H. с соавторами (2007) проведены экспериментальные исследования по изучению влияния диеты, обогащенной *Humulus lupulus* L., генистеином 1,92 и дайдзеином 1,24 мг/кг корма, на метаболизм костной ткани (исследовались биохимические показатели крови и показатели минеральной плотности костной ткани). Доказано, что диета, обогащенная хмелем, не уступает эталонным фитоэстрогенам, улучшает биохимические показатели крови и повышает показатели минеральной плотности костной ткани [257].

Известны андрогенные свойства CO_2 экстрактов соплодий хмеля. Имеются данные о том, что этанольные экстракты из хмеля увеличивают выработку тестостерона, массу семенников и придаточных желез у крыс. Однако структура соединений ответственных за данный эффект не установлена [68]. Исследования показали, что андрогенная активность у веществ 6-ИПН, 8-ИПН, ксантогумол, изоксантогумол, 6-геранилнарингенин, 3-геранилхалконарингенин, 8-геранилнарингенин, 6,8-диизопренилнарингенин и 4-О-метил-3-изопренилхалконарингенин не отмечена, для них также не характерны прогестагенные свойства [68].

В последние годы активно изучаются пренилированные халконы и флавоны как перспективные соединения с хемопревентивными свойствами, предотвращающими образование злокачественных опухолей.

Пренилированные флавоноиды образуются из пренилированных халконов при термической изомеризации [298].

Указанные группы БАВ разрушают лейкозные клетки человека HL-60 (IC50 8,67 мкг/мл), индуцируя Fas-опосредованный апоптоз. Пренилированные флавоноиды проявляют цитотоксическую активность за счет индукции протеолитических ферментов прокаспаз, инициирующих ранний апоптоз [346].

Механизмом антипролиферативного действия пренилированных флавоноидов хмеля является способность ингибировать ферменты цитохрома Р-450, активизирующие канцерогенные вещества. В исследованиях C.L. Miranda, M.C. Henderson с соавторами (2000) показана противоопухолевая активность ксантогумола, изоксантогумола, 8-ПН. Установлено, что указанные вещества

ингибируют активность Р-450 1А2-зависимой ацетанилид-4-гидроксилазы человека. В работах M.C. Henderson с соавторами (2000) и R.J. Rodriguez с соавторами (2001) показано, что ксантогумол в дозе 10 мкМ полностью ингибирует активность 7-этоксирезоруфин О-диэтилазы CYP1A1, CYP1B1. Но эти же вещества оказались слабыми ингибиторами в отношении CYP3A4, CYP2E1. 8-ИПН и изоксантогумол снижают количество ковалентно связанного радиоактивно меченого афлатоксина B_1 (канцерогенного вещества) с микросомальными белками [114, 287].

Hemachandra LP. С соавторами (2012) показали, что ксантогумол и 8-ПН угнетают эстроген-индуцированную злокачественную трансформацию MCF-10A, тем самым представляют интерес для дальнейшего изучения в качестве химиопрофилактических средств [283].

G. Gerhauzer с соавторами (2002) установлены антиканцерогенные свойства ксантогумола, реализуемые на этапе инициации и прогрессирования опухоли, изменяя активность ферментов, участвующих в канцерогенезе. Данные процессы реализуются через ингибирование синтеза ДНК, замедление клеточного цикла на S-фазе, инициации апоптоза и дифференцирования клеток.

Кроме этого доказано, что ксантогумол проявляет антиоксидантную активность в отношении пероксильных и гидроксильных радикалов, окиси азота и супероксианионрадикалов [114].

Экспериментально показано, что ксантогумол индуцирует фермент второй фазы печеночной детоксикации хинонредуктазу (модель культуры клеток гепатомы мышей Hepa 1c1c7). Сравнительный анализ пренилированных халконов и флаванонов хмеля показал, что данные соединения одинаково повышают активность хинонредуктазы [114, 343].

Доказано, что пренилированные халконы являются скавенджерами различных форм свободных радикалов O_2, тем самым тормозят свободнорадикальные изменения проканцерогенов. В модели культуры тканей молочной железы мышей выявлено свойство ксантогумола предотвращать пренеопластические изменения, вызванные канцерогенами [68, 114].

Известны результаты исследований влияния таких пренилированных флавоноидов как изоксантогумол, ксантогумол, дегидроциклоксантогумол (0,1 –100 мкМ) на культуры клеток рака толстой кишки (HT-29), рака молочной железы (MCF-7) и яичников человека (A-2780), доказано дозозависимое угнетение роста указанных клеток. Указанные флавоноиды в дозе, превышающей 100 мкМ, показали цитотоксический эффект [224, 227].

Monteiro R. с соавторами (2007) показали, что ксантогумол, изоксантогумол, 8-ПН подавляют активность ароматазы и снижают образование эстрогена [302].

Дополнительный механизм, определяющий противоопухолевую активность ксантогумола, заключается в его способности ингибировать липооксигеназу, циклооксигеназу, а также антиэстрогенные свойства. Названные авторы объясняют это способностью халкона ксантогумол легко переходить в циклический флаванон изоксантогумол [114].

Kac J. с соавторами (2008) исследовали антимутагенные свойства ксантогумола. Показано, что ксантогумол в тест-системах гепатомы человека клеток HepG2 фракции E4d в 10mug/мл полностью предотвращает образование IQ индуцированных повреждений ДНК [225].

Wang W.S. с соавторами (2008) показал, что пренилированные халконы проявляют цитотоксическую активность в отношении рака желудка человека куп-823 и карциномы печени клеток HepG2 [340].

Установлена способность ксантогумола угнетать канцерогенез. Для 8-ИПН характерна антиметастатическая и антиинвазивная активность. В связи с этим, проводятся исследования по биодоступности, фармакокинетике, биотрансформации 8-ИПН при пероральном применении, исследуются вопросы безопасности.

Учитывая свойства пренилированных флавоноидов угнетать метаболическую активность канцерогенов, индуцировать апоптоз опухолевых клеток, весьма очевидна перспективность их дальнейшего изучения и внедрения в качестве химиопрофилактических средств.

Говоря об изученности биологической активности иных органов растения хмеля обыкновенного, листьев и стеблей, следует отметить незначительное количество публикаций.

Известны работы по изучению сорбционной активности указанных органов растений. Отмечены достаточные сорбционные свойства в отношении свинца и других солей тяжелых металлов. Объясняется это способностью карбоксильных групп фенольных соединений хмеля вступать в реакцию комплексообразования с солями тяжелых металлов. При взаимодействии вегетативной сырьевой массы с испытуемыми растворами сорбция отмечается уже в течение первых 5 минут. Установлено, что 1,0 сырьевой биомассы листьев хмеля может сорбировать 74,2 мг свинца. Исследовалась зависимость сорбционной активности в зависимости от pH среды, оптимальным значением оказался показатель pH 5,0. Аналогичны результаты исследований и по стеблевой части растений. Десорбция связанных ионов Pb (до 99%) может быть вызвана цитратом Na. Результаты данных исследований показывают на возможность использования отходов производства хмеля для очистки воды от солей тяжелых металлов [68, 230, 335].

В некоторых европейских странах (Бельгия, Румыния) молодые побеги и листья хмеля используются как приправа для супов и соусов, изготовления салатов. Указанные части растений используются в сельском хозяйстве как кормовая добавка. Стеблевая часть хмеля используется для производства низкосортной бумаги, грубой пряжи, употребляемой в изготовлении веревок и мешковин [77, 78].

Проведенный информационный анализ показал всестороннюю изученность соплодий хмеля обыкновенного, что и определяет их широкое применение в медицинской практике, пищевой и пивоваренной промышленностях. В фармацевтическом производстве используются соплодия дикорастущего вида и культивируемых сортов хмеля обыкновенного.

Листья хмеля обыкновенного имеют большую вегетативную массу и являются отходами хмелепроизводства, требующими затраты на утилизацию. Химический состав и биологические свойства листьев хмеля обыкновенного изучены недостаточно, что ограничивает их область применения и объясняет низкий уровень переработки сырья хмеля. В связи с этим углубленное изучение химического состава и биологических свойств, решение вопросов стандартизации листьев хмеля обыкновенного являются актуальными задачами.

***

Анализ состояния изученности химических, биологических и фармакологических свойств растений рода первоцвет и рода хмель показал, что данные виды широко распространены и культивируются на территории РФ, имеют достаточную сырьевую базу. Указанные растения содержат богатый комплекс БАВ, широко используются в научной и народной медицине, пищевой и пивоваренной промышленностях.

Использование пищевых и лекарственных растений в медицинской практике, пищевой промышленности и иных отраслях народного хозяйства не всегда предусматривает возможность получения комплекса БАВ из одного вида сырья или использования различных частей одного растения. Поэтому проблема рационального использования и комплексной переработки сырья имеет социально-экономическое значение.

В зарубежной практике официнальными являются корневище с корнями *Primula veris* L. или *Primula elatior* (L.) Hill, на основе которых зарегистрированы и разрешены к применению отхаркивающие лекарственные средства. Надземные органы являются отходами фармацевтического производства. В РФ разрешены к применению листья первоцвета весеннего, имеющие ограниченную область применения как пищевое поливитаминное растительное сырье. Актуальным является сравнительное изучение официнальных видов сырья и малоизученных близкородственных видов, имеющеих достаточную сырьевую базу на территории РФ, таковым может быть первоцвет крупночашечный. Исследование отходов хмелепроизводства листьев культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного как доступных источников БАВ, возможности использования в медицине и иных отраслях народного хозяйства также представляет практический интерес.

В связи с вышеизложенным, очевидна целесообразность изучения химического состава, фармакологических свойств, стандартизации растений рода первоцвет и рода хмель для обоснования их рационального использования и возможности применения в медицинской практике.

Существующая отечественная нормативная документация на листья первоцвета весеннего (ГОСТ 3166-76) не позволяет объективно оценивать качество ЛРС, поскольку не предусматривает определение содержания действующих веществ, обусловливающих их фармакологические свойства; основных показателей качества сырья, микробиологической чистоты и радионуклидов; не содержит полного описания морфологических признаков; описание анатомических признаков сырья вовсе отсутствует. Возможность внедрения травы первоцветов и листьев хмеля обыкновенного в медицинскую практику делает необходимым разработку НД на указанные виды сырья. В связи с этим возникает необходимость в разработке новых подходов к стандартизации сырья растений рода первоцвет, листьев хмеля обыкновенного, созданию для них современной НД.

Таким образом, использование возможностей отечественной сырьевой базы за счет рационального применения официнальных и внедрения новых малоизученных видов растений, переработка отходов производства позволит расширить ассортимент отечественного растительного сырья.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов исследования

Объектами наших исследований стали трава первоцвета весеннего (лекарственного) (*Primula veris* L., или *P. officinalis* (L.) Hill.), первоцвета крупночашечного (*Primula macrocalyx* Bunge.), листья и соплодия хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) дикорастущего вида и культивируемых сортов «Ранний», «Крылатский» и «Подвязный».

Сырье первоцвета весеннего заготавливали в Европейской части РФ (Курской и Белгородской областях) и некоторых районах Республики Башкортостан, первоцвета крупночашечного – в Уфимском, Иглинском, Чишминском, Нуримановском и др. районах РБ в течение 2005–2011 годов в различные фазы вегетации.

Сырье хмеля обыкновенного дикорастущего вида заготавливали в Уфимском, Благовещенском, Давлекановском, Белебеевском, Туймазинском и др. районах РБ; сырье, культивируемое на территории Чувашской Республики, сортов «Ранний», «Крылатский» и «Подвязный» было предоставлено ООО «АгроРесурсы», г. Чебоксары (п.г.т. Урмары) в 2005-2012 гг. в различные фазы вегетации.

Сырье подвергали воздушно-теневой сушке, упаковывали и хранили в соответствии с требованиями ГОСТ 17768-90 (в сухом вентилируемом помещении, в защищенном от света месте).

Объектами биологических исследований служили водные растворы густого экстракта из травы первоцвета весеннего, густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного.

2.2. Методы исследований

2.2.1 Морфолого-анатомический анализ

Морфолого-анатомическое исследование проводили на свежем, фиксированном (смесь спирта и глицерина) и высушенном растительном материале. Препараты для анатомического анализа готовили по ГФ СССР XI изд. [53, 54].

Микропрепараты исследовали с применением микроскопов «Биолам», «Минимед-501». Фотографии микропрепаратов фиксировали на приборе «МФН-10 У 4.2» и с помощью цифровой насадки. Также был использован микровизор проходящего света серии «µVizo-100» (с основой оптико-механической части микроскопа «Микмед-6»), фотографии выполняли с помощью встроенной цифровой видеокамеры с разрешением 1 МП и IBM-совместимого компьютера. Некоторые анатомические исследования проводились с применением светового микроскопа «Axio Imager 1» («Carl Zeiss», Jena) с вмонтированной цифровой камерой «AxioCam MRc 5» с программным управлением, при следующих увеличениях: объектив ×5, 10, 20, 40, 63 (иммерсия) и 100 (иммерсия), окуляр ×10, переходник (адаптер) цифровой камеры ×0,63. Фотоснимки обрабатывались на компьютере с помощью программы «Adobe Photoshop 7.0».

2.2.2 Фитохимический анализ

В предварительном общем фитохимическом анализе исследуемые растения тестировали на содержание основных групп БАВ. Сырье первоцвета весеннего – на содержание фенольных соединений (флавоноидов, кумаринов, дубильных веществ, оксикоричных кислот), липофильных веществ, тритерпеновых сапонинов, органических и аминокислот. Сырье хмеля обыкновенного – на содержание фенольных соединений (флавоноидов, изофлавоноидов, кума-

ринов, дубильных веществ, стильбенов, оксикоричных кислот), липофильных веществ, производных АФГ.

Идентификацию перечисленных групп БАВ проводили в водных, водно-спиртовых, бутанольных, хлороформных, этилацетатных извлечениях из исследуемых видов сырья специфическими качественными реакциями и методами хроматографии.

Водные извлечения из сырья (1:10) получали путем трехкратной дробной экстракции на кипящей водяной бане с последующим сгущением экстракта. Упаренные водные экстракты использовали для определения водорастворимых аминокислот, органических кислот.

Аминокислоты

Исследование качественного состава аминокислот проводили в водных извлечениях из сырья с использованием нингидриновой реакции и метода ТСХ [86, 206, 209].

Для проведения хроматографического анализа в тонком слое сорбента использовали пластинки «Kiselgel». С этой целью 0.03–0.06 мл предварительно полученных водных извлечений наносили на хроматографические пластинки (15×20 см) и хроматографировали с достоверными образцами аминокислот восходящим способом в системе метилэтилкетон-пиридин-вода-аммиак в соотношении 70:15:15:2. После высушивания на воздухе хроматограммы обрабатывали спиртовым раствором нингидрина 0.2% с последующим нагреванием в сушильном шкафу при 100–105°С в течение 3–5 минут. Растворами сравнения служили 0.05% растворы СО аспарагина, глицина, пролина, кислоты глютаминовой, цистеина, серина, тирозина, гистиидина, треонина, кислоты аспарагиновой. Аминокислоты проявлялись в виде пятен красно-фиолетового цвета [86, 209].

С целью подтверждения результатов хроматографического анализа и количественного определения аминокислот использовали аминокислотный анализатор модели «ААА-339» («Microtecha», Чехия). Для этого сырье исследуе-

мых объектов экстрагировали горячей водой до полного истощения. Экстракты фильтровали, упаривали досуха под вакуумом. Точные навески сухих остатков растворяли в натриево-цитратном буфере (pH 2,2) с последующим доведением объема растворов до 10 мл, анализировали на указанном анализаторе. Анализ аминокислотного состава проводили в стандартных условиях, используемых для разделения белковых гидролизатов.

Содержание идентифицированных аминокислот определяли по площади пиков, выраженное в наномолях и нанограммах в аликвоте раствора, используемого для анализа. Затем проводили расчёт количественного содержания идентифицированных свободных аминокислот в мг%.

Органические кислоты

Исследование качественного состава органических кислот проводили в сгущенных водных извлечениях из сырья с использованием метода хроматографического анализа в тонком слое сорбента с использованием пластинок «Sorbfil» (марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ, Россия). Хроматографирование проводили с использованием достоверных образцов органических кислот восходящим способом в системе растворителей – петролейный эфир-хлороформ-кислота муравьиная (10:4:1). После высушивания на воздухе хроматограммы обрабатывали раствором реактива бромкрезоловый зеленый и детектировали в УФ-свете [37].

Идентификацию кислоты аскорбиновой проводили хроматографированием в тонком слое сорбента на пластинках «Sorbfil» в системе растворителей: этилацетат-кислота уксусная (80:20) с последующим детектированием в УФ-свете и обработкой реактивом бромкрезоловый зеленый.

Исследование органических кислот методом ВЭЖХ

Для дальнейшего исследования состава органических кислот был использован метод ВЭЖХ. Исследования проводили на хроматографе фирмы

«Gilston» (модель 305, Франция); инжектор ручной, модель «Rheodyne 7125» (США). Обработка результатов исследований проводилась с использованием программы «Мультихром для «Windows».

Методика. 1.0 г (точная навеска) измельченного сырья исследуемых образцов переносили в колбу на 100 мл, заливали 20 мл воды очищенной, присоединяли к обратному холодильнику, доводили до кипения на водяной бане и нагревали еще в течение 2 часов. По охлаждении смесь фильтровали через бумажный фильтр в колбу объемом 25 мл, доводили водой очищенной до метки (раствор A_1). Затем 10 мл раствора A_1 переносили в колбу объемом 50 мл, прибавляли 0.005 М раствор кислоты серной, доводили до метки указанным растворителем. Параллельно готовились 0.05% растворы СО органических кислот фирм «Fluka», «Sigma-aldrich» в 0.005 М растворе серной кислоты.

Условия хроматографирования: неподвижная фаза – металлическая колонка «Altech OA-1000 Organic Acids» размером 6,5×300 мм; подвижная фаза – 0.005 М кислота серная; скорость подачи элюента – 0.5 мл/мин; время проведения анализа – 120 мин; t° С – комнатная; УФ-детектор («Gilston UV/VIS», модель 151); длина волны 210 нм; объем вводимых в хроматограф исследуемых растворов и СО – 50 мкл.

Разделенные вещества идентифицировали, сопоставляя время удерживания пиков проб, полученных на хроматограммах, со временем удерживания СО. Методом внутренней нормализации определяли относительное содержание отдельных органических кислот в исследуемом образце.

Количественное определение свободных органических кислот проводили методом кислотно-основного титрования по методике ГФ-XI [53].

С целью количественного определения кислоты аскорбиновой применен спектрофотометрический метод, основанный на цветной реакции кислоты аскорбиновой с фосфорно-молибденовым комплексом [182].

Приготовление водно-спиртовых извлечений и фракционирование биологически активных соединений органическими растворителями

Для исследования состава БАВ 5.0 г измельченного (1–2 мм) сырья исследуемых образцов исчерпывающе экстрагировали раствором спирта этилового 70%. Полученные извлечения подвергали объединению, упариванию до водного остатка, охлаждению, фильтрованию. Фильтраты применялись для дальнейшей жидкостной экстракции органическими растворителями: хлороформом, эфиром, этилацетатом и бутанолом. Полученные извлечения упаривали под вакуумом и использовали для проведения качественных реакций.

Кумарины

Идентификацию кумаринов осуществляли в хлороформных фракциях методом ТСХ с использованием пластинок «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А-У (Россия). Хроматографирование проводили в системе растворителей: бензол-этилацетат (2:1) с последующей обработкой хроматографических пластин раствором диазотированной кислоты сульфаниловой, парами аммиака, 10% спиртовым раствором натрия гидроксида, вещества идентифицировали при просмотре в УФ-свете [116].

Фенолкарбоновые кислоты

Идентификацию фенолкарбоновых кислот осуществляли в этилацетатных фракциях методами БХ и ТСХ. Хроматографирование на бумаге проводили в системе растворителей: 2% раствор кислоты уксусной с последующей обработкой специфическими реактивами: парами аммиака, 0.5% спиртовым раствором реактива бромкрезолового зеленого, диазотированным n-нитроанилином, 1%-ным спиртовым раствором железа хлорида III [19, 322].

Хроматографию в тонком слое сорбента проводили на пластинках «Silufol» марки UV-254, 366 (Чехия) и «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А-У (Россия). Использовали систему растворителей: хлороформ – спирт метиловый –

вода (26:14:3), определение кислот проводили детектированием в УФ-свете при длине волны 254 нм [19, 209, 296].

Флавоноиды

Идентификацию флавоноидов осуществляли в этилацетатных и бутанольных фракциях, а также водных остатках извлечений из образцов исследуемых растений с использованием специфических качественных реакций: цианидиновой, цианидиновой по Брианту (окрашивание бутанольного слоя указывает на агликоновую природу исследуемых веществ); с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида (образуется желто-зеленое окрашивание); с 10% спиртовым раствором натрия гидроксида (образуется желто-бурое окрашивание); с раствором ацетата свинца (флавоноиды с О-диоксигруппой в кольце образуют желтый осадок); гидролизаты флавоноидных гликозидов с реактивом Фелинга при нагревании образуют кирпично-красные осадки; 5-оксифлавонолы и 5-оксифлавоны с борно-цитратным реактивом дают ярко-желтое окрашивание с желтовато-зеленой флуоресценцией [237, 270].

Для определения качественного состава флавоноидов нами были использованы методы БХ и ТСХ.

Хроматографирование на бумаге проводили в системах растворителей: бензол – этилацетат – кислота уксусная (50:50:1), 15% раствор кислоты уксусной; в качестве проявителя использовали специфические реактивы (2% метанольный раствор циркония оксихлорида, спиртовый раствор натрия гидроксида, пары аммиака), зоны адсорбции рассматривали в видимом и УФ-свете до и после обработки проявителем [106].

Для выполнения хроматографии в тонком слое сорбента использовали пластинки «Silufol» (марки UV-254 и UV-366, Чехия), «Sorbfil» (марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ, Россия).

Для сырья исследуемых образцов растений рода первоцвет экспериментально нами определены наиболее оптимальные системы растворителей: этилацетат – кислота уксусная ледяная – вода (5:1:1); кислота уксусная ледя-

ная – кислота муравьиная концентрированная – хлороформ (10:2:2); н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2) [157]. Для сырья исследуемых образцов хмеля обыкновенного наиболее оптимальной оказалась система растворителей: этилацетат – кислота ледяная уксусная – вода (5:1:1) [212]. Хроматограммы проявляли специфическим хромогенными реактивами (10% спиртовый раствор натрия гидроокиси, 5% спиртовый раствор алюминия хлорида с последующим нагреванием пластинки в сушильном шкафу t = 100–105ºС (2–3 мин), 0,1% раствор ванилина в кислоте серной с последующим нагреванием при t = 80ºС (3 мин) и рассматривали в видимом и УФ-свете до и после проявлений проявителем [106].

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводили методом дифференциальной спектрофотометрии по методике ГФ СССР XI изд., адаптированной для исследуемых видов сырья.

Арбутин

Идентификацию арбутина осуществляли в бутанольных фракциях методом ТСХ с использованием пластинок «Sorbfil» марки ПТСХ-АФ-А-У (Россия). Хроматографирование проводили в системе растворителей: хлороформ – спирт метиловый (8:2) с последующей обработкой хроматографических пластин диазотированной кислотой сульфаниловой, 10% спиртовым раствором натрия гидроксида, нагреванием в сушильном шкафу 2–5 мин (t=100°С) [206].

Нами также была использована хроматография на бумаге в системе растворителей: 5% раствор кислоты уксусной, проявители: раствор кислоты диазотированной сульфаниловой (р-в Паули), 10% спиртовый раствор натрия гидроксида [53, 54].

2.2.3 Методы исследования фенольных соединений. Методы хроматографии

Методы хроматографического анализа в тонком слое сорбента и на бумаге активно используются в анализе качественного состава фенольных соеди-

нений, особенно их смесей (флавоноидов, простых фенолов, кумаринов, фенилпропаноидов, фенолкарбоновых кислот). Данные методы анализа включены в частные ФС и монографии на лекарственное растительное сырье государственных фармакопей многих стран. Многочисленные работы посвящены описанию хроматографических характеристик БАВ в зависимости от строения, реакций взаимодействия со специфическими реактивами.

В наших исследованиях мы использовали хроматографическую бумагу "Фильтрак", FN-12, FN-5, FN-1. Для выполнения хроматографии в тонком слое сорбента использовали «Сорбфил» (марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ, ЗАО «Сорбполимер», Россия), "Silufol" UV 254, 366 (Чехия), полиамидный сорбент [206, 209, 210, 338].

На хроматографические пластинки наносили микропипеткой 0.01–0.05 мл растворов анализируемых фракций, водных, водно-спиртовых извлечений из сырья, растворов полученных густых экстрактов из исследуемых растений. Для отделения флавоноидных соединений от фенолкарбоновых кислот и других сопутствующих соединений использовали метод восходящей и нисходящей одномерной, двумерной и многомерной хроматографии на бумаге. С целью хроматографического анализа использовали системы растворителей: хлороформ – формамид (1:1), бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1), н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:2), бензо-этилацетат (2:1), петролейный эфир-этилацетат (2:1), петролейный эфир-ацетон (8:2), 2%, 15%, 30% растворы кислоты уксусной. Для их приготовления использовали растворители марок х. ч. или ч. д. а.

Физические методы анализа.
Спектрофотометрия

Метод дифференциальной спектрофотометрии широко признан в функциональном анализе фенольных соединений. Исследования показали, что по УФ-спектрам фенольных соединений можно определить их принадлежность к определенному классу и типу соединений. Так, в функциональном анализе

флавоноидов широко используются специфические реакции Харброна [276, 277, 295], Гейсмана [270], Литвиненко [105].

Электронные спектры поглощения регистрировали в области от 200 нм до 600 нм на спектрофотометрах «СФ-2000», «Specord 40» в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

В качестве растворителей для фенольных соединений использовали безводные спирты этиловый и метиловый. Для получения характерных УФ-спектров использовали следующие комплексообразующие и ионизирующие добавки: кислоту борную в спирте метиловом в присутствии натрия ацетата; натрия ацетат безводный; метанольный раствор циркония оксихлорида 2%; метанольный раствор калия гидроксида 10%.

С целью определения характера смещения положений максимумов поглощения под влиянием реактивов УФ-спектры записывали на фоне чистого растворителя и на фоне исходного раствора испытуемого вещества равной концентрации.

Дифференциальные спектры регистрировали для растворов кристаллических веществ (исходный раствор: 0.02–0.03 г вещества в 10 мл спирта метилового, далее его разводили в 10 раз), а также – для элюатов зон адсорбции с хроматограмм.

Исследование фенольных соединений методом ВЭЖХ

Методика. Для исследования качественного состава фенольных соединений, в том числе флавоноидов, методом ВЭЖХ использовали сырье исследуемых образцов со степенью измельчения частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм (ГОСТ 214-83). Навеска сырья для первоцветов весеннего и крупночашечного составила по 4.0 г, для образцов хмеля обыкновенного-по 2.0 г, для густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного – по 1.0 г.

Точную навеску сырья переносили в мерную колбу объемом 250 мл, приливали 50 мл раствора спирта этилового 70%, присоединив к обратному холо-

дильнику, нагревали в течение 1 ч с момента закипания спиртовой смеси на кипящей водяной бане. По охлаждении извлечение фильтровали (бумажный фильтр) в мерную колбу объемом 100 мл и доводили до метки раствором спирта этилового 70% (исследуемый раствор). Параллельно готовили серию 0.05% растворов стандартных образцов (РСО) фенольных соединений в спирте метиловом. Для чего использовали достоверные образцы производства «Fluka», «Sigma-aldrich», «JCN» (USA).

Таким же образом готовили растворы ГЭТПВ и ГЭЛХО. 1.0 экстракта (точная навеска) растворяли в 40 мл раствора спирта этилового 70%, фильтровали через бумажный фильтр, доводили раствором спирта этилового 70% до метки (исследуемый раствор А). 1 мл раствора А переносили в мерную колбу объёмом 25 мл, доводили раствором спирта этилового 70% до метки.

Исследования проводили на хроматографе фирмы «Gilston» (модель 305, Франция); инжектор ручной, модель «Rheodyne 7125» (США). Обработка результатов исследований проводилась с использованием программы «Мультихром» для «Windows».

Условия хроматографирования: неподвижная фаза – металлическая колонка «Kromasil C 18» размером 4,6×250 мм (размер частиц 5 микрон); подвижная фаза: спирт метиловый – вода очищенная – кислота фосфорная концентрированная, в соотношении 400:600:5 и ацетонитрил-вода-концентрированная кислота фосфорная в соотношении 400:600:5. Скорость подачи элюента – 0.5 мл/мин – 0.8 мл/мин; время проведения анализа от 70 до 120 мин; t ° C – комнатная; УФ-детектор («Gilston UV/VIS», модель 151); длина волны 254 нм; объем вводимых в хроматограф исследуемых растворов и растворов СО – 20 мкл. Для приготовления подвижной фазы использовали спирт метиловый (ос. ч.), кислоту фосфорную концентрированную (ос. ч.), дистиллированную воду.

Разделенные вещества идентифицировали, сопоставляя времена удерживания пиков проб, полученных на хроматограммах, со временами удерживания

СО. Методом внутренней нормализации определяли относительное содержание некоторых фенольных соединений в исследуемом образце [87, 284, 303].

Исследование ресвератрола методом ВЭЖХ

Определение ресвератрола проводили методом ВЭЖХ с использованием указанного оборудования.

Методика. Сырье хмеля обыкновенного около 0.5 г (точная навеска), измельченного до 2 мм в соответствии с ГОСТ 214-83, помещенного в колбу на 50 мл, заливали 20 мл метанола. Колбу с исследуемым сырьем, присоединенную к обратному холодильнику, нагревали с момента закипания экстрагента в течение 1 часа. По охлаждении смесь фильтровали в мерную колбу вместимостью 25 мл через бумажный фильтр, промывали двумя порциями метанола по 2 мл, доводили метанолом до метки. Полученное извлечение помещали на водяную баню и упаривали до объема 2 мл (исследуемый раствор). Параллельно готовили 0.02% раствор СО ресвератрола в метаноле.

Условия хроматографирования: неподвижная фаза – металлическая колонка «Kromasil C 18» размером 4,6x250 мм (размер частиц 5 микрон); подвижная фаза: смесь раствор ТФУ pH 2,5 – ацетонитрил, в соотношении 140:60; скорость подачи элюента – 1 мл/мин; время проведения анализа – 30 мин; t °C – комнатная; УФ-детектор («Gilston UV/VIS», модель 151); длина волны 307 нм; объем вводимых в хроматограф исследуемых растворов и растворов СО – 50 мкл.

Раствор стандартного образца готовили с использованием стандарта ресвератрол фирмы «Sigma-aldrich» и спирт метиловый (ос. ч.). Для приготовления подвижной фазы использовали ТФУ, ацетонитрил (ос. ч.), воду очищенную, пригодную для выполнения ВЭЖХ.

Определение разделенных БАВ проводили, сопоставляя времена удерживания пиков проб, отраженных на хроматограммах, со временами удерживания растворов СО.

Исследование изофлавоноидов методом ВЭЖХ

Определение изофлавоноидов проводили методом ВЭЖХ с использованием указанного выше оборудования.

Методика. Сырье хмеля обыкновенного около 1.0 г (точная навеска), измельченного до 2 мм в соответствии с ГОСТ 214-83, помещенного в мерную колбу на 250 мл, заливали 50 мл раствора спирта этилового 70%. Колбу с исследуемым сырьем, присоединенную к обратному холодильнику, нагревали с момента закипания экстрагента в течение 1 часа. По охлаждении смесь фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл через бумажный фильтр, промывали двумя порциями этанола по 3 мл, доводили раствором спирта этилового 70% до метки (исследуемый раствор). Параллельно готовили 0.02% раствор СО генистина, генистеина, даидзеина в растворе спирта этилового 70%.

Условия хроматографирования: неподвижная фаза – металлическая колонка «Luna C18» размером 4,6×250 мм (размер частиц 5 микрон); подвижная фаза: смесь ацетонитрил – 0,1% кислота фосфорная (соотношение 350:650); скорость подачи элюента – 0.8 мл/мин; время проведения анализа – 120 мин; t°C – комнатная; УФ-детектор («Gilston UV/VIS», модель 151); длина волны 255 нм; объем вводимых в хроматограф исследуемых растворов и растворов СО – 20 мкл.

СО стандартных образцов готовили с использованием стандартов генистина, генистеина, даидзеина фирмы «Sigma-aldrich», «Fluka» и спирт этиловый (ос. ч.). Подвижную фазу готовили с использованием кислоты фосфорной, ацетонитрила (ос.ч.), воды очищенной дистиллированной.

Определение разделенных БАВ проводили, сопоставляя времена удерживания пиков проб, отраженных на хроматограммах, со временами удерживания растворов РСО.

Химические методы для доказательства строения фенольных соединений. С этой целью проводили кислотный и щелочной гидролиз, щелочное расщепление и др. [271, 275, 293, 308]. Для выполнения кислотного гидролиза

применяли мягкие и жесткие условия. При проведении качественного анализа гликозидов использовали жесткий кислотный гидролиз: 0.01–0.02 г исследуемого гликозидного соединения растворяли в 10–20 мл 10% раствора кислоты хлористоводородной в 50% растворе кислоты уксусной, с последующим нагреванием в течение 2–4 ч на водяной бане в колбе с обратным холодильником. Процесс гидролиза мониторировали БХ в 15% растворе кислоты уксусной. По завершению гидролиза реакционную смесь обрабатывали диэтиловым эфиром в делительной воронке (по 5 мл пятикратно). Объединенные эфирные извлечения сушили при помощи натрия сульфата безводного, доводили до сухого остатка, перекристаллизовывали из спирта этилового [244].

Для установления места присоединения углеводов к агликону применяли кислотный гидролиз в мягких условиях, для чего 0.01–0.02 г гликозидного соединения растворяли в 10–20 мл 0,05% раствора кислоты хлористоводородной, подвергали нагреванию в течение 1,5–2,0 часов в колбе с обратным холодильником, через 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 и 120 мин отбирали пробы для последующего хроматографирования продуктов кислотного гидролиза.

Для выполнения щелочного гидролиза 0.01–0.03 г исследуемого гликозидного соединения растворяли в 10 мл 0,5% водного раствора гидроксида калия, нагревали 3 ч в колбе с обратным холодильником на водяной бане. Через 5, 10, 20, 30, 60 и 120 мин отбирали пробы, подвергали нейтрализации и хроматографированию в системах растворителей (15-, 30%-растворы кислоты уксусной). В результате щелочного гидролиза не происходит расщепления 3-биозидов и 7-биозидов с 1–2 порядком связи между углеводами [123].

2.2.4 Методы изучения тритерпеновых сапонинов

Для проведения качественного анализа на указанную группу БАВ использовали водно-спиртовой извлечение из сырья исследуемых образцов первоцвета, для чего 5.0 измельченного сырья заливали 50 мл раствора спирта этилового 50%, экстрагировали на кипящей водяной бане в течение 15 мин, затем охлаждали и фильтровали, 20 мл фильтрата упаривали до удаления спирта

и использовали для проведения осадочной реакции и теста пенообразования. Спирто-водное извлечение использовали для проведения цветных реакций Лафона и Сальковского [37, 206].

Кислота урсоловая

Идентификация кислоты урсоловой методом ТСХ

Для качественного анализа нами был использован метод ТСХ на пластинках с кизельгелем («Kieselgel 40 F254», E. Мегк, Darmstadt) в системе растворителей этилацетат – спирт метиловый – диэтиламин (70:20:15) восходящим способом (предварительное насыщение камеры 1 ч) с последующим проявлением раствором ванилина [126]. Для идентификации тритерпеновых сапонинов использовали водно-спиртовое извлечения из изучаемых видов сырья и гидролизаты водно-спиртовых извлечений с раствором натрия гидроксида 30%, а также 1% спиртовый раствор СО кислоты урсоловой.

Методика. 4.0 г измельченного сырья исследуемых образцов первоцветов помещали в колбу объёмом 200 мл, заливали 70 мл раствора спирта этилового 70%, присоединив к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа. По охлаждении смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 100 мл, объем доводили до метки указанным растворителем (раствор А).

К раствору А (10 мл) прибавляли 0.6 мл 30% раствора гидроксида натрия, после перемешивания нагревали на кипящей водяной бане с системой обратного холодильника в течение часа. По охлаждении до комнатной температуры приливали 1.8 мл кислоты хлористоводородной (pH 1.9), нагревали на водяной бане. По мере охлаждения к полученному раствору прибавляли 10% раствор гидроксида натрия до достижения значения pH =7.5–8.5, затем фильтровали через обеззоленный фильтр «синяя лента». Фильтр с осажденным веществом переносили в колбу, где проводилось осаждение, растворяли в 50 мл раствора спирта этилового 70% (раствор Б).

На хроматографические пластинки наносили по 5 мкл испытуемых растворов А и Б, 1% спиртового раствора СО кислоты урсоловой. Хроматографи-

рование проводили в вышеназванной системе растворителей в предварительно насыщенной камере (1 час). Длина пробега растворителей составила 15 см. В качестве проявителя использовали раствор ванилина. Хроматограмму оценивали в видимом свете, зоны адсорбции описывали относительно зоны адсорбции СО кислоты урсоловой.

Количественное определение кислоты урсоловой

Для этого нами использовалась методика спектрофотометрического определения кислоты урсоловой, основанная на реакции с кислотой серной концентрированной [126].

Методика. Точную навеску высушенного измельченного до 2 мм сырья исследуемых образцов первоцвета (4.0 г) переносили в колбу объемом 200 мл, приливали 70 мл раствора спирта этилового 70%, присоединив к обратному холодильнику, нагревали на водяной бане в течение часа. По охлаждении смесь фильтровали (бумажный фильтр) в мерную колбу объемом 100 мл, доводили указанным растворителем до метки (раствор А). В выпарительную чашку помещали 0.5 мл раствора А, растворитель выпаривали досуха на водяной бане. Сухой остаток дважды обрабатывали хлороформом (порции по 5 мл) в выпарительной чашке. Объединенные хлороформные извлечения переносили в стеклянную колонку диаметром 10 мм и длиной 25 мм с 3 г силикагеля, промывали в выпарительную чашку 5 мл хлороформа и переносили в ту же колонку. Очищенный элюент собирали и выпаривали досуха. К полученному сухому остатку приливали 100 мл кислоты серной концентрированной, перемешивали и выдерживали на водяной бане в течение часа при t 70°С. Для выбора длины волны спектр поглощения полученного комплекса снимали в интервале длин волн от 220 нм до 430 нм. Раствор сравнения – кислота серная концентрированная.

2.2.5 Методы изучения производных ацилфлороглюцидов

Для идентификации производных АФГ 1.0 г сухого измельченного сырья исследуемых образцов хмеля обыкновенного переносили в колбу объемом 100

мл, приливали 80 мл раствора спирта этилового 70%, экстрагировали 30 минут при периодическом встряхивании, затем объем раствора доводили до метки, перемешивали и фильтровали (бумажный фильтр «красная лента»). К 1 мл полученного экстракта приливали 1 мл 1% раствора ацетата свинца. Появление белого хлопьевидного осадка говорит о наличии производных АФГ [69, 70].

Количественное определение производных ацилфлороглюцидов проводили двумя методами: методом титриметрии [46, 47], (согласно НД ФС 42-0147-05 «Хмеля соплодия»; ФС 42-2631-89 «Экстракт шишек хмеля») и методом кондуктометрии [50]

Методика титриметрического определения суммы ацилфлороглюцидов (лупулон, гулупон, гумулон) адаптирована нами к исследуемым образцам хмеля обыкновенного и приведена в главе 5.

Количественное определение α-кислоты методом кондуктометрии по ГОСТ 21948-76 «Хмель-сырец и хмель прессованный. Методы испытаний»

Методика. Для проведения испытания пробу сырья хмеля, предназначенную для определения α-кислот, измельчали на электромельнице до размера частиц 1–3 мм. Взвешивали 7.5 г предварительно размолотого хмеля с погрешностью не более 0.01 г. Навеску переносили в экстракционную колбу, приливали 50 мл ди-изопропилового эфира и экстрагировали в течение 5 минут на встряхивателе. Содержимое экстракционной колбы переносили на складчатый фильтр и отфильтровывали в коническую колбу вместимостью 100 мл, остаток экстракта выдавливали фарфоровым пестиком.

С помощью аспиратора отбирали пипеткой 10 мл экстракта, переносили в химический стакан вместимостью 100 мл и приливали 40 мл раствора глицерина 5%. В стакан опускали якорь магнитной мешалки. Стакан вставляли в гнездо магнитной мешалки, на штативе которой закрепляли микробюретку с раствором уксуснокислого свинца и датчик кондуктометра. В стакан с титруемой жидкостью опускали кондуктометрическую ячейку и определяли ну-

левую точку методом титрования. Приливали раствор уксуснокислого свинца по 0.1–0.2 мл, постоянно размешивая, и после каждой порции определяли на приборе-кондуктометре «АНИОН–4100» модель 4120 значение удельной электропроводности титруемого раствора. Данный прибор имеет режим автоматической температурной компенсации. Измерения электропроводности раствора проводили при температуре 25ºС. Как только удельная электропроводность начинала значительно увеличиваться, приливали еще 4–5 порций уксуснокислого свинца.

Из полученных значений электропроводности строили кондуктограмму. По оси абсцисс откладывали количество уксуснокислого свинца, израсходованного на титрование, в миллилитрах, а по оси ординат – удельную электропроводность раствора. Точки соединяли прямыми линиями, из пересечения которых на ось абсцисс опускали перпендикуляр и находили точку эквивалентности, соответствующую количеству уксуснокислого свинца, израсходованного на титрование α-кислот, в миллилитрах.

Содержание α-кислот (X) в процентах в пересчете на абсолютно сухое вещество вычисляли по формуле (1):

$$X = \frac{2.54 \times V \times 100}{100 - W}, \qquad (1)$$

где, V – количество 4%-ного раствора уксуснокислого свинца, израсходованного на титрование до точки эквивалентности, мл;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах, %;

2.54 – поправочный коэффициент.

Для приготовления 5%-ного спиртового раствора глицерина 5 мл глицерина растворяли в 95 мл спирта этилового. Для приготовления 4%-ного раствора уксуснокислого свинца 4.0 г уксуснокислого свинца отвешивали на аналитических весах и растворяли в 25%-ном спиртовом растворе глицерина (75 мл спирта этилового с 25 мл глицерина).

2.2.6 Выделение и идентификация основных групп БАВ

Данный фрагмент работы по выделению и идентификации основных групп БАВ из исследуемых образцов сырья проводился совместно с кафедрами фармакогнозии ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» и «Курский государственный медицинский университет» под руководством профессоров В.А. Куркина, В.Н. Бубенчиковой. Идентификацию выделенных веществ проводили на базе лаборатории физико-химических методов анализа, ФГБУ РАН «Институт органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук» под руководством научных сотрудников, к.х.н. Ш. М. Салихова, к.х.н. Е.Г. Галкина.

Препаративное разделение БАВ проводили методами дробной экстракции и колоночной хроматографии с использованием силикагеля L 40/100 и L 100/110 мкм. Очистку фракций осуществляли на микроколонках с силикагелем L40/100, полиамидом (Wolem DC). Процесс фракционирования БАВ контролировали методами ТСХ, УФ-спектроскопии.

Индивидуальные БАВ из исследуемых растений были выделены колоночной хроматографией на полиамидном сорбенте этанольно-хлороформными смесями с применением метода рехроматографии на микроколонках с полиамидным сорбентом (элюент-этанольно-водные смеси).

Структуру выделенных веществ определяли методами УФ, ЯМР ^{1}H-, ЯМР ^{13}C –спектроскопии; корреляционной спектроскопии ЯМР ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQCED, HMBC; хромато-масс-спектрометрии.

Идентификация выделенных веществ методом ЯМР-спектроскопии

Исследования проводились на ЯМР спектрометре высокого разрешения «Bruker Avance III 500MHz».

Спектры ЯМР регистрировались на спектрометре «Bruker Avance-III» при комнатной температуре в $CDCl_3$, DMSO. Рабочая частота в МГц на протонах: 500MHz. Калибровка прибора была выполнена на стандартном тестовом образце: форма линии (3% $CHCl_3$, 0.2% TMC, Ацетон-d6), чувствительность на

ядрах ^{1}H (0.1% Этилбензол, $CDCl_3$). Соотношение сигнал-шум на стандартном тестовом образце (0.1% этилбензол в $CDCl_3$) составляет S/N = 750:1. Для оригинальной лоренцевой линии сигнала хлороформа ширина на полувысоте составила 0.15 Гц на образце «Lineshape test sample» (3% $CHCl_3$, 0.2% ТМС, Ацетон-d6). Спектр ЯМР ^{1}H регистрировались с параметрами: спектральная ширина 10.0 кГц, количество точек накопления 64K, количество прохождений 8, время накопления 3.3 s, релаксационная задержка 5.0 с., длительность 90° импульса составила 11.5 мкс. Перед преобразованием Фурье спад свободной индукции был умножен на лоренцевую оконную функцию (lb=1Hz).

Спектры ЯМР ^{13}C с развязкой от протонов переменной мощности (power-gated) с использованием составных импульсов WALTZ-16 были зарегистрированы при следующих условиях: спектральное окно – 29.8 кГц, количество точек – 64K, длительность возбуждающего импульса (30°) – 3.2 мкс, релаксационная задержка – 0.9 с, количество прохождений 256. Редактирование спектров ЯМР ^{13}C проводилось на основании эксперимента DEPT-135. Спектр COSY (cosygpqf) был зарегистрирован со следующими параметрами: размер матрицы 4K на 512 эксп. при спектральном окне 5.0 кГц, при обработке использовалась синусоидальная-колоколообразная взвешивающая функция для F1 и F2 проекций (ssb=2). HSQC спектр (hsqcetgp, размер матрицы 2K на 256 эксп., 5.0 кГц для F2-проекции и 27.7 кГц – для F1) был зарегистрирован с задержкой d4 оптимизированной под наблюдение J_{CH} =145 Гц. HMBC спектр (hmbcgpndqf, размер матрицы 2K на 256 эксп., 5.0 кГц для F2-проекции и 27.7 кГц – для F1) был зарегистрирован с задержкой d6 = 71.4 мс (cnst13=7 Гц).

Идентификация выделенных веществ методом хромато-масс-спектрометрии

Идентификацию липофильных соединений сырья первоцвета, в том числе полиметоксилированных флавоноидов, проводили следующим образом.

Исследования проводили на хромато-масс-спектрометре фирмы «Agilent Technologies», состоящего из газового хроматографа – «Hewlett-Paccard 7890» и масс-селективного детектора «MSD HP-5973N» с квадрупольным анализато-

ром. Программное обеспечение – «HP ChemStation E 02.00». Идентификацию зарегистрированных масс-спектров компонентов проводили с помощью библиотеки масс-спектров NIST-05, содержащей библиотеку масс-спектров более чем на 250 тысяч соединений.

Разделение компонентов осуществляли на кварцевой капиллярной колонке HP – 5 MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, привитая фаза содержала смесь 5% фенилметилсиликона и 95% диметилполисилоксана, толщина привитой фазы 0.33 ммк, при программировании температуры от 100°С до 300°С со скоростью нагрева 10°С в мин. Газ-носитель – гелий, скорость подачи – 1 $см^3$/сек.

Программированный нагрев хроматографической колонки: изотерма 50°С, 5 мин, подъем температуры до 290°С, скорость подъема 10°/мин. Температура инжектора – 295°С (постоянный поток).

Условия масс-спектрометрического анализа – энергия ионизирующих электронов 70 эВ, регистрация спектров в диапазоне массовых значений от 39 Да до 450 Да со скоростью 2,5 скан/сек.

Идентификацию липофильных соединений сырья хмеля обыкновенного проводили следующим образом.

Исследования проводили в системе хроматограф-масс-спектрометр-ЭВМ, для чего использовали спектрометр высокого разрешения «Thermo Finnigan», хроматограф «Finnigan 800», масс-спектрометр высокого разрешения MAT-95XP ЭВМ “Delta” с системой обработки данных «Data Sistem», содержащей библиотеку Wiley 275 (275 000 масс-спектров).

Разделение компонентов осуществляли на кварцевой капиллярной колонке DB25MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, привитая фаза содержала смесь 5% фенилметилсиликона и 95% диметилполисилоксана, толщина привитой фазы 0,33 ммк, при программировании температуры от 100°С до 300°С со скоростью нагрева 10°С в мин. Газ-носитель – гелий, скорость подачи – 1 $см^3$/сек.

Программированный нагрев хроматографической колонки: начальная температура – 140°С, подъем температуры до 300°С, скорость подъема 10°/мин. Температура инжектора – 290°С (постоянный поток).

Условия получения масс-спектра: ионизация электронным ударом, энергия электронов 70 эВ. Разрешение порядка 10000. Скорость сканирования 1 сек/декаду, регистрация спектров в диапазоне массовых значений от 40 Да до 600 Да.

Идентификацию зарегистрированных масс-спектров компонентов проводили с помощью библиотеки масс-спектров Wiley 275. Относительное содержание компонентов смеси (количественный анализ) вычисляли из соотношений площадей хроматографических пиков (метод простой нормировки). Хромато-масс-спектрограмма образцов – по полному ионному току.

При обработке результатов исследований обращали внимание на параметры: показатель количественного вклада в смесь, время удерживания, индекс сходства (Match qulity) полученного и библиотечного спектров. Если показатель Match qulity равнялся 90% и более, что говорило о высоком совпадении спектров, то последующий анализ спектров не проводился. В оставшихся случаях обращали внимание на другие параметры: коэффициент тождественности, отличие коэффициента тождественности и «идеального совпадения», коэффициент загрязненности, показатель чистоты спектра, взаимную корреляцию, величину надежности [64, 100, 104, 170, 207, 280].

2.2.7 Методы стандартизации сырья

Отбор проб для товароведческого анализа сырья исследуемых видов проводили в соответствии с ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб» [137].

Определение числовых показателей (влажности, золы общей и золы нерастворимой в растворе кислоты хлористоводородной 10%, содержание экстрактивных веществ, содержание примесей) проводили по методикам ГФ XI [53, 54].

Содержание основных групп БАВ (суммы флавоноидов, кислоты аскорбиновой, суммы АФГ) определяли по разработанным нами методикам.

Испытание исследуемых образцов сырья по показателю микробиологическая чистота проводили согласно статье ГФ XI «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» [52], изменению №3 от 19.06.03 г. (катего-

рия 4А – для лекарственного растительного сырья, подвергающегося термической обработке для приготовления лекарственной формы), по ОФС 42-0067-07, ГФ XII, часть 1, [69, 138].

Определение содержания радионуклидов в сырье исследуемых видов выполняли в лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО БГМУ согласно ОФС 42-0011-03 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье. Стронций-90, цезий-137. Отбор проб, анализ, оценка результатов» [136]. Выделение стронция-90 проводилось радиохимическим методом с дальнейшим измерением активности на гамма-бета спектрометрическом комплексе «Прогресс» № 346 (НПП «Доза», 2000 г.).

Сроки хранения сырья исследуемых видов определяли на образцах сырья, хранившихся в лабораторных условиях, по ГОСТ 17768-90 [49, 137].

Каждые полгода в образцах сырья исследуемых видов определялось содержание БАВ (суммы флавоноидов, кислоты аскорбиновой, суммы АФГ) по разработанным нами методикам. Определение числовых показателей проводили по методике ГФ XI [53, 54, 55] в высушенном растительном материале в 5 повторностях.

Экспериментальные данные подвергали статистической обработке общепринятыми методами для малой выборки с определением средней величины (M) и средней арифметической ошибки (m) [53, 54].

Достоверность результатов (P) оценивалась с применением критерия Манна-Уитни [168]. Различие считали достоверным при вероятности 95% ($p \leq 0,05$).

2.2.8 Методы токсико-фармакологических исследований

Фармакологические исследования проводили на базе лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО БГМУ, группы фармакологических исследований лаборатории биоорганической химии ФГБУ РАН «Институт органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук»; исследование антиоксидантной активности выполняли на кафедре биологической и органический химии ГБОУ ВПО БГМУ.

Экспериментальные исследования были выполнены на животных следующих видов: 88 беспородных белых крысах (150 –200 г), 119 белых крысах линии Вистар (165–170 г), 132 беспородных белых мышах (18–22 г).

Животных содержали в условиях вивария с естественным световым режимом на стандартной диете [ГОСТ Р 50258-92], с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (2007) и правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ [ГОСТ Р 51000.3-96, ГОСТ Р 51000.4-96]. Забой животных проводили согласно требованиям «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (2007) [43].

Статистическая обработка полученных в эксперименте материалов проведена в соответствии с требованиями ГФ XI на персональном компьютере с использованием программы статистической обработки (Statgraphics plus 5.1).

В экспериментах использовали ГЭТПВ, ГЭЛХО, полученные на основе водно-спиртовых извлечений из растительного сырья. Сгущение полученных извлечений проводили на вакуум-выпарительном ротационном испарителе марки «ИРМ-1».

Исследование острой токсичности густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Исследование острой токсичности LD_{50} проводили по общепринятому методу [160, 215].

Острую токсичность изучали на 84 беспородных мышах обоего пола массой 18–22 г при пероральном способе введения водных растворов ГЭТПВ и ГЭЛХО в следующих дозах: 100, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 мг/кг. Каждая доза исследовалась в группе из 6 животных (3 самца и 3 самки), всего 14 групп. Наблюдение за состоянием животных проводили в течение 14 дней. Регистрировали следующие клинические показатели интоксикации: общее состояние подопытных животных, двигательная активность, поведение, состоя-

ние дыхательной системы, кожного и шерстного покрова, потребление пищи и воды и др. Параметры острой токсичности вычисляли по методу Литчфильда и Уилкоксона [22].

Изучение антигипоксантного действия густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Эксперимент выполняли на 48 беспородных мышах-самцах с одинаковой массой 18.0±0.3 г на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией согласно методике, описанной в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [160].

Профилактически в течение 14 дней животным перорально вводили растворы исследуемых экстрактов и препаратов сравнения. На 15 день воспроизводили нормобарическую гипоксию с последующей гиперкапнией. Экспериментальных животных по одному помещали в герметически закрытые банки объёмом 200 см^3. При достижении явных признаков гипоксии (удушье) завершали наблюдение. Животных декапитировали, извлекали головной мозг и гомогенизировали в физиологическом растворе. Для определения активности процессов липопероксидации в клетках головного мозга использовали показатель содержание малонового деальдегида (МДА), определяемого общепринятым спектрофотометрическим методом.

Методика. Для получения гомогената головной мозг экспериментального животного растирали в гомогенизаторе Поттера в 3 мл буфера 0,025 М трис-HCl (pH 7.4), содержащего 0.175 М хлорида калия. К 2.5 мл гомогената добавляли 1 мл 17% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (конечная концентрация 5%), осаждали белковую часть, осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость переносили в пробирки, прибавляли 1 мл 0.8% водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты, помещали на кипящую водяную баню на 10 минут, по мере окрашивания смеси в розовый цвет пробы охлаждали при комнатной температуре, измеряли оптическую плотность при λ= 532 нм. Контролем служила проба, содержащая буфер pH 7.4 вместо надосадочной жидкости.

Количество МДА рассчитывали с использованием молярного коэффициента экстинкции 1.56×105 $см^{-1}×М^{-1}$, полученный результат выражали в нмолях/мг [140].

Исследуемые экстракты вводились в дозе 21 мг/кг в виде водного раствора (выбор дозы основан на суточной норме потребления для взрослого человека в пересчете на рутин). В качестве препарата сравнения использовали дигидрохлорид триметазидина («Предуктал») в дозе 1 мг/кг, а в качестве препарата сравнения природного происхождения – экстракт плодов боярышника в дозе, эквивалентной дозе исследуемого экстракта в пересчете на рутин [186].

Дозу исследуемых экстрактов и препарата сравнения растительного происхождения (плодов боярышника) определяли исходя из суточной нормы потребления флавоноидов (в пересчете на рутин) [42, 131, 155, 183].

Изучение антиоксидантных свойств густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Антиоксидантные свойства исследуемых экстрактов оценивали по влиянию на Fe^{2+} – индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ) по Владимирову (1989) с использованием отечественного аппаратно-программного комплекса «ХЛМ-003» [191, 193], для чего нами были использованы тест-системы, инициирующие свободно-радикальное окисление (СРО) – образование активных форм кислорода (АФК) и перекисного оксиления липидов (ПОЛ).

Изучение влияния на Fe^{2+}-индуцированную хемилюминесценцию, имитирующую образование АФК, проводили на хемилюминомере «ХЛМ-003» [33, 191, 193].

Система, имитирующая АФК, содержала фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением цитрата Na (2.5% раствор) и люминол (10^{-5}М), резко повышающий активность свечения [9, 143].

Регистрацию люминолзависимой ХЛ проводили в светоизолированной камере прибора, куда помещали сосуд с инкубационной смесью: 2.0 мл физиологического раствора, содержащего рабочий раствор люминола (5-амино-2,3-

дигдро-1,4-фталазиндион) в конечной концентрации 10^{-5} М. Хемилюминесценцию инициировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сульфата железа (II) при постоянном перемешивании. Растворы исследуемых экстрактов добавляли в указанную модельную систему за 1 мин до введения сульфата железа (II). Затем вели запись ХЛ в течение 5 мин.

Изучение влияния на систему, имитирующую процессы ПОЛ, проводили на модели Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции с использованием 1% суспензии липосом яичного желтка, обладающей высокой окисляемостью, на хемилюминомере «ХЛМ-003» [33, 57, 79, 89, 191, 193, 228].

Регистрацию люминолзависимой ХЛ проводили в светоизолированной камере прибора, куда помещали сосуд с инкубационной смесью. Для чего яичный желток, смешанный с фосфатным буфером в соотношении 1:5, гомогенизировали, содержание белка доводили дальнейшим разведением до 1 мг на 1 мл (около 25 мл полученного гомогената на 1 л буфера). Для инициации ХЛ в 20 мл полученной смеси прибавляли 1 мл 50 мМ раствора сульфата железа (II) при постоянном перемешивании, что вызывало окисление ненасыщенных жирных кислот желточных липопротеидов. По интенсивности ХЛ судили о процессах ПОЛ. Растворы исследуемых экстрактов добавляли в указанную модельную систему за 1 мин до введения сульфата железа (II). Затем вели запись ХЛ в течение 5 мин.

Для приготовления модельных тест-систем использовали фосфатно-солевой буферный раствор состава: 20 мМ KH_2PO_4, 105 мМ KCl (pH 7.45). Инициировали процесс добавлением 1 мл соли сульфата железа (II) (конечная концентрация ионов Fe^{2+} в среде инкубации составила 2,5 мМ).

Об интенсивности Fe^{2+}-индуцированной ХЛ судили по следующим параметрам: светосумме свечения (SL) и максимальной амплитуде свечения (HL), соответствующие скорости образования АФК и ПОЛ. Величины показателей выражали в условных единицах. Показатель хемилюминесценции светосумма свечения (SL) выражалась в условных единицах (1 у.е.= 3,06Ч105 квантов в сек).

Обработку хемилюминограмм проводили с помощью разработанной авторами установки компьютерной программы [192, 193].

Результаты экспериментов оценивали по степени изменения хемилюминесценции в присутствии исследуемых экстрактов и пересчитывали в% от контроля. Исследуемые экстракты разводили в физиологическом растворе, отбирали от 0.05 мл до 1.0 мл исследуемых растворов и прибавляли в тест-системы.

В качестве контроля служили модельные системы без добавления растворов исследуемых экстрактов (с добавлением физиологического раствора в тех же объемах).

Методика выполнения эксперимента, приготовление реактивов изложены в инструкциях к аппаратно-программному комплексу «ХЛМ-003» [191, 193].

Изучение влияния на проницаемость капилляров густого экстракта из травы первоцвета весеннего

Экспериментальные исследования проводили на 24 белых крысах линии Вистар массой 165–170 г. Изучение ангиопротекторного действия испытуемого экстракта ГЭТПВ проводили на модели локальной воспалительной реакции, индуцированной ксилолом, с помощью модифицированного метода К.Н. Монаковой [20, 22].

Индикатором проницаемости стенок сосудов явился 0.5% раствор трипановой сини (на физиологическом растворе), вводимый в вену хвоста крыс из расчета 1 мл/100 г. Животным опытных групп внутрижелудочно вводили раствор испытуемого экстракта в дозе 21 мг/кг в виде водного раствора в течение 5 дней 1 раз в сутки. Критерием состояния проницаемости капилляров явилось время появления на коже сине-окрашенных петехий и отчётливого их прокрашивания.

Изучение эндотелиопротекторной активности густого экстракта из травы первоцвета весеннего

Экспериментальные исследования проводили на 95 белых крысах линии Вистар массой 170–200 г. В качестве хронической модели эндотелиальной дисфункции нами была выбрана модель хронического аллоксанового диабета.

Аллоксановый диабет вызывали двухкратным подкожным введением водного раствора аллоксана в дозе 75 мг/кг голодавшим в течение суток животным. Исследуемый препарат густого экстракта из травы первоцвета весеннего вводили в дозе 21 мг/кг в виде водного раствора. В качестве препарата сравнения использовали препарат «Антистакс». Исследуемые препараты вводили внутрижелудочно на протяжении трех месяцев с момента введения аллоксана ежедневно. В экспериментальных группах в течение этого периода наблюдали смертность животных. Затем проводили оценку антиоксидантной активности исследуемого препарата, показателей эндотелина и метаболитов NO в плазме крови.

Общую антиокислительную активность (ОАА) определяли колориметрическим методом с помощью стандартного тест-набора «Total in-tioxidant status» фирмы «Randox Laboratories» (Великобритания). Принцип метода основан на подавлении развития окраски хромогена в тестируемой пробе пропорционально концентрации антиоксидантов. Хромоген ABTSR (2.2-азино-ди-[3-этилбензтиазолина сульфонат]) при инкубации с пероксидазой и H_2O_2 образует радикал ABTSR+, полученный раствор имеет стабильный зелено-голубой цвет, интенсивность которого может быть измерена при 600 нм. Активность ГПО и СОД оценивали с использованием коммерческих тест-систем фирмы «Randox Laboratories» – «Ransel» и «Ransod», соответственно, согласно приложенным инструкциям. Количественное определение содержания ТБК-активных продуктов в плазме крови определяли с помощью наборов «ТБК-АГАТ» фирмы «АГАТ-МЕД» (Россия). Уровень эндотелина определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческого набора «QuantiGlo ELISA Kit» («RnD Systems», Англия). Содержание окиси азота определяли биохимическим методом с помощью наборов «Total Nitric Oxide and Nitrate/ Nitrite Parameter Assay Kit» фирмы «RnD Systems», Англия.

Изучение влияния густых экстрактов из листьев и соплодий хмеля обыкновенного на ориентировочно-исследовательское поведение крыс

Для выполнения экспериментального исследования использовали густые экстракты из листьев и соплодий хмеля обыкновенного (ГЭЛХО и ГЭСХО).

ГЭСХО был получен по технологической схеме, разработанной нами для получения густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного (глава 6, раздел 6.1). Исследования проведены на 40 белых беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 170-200 г.

Экспериментальные исследования по изучению влияния экстрактов из хмеля обыкновенного на ориентировочно-исследовательское поведение крыс оценивались в тестах: «вертикальная двигательная активность» **(**по показателю вертикальные стойки); «норковый рефлекс» (число заглядываний в отверстия); «влияние на стереотипное поведение» (по показателю число чисток) [18, 160].

Для исследования использовали ГЭЛХО и ГЭСХО в двух концентрациях: 21 мг/кг и 42 мг/кг, вводимые животным внутрижелудочно в течение 21 дня.

До начала эксперимента (с интервалом в 4 дня) регистрировали исходные характеристики поведения крыс, после чего подопытные животные были разделены на 5 групп. В дальнейшем характеристики поведения крыс контролировали на 10- и 21-е сутки исследования.

Исследование ноотропной активности густых экстрактов из листьев и соплодий хмеля обыкновенного

Эксперименты были выполнены на 48 беспородных белых крысах, массой 170–200 г.

Для определения специфической ноотропной активности использовали оценку антиамнестического действия с применением методики условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) с последующим использованием электрошока в качестве амнезирующего фактора по модифицированной методике Буреша [159, 243].

Для исследования использовали ГЭЛХО и ГЭСХО в двух концентрациях: 21 мг/кг и 42 мг/кг. В качестве препарата сравнения был использован пирацетам (20% раствор для инъекций), вводимый в дозе 400 мг/кг и физиологический раствор (в контрольной группе).

Методика. Установка для эксперимента УРПИ представляла собой два смежных отсека, один из которых большой, освещенный; другой – меньшего размера, затемненный, закрытый со всех сторон, имеющий четырехугольное отверстие для сообщения с большим отсеком и электрифицированный пол.

Метод состоял из двух этапов: обучение навыку и воспроизведение его сохранности. В первый день (обучение) крысу помещали на середину площадки освещенного отсека, хвостом к отверстию в темный отсек. При этом регистрировали: латентный период 1-го захода в темный отсек (время от момента помещения животного в середину площадки до 1-го захода в темный отсек), общее время наблюдения 3 минуты (животных, не заходивших в темную камеру за это время, из опыта исключали). После каждого захода в темный отсек животному наносили электроболевое раздражение (40 В, 3 импульса по 1 с., с интервалом 0,5 с.). Производилась регистрация количества заходов в темный отсек.

Воспроизведение навыка УРПИ осуществляли на 2-е сутки после обучения (второй день эксперимента). Процедура воспроизведения эксперимента 2-го дня соответствовала первому, с разницей в исключении электроболевой стимуляции животного.

В 1- и 2-й день эксперимента регистрировали показатели: количество заходов в темный отсек – показатель, отражающий обучаемость животных (чем меньше заходов, тем быстрее происходит процесс обучения); латентный период первого захода (для сравнения с аналогичным показателем после обучения); общее время нахождения в темном отсеке (чем меньше указанное время, тем более сохранным считается памятный след).

Снижение количества заходов в темный отсек у животных, получавших исследуемый препарат, по сравнению с контролем расценивалось как положительное влияние на скорость процессов обучения (1-й день). Увели-

чение латентного периода первого захода в темный отсек при воспроизведении по сравнению с латентным периодом первого захода до обучения, а также уменьшение количества заходов в темный отсек и общего времени пребывания в нем животных экспериментальной группы по сравнению с контролем расценивались как положительное влияние исследуемых препаратов на фиксацию и прочность сохранения памятного следа.

Проверка сохранности УРПИ (воспроизведение рефлекса) проводилась через 24 часа, повторным помещением животного в освещенный отсек.

2.3 Статистическая обработка данных

Полученные в ходе экспериментов данные статистически обработаны общепринятыми методами для малой выборки с определением средней величины (M) и средней арифметической ошибки (m) [53, 54]. Достоверность результатов (P) оценивалась с применением критерия Манна-Уитни [168]. Различие считали достоверным при вероятности 95% ($p \leq 0,05$).

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА, ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ПЕРВОЦВЕТ И РОДА ХМЕЛЯ

Исследование химического состава растений рода первоцвет и рода хмель проведено для обоснования применения отходов производства, комплексной переработки сырья, оптимизации использования растений отечественной флоры как доступных источников сырья.

Нерациональное использование травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного обусловлено недостаточной изученностью их химического состава. В связи с этим представляло интерес изучить химический состав растений рода первоцвет, хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов, провести сравнительный анализ содержания основных групп БАВ в исследуемых видах сырья.

Предварительный фитохимический анализ показал наличие в исследуемых объектах травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев культивируемых сортов и дикорастущео вида основных групп БАВ: полифенольных соединений (простых фенолов, флавоноидов, в том числе изофлавоноидов, кумаринов, фенилпропаноидов, фенолкарбоновых кислот, стильбенов, катехинов), тритерпеновых сапонинов, терпеноидных соединений, органических и аминокислот.

Указанные группы БАВ, согласно данным предварительного фитохимического анализа и литературным источникам, в исследуемых объектах являются доминирующими, поэтому выбраны нами для дальнейшего изучения.

3.1. Исследование фенольных соединений растений рода первоцвет и рода хмель

Согласно данным литературы, растения рода первоцвет содержат соединения фенольной природы. Имеются выборочные данные по содержанию липофильных флавоноидов, производных кверцетина, кемпферола и др. флавоноидов в первоцвете весеннем, состав фенольных соединений первоцвета крупночашечного изучен недостаточно. Анализ современной литературы также показал всестороннюю изученность химического состава соплодий хмеля обыкновенного, в том числе фенольных соединений, описаны флавоноиды, пренилированные халконы, фенолокислоты, стильбены, изофлавоноиды и др. Однако, имеются отдельные данные по содержанию веществ фенольной природы в листьях хмеля обыкновенного.

Исследование качественного состава фенольных соединений методами хроматографии

Проведенные качественные реакции (глава 2, раздел 2.2.2) показали, что изучаемые растения содержат фенольные соединения.

Используемые методы хроматографии (бумажная, тонкослойная, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия) показали наличие в растениях рода первоцвет 34 веществ фенольной природы, 10 из которых идентифицированы впервые для первоцвета весеннего, 23 – для первоцвета крупночашечного (таблица 1). В хмеле обыкновенном дикорастущего вида и культивируемых сортов определены 23 вещества фенольной природы, 18 из которых для листьев хмеля идентифицированы впервые (таблица 2).

Таблица 1 – Результаты проведенного хроматографического анализа на содержание основных групп фенольных соединений в растениях рода первоцвет

Вид растения	Простые фенолы	Фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты	Кумарины	Дубильные вещества	Флавоноиды
1	2	3	4	5	6
Первоцвет весенний	3.08 – арбутин	3.11 – галловая 3.12 – кофейная 3.13 – феруловая 3.14 – хлорогеновая 3.16 – коричная 3.30 – цикориевая	3.09 – умбеллиферон	3.17 – танин	3.01 – 3´,4´-метилендиокси-3-гидроксифлавон 3.02 – флавон 3.03 – 8-метоксифлавон 3.04 – 3-метоксифлавон 3.05 –3-ацетил-7,8-диметокси-2-диметил-1Н-нафто(2,1-6) пиран-1-он 3.06 – запотин 3.07 – 5,6,7,3´,4´-пентаметоксифлавон 3.19 – апигенин 3.20 – кверцетин 3.21 – кемпферол 3.22 – дигидрокверцетин (таксифолин) 3.23 – цинарозид 3.24 – гиперозид 3.25 – байкалин 3.26 – рутин 3.27 – витексин

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Первоцвет крупночашечный	3.08 – арбутин	3.11 – галловая 3.12 – кофейная 3.13 – феруловая 3.14 – хлорогеновая 3.15 – неохлороге-новая 3.16 – коричная 3.30 – цикориевая 3.31 – О-кумаровая 3.32 – салициловая	3.10 – кумарин 3.28 – дигидро-ку-марин 3.29 – О-метокси-кумарин	3.18 – катехин	3.01 – 3´,4´-метиленди-окси-3-гидрокси-флавон 3.02 – флавон 3.03 – 8-метоксифлавон 3.04 – 3-метоксифлавон 3.05 – 3-ацетил-7,8-диме-токси-2-диметил-1Н-нафто(2,1-6) пиран-1-он 3.06 – запотин 3.07 –5,6,7, 3´,4´-пента-метоксифлавон 3.19 – апигенин 3.20 – кверцетин 3.22 – дигидрокверцетин (таксифолин) 3.24 – гиперозид 3.25 – байкалин 3.26 – рутин 3.27 – витексин 3.33 – яцеин 3.34 – кверцимеритрин

Таблица 2 – Результаты проведенного хроматографического анализа на содержание основных групп фенольных соединений в хмеле обыкновенном

Вид растения	Стильбены	Фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты	Кумарины	Дубильные вещества	Флавоноиды	Изофлавоноиды
Хмель обыкновенный дикорастущий (Давлекановский, Уфимский р-ны)	3.38 – ресве-ратрол	3.11 – галловая 3.12 –кофейная 3.13 – феруловая 3.14 – хлороге-новая 3.15 – неохлороге-новая 3.16 – коричная 3.30 – цикориевая	3.09 – умбелли-ферон 3.10 – кумарин	3.17 – танин 3.36 – ЭГКГалат 3.37 –эпика-техин	3.20 – кверцетин 3.21 – кемпферол 3.22 – дигидрок-вер-цетин (так-сифолин) 3.23 – цинарозид 3.24 – гиперозид 3.26 – рутин 3.35 – лютеолин	3.39 – генистин 3.40 –генистеин 3.41 – даидзеин
Хмель обыкно-венный культивируемый (сорта «Ранний», «Крылатский», «Подвязный»)	3.38 – рес-ве-ратрол	3.11 – галловая 3.12 – кофейная 3.13 – феруловая 3.14 – хлорогено-вая 3.15 – неохлороге-новая 3.16 – коричная 3.30 – цикориевая	3.10 – кумарин	3.36 – ЭГКГалат 3.37 –эпика-техин	3.20 – кверцетин 3.21 – кемпферол 3.22 – дигидрок-вер-цетин (так-сифолин) 3.23 – цинарозид 3.24 – гиперозид 3.26 – рутин 3.35 – лютеолин	3.39 – генистин 3.40 –генистеин 3.41 – даидзеин

Чтобы подтвердить результаты качественного хроматографического анализа фенольных соединений исследуемых растений, был использован метод ВЭЖХ (внутренняя нормализация) (глава 2, раздел 2.2.3). Идентификацию разделенных БАВ проводили, сопоставляя время удерживания пиков анализируемой пробы и стандартных образцов веществ. В таблицах 3, 4 и приложениях 1–8 отражены результаты проведенных исследований.

Таблица 3 – Результаты исследования состава фенольных соединений растений рода первоцвет методом ВЭЖХ

Наименование вещества	Сырье первоцвета весеннего	Сырье первоцвета крупночашечного
	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)
1	2	3
Арбутин	5,73	5,76
Умбеллиферон	5,93	–
Танин	6,14	–
Галловая кислота	6,24	6,26
Катехин	–	6,73
Хлорогеновая кислота	7,36	7,37
О-кумаровая кислота	–	7,95
Кофейная кислота	8,76	8,78
Цикориевая кислота	10,40	10,41
Феруловая кислота	11,55	11,56
Неохлорогеновая кислота	–	12,91

Продолжение таблицы 3		
1	2	3
Салициловая кислота	–	14,61
Лютеолин-7-глюкозид (цинарозид)	14,98	–
Кверцимеритрин	–	16,12
Дигидрокумарин	–	18,48
О-метоксикумарин	–	19,31
Коричная кислота	22,24	22,27
Рутин	24,85	24,86
Гиперозид	26,15	26,17
Витексин	31,11	31,12
Кумарин	35,63	35,64
Байкалин	41,51	41,52
Яцеин	–	46,56
Кверцетин	53,27	53,28
Кемпферол	55,19	–
Дигидрокверцетин	61,44	61,46
Апигенин	69,75	69,76

В ходе проведенного исследования методом ВЭЖХ в изучаемых видах первоцвета идентифицировано 27 веществ фенольной природы. Для сырья первоцвета весеннего впервые определено 10 фенольных соединений, представленные галловой, коричной, хлорогеновой кислотами из группы фенолокислот; апигенином, байкалином, витексином, цинарозидом из класса флавоноидов; умбеллефероном и кумарином из класса кумаринов, арбутином из класса простых фенолов. В сырье первоцвета крупночашечного впервые определено 23 фенольных соединения, преобладающими из которых были из группы оксикоричных

кислот – коричная кислота; из класса флавоноидов – кверцетин, апигенин, дигидрокверцетин (таксифолин), гиперозид, рутин; из кумаринов – кумарин, О-метоксикумарин; из класса простых фенолов – арбутин.

Таблица 4 – Результаты исследования состава фенольных соединений хмеля обыкновенного методом ВЭЖХ

Наименование вещества	Сырье листьев хмеля обыкновенного	Сырье соплодий хмеля обыкновенного
	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)
Умбеллиферон	–	3,07
Танин	3,12	3,12
Галловая кислота	3,42	3,42
ЭГКГаллат	3,97	3,96
Хлорогеновая кислота	4,25	4,25
Кофейная кислота	5,73	5,74
Цикориевая кислота	5,96	5,96
Феруловая кислота	7,97	7,98
Неохлорогеновая кислота	9,52	9,54
Лютеолин 7-глюкозид (цинарозид)	10,83	10,84
Коричная кислота	11,01	11,04
Эпикатехин	–	12,64
Рутин	14,08	14,09
Гиперозид	16,31	16,32
Кумарин	21,13	21,14
Кверцетин	40,04	40,07
Кемпферол	58,78	58,79
Лютеолин	69,34	69,35

В ходе проведенного исследования методом ВЭЖХ в изучаемых видах сырья хмеля обыкновенного идентифицировано 18 веществ фенольной природы. Из данных таблицы видно, что по качественному составу веществ фенольной природы листья хмеля обыкновенного не уступают соплодиям. В листьях хмеля обыкновенного впервые идентифицировано 13 веществ фенольной природы, представленных галловой, коричной, хлорогеновой, неохлорогеновой, феруловой, цикориевой кислотами из группы фенолокислот; рутином, гиперозидом, цинарозидом, лютеолином – из группы флавоноидов; умбеллефероном и кумарином – из группы кумаринов, таннином, эпикатехином, ЭГКГаллатом – из группы дубильных веществ.

3.2. Выделение основных групп биологически активных веществ

Проведенный анализ показал, что вещества фенольной природы исследуемых растений рода первоцвет и рода хмель являются перспективными для дальнейшего изучения.

Для выделения индивидуальных соединений использовали высушенное измельченное растительное сырье (надземную часть исследуемых растений). Для этого было взято измельченное растительное сырье (1–3 мм) от 200 г до 3,0 кг. Экспериментально установлено, что максимальный выход фенольных соединений (качественно и количественно) осуществляется раствором спирта этилового 70% [147, 212]. Полученные извлечения упаривали под вакуумом до водного концентрата и разделяли методами избирательной жидкостной экстракции и адсорбционной колоночной хроматографии.

При разделении веществ методом колоночной хроматографии упаренные извлечения наносили на силикагель L 40/100 и L 100/110 мкм. Экстрак-

тивные вещества элюировали хлороформом, спирто-хлороформными смесями и спиртом этиловым. Полученные элюаты делились на фракции одинакового состава и упаривались под вакумом. Индивидуальные вещества выделяли с использованием рехроматографии на микроколонках с полиамидным сорбентом («Wolem DC»), при необходимости очищали перекристаллизацией.

В случаях разделения веществ с использованием метода избирательной жидкостной экстракции предварительно очищенные концентрированные извлечения обрабатывались равными количествами органических растворителей (диэтилового эфира, хлороформа, этилацетата, бутанола). Для каждого растворителя обработку повторяли 6–8 раз. Полученные извлечения обезвоживали натрия сульфатом безводным и упаривали под вакуумом до полного удаления растворителя. Вещества во фракциях разделяли дробной кристаллизацией, колоночной и тонкослойной хроматографией на полиамиде и силикагеле.

Процесс фракционирования БАВ контролировали методами БХ, ТСХ, УФ-спектроскопии. Для выполнения ТСХ использовали пластинки «Sorbfil» (марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ), "Silufol" UV 254, 366, различные системы растворителей. УФ-спектры растворов выделенных веществ и водно-спиртовых извлечений регистрировали с помощью спектрофотометра «Specord 40». Для проведения БХ использовали растворы кислоты уксусной 2%, 15%, 30%; системы растворителей н. бутанол – кислота уксусная – вода (БУВ) (4:1:5), бензол – этилацетат – кислота уксусная (50:50:1), этилацетат – кислота муравьиная-вода (3:1:1). Для выполнения ТСХ использовали следующие системы растворителей: хлороформ – спирт этиловый – вода (26:16:3), БУВ (4:1:2); система БУВ (4:1:2) оказалась более оптимальной.

Выделение фенольных соединений рассмотрим на примере первоцвета весеннего. Для выделения БАВ высушенное измельченное растительное сырье, траву первоцветов весеннего (1,5 кг), экстрагировали методом мацерации раствором спирта этилового 70% в соотношении 1:10 в течение суток при комнатной температуре с последующим нагреванием на водяной бане в течение 2 часов. Полученное водно-спиртовое извлечение упаривали и сгущали при t от 40°С до

60°С до получения густого остатка (около 100 мл). Затем смешивали с селикагелем L40/100 (100 г) и высушивали, полученный порошок (извлечение + силикагель) переносили на хроматографическую колонку (диаметр – 5 см, высота сорбента – 3 см), заполненную силикагелем в смеси с хлороформом.

Фракционирование БАВ проводили, элюируя колонку последовательно хлороформом и далее раствором спирта этилового 96% в хлороформе в различных концентрациях (1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% и 96%). Процесс фракционирования БАВ контролировали методами БХ, ТСХ, УФ-спектроскопии. Результаты фракционирования БАВ представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Фракции водно-спиртового извлечения из сырья первоцветов

Фракции	Объем растворителя, мл	Элюент спирт этиловый: хлороформ (соотношение)
1–4	300	хлороформ
5–14	300	1:99
15–22	500	3:97
23–29	500	5:95
30–36	500	7:93
37–51	1000	10:90
52–59	500	15:85
60–67	500	20:80
68–75	500	30:70
76–83	500	40:60
84–91	500	50:50
92–105	300	спирт

Следующую очистку фракций осуществляли методом рехроматографии на микроколонках с полиамидом. Для этого фракции с БАВ отделяли от осадков и переносили на микроколонки, элюировали водой и водно-спиртовыми растворами различных концентраций (20%, 40%, 70%, 96%). Фракции, содержащие одинаковые вещества, объединяли, при необходимости упаривали, при

этом наблюдали появление осадков. Выпавшие осадки отделяли, перекристаллизовывали из спирта этилового, водно-спиртовых растворов.

Для сырья первоцвета весеннего были получены следующие фракции.

Фракции 8–11 (элюент – спирт: хлороформ в соотношении 1:99), представляли собой густые маслянистые жидкости от желто-зеленого до темно-зеленого цвета. Полученные вещества в небольшом количестве элюента переносили по отдельности в хроматографическую микроколонку с полиамидом. Колонку элюировали хлороформом и смесью спирта этилового-хлороформа в различных соотношениях и спиртом этиловым. В результате проведенных исследований во фракциях 8–11 выделены вещества, отнесенные нами в ходе дальнейших исследований к полиметоксилированным флавоноидам (3.01–3.07), во фракциях 29–36 – к кумариновым соединениям (3.09, 3.10), во фракциях 37–51 – к простым фенолам (3.08).

В последующих фракциях 60-67 выделены вещества, отнесенные в ходе последующих исследований к фенолокислотам 3.11, во фракциях 68–75 – к окискоричным кислотам 3.12–3.16, во фракциях 76–83 – к дубильным веществам (3.17, 3.18), во фракциях 88–105 – к флавоноидам (3.19–3.27).

В ходе проведенных исследований использованы известные групповые методики выделения фенольных соединений, примененные нами для исследуемых видов растения рода первоцвет. Схема выделения веществ фенольной природы представлена на рисунке 2.

Выделение основных групп фенольных соединений так же рассмотрим на примере травы первоцвета весннего. Результаты идентификации БАВ из первоцвета весеннего представлены в таблицах 7, 8, 9.

Выделение фенольных соединений

Извлечение фенольных соединений проводили экстрагированием измельченной травы первоцвета весеннего (1.5 кг) раствором спирта этилового 70% методом мацерации. Полученное извлечение (15 л) упаривали до водного концентрата (2 л). Очистку от липофильных веществ проводили шестикратной экстракцией четыреххлористым углеродом.

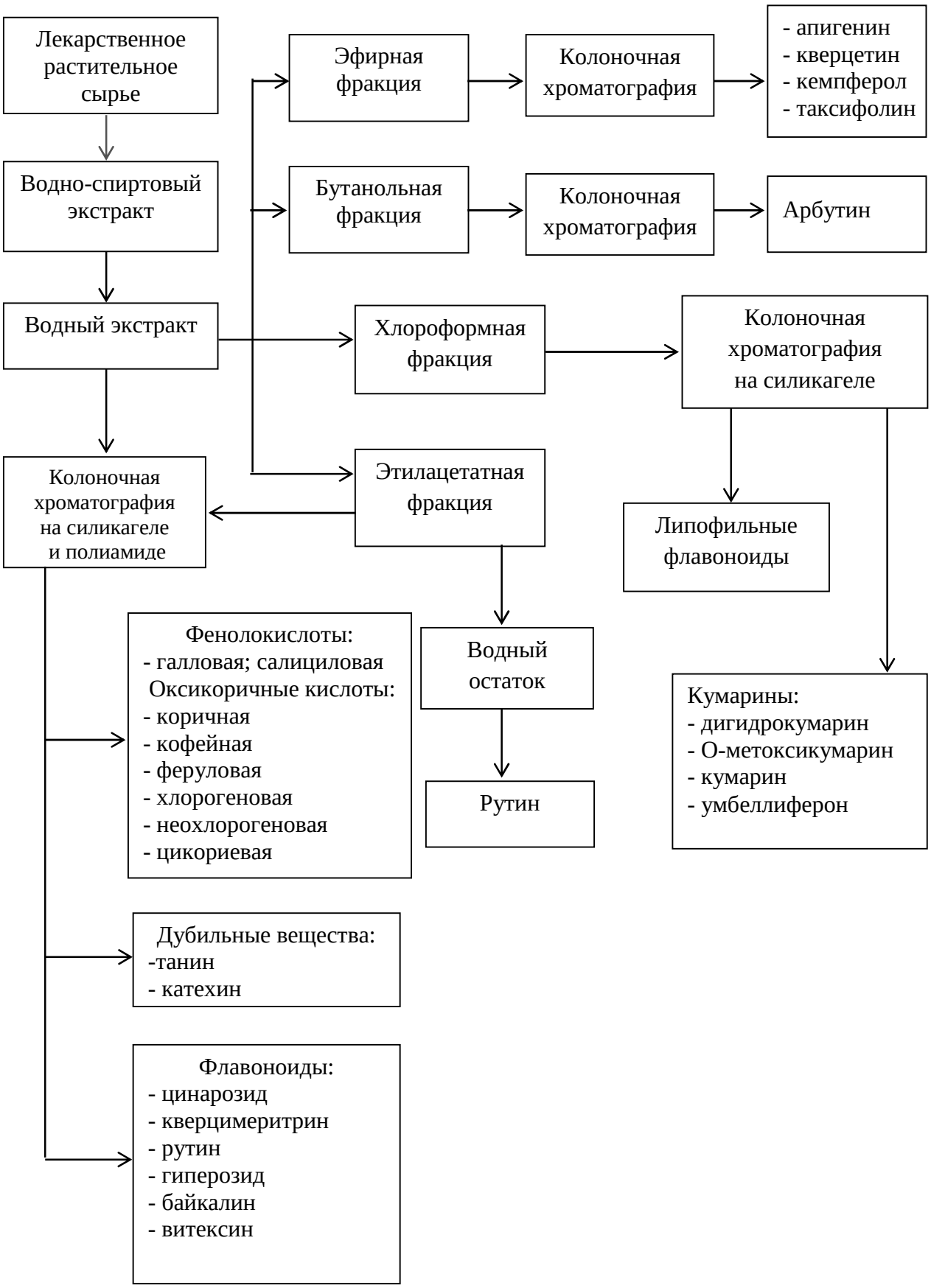


Рисунок 2 – Схема выделения фенольных веществ из растений рода первоцвет

В дальнейшем очищенный экстракт подвергали селективной экстракции различными растворителями: диэтиловым эфиром, хлороформом, этилацетатом, бутанолом. Для каждого вида растворителя операцию проводили по 5–8 раз. Полученные экстракты упаривали под вакуумом до полной отгонки растворителя. Индивидуальные вещества выделяли на микроколонках с полиамидным сорбентом.

Выделение агликонов флавоноидов

Для отделения агликонов флавоноидов применяли фракцию, извлеченную диэтиловым эфиром. Полученную фракцию упаривали до сухого остатка (0,75 г), который растворяли в спирте изопропиловом, переносили в хроматографическую колонку с полиамидным сорбентом, элюировали изопропиловым спиртом, отбирая фракции и проводя качественный анализ. Методами хроматографии (система растворителей бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1) предварительно обнаружены вещества 3.19, 3.20, 3.21, 3.22. Полученные смеси веществ подвергали повторной рехроматографии на колонках с полиамидным сорбентом элюируя хлороформом и смесью хлороформа с этанолом, увеличивая концентрацию последнего. В результате выделены вещества 3.19 апигенин (22 мг), 3.20 кверцетин (16 мг), 3.21 кемпферол (12 мг), 3.22 дигидрокверцетин (17 мг).

Выделение гликозидов флавоноидов

Для выделения флавоноидных голикозидов использовали фракцию, полученную экстракцией этилацетатом. По результатам исследований методом БХ, ТСХ, УФ-спектроскопии были обнаружены вещества, идентифицированные нами в ходе дальнейших исследований: оксикоричные кислоты – 3.12 кофейная (11 мг), 3.13 феруловая (9 мг), 3.14 хлорогеновая (11 мг), 3.15 неохлорогеновая (13 мг), 3.16 коричная (15 мг), фенолкарбоновые кислоты – 3.11 галловая (10 мг), флавоноидные монозиды (вещества 3.23 цинарозид, 3.24 гиперозид, 3.25 байкалин).

Выделение О- и С-гликозидов флавоноидов

Для отделения флавоноидов от оксикоричных кислот использовали растворители с разной степенью полярности. Упаренный до смолообразного состояния остаток растворяли в минимальном количестве метанола при нагревании, охлаждали и переносили, перемешивая в избыток диэтилового эфира. Наблюдали образование осадка.

В эфирно-метанольном растворе методами хроматографии определены оксикоричные кислоты – 3.12 кофейная, 3.13 феруловая, 3.14 хлорогеновая, 3.15 неохлорогеновая, 3.16 коричная, фенолкарбоновые кислоты – 3.11 галловая.

Дальнейшее разделение полученного осадка проводили растворением в этаноле, смешиванием с полиамидным сорбентом (15.0 г) и дальнейшим хроматографированием на колонке с полиамидом, элюированием этилацетатом и смесью этилацетата с этанолом. Собранные фракции по 40–50 мл подвергались качественному анализу методом БХ в системах растворителей бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1) и 15% раствор кислоты уксусной. На основании отрицательной цианидиновой пробы по Брианту, результатов кислотного гидролиза вещества полученного осадка отнесены к гликозидам флавоноидов. Сравнением УФ-спектров гликозидов и их агликонов, динамики гидролиза было установлено, что большинство гликозидов легко подвергались гидролизу, что позволило отнести их к О-гликозидам (вещества 3.23 цинарозид, 3.24 гиперозид, 3.25 байкалин). Вещество 3.27, не гидролизующееся в обычных условиях гидролиза, было отнесено к С-гликозидам. В результате выделены вещества 3.23 цинарозид (12 мг), 3.24 гиперозид (45 мг), 3.25 байкалин (12 мг), 3.26 рутин (23 мг), 3.27 витексин (11 мг).

Выделение биозидов флавоноидов (рутина)

Для выделения рутина использовали водный остаток извлечения, полученный после тщательной экстракции этилацетатом (рисунок 2). Полученный водный остаток оставляли в холодильной камере. Через некоторое время наблюдалось выпадение мелких кристаллов желтого цвета игольчатой формы, оказавшихся индивидуальным чистым веществом 3.26 рутин (54 мг).

Выделение кумаринов

Для извлечения кумаринов использовали водно-спиртовый экстракт, полученный вышеописанным способом, из сырья первоцвета весеннего (300 г). Сгущенное до водного остатка водно-спиртовое извлечение из сырья выдерживали при t=2–4°С, отфильтровывали от выпавших в осадок хлорофилла и липофильных веществ. Фильтрат обрабатывали хлороформом.

Для освобождения от веществ, не относящихся к кумаринам, использовали лактонные свойства кумариновых производных. Для этого остаток хлороформного извлечения растворяли в 3% растворе NaOH (200 мл) и четырехкратно обрабатывали хлороформом. Водную фракцию подкисляли раствором кислоты серной 10% до значения pH 3–4, при этом О-кумариновые кислоты замыкаются в кумарины, которые выделяли хлороформом четырехкратно по 150 мл.

Полученные извлечения промывали водой очищенной и упаривали до смолообразного состояния (остаток 1,5 г). Полученный остаток растворяли в этаноле (20 мл), смешивали с селикагелем (20.0 г), высушивали при t=35°С, переносили на колонку с силикагелем и элюировали хлороформом и смесью хлороформа с этанолом. Фракционный состав анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» в системе растворителей бензол-этилацетат (2:1). Фракции с индивидуальными веществами упаривали, остатки кристаллизовали из этанола или из смеси этанол-хлороформ. В результате проведенных исследований были идентифицированы вещества 3.10 кумарин (14 мг) и 3.09 умбеллиферон (17 мг).

Выделение арбутина

Для выделения арбутина использовали бутанольную фракцию, которую упаривали до смолообразного остатка и переносили в хроматографическую колонку с суспензией полиамида и воды. Элюировали горячей водой. Элюент анализировали хроматографией на бумаге в системе растворителей: этилацетат – кислота муравьиная – вода (3:1:1) и раствор кислоты уксусной 15%. Из полученного элюента выделено индивидуальное вещество 3.08 арбутин (14 мг).

Выделение фенолкарбоновых и оксикоричных кислот кислот

Для выделения оксикоричных кислот использовали эфирно-метанольный фильтрат, полученный после отделения флавоноидов из этилацетатной фракции. С целью выделения индивидуальных веществ указанную фракцию упаривали до полного удаления эфира, смешивали с полиамидным сорбентом и переносили в хроматографическую колонку с взвесью полиамида и воды, элюировали (элюент вода и водно-спиртовый раствор). Анализ качественного состава проводили хроматографией на бумаге в системе растворителей раствор кислоты уксусной 2%. В результате выделены вещества 3.11 галловая (25 мг), 3.12 кофейная (11 мг), 3.13 феруловая (13 мг), 3.14 хлорогеновая кислота (18 мг), 3.15 неохлорогеновая (16 мг), 3.16 коричная кислоты (14 мг).

В результате проведенных исследований из изучаемых видов сырья первоцвета выделено 27 соединений фенольной природы, из них 16 флавоноидов, в том числе – 7 полиметоксилированных флавоноидов, 1 фенологликозид, 6 производных фенолкарбоновых и оксикоричных кислот, 2 кумарина, 2 соединения из группы дубильных веществ.

Выделение биологически активных веществ из сырья хмеля обыкновенного

Выделение индивидуальных соединений из листьев хмеля обыкновенного проводили аналогично первоцвету весеннему. Результаты фракционирования БАВ представлены в таблице 6. Результаты идентификации БАВ лисьев хмеля обыкновеного представлены в таблицах 7, 8, 9.

В результате выполненных исследований во фракциях 22–26 выделен 1 фитостерин (3.42), во фракциях 27–34 – 2 кумарина (3.09, 3.10), во фракциях 40–44 – 1 фенолокислота (3.11), во фракциях 45–49 – 6 оксикоричных кислот (3.12–3.16), во фракциях 50–53 – 3 соединения из группы дубильных веществ (3.17, 3.36, 3.37), во фракциях 54–67 – 7 флавоноидных соединений (3.20–3.26, 3.35).

В ходе проведенных исследований использованы известные групповые методики выделения фенольных соединений, примененные нами для иссле-

дуемых видов растения рода хмель. Схема выделения веществ фенольной природы представлена на рисунке 3.

Таблица 6 – Фракции водно-спиртового извлечения из сырья хмеля обыкновенного

Фракции	Объем растворителя, мл	Элюент спирт этиловый: хлороформ (соотношение)
1–4	300	хлороформ
5–10	300	1:99
11–16	300	3:97
17–21	300	5:95
22–26	300	7:93
27–34	500	10:90
35–39	300	15:85
40–44	300	20:80
45–49	300	30:70
50–53	200	40:60
54–58	300	50:50
59–62	200	60:40
63–67	300	спирт

Таким образом, в ходе проведенных исследований из изучаемых видов сырья хмеля обыкновенного выделено 18 соединений фенольной природы, из них 7 флавоноидных соединений, 6 производных фенолкарбоновых и оксикоричных кислот, 2 кумарина, 3 соединения из группы дубильных веществ.

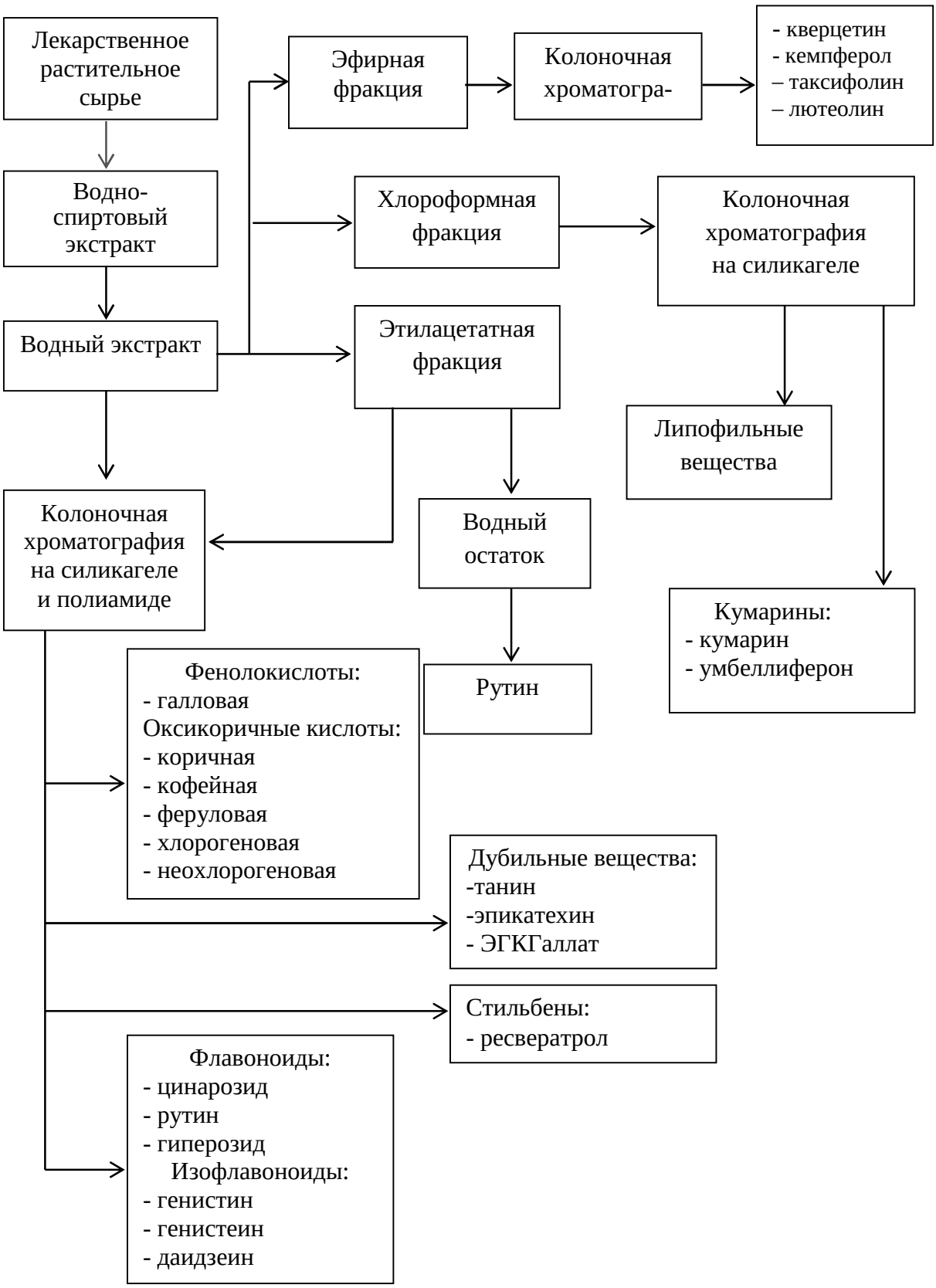


Рисунок 3 – Схема выделения фенольных веществ из хмеля обыкновенного

3.3 Идентификация выделенных веществ

Идентификацию выделенных веществ проводили используя методы ЯМР ^{1}H-, ЯМР ^{13}C – спектроскопии, корреляционной спектроскопии ЯМР ^{1}H-^{1}H COSY ,^{1}H-^{13}C HSQCED, HMBC (ЯМР-спектрометр высокого разрешения «Bruker Avance III 500 MHz»), хромато-масс-спектрометрии, на основании физико-химических свойств, методов хроматографии, сравнением со стандартными образцами веществ, УФ – спектроскопии с использованием диагностических, комплексообразующих реактивов (глава 2, разделы 2.2.2, 2.2.3, 2.2.6).

Полиметоксилированные флавоноиды

В ходе проведенных исследований было выделено вещество 3.01, представляющее собой густую маслянистую жидкость темно-зеленого цвета. Структурные данные вещества 3.01 приведены на рисунках 4–6 в приложениях 9–11.

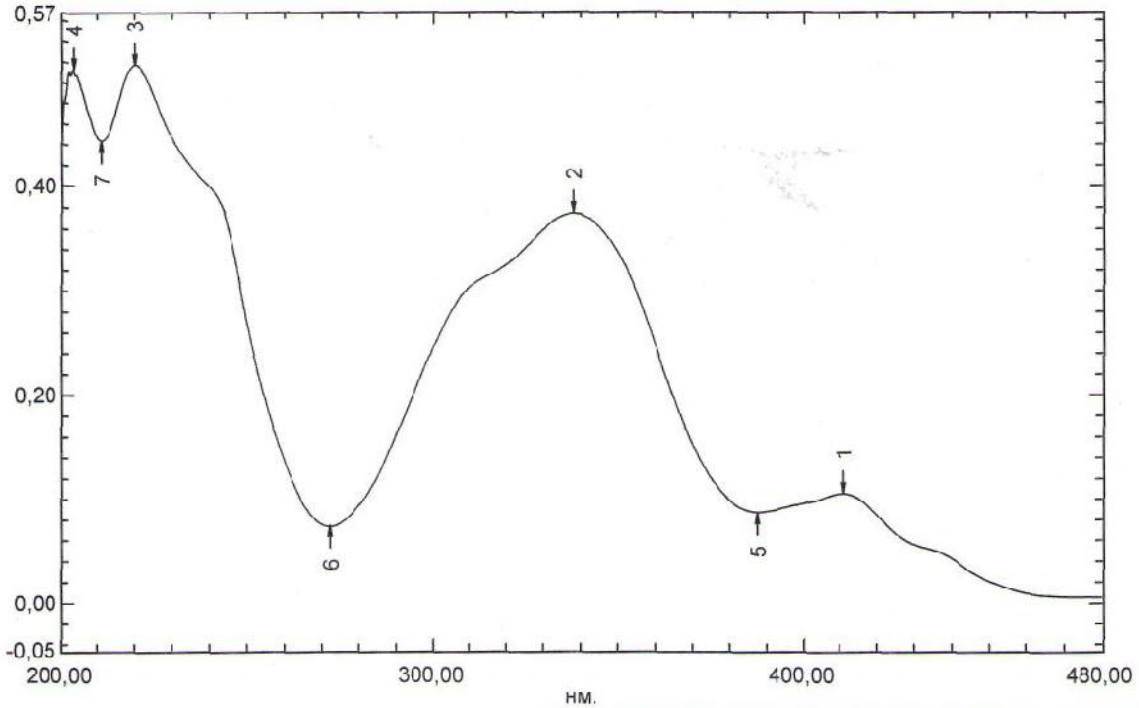


Рисунок 4 – Спектр раствора вещества 3.01 (3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона)

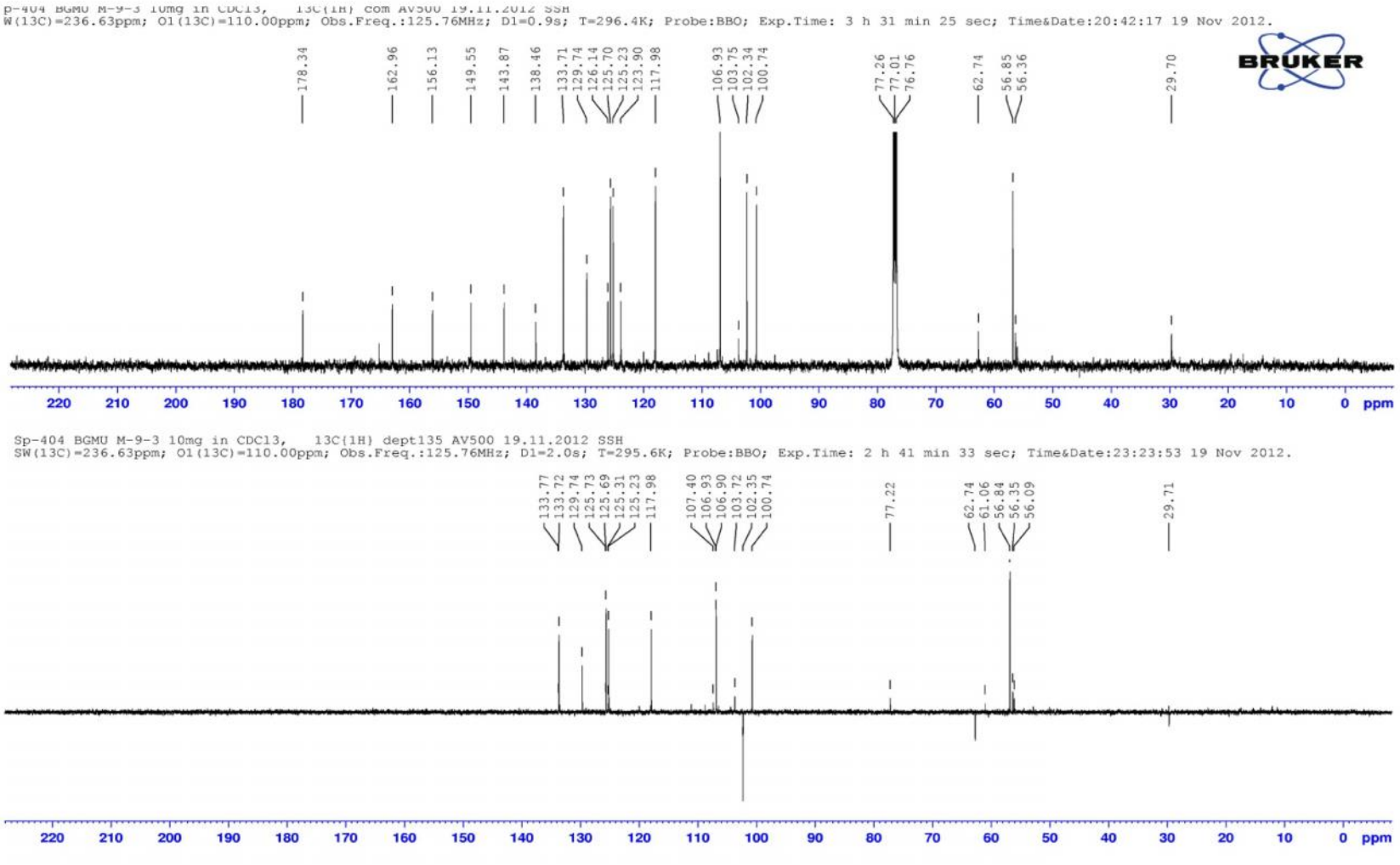


Рисунок 5 – Спектр ЯМР ^{13}C вещества 3.01 (3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона) в $CDCl_3$

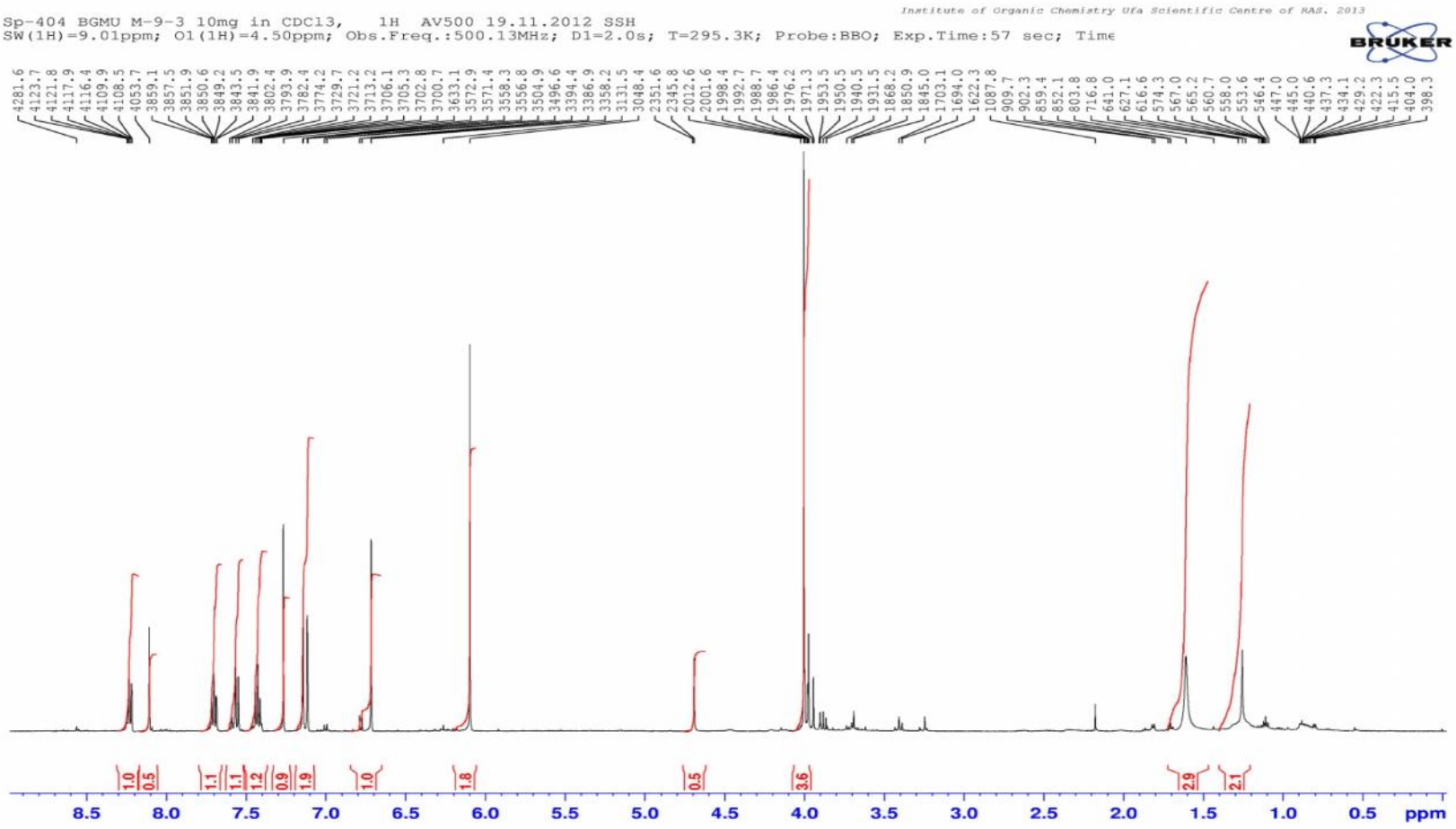


Рисунок 6 – Спектр ЯМР ^{1}H вещества 3.01(3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона) в $CDCl_3$

В спектрах ЯМР ^{13}C представлены сигналы восьми четвертичных углеродных атомов, одной CH_2-групп, семи CH- и одной OCH_3-групп. Сигналы карбонильного С-4 (δ_C 178.34) углеродного атома, а также углеродных атомов двойной связи С-2 (δ_C 162.96) и С-3 (δ_C 106.93) обладают характеристичными значениями химических сдвигов 1,3-замещенной (т. е. положение 3 по отношению C=O) еноновой системы. Для протонированных углеродных атомов и их протонов положения сигналов установлены на основании анализа спектров COSY и HSQC.

Положение 7-метокси-1,3-бензодиоксольного заместителя в 4Н-хромен-4-оне установили на основании сильнопольных сигналов протона Н-3 (δ_H 6.72) и его углерода С-3 (δ_C 106.93). Это характерно для протона еноновой двойной связи находящегося в области экранирования магнитно-анизотропной группы C=O, что приводит к смещению сигнала в спектре в более сильное поле (если бы протон находился в положении С-2, а бензодиоксольный заместитель в С-3, то сигналы Н-2 регистрировались бы в более слабом поле в области 8.1–8.5 м.д.).

Корреляционные пики Н-2’/С-3’ и Н-2’/С-1’ в спектре HMBC указывают на то, что диоксольный фрагмент находится в положении С-1’ и С-3’, а пик OMe/C-7’ является доказательством расположения метоксильной группы на углероде С-7’.

Кроме того, в спектрах масс-спектроскопии молекулярный ион M^+ равен 296, что соответствует предполагаемой структуре 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона (рисунок 7).

Вещество 3.01 представляет собой густую маслянистую жидкость темно-зеленого цвета состава $C_{17}H_{12}O_5$, 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавон (2-(7-метокси-1,3-бензодиоксол-5-ил)-4Н-хромен-4-он), УФ – спектр в спирте этиловом: λ_{max} 219 , 337, 410 нм.

ЯМР ^1H ($CDCl_3$): 4.0 (3H, с, OCH_3), 6.10 (2H, с, Н-2’), 6.71 (1H, с, Н-3), 7.11 (1H, д, *J*=1.5 Гц, Н-6’), 7.14 (1H, д, *J*=1.5 Гц, Н-4’), 7.43 (1H, дд, *J*=7.9, 7.3 Гц, Н-6), 7.55 (1H, д, *J*=8.2 Гц, Н-8), 7.69 (1H, ддд, *J*=8.2, 7.3, 1.5 Гц, Н-7), 8.22 (1H, дд, *J*=7.9, 1.5 Гц, Н-5).

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 56.36 (OCH_3), 100.74 ($C^{6'}$), 102.34 ($C^{2'}$), 106.93 (C^3, $C^{4'}$), 117.98 (C^8), 123.89 (C^{10}), 125.23 (C^6), 125.69 (C^5), 126.14 ($C^{5'}$), 133.71 (C^7), 138.45 ($C^{1'}$), 143.87 ($C^{7'}$), 149.55 ($C^{3'}$), 159.13 (C^9), 162.96 (C^2), 178.34 (C=O).

Данное соединение 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавон (рисунок 6) впервые выделено из травы первоцвета весеннего.

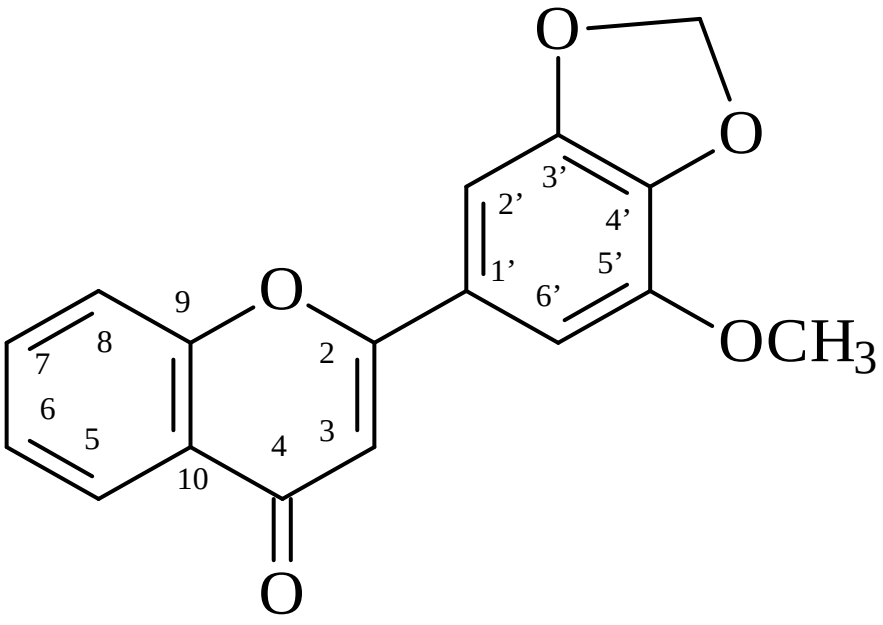


Рисунок 7 – Структурная формула 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона

Вещество 3.02, представляет собой бесцветное кристаллическое вещество, $C_{15}H_{10}O_2$, имеет следующие характеристики.

ЯМР ^1H ($CDCl_3$): 6.82 (1H, с, H^3), 7.40 (1H, дд, *J*=8.2, 1.0, H^6), 7.51 (2H, м, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 7.55 (2H, м, $H^{4'}$, H^8), 7.68 (1H, дд, *J*=8.2, 1.0, H^7), 7.91 (2H, м, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 8.23 (1H, дд, *J*=8.2, 1.7, H^5).

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 107.3 (C^3), 117.9 (C^8), 123.7 (C^{10}), 124.9 (C^6), 125.4 (C^5), 126.0 ($C^{6'}$, $C^{2'}$), 128.8 ($C^{3'}$, $C^{5'}$), 131.3 ($C^{4'}$), 131.5 ($C^{1'}$), 133.5 (C^7), 156.0 (C^9), 163.0 (C^2), 178.0 (C=O).

По данным ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии вещество 3.02 идентифицировано как флавон (2-фенил-4Н-хромен-4-он) (рисунок 8).

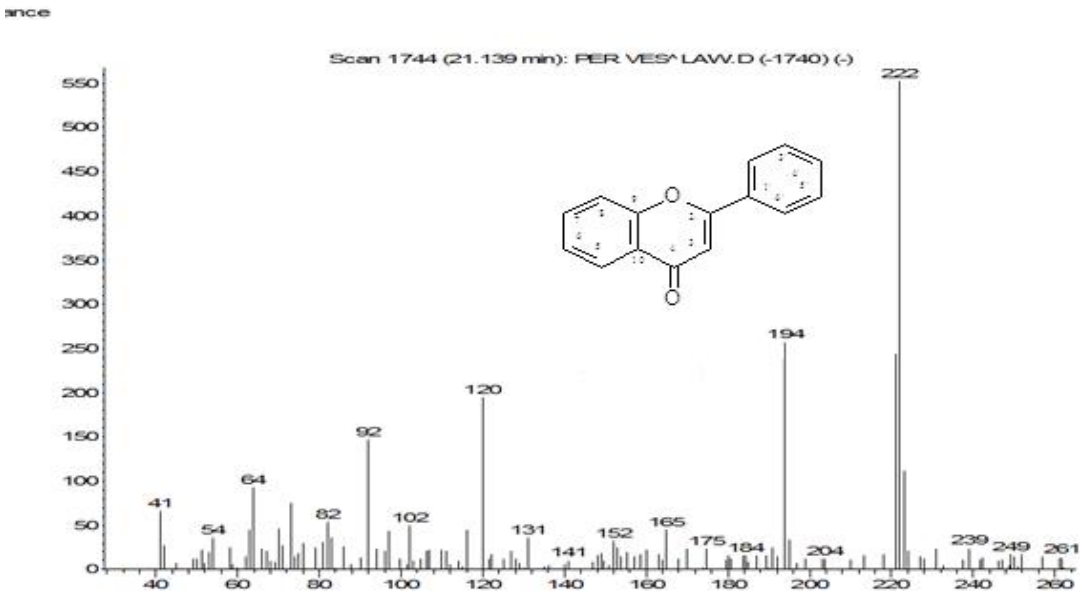


Рисунок 8 – Масс-спектр флавона

Вещество 3.03, находящееся в липофильной фракции, $C_{16}H_{12}O_3$, имеет следующие характеристики.

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 56.2 (OCH_3), 107.1 (C^3), 114.2 (C^5), 116.1 (C^7), 124.1 (C^{10}), 124.6 (C^6), 126.1 ($C^{6'}$, $C^{2'}$), 128.7 ($C^{3'}$, $C^{5'}$), 131.2 ($C^{4'}$), 131.6 ($C^{1'}$), 146.1 (C^9), 148.8 (C^8), 162.6 (C^2), 178.0 (C=O).

По данным ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии вещество 3.03 идентифицировано как 8-метокси-флавон (8-метокси-2-фенил-4Н-хромен-4-он) (рисунок 9).

Вещество 3.04, находящееся в липофильной фракции, $C_{16}H_{12}O_3$, имеет следующие характеристики.

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 55.3 (OCH_3), 107.5 (C^3), 111.5 ($C^{2'}$), 116.9 ($C^{4'}$), 117.9 (C^8), 118.5 ($C^{6'}$), 123.7 (C^{10}), 124.9 (C^6), 125.4 (C^5), 129.8 ($C^{5'}$), 132.8 ($C^{1'}$), 133.2 (C^7), 155.9 (C^9), 159.7 ($C^{3'}$) 162.8 (C^2), 178.0 (C^4).

По данным ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии вещество 3.04 идентифицировано как 3’-метокси-флавон (3’-метокси-2-фенил-4Н-хромен-4-он) (рисунок 10).

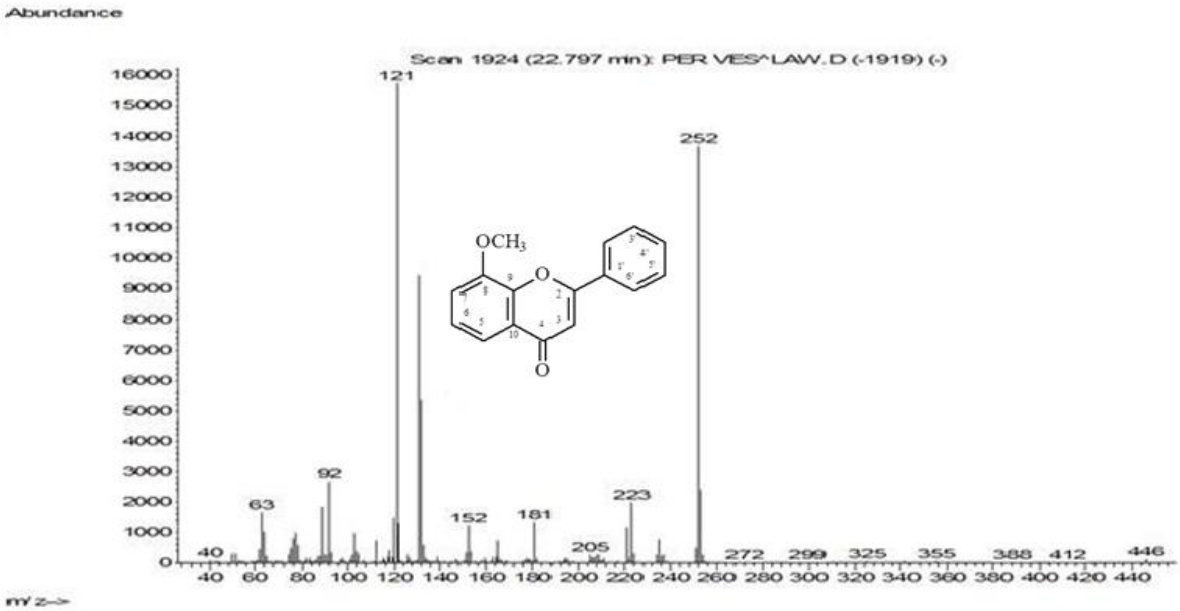


Рисунок 9 – Масс- спектр 8-метокси-флавона

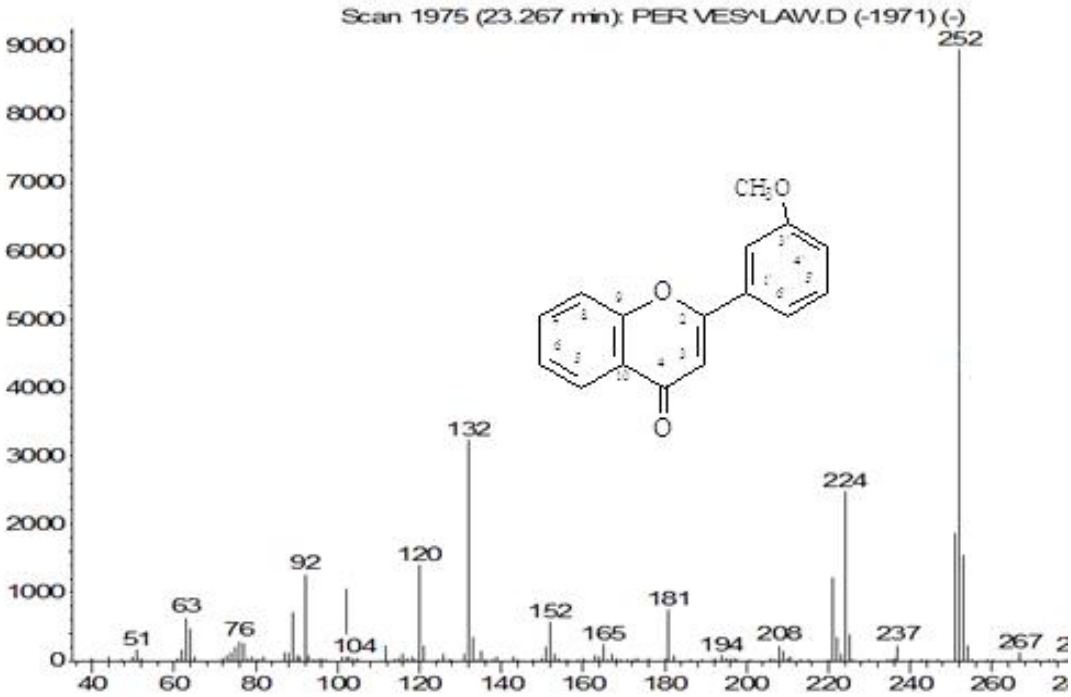


Рисунок 10 – Масс-спектр 3’-метокси-флавона

Вещество 3.05, находящееся в липофильной фракции по данным ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии идентифицировано как 3-ацетил-

7,8-диметокси-2-диметил-1Н-нафто(2,1-б)пиран-1-он (3-ацетил-7,8-диметокси-2-метил-1Н-бензо[f]хромен-1-он) (рисунок 11).

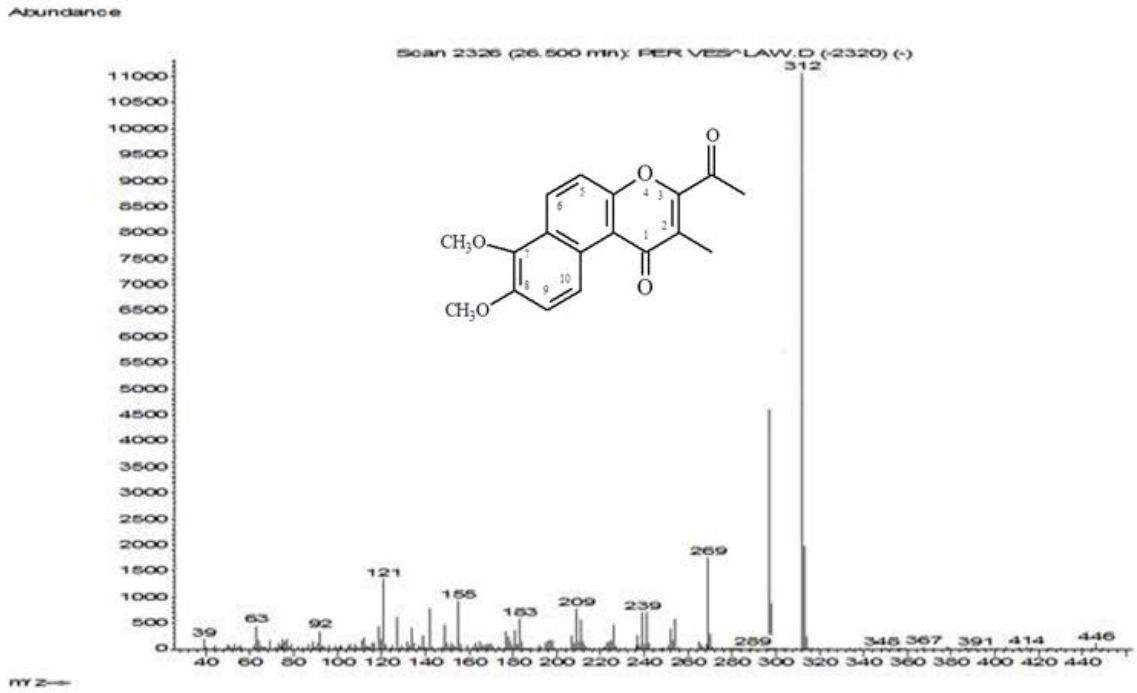


Рисунок 11 – Масс-спектр 3-ацетил-7,8-диметокси-2-метил-1Н-бензо[f]хромен-1-он

Вещество 3.06, находящееся в липофильной фракции, $C_{19}H_{18}O_6$, имеет следующие характеристики.

ЯМР ^{1}H ($CDCl_3$): 3.78 (3H, с, OCH_3), 3.79 (3H, с, OCH_3), 3.92 (3H, с, OCH_3), 3.98 (3H, с, OCH_3), 6.26 (1H, с, H^3), 6.63 (2H, д, *J*=8.4, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 7.20 (1H, д, *J*=9.2, H^8), 7.28 (1H, д, *J*=9.2, H^7), 7.39 (1H, т, *J*=8.4, $H^{4'}$).

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 56.0 (OCH_3), 56.1 (OCH_3), 57.3 (OCH_3), 61.8 (OCH_3), 104.0 ($C^{5'}$, $C^{3'}$), 111.4 ($C^{1'}$), 113.7 (C^8), 115.2 (C^3), 119.1 (C^7), 119.4 (C^{10}), 132.0 ($C^{4'}$), 148.0 (C^5), 149.6 (C^6), 152.7 (C^9), 158.6 ($C^{2'}$, $C^{6'}$), 158.9 (C^2), 178.2 (C^4).

По данным ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии вещество 3.06 идентифицировано как 5, 6, 2’, 6’-тетраметоксифлавон (запотин, 2-(2,6-диметксифенил)-5,6,-диметокси-4Н-хромен-4-он) (рисунок 12).

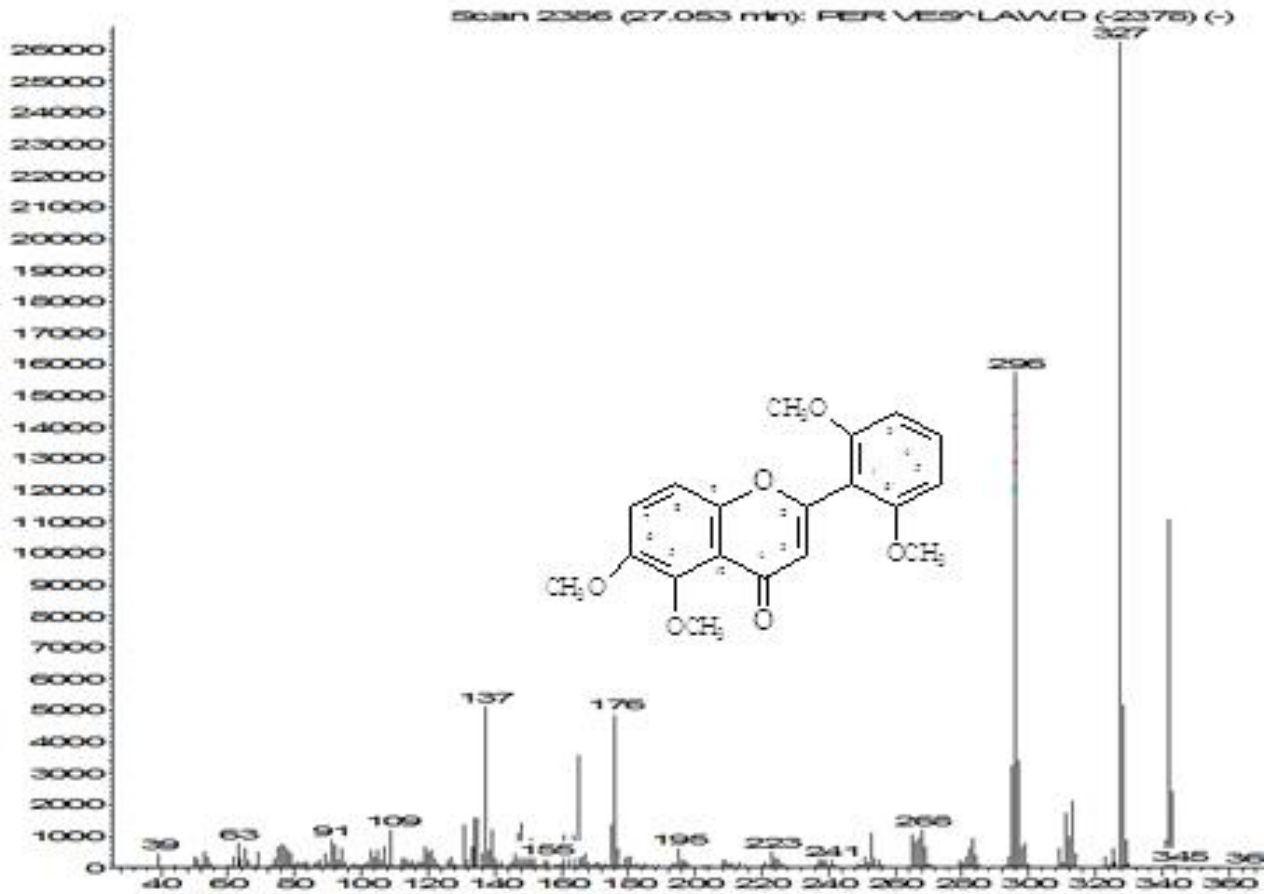


Рисунок 12 – Масс-спектр 5, 6, 2’, 6’-тетраметоксифлавон (запотин)

Вещество 3.07, находящееся в липофильной фракции, $C_{20}H_{18}O_7$, UV (MeOH, λ, nm): 239, 267, 325.

ЯМР ^{1}H ($CDCl_3$): 3.92 (3H, с, OCH_3), 3.95 (3H, с, OCH_3), 3.98 (3H, с, OCH_3), 4.00 (3H, с, OCH_3), 4.01 (3H, с, OCH_3), 6.59 (1H, с, H^3), 6.80 (1H, с, H^8), 6.98 (1H, д, *J*=8.0, $H^{5'}$), 7.34 (1H, д, *J*=2.0, $H^{2'}$), 7.52 (1H, дд, *J*=8.0, 2.0, $H^{6'}$).

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 56.0 (OCH_3), 56.1 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 61.6 (OCH_3), 62.2 (OCH_3), 96.3 (C^8), 107.4 (C^3), 108.7 ($C^{2'}$), 111.0 ($C^{5'}$), 112.9 (C^{10}), 119.7 ($C^{6'}$), 124.1 ($C^{1'}$), 140.4 (C^6), 149.3 ($C^{3'}$), 151.9 ($C^{4'}$), 152.6 (C^9), 154.5 (C^5), 157.6 (C^7), 160.0 (C^2), 177.2 (C^4).

По данным УФ, ЯМР-спектроскопии, хромато-масс-спектрометрии вещество 3.07 идентифицировано как 3’,4’,5,6,7- пентаметоксифлавон (синенсетинт) (2-(3,4-диметоксифенил)-5,6,7-триметокси-4Н-хромен-4-он) (рисунок 13).

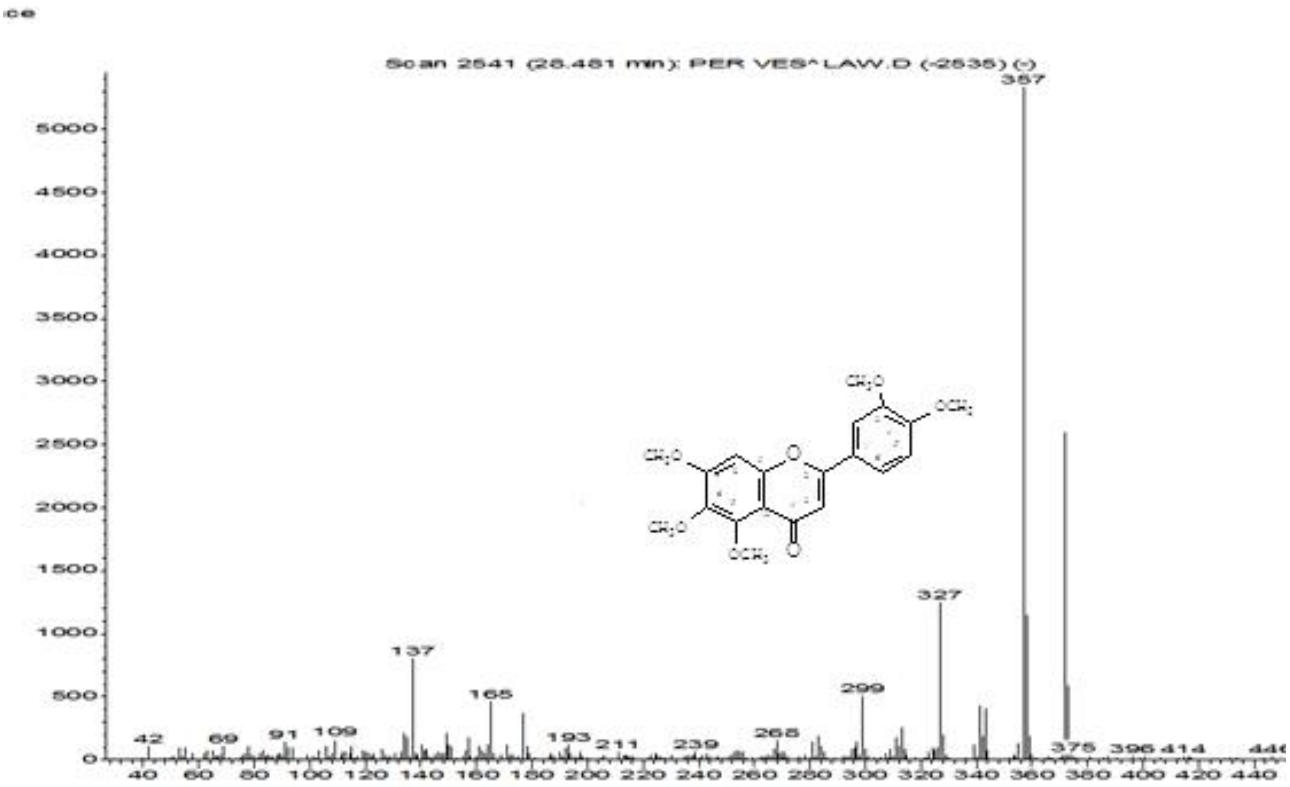


Рисунок 13 – Масс спектр 5,6,7,3’,4’- пентаметоксифлавон (синенсетинт)

Простые фенолы

Вещество 3.08, арбутин (гидрохинон-β-D-глюкопиранозид**)**, представляет собой кристаллическое вещество белого цвета, $C_{12}H_{16}O_7$, т.пл.196,5°С. На хроматограмме в УФ-свете имеет зону адсорбции, окрашенную в бледно-фиолетовый цвет; не обнаруживается в видимом свете, при проявлении реактивом Паули детектируется в виде зоны адсорбции красного цвета (таблица 7).

ЯМР ^{1}H (D_2O): 3.64 (1H, т, *J*=8.3, $H^{4'}$), 3.84 (1H, т, *J*=5.0, $H^{2'}$), 3.88 (1H, м, $H^{5'}$), 4.01 (1H, т, *J*=5.0, $H^{3'}$), 4.05 (1H, дд, *J*=11.6, 5.0, $H^{6a'}$), 4.16 (1H, дд, *J*=11.6, 4.4, $H^{6b'}$), 4.99 (1H, д, *J*=7.6, $H^{1'}$).

ЯМР ^{13}C (D_2O): 63.40 ($C^{6'}$), 72.30 ($C^{4'}$), 75.83 ($C^{2'}$), 78.43 ($C^{3'}$), 78.91 ($C^{5'}$), 104.19 ($C^{1'}$), 119.08 (C^3, C^5), 121.29 (C^2, C^6), 153.26 (C^4), 154.12 (C^1).

По результатам ЯМР-спектроскопии и сравнения со стандартным образцом свидетеля выделенное вещество 3.08 отнесено к арбутину.

Кумарины

Вещества 3.09 и 3.10 по результатам качественных реакций, ТСХ, БХ отнесены к производным кумарина.

Вещество 3.09, умбеллиферон (7-оксикумарин), представляет собой игольчатые кристаллы белого цвета, $C_9H_6O_3$, т. пл. 233-234°C. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 322, 340.

ЯМР ^{1}H (CD_3OD): 6.17 (1H, д, *J*=9.6, H^3), 6.70 (1H, д, *J*=2.2, H^8), 6.78 (1H, дд, *J*=8.1, 2.2, H^6), 7.44 (1H, д, *J*=8.1, H^5), 7.83 (1H, д, *J*=9.6, H^4).

ЯМР ^{13}C (CD_3OD): 102.42 (C^8), 111.38 (C^3), 112.14 (C^{10}), 113.51 (C^6), 129.67 (C^5), 145.02 (C^4), 156.22 (C^2), 162.11 (C^9), 162.75 (C^7).

Величина R_f изучаемого вещества и стандартного образца умбеллиферона в различных системах растворителей совпали (таблица 7).

По данным УФ, ЯМР-спектроскопии и сравнения с достоверным образцом, выделенное вещество 3.09 отнесено к умбеллиферону.

Вещество 3.10, кумарин (бензо-α-пирон), представляет собой игольчатые кристаллы без цвета, $C_9H_6O_2$, т. пл. 67-68°C. UV spectrum (EtOH, λ , nm): 275, 325. Характерная зеленоватая флуоресценция зоны адсорбции в УФ-свете, появляющаяся при обработке хроматограмм 10% раствором NaOH, позволили отнести выделенное вещество к кумариновым соединениям (таблица 7).

ЯМР ^{1}H ($CDCl_3$): 6.42 (1H, д, *J*=9.5, H^4), 7.28 (1H, м, H^9), 7.32 (1H, дд, *J*=8.1, 1.5, H^7), 7.50 (1H, ддд, *J*=8.1, 7.7, 1.7, H^8), 7.53 (1H, дд, *J*=7.9, 1.7, H^{10}), 7.73 (1H, д, *J*=9.5, H^3).

ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 116.09 (C^7), 116.17 (C^3), 118.58 (C^5), 124.13 (C^9), 127.69 (C^{10}), 131.06 (C^8), 143.33 (C^4), 153.66 (C^6), 160.36 (C=O).

Сравнение величин R_f в различных системах растворителей вещества 3.10 и стандартного образца кумарина показало их идентичность.

Результаты УФ, ЯМР-спектроскопии и сравнения со стандартным образцом свидетеля позволили отнести вещество 3.10 к кумарину.

Таблица 7 – Физико-химические свойства веществ, выделенных из сырья первоцветов и хмеля обыкновенного

Номер вещества	Название вещества	Брутто формула	Т пл., °С	молекулярная масса	Цвет веществ в УФ-свете				Величина Rf
					до проявления	после проявления			
						парами аммиака	спиртовым раствором натрия гидроксида	раствором циркония оксихлорида	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ПРОСТЫЕ ФЕНОЛЫ									
3.08	Арбутин (гидрохинон-О-β-D-глюкопиранозид)	$C_{12}H_{16}O_7$	195-197	272,26	светло-фиолетовый	–	–	интенсивно-фиолетовый	0,86 Б; 0,92 З; 0,88 И
КУМАРИНЫ									
3.09	Умбеллиферон (7-оксикумарин)	$C_9H_6O_3$	233-234	162,88	голубой	интенсивно-голубой	интенсивно-голубой	голубой	0,67 Б; 0,34 Г; 0,26 Ж
3.10	Кумарин (бензо-α-пирон)	$C_9H_6O_2$	67-68	146,89	–	–	зеленоватый	–	0,81 Г; 0,95 Ж
ФЕНОЛОКИСЛОТЫ									
3.11	Галловая (3,4,5-триоксибензойная)	$C_7H_6O_5$	254-256	170,00	темный	–	–	синий	0,63 А; 0,57 Е

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ГИДРОКСИКОРИЧНЫЕ КИСЛОТЫ									
3.12	Кофейная (3,4-диоксикоричная)	$C_9H_8O_4$	193-195	184,30	светло-голубой	интенсивно-голубой	интенсивно-голубой	голубой	0,83 А; 0,42Б; 0,27 В
3.13	Феруловая (4-окси-3-метокси-коричная)	$C_{10}H_{10}O_4$	167-169	194,19	голубовато-фиолетовый	интенсивно голубвато-фиолетовый	интенсивно голубвато-фиолетовый	голубой	0,84 А; 0,56 Б; 0,34 В
3.14	Хлорогеновая (5-О-кофеил-D-хинная)	$C_{16}H_{18}O_9$	203-205	353,08	голубой	зеленовато-голубой	зеленовато-голубой	голубой	0,66А; 0,73 Б; 0,71 В
3.15	Неохлорогеновая (3-0-кофеил- D-хинная)	$C_{16}H_{18}O_9$	аморфн.	354,00	голубой	голубой	зеленовато-голубой	голубой	0,73 В
3.16	Коричная (β-фенилакриловая кислота)	$C_9H_8O_2$	133	148,16	–	желтая (пары йода)	–	–	–
ФЛАВОНОИДЫ									
3.19	Апигенин (5, 7, 4´-триоксифлавон)	$C_{15}H_{10}O_5$	341-344	270,24	темный	зеленый	–	желтый	0,83 А; 0,19 Е
3.20	Кверцетин (3,5,7, 3´-4´-пентаоксифлавон)	$C_{15}H_{10}O_7$	310-312	302,00	желтый	интенсивно-желтый	желтый	–	0,69 А; 0,11Б; 0,13 Е
3.21	Кемпферол (3,5, 7,4´-тетраоксифлавон)	$C_{15}H_{10}O_6$	276-277	286,00	желтый	–	–	оранжевый	0,88 А; 0,16Б; 0,11 В; 0,11 Е

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3.22	Дигидрокверцетин (2R,3R)-2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-2,3-дигидрохромен-4-он)	$C_{15}H_{12}O_7$	222-224	304,25	желтый	интен-сивно-желтый	желтый	–	0,68 А; 0,10 Б; 0,12 Е
3.23	Цинарозид (лютео-лин-7-О-β-D-глюкопиранозид)	$C_{12}H_{20}O_{11}$	256-258	448,00	темно-коричне-вый	оранже-вый	–	желтый	0,25 Е
3.24	Гиперозид (кверцетин-3-О-β-D-галактопиранозид)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	235-237	464,00	темно-желтый	–	–	желтый	0,51 Б
3.25	Байкалин (5,6-дигидрокси-4-оксиген-2-фенил-4Н-1-бензопиран-7- β-D-глюкопиранозид)	$C_{22}H_{21}O_{11}$	220-222	461,10	темно-желтый	–	–	желтый	0,50 Б
3.26	Рутин (кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозидо-(1→6)-О-α-L-рамнопиранозид)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	188-190	610,52	темно-бурый	оранже-вый	желто-оранже-вый	желтый	0,71 А; 0,57 Б
3.27	Витексин (8-С-β-D-глюкопиранозид апи-генина)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	263-265	432,20	темный	желтова-то-зеле-ный	желтый	желтый	0,35 Е
3.33	Яцеин (яцеидин-7- о-β-D-глюкопиранозид)	$C_{24}H_{26}O_{13}$	205-207	522,00	темный	–	–	Желтый	0,39 Е

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3.34	Кверцимеритрин (кверцетин-7-о-β-D-глюкопиранозид)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	247-249	464,00	темный	–	–	желтый	0,38 Е
3.35	Лютеолин (2-(3,4-дигроксифенил)-5,7-дигрокси-4Н-хромен-4-он)	$C_{15}H_{10}O_6$	228-330	286,24	темный	оранже-вый	–	желтый	0,22 Е

Примечание: Системы растворителей для хроматографирования:

А – н. бутанол- кислота уксусная – вода (4:1:2) – БХ;
Б – 15% раствор кислоты уксусной – БХ;
В – 2% раствор кислоты уксусной – БХ;
Г – бензол-этилацетат (2:1) – ТСХ («Silufol»);
Д – бензол-этилацетат-кислота уксусная (50:50:1) – БХ;
Е – 30% раствор кислоты уксусной – БХ;
Ж – хлороформ – формамид – БХ;
З – этилацетат- кислота муравьиная – вода (3:1:1) – БХ;
И – 60% раствор кислоты уксусной – ТСХ («Silufol»);
К – хлороформ-спирт этиловый-вода (100:50:2) – ТСХ («Silufol»);
Л – н. бутанол – кислота уксусная – вода (4:1:5) – БХ.

Фенолокислоты

Вещество 3.11 галловая кислота (триоксибензойная кислота) представляет собой бесцветные слегка желтоватые кристаллы, $C_7H_6O_5$**.** т. пл. 254–256°C. UV (EtOH, λ , nm): 220, 271.

Вещество 3.11 при взаимодействии с 1% раствором железа хлорида (III) приобретает синюю окраску, характерную для кислоты галловой и ее эфиров [19].

ЯМР ^{1}H (acetone-d6): 7.15 (2H, c, H^3, H^7).

ЯМР ^{13}C (acetone-d6): 109.14 (C^3, C^7), 120.81 (C^2), 137.77 (C^5), 144.94 (C^4, C^6), 167.39 (C^1).

По результатам проведенных исследований методами ТСХ, БХ, УФ-спектроскопии, сравнения со стандартным образцом, вещество 3.11 идентифицировано как галловая кислота.

Гидроксикоричные кислоты

Вещества 3.12, 3.13, 3.14 , 3.15, 3.16 по флуоресценции адсорбционных зон на хроматограммах в фильтрованном УФ-свете и результатам качественных цветных реакций отнесены нами к производным кислоты коричной (таблицы 3, 4). Появление голубой окраски зон адсорбции веществ 3.08 и 3.09 на хроматографических пластинках в результате обработки реактивом кислоты барбитуровой говорит о наличии в структуре указанных веществ хинной кислоты [322].

УФ-спектральные характеристики предполагают, что исследуемые вещества относятся к производным кислоты коричной с максимумами поглощения в областях 236–245 и 297–325 нм.

Вещество 3.12, кофейная кислота (3,4-диоксикоричная), представляет собой кристаллы светло-желтого цвета, хорошо растворимые в этиловом и метиловом спиртах, плохо – в воде; $C_9H_8O_4$, т.пл. 193–195°C. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 246, 292 пл., 331.

Вещество 3.12 в УФ-свете на хроматограмме проявляется в виде сине-голубой зоны адсорбции, переходящей в желто-зеленую в парах аммиака, при взаимодействии с диазотированнной сульфаниловой кислотой наблюдается коричневое окрашивание адсорбционной зоны. При добавлении Na этилата наблюдается батохромный сдвиг основных полос поглощения до 271, 354 нм, что определяет присутствие 3,4-диоксигруппировки в исследуемом веществе [31, 48].

Результаты ТСХ, БХ, УФ-спектроскопии, сравнения со стандратным образцом позволили определить вещество 3.12 как кофейную кислоту.

Вещество 3.13, феруловая кислота (4-окси, 3-метоксикоричная кислота), представляет собой кристаллы розового цвета, хорошо растворимые в спиртах этиловом, метиловом, воде. $C_{10}H_{10}O_4$, т. пл. 167-169°C; UV spectrum (EtOH, λ , nm): 244, 298 пл., 330.

Хроматографически в УФ-свете вещество 3.13 проявляется в виде сине-голубой зоны адсорбции, приобретающей фиолетовую окраску от паров аммиака, от диазотированной сульфаниловой кислоты – желто-оранжевую. В присутствии Na этилата наблюдается батохромный сдвиг до 252, 317, 348 нм.

Сравнение со стандартным образцом свидетеля вещество 3.13 идентифицировано как феруловая кислота.

Вещество 3.14, хлорогеновая кислота (5-О-кофеоил-D-хинную кислоту), представляет собой кристаллы белого цвета, растворимые в этаноле, этилацетате; $C_{16}H_{18}O_3$, т. пл. 203–205°C. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 246, 302 пл., 328.

Вещество 3.14 на хроматограмме имеет сине-фиолетовую зону адсорбции, при воздействии паров аммиака переходящая в зелено-голубую флуоресценциию, от диазотированной сульфаниловой кислоты – в желто-коричневую.

При добавлении Na этилата наблюдается батохромный сдвиг основных полос поглощения до 266, 307 пл., 378 нм, что говорит о наличии оксигруппы в молекуле вещества. Добавление к раствору вещества 3.08 циркония оксихло-

рида наблюдается батохромный сдвиг максимума I полосы на 36 нм, что говорит о наличии 3,4-диоксигруппировки в изучаемом веществе [63].

Результаты ТСХ, БХ, УФ-спектроскопии, физико-химические свойства, сравнение со стандартным образцом, позволили определить вещество 3.14 как хлорогеновую кислоту [19, 63].

Вещество 3.15, неохлорогеновая кислота (3-О-кофеоил-D-хинная кислота), представляет собой аморфный порошок белого цвета, $C_{16}H_{18}O_9$. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 246, 302 пл., 326 [63].

При добавлении натрия гидроксида в спирте этиловом и циркония оксихлорида наблюдаются батохромные сдвиги максимума I полосы поглощения, что говорит о присутствии 3,4-диоксигруппы в структуре исследуемого вещества.

Результаты хроматографического анализа на бумаге в сравнении со стандартным образцом неохлорогеновой кислоты, УФ-спектроскопии позволили предположить, что вещество 3.15 является неохлорогеновой кислотой [19, 63].

Вещество 3.16, коричная кислота (β-фенилакриловая кислота)**,** представляет собой кристаллы бледно-желтого цвета, хорошо растворимы в эфире, спирте, бензоле, плохо-в воде; $C_9H_8O_2$, т. пл.133°С. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 276.

Хроматографически в УФ-свете не обнаруживается, при проявлении в йодной камере в видимом свете проявляет желтоватое окрашивание. В присутствии Na этилата происходит гипсохромный сдвиг до 267 нм.

По результатам ТСХ, БХ, физико-химическим свойствам, УФ-спектроскопии и сравнения с достоверным образцом, вещество 3.16 идентифицировано как коричная кислота.

Дубильные вещества

Вещество 3.17, танин, представляет собой аморфный порошок светло-жёлтого цвета со слабым своеобразным запахом, вяжущего вкуса, растворимый в воде, этаноле и глицерине. Идентифицирован на основании результатов

ЯМР – спектроскопии (ЯМР ^{13}C совпал с данными в журнале Food Chemistry 118 (2010) p.740) и сравнения с достоверным образцом свидетеля.

Вещество 3.18, катехин, (3,5,7,3′,4′ - пентаоксифлаван) представляет собой бесцветное кристаллическое вещество; $C_{15}H_{14}O_6$, с т.пл.175°С.

ЯМР ^1H (DMSO): 2.49 (1H, м, H^{4a}), 2.62 (1H, м, H^{4b}), 3.79 (1H, м, H^3), 4.46 (1H, д, *J*=7.3, H^2), 4.84 (1H, д, *J*=4.0, OH), 5.67 (1H, д, *J*=2.0, H-), 5.87 (1H, д, *J*=2.0, H^8), 6.58 (1H, дд, *J*=2.0, 8.0, $H^{5'}$), 6.67 (1H, д, *J*=8.0, $H^{6'}$), 6.71 (1H, д, *J*=2.0, $H^{2'}$), 8.79 (1H, с, OH), 8.83 (1H, с, OH), 8.91 (1H, с, OH), 9.15 (1H, с, OH).

ЯМР ^{13}C (DMSO): 27.84 (C^4), 66.27 (C^3), 80.96 (C^2), 93.78 (C^9), 95.05 (C^7), 99.00 (C^5), 114.48 (C^{12}), 115.01 (C^{15}), 118.36 (C^{16}), 130.55 (C^{11}), 144.79 (C^{14}), 155.31 (C^6), 156.12 (C^{10}), 156.41 (C^8).

По результатам ЯМР-спектроскопии и сравнение со стандартным образцом свидетеля выделенное вещество 3.18 отнесено к катехину.

Флавоноиды

Агликоны флавоноидов

Вещество 3.19, апигенин (5,7,4´ – тригидроксифлавон, 5,7-дигидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4Н-хроман-4-он), представляет собой игольчатые кристаллы бледно-желтого цвета, $C_{15}H_{10}O_5$, т.пл. 341–344°С. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 272, 296, 337.

Вещество 3.19 на хроматограмме в УФ-свете имеет зону адсорбции желтого цвета (таблица 7), дает положительную цианидиновую реакцию по Брианту (слой октанола окрашивается в ярко-розовый цвет), что говорит об агликоновой природе выделенного флавоноида.

В присутствии Na ацетата наблюдался батохромный сдвиг I полосы на 43 нм, что говорит о наличии свободной оксигруппы в С-7 положении. При добавлении Na этилата происходил батохромный сдвиг I полосы на 57 нм, что предполагает наличие свободной оксигруппы в С-4´ положении. Батохромный

сдвиг I полосы на 50 нм наблюдался при добавлении алюминия хлорида, говорит о наличии оксигруппы в положении С-5 у флавонов (таблица 8).

ЯМР ^{1}H (DMSO-d6): 7.93 (2H, д, *J*=8.0, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 6.92 (2H, д, *J*=8.0, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 6.77 (1H, д, *J*=2.5, H^{8}), 6.47 (1H, с, H^{3}), 6.21 (1H, д, *J*=2.5, H^{6}).

ЯМР ^{13}C (DMSO-d6): 182.21 (C^{4}), 164.19 (C^{2}), 163.31 (C^{7}), 161.95 (C^{5}), 161.79 ($C^{4'}$), 157.86 (C^{9}), 128.98 ($C^{2'}$, $C^{6'}$), 121.63 ($C^{1'}$), 116.51 ($C^{3'}$, $C^{6'}$), 105.83 (C^{10}), 103.30 (C^{3}), 99.89 (C^{6}), 94.55 (C^{8}).

На основании проведенных исследований и сравнения со стандартным образцом выделенное вещество 3.19 отнесено к апигенину.

Вещество 3.20, кверцетин (3,5,7,3´,4´-пентагидрооксифлавон), представляет собой кристаллы ярко-желтого цвета, $C_{15}H_{10}O_{7}$, с т. пл. 310-312°С. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 258, 272,372.

Вещество 3.20 на хроматограмме в УФ-свете имеет зону адсорбции желто-оранжевого цвета (таблица 7), дает положительную цианидиновую реакцию по Брианту (слой октанола окрашивается в ярко-розовый цвет), что говорит об агликоновой природе выделенного флавоноида.

При добавлении Na ацетата наблюдался батохромный сдвиг I полосы на 22 нм, что говорит о наличии свободной оксигруппы в С-7 положении. Под воздействием Na ацетата и кислоты борной происходил батохромный сдвиг I полосы на 18 нм, что говорит о наличии гидроксильных групп в С-3´,4´положениях кольца В. При добавлении алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг полосы на 58 нм, не разлагающийся при последующем прибавлении кислоты хлористоводородной, что говорит о наличии оксигрупп в положениях С-3,5 (таблица 8) .

ЯМР ^{1}H (CD_3OD): 6.1 (1H, д, *J*=2.1, H^{6}), 6.37 (1H, д, *J*=2.1, H^{8}), 6.87 (1H, д, *J*=8.5, H^{5}), 7.6 (1H, дд, *J*=8.5, 2.1, H^{6}), 7.74 (1H, д, *J*=2.1, H^{2}).

ЯМР ^{13}C (CD_3OD): 94.12 (C^{8}), 99.87 (C^{6}), 105.16 (C^{3}), 115.36 (C^{10}), 115.69 ($C^{5'}$), 121.48 ($C^{6'}$), 124.62 ($C^{2'}$), 137.72 ($C^{1'}$), 146.27 (C^{9}), 148.57 ($C^{3'}$), 149.36 ($C^{4'}$), 158.51 (C^{5}), 163.46 (C^{7}), 166.46 (C^{2}), 177.57 (C^{4}).

Таблица 8 – Характеристика УФ-спектров флавоноидов, выделенных из сырья первоцветов и хмеля обыкновенного

Наименование вещества	Полосы поглощения	(EtOH,λ, nm)	Na ацетат		Na ацетат + кислота борная		Алюминия хлорид		Na этилат	
			λ, nm	Δ λ	λ, nm	Δ λ	λ, nm	Δ λ	λ, nm	Δ λ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Апигенин	I II	337, 296 пл. 272	380 279	+43 +7	382 277	+45 +5	387 281	+50 +9	394 278	+57 +6
Байкалин	I II	324 283 218	–	–	–	–	344 295 223	+20 +12 +5	–	–
Витексин	I II	336 272	378 280	+42 +8	–	–	386 284	+50 +12	398 281	+62 +9
Цинарозид	I II	348 260	388 279	+40 +19	–	–	396 279	+48 +15	–	–
Кверцетин	I II	372, 272 пл. 258	394 264	+22 +6	390 260	+18 +2	430 269	+58 +11	–	–
Рутин	I II	361, 270 пл. 259	400 264	+39 +5	390 262	+29 +3	410 266	+42 +7	–	–
Кемпферол	I II	370 266	381 271	+11 +5	379 269	+9 +3	424 278	+54 +12	413	+43

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Гиперозид	I II	364, 267 пл. 257	383 260	+19 +3	380 261	+16 +4	419 270	+55 +13	–	–
Дигидроквер-цетин	I II	336, 293 пл. 261	351 265	+15 +4	354 269	+18 +8	381 272	+45 +11	378	+42
Кверцимерит-рин	I II	375 255	–	–	400 –	+25 –	440 –	+65 –	–	–
Цинарозид	I II	350 266,255	352 –	+2	410	+60	396 –	+46	–	–
Байкалин	I II	310 275	–	–	–	–	354	+44	–	–
Яцеин	I II	350 270,260	–	–	–	–	400	+50	–	–

Проба смешения выделенного вещества 3.20 и стандартного образца кверцетина не дала депрессии температуры плавления. Таким образом, выделенное вещество 3.20 идентифицировано как кверцетин.

Вещество 3.21, кемпферол (3,5,7,4´- тетрагидрооксифлавон), представляет собой кристаллы светло-желтого цвета, $C_{15}H_{10}O_6$,с т. пл. 276-277^{0}C. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 266, 370.

Добавление Na ацетата вызывал батохромный сдвиг I полосы на 11 нм, что предполагает наличие свободной гидроксильной группы в С-7 положении. Под влиянием Na метилата происходил батохромный сдвиг I полосы на 43 нм, что говорит о наличии гидроксильной группы в С-3´,4´положениях кольца В. Наличие гидроксильной группы в положениях С-3,5 было подтверждено батохромным сдвигом I полосы на 54 нм при добавлении алюминия хлорида, дальнейшее прибавление кислоты хлористоводородной не привело к его разложению (таблица 8) [106].

ЯМР ^{1}H (DMSO): 8.10 (2H, д, *J*=8.0, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 7.0 (2H, д, *J*=8.0, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 6.54 (1H, д, *J*=2.0, H^8), 6.28 (1H, д, *J*=2.0, H^6).

ЯМР ^{13}C (DMSO): 93.50 (C^8), 98.21 (C^6), 103.16 (C^{10}), 115.42 ($C^{3'}$, $C^{5'}$), 121.74 ($C^{1'}$), 129.57 ($C^{2'}$, $C^{6'}$), 135.67 (C^3), 146.81 (C^2), 156.23 (C^9), 159.25 ($C^{4'}$), 160.72 (C^5), 163.96 (C^7), 175.90 (C^4).

На основании проведенных исследований и сравнения со стандартным образцом выделенное вещество 3.21 отнесено к кемпферолу.

Вещество 3.22, дигидрокверцетин (таксифолин) (2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидро-4Н-хромен-4-он) представляет собой кристаллы светло-желтого цвета, $C_{15}H_{12}O_7$,с т. пл. 222-224°C. UV (EtOH, λ, nm): 261, 293, 336.

В присутствии Na ацетата наблюдался батохромный сдвиг I полосы на 15 нм, что предполагает наличие свободной гидроксильной группы в С-7 положении. Под влиянием Na ацетата и кислоты борной происходил батохром-

ный сдвиг I полосы на 18 нм, что говорит о наличии гидроксильных групп в С-3´,4´положениях кольца В. При добавлении алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг I полосы на 45 нм, не разлагающийся при последующем прибавлении кислоты хлористоводородной, что говорит о наличии гидроксильной группы в положении С-3,5 (таблица 8) [106].

ЯМР ^{1}H (DMSO): 4.50 (1H, д, *J*=11.1, H^{3}), 4.98 (1H, д, *J*=11.1, H^{2}), 5.85 (1H, д, *J*=2.1, H^{6}), 5.90 (1H, д, *J*=2.1, H^{8}), 6.74 (2H, с, $H^{2'}$, $H^{5'}$), 6.87 (1H, с, $H^{6'}$), 8.96 (1H, с, $OH^{3'}$), 9.01 (1H, с, $OH^{4'}$), 10.81 (1H, с, OH^{7}), 11.89 (1H, с, OH^{5}).

ЯМР ^{13}C (DMSO): 71.57 (C^{3}), 83.04 (C^{2}), 94.92 (C^{8}), 95.94 (C^{6}), 100.56 (C^{10}), 115.41 ($C^{5'}$), 115.38 ($C^{2'}$), 119.34 ($C^{6'}$), 128.0 ($C^{1'}$), 144.91 ($C^{3'}$), 145.73 ($C^{4'}$), 162.52 (C^{9}), 163.34 (C^{5}), 166.76 (C^{7}), 197.72 (C^{4}).

На основании результатов УФ, ЯМР – спектроскопии и сравнения со стандартным образцом свидетеля выделенное вещество 3.22 отнесено к дигидрокверцетину.

О-гликозиды флавоноидов

Вещество 3.23, цинарозид (лютеолин-7-О-β-D-глюкопиранозид), представляет собой кристаллическое вещество желтого цвета. $C_{21}H_{20}O_{11}$, т. пл. 256–258°С. UV spectrum (EtOH, λ , nm): 260,348.

Вещество 3.23 на хроматограмме имеет зону адсорбции темного цвета, переходящего в желтый после проявления циркония оксихлоридом и в оранжевый при обработке парами аммиака (таблица 7). Вещество дает положительную цианидиновую реакцию (слой октанола не окрашивается окрашивается), восстанавливает жидкость Фелинга только после гидролиза, что говорит о гликозидной природе выделенного флавоноида.

При добавлении алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг (EtOH, λ , nm): 279, 396, что говорит о наличии свободных оксигрупп в 5, 3´, 4´-положениях [106]. Исследованиями спектральных характеристик в УФ-области определено, что углеводный компонент может располагаться у С-7 (отсутствие батохромного сдвига с натрия ацетатом).

ЯМР ^{1}H (Aceton-d6 + D_2O): 3.42 (1H, т, *J*=9.0, $H^{4'}$), 3.49 (1H, т, *J*=9.0, $H^{2''}$), 3.56 (1H, т, *J*=9.0, $H^{3''}$), 3.60 (1H, м, $H^{5''}$), 3.68 (1H, дд, *J*=12.2, 5.6, $H^{6a''}$), 3.85 (1H, дд, *J*=12.2, 1.8, $H^{6b''}$), 5.10 (1H, д, *J*=7.8, $H^{1''}$), 6.44 (1H, д, *J*=1.8, H^{6}), 6.63 (1H, s, H^{3}), 6.83 (1H, д, *J*=1.8, H^{8}), 6.95 (1H, д, *J*=8.0, $H^{5'}$), 7.41 (1H, д, *J*=8.0, $H^{6'}$), 7.43 (1H, уш.с., $H^{2'}$).

ЯМР ^{13}C (Aceton-d6 + D_2O): 61.7 ($C^{6''}$), 70.3 ($C^{4''}$), 73.8 ($C^{2''}$), 76.8 ($C^{3''}$), 77.4 ($C^{5''}$), 95.8 (C^{8}), 100.5 (C^{6}), 100.7 ($C^{1''}$), 103.7 (C^{3}), 106.3 (C^{10}), 113.8 ($C^{2''}$), 116.5 ($C^{5'}$), 120.3 ($C^{6'}$), 122.6 ($C^{1'}$), 146.3($C^{3'}$), 150.4 ($C^{4'}$), 158.0 (C^{9}), 161.8 (C^{5}), 163.9 (C^{7}), 165.8 (C^{2}), 183.1 (C^{4}).

На основании результатов УФ, ЯМР – спектроскопии и сравнения со стандартным образцом свидетеля выделенное вещество 3.23 отнесено к цинарозиду [82].

Вещество 3.24, гиперозид (кверцетин-3-O-β-D-галактопиранозид) представляет собой кристаллы светло-желтого цвета, $C_{21}H_{20}O_{12}$, т. пл. 235–237^{0}C. UV spectrum (EtOH, λ , nm): 257, 267, 364.

Вещество 3.24 на хроматограмме в УФ-свете имеет зону адсорбции темно-желтого цвета (таблица 7), дает положительную цианидиновую реакцию по Брианту (слой октанола не окрашивается), что говорит о гликозидной природе выделенного флавоноида [237].

Под влиянием Na ацетата произошел батохромный сдвиг I полосы на 19 нм, что предполагает наличие свободной гидроксильной группы в С-7 положении. При добавлении Na ацетата и кислоты борной происходил батохромный сдвиг I полосы на 16 нм, что говорит о наличии гидроксильных групп в С-3´,4´положениях кольца В. Добавление алюминия хлорида вызвало батохромный сдвиг I полосы на 55 нм, не разлагающийся при последующем прибавлении кислоты хлористоводородной, что предполагает наличие гидроксильной группы в положениях С-3,5 (таблица 8) [106].

ЯМР ^{1}H (CD_3OD): 3.49 (1H, т, *J*=6.0, $H^{5''}$), 3.56 (1H, м, $H^{3''}$), 3.65 (2H, дд, *J*=11.2, 6.0, $H_{6''}$), 3.81(1H, дд, *J*=9.5, 8.0, $H^{2''}$), 3.86 (1H, м, $H^{4''}$), 5.26 (1H, д,

J=7.6, $H^{1''}$), 6.23 (1H, д, *J*=2.0, H^{6}), 6.43 (1H, д, *J*=2.0, H^{8}), 6.89 (1H, дд, *J*=8.6, 2.0, $H^{5'}$), 7.62 (1H, дд, *J*=8.6, 1.1, $H^{6'}$), 7.82 (1H, д, *J*=2.0, $H^{2'}$).

ЯМР ^{13}C (CD_3OD): 62.10 ($C^{6''}$), 70.12($C^{4''}$), 73.25 ($C^{2''}$), 75.18 ($C^{3''}$), 77.37 ($C^{5''}$), 94.91 (C^{8}), 100.07 (C^{6}), 105.16 ($C^{1''}$), 105.66 (C^{10}), 116.39 ($C^{5'}$), 117.92 ($C^{2'}$), 123.16 ($C^{6'}$), 123.34 ($C^{1'}$), 135.66 (C^{3}), 146.12 ($C^{3'}$), 150.06 ($C^{4'}$), 158.56 (C^{9}), 158.92 (C^{2}), 163.19 (C^{5}), 166.13 (C^{7}), 179.61 (C^{4}).

На основании результатов УФ, ЯМР–спектроскопии, вещество 3.24 было идентифицировано как гиперозид.

Вещество 3.25, байкалин (байкалеин-7-глюкуронид)**,** представляет собой кристаллы желтого цвета, $C_{22}H_{21}O_{11}$, т. пл. 220–222^{0} С. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 218, 283, 324.

При добавлении алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг (EtOH, λ, nm): 223, 295, 344.

ЯМР ^{1}H (DMSO-d6): 3.37 (1H, т, *J*=9.0, $H^{4''}$), 3.43 (2H, м, $H^{2''}$, $H^{3''}$), 4.05 (1H, д, *J*=9.0, $H^{5''}$), 5.23 (1H, д, *J*=7.9, $H^{1''}$), 7.0 (1H, с, H^{3}), 7.09 (1H, с, H^{8}), 7.61 (3H, м, $H^{3'}$, $H^{4'}$, $H^{5'}$), 8.08 (2H, м, $H^{2'}$, $H^{6'}$).

ЯМР ^{13}C (DMSO-d6): 71.39 ($C^{4''}$), 72.73 ($C^{2''}$), 75.11 ($C^{5''}$), 75.28 ($C^{3''}$), 93.73 (C^{8}), 99.76 ($C^{1''}$), 104.12 (C^{3}), 106.07 (C^{10}), 126.14 ($C^{2'}$, $C^{6'}$), 129.07 ($C^{3'}$, $C^{5'}$), 130.15 (C^{6}), 130.28 ($C^{1'}$), 132.14 ($C^{4'}$), 146.56 (C^{5}), 149.38 (C^{9}), 150.93 (C^{7}), 163.91 (C^{2}), 170.76 ($C^{6''}$), 182.46 (C^{4}).

Выполненные исследования и сравнительный анализ с достоверным образцом свидетеля позволили отнести выделенное вещество 3.25 к байкалину.

Вещество 3.26, рутин (3-О-рутинозид кверцетина), представляет собой кристаллы бледно-желтого цвета, $C_{27}H_{30}O_{16}$, с т. пл. 188–190°С. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 259, 270, 361.

Вещество 3.26 на хроматограмме в УФ-свете имеет зону адсорбции бурого цвета, переходящего в желтый в результате проявления раствором циркония оксихлорида и в оранжевый при действии паров аммиака. Вещество проявляет

положительную цианидиновую реакцию по Брианту (слой октанола не окрашивается), восстанавливает жидкость Фелинга после гидролиза, что говорит о гликозидной природе выделенного флавоноида [237].

В присутствии Na ацетата наблюдался батохромный сдвиг I полосы на 39 нм, что предполагает наличие свободной гидроксильной группы в С-7 положении. Под влиянием Na ацетата и кислоты борной происходил батохромный сдвиг I полосы на 29 нм, что говорит о наличии гидроксильных групп в С-3´,4´положениях кольца В. При добавлении алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг I полосы на 42 нм, не разлагающийся при последующем прибавлении кислоты хлористоводородной, что говорит о наличии гидроксильной группы в положении С-3,5 (таблица 8).

ЯМР ^{1}H (CD_3OD): 1.12 (3H, д, *J*=6.3, $H^{6'''}$), 3.30- 3.85 (10H, м, $H^{2''}$, $H^{3''}$, $H^{4''}$, $H^{5''}$, $H^{6''a}$, $H^{6''b}$, $H^{2'''}$, $H^{3'''}$, $H^{4'''}$, $H^{5'''}$), 4.52 (1H, д, *J*=1.5, $H^{1'''}$), 5.10 (1H, д, *J*=7.5, $H^{1''}$), 6.20 (1H, д, *J*=2.1, H^{6}), 6.38 (1H, д, *J*=2.1, H^{8}), 6.88 (1H, д, *J*=8.4, $H^{5'}$), 7.63 (1H, дд, *J*=8.5, 2.2, $H^{6'}$), 7.67 (1H, д, *J*=2.05, H*2'*).

ЯМР ^{13}C (CD_3OD): 18.0 ($C^{6'''}$), 68.7 ($C^{6''}$), 69.9 ($C^{5'''}$), 71.5 ($C^{4''}$), 72.3 ($C^{2'''}$), 72.4 ($C^{3'''}$), 74.1 ($C^{4'''}$), 75.9 ($C^{2''}$), 77.4 ($C^{5''}$), 78.3 ($C^{3''}$), 95.1 (C^{8}), 100.2 (C^{6}), 102.6 ($C^{1'''}$), 105.0 ($C^{1''}$), 105.8 (C^{10}), 116.3 ($C^{5'}$), 118.0 ($C^{2'}$), 123.4 ($C^{1'}$), 123.8 ($C^{6'}$), 135.9 (C^{3}), 146.1 ($C^{3'}$), 150.1 ($C^{4'}$), 158.8 (C^{2}), 159.7 (C^{9}), 163.3 (C^{5}), 166.3 (C^{7}), 179.7 (C^{4}).

На основании результатов УФ, ЯМР –спектроскопии, а также отсутствие депрессии температуры плавления выделенного вещества и достоверного образца, вещество 3.26 было идентифицировано как рутин.

С-гликозиды

Вещество 3.27, витексин (8-С-β-D-глюкопиранозид апигенина), представляет собой кристаллы светло-желтого цвета, $C_{21}H_{20}O_{10}$,с т. пл. 263-265^{0}С. UV spectrum (EtOH, λ , nm): 272, 336.

При добавлении алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг (EtOH, λ, nm): 284, 386. При добавлении Na ацетата наблюдался батохромный сдвиг (EtOH, λ, nm): 280, 378.

ЯМР ^{1}H (Aceton-d6 + D_2O): 3.53 (1H, м, $H^{5''}$), 3.54 (1H, м, $H^{3''}$), 3.57 (1H, м, $H^{4''}$), 3.74 (1H, дд, *J*=12.3, 5.5, $H^{6a''}$), 3.77 (1H, дд, *J*=12.3, 2.0, $H^{6b''}$), 4.11 (1H, т, *J*=9.0, $H^{2''}$), 4.85 (1H, д, *J*=9.9, $H^{1''}$), 6.44 (1H, с, H^{8}), 6.60 (1H, с, H^{3}), 6.95 (2H, д, *J*=8.6, $H^{3'}$, $H^{5'}$), 7.85 (2H, д, *J*=8.6, $H^{2'}$, $H^{6'}$).

ЯМР ^{13}C (Aceton-d6 + D_2O): 61.7 ($C^{6''}$), 70.6 ($C^{4''}$), 72.0 ($C^{2''}$), 74.5 ($C^{1''}$), 79.2 ($C^{3''}$), 81.6 ($C^{5''}$), 95.3 (C^{8}), 103.4 (C^{3}), 104.3 (C^{10}), 108.7 (C^{6}), 116.7 ($C^{3'}$, $C^{5'}$), 122.4 ($C^{1'}$), 129.0 ($C^{2'}$, $C^{6'}$), 157.7 (C^{9}), 161.0 (C^{5}), 162.0($C^{4'}$), 164.5 (C^{7}), 165.0 (C^{2}), 183.1 (C^{4}).

По данным УФ, ЯМР-спектрального анализа, по литературным данным выделенное вещество 3.27 было идентифицировано как витексин [237].

В ходе выполненных исследований по выделению индивидуальных соединений из листьев хмеля обыкновенного во фракциях 22–26 выделен 1 фитостерин 3.42 (54 мг). Во фракциях 27–34, в хлороформных фракциях водно-спиртового извлечения из сырья хмеля обыкновенного выделено 2 кумарина: 3.09 умбеллиферон (13 мг) и 3.10 кумарин (16 мг). Во фракциях 40-44 выделена галловая кислота 3.11 (12 мг), во фракциях 45–49 и в эфирно-метанольном растворе, полученном после отделения флавоноидов из этилацетатной фракции, выделены – 5 оксикоричных кислот: 3.12 кофейная (11 мг), 3.13 феруловая (16 мг), 3.14 хлорогеновая (12 мг), 3.15 неохлорогеновая (18 мг), 3.16 коричная (14 мг). Структуру выделенных веществ определяли качественными реакциями, методами хроматографии, сравнением с достоверными образцами свидетелей, на основании физико-химических свойств, методами УФ-спектроскопии с использованием диагностических и комплексообразующих реактивов, а также данных ЯМР-спектроскопии.

Методом колоночной хроматографии выделены вещества 3.17 танин (11 мг), 3.36 ЭГКГаллат (23 мг), 3.37 эпикатехин (17 мг). Структуру выделен-

ных веществ определили методами ЯМР-, УФ-спектроскопии. Физико-химические свойства танина описаны выше.

Вещество 3.36, эпигаллокатехинагаллат (5,7-дигрокси-2-(3,4,5-тригидроксифенил)-3,4-дигидро-2Н-хромен-3-ил-3,4,5-тригидроксибензоат), $C_{22}H_{18}O_{11}$. Представляет собой аморфный порошок светло-жёлтого цвета со слабым своеобразным запахом, вяжущего вкуса, растворимый в воде, этаноле и глицерине. Идентифицирован на основании результатов ЯМР-спектроскопии (ЯМР ^{13}С совпал с данными в журнале Food Chemistry 118 (2010) p. 740).

ЯМР ^{1}Н (acetone-d6): 2.89 (1Н, дд, *J*=2.3, 17.3, H^{4a}), 3.02 (1Н, дд, *J*=4.5, 17.3, H^{4b}), 5.05 (1Н, с, H^{2}), 5.54 (1Н, т, *J*=2.3, H^{3}), 6.01 (1Н, д, *J*=2.4, H^{6}), 6.04 (1Н, д, *J*=2.4, $H^{8'}$), 6.61 (2Н, с, $H^{2'}$, $H^{6'}$), 7.01 (2Н, с, $H^{2'}$, $H^{6'}$).

ЯМР ^{13}С (acetone-d6): 78.1 (C^{2}), 69.2 (C^{3}), 26.6 (C^{4}), 157.1 (C^{5}), 95.8 (C^{6}), 157.8 (C^{7}), 96.5 (C^{8}), 157.4 (C^{8a}), 99.0 (C^{4a}), 130.7 ($C^{1'}$), 106.7 ($C^{2'}$, $C^{6'}$), 146.2 ($C^{3'}$, $C^{5'}$), 133.1 ($C^{4'}$), 121.9 ($C^{1''}$), 110.0 ($C^{2''}$, $C^{6''}$), 145.9 ($C^{3''}$, $C^{5''}$), 138.8 ($C^{4'}$), 166.0 (С=О).

По результатам ЯМР-спектроскопии и сравнение с достоверным образцом свидетеля выделенное вещество 3.36 отнесено к ЭГКГаллату.

Вещество 3.37, эпикатехин, $C_{15}H_{14}O_{6}$, представляет собой светло-жёлтый аморфный порошок со слабым специфическим запахом, вяжущего вкуса, растворимый в воде, спирте этиловом и глицерине. Идентифицирован на основании результатов ЯМР-спектроскопии (ЯМР ^{13}С совпал с данными в журнале Food Chemistry 118 (2010) p. 740).

ЯМР ^{1}Н (acetone-d6): 6.97 (1Н, д, *J*=1.7, $H^{2'}$); 6.78 (1Н, дд, *J*=7.5, 1.7, $H^{6'}$); 6.74 (1Н, д, *J*=7.5, $H^{5'}$); 5.94 (1Н, д, *J*=2.2, H^{6}) 5.91 (1Н, д, *J*=2.2, H^{8}); 4.81 (1Н, с, H^{2}); 4.17 (1Н, уш.с., H^{3}); 2.85 (1Н, дд, *J*=4.5, 16.5, H^{4a}); 2.73 (1Н, дд, *J*=2.5, 16.7, H^{4b}).

ЯМР ^{13}С (acetone-d6): 29.22 (C^{4}); 67.74 (C^{3}); 79.85 (C^{2}); 95.92 (C^{8}); 96.46 (C^{6}); 100.09 (C^{10}); 115.34 ($C^{2'}$), 115.92 ($C^{5'}$); 119.12 ($C^{6'}$); 132.30 ($C^{1'}$); 145.72 ($C^{4'}$); 145.89 ($C^{3'}$); 157.34 (C^{9}); 157.61 (C^{7}); 157.95 (C^{5}).

По результатам ЯМР-спектроскопии и сравнение с достоверным образцом свидетеля выделенное вещество 3.37 отнесено к эпикатехину.

Во фракциях 54–67 – 7 флавоноидных соединений: агликоны флавоноидов 3.20 кверцетин (17 мг), 3.21 кемпферол (19 мг), 3.22 дигидрокверцетин (таксифолин) (14 мг), 3.35 лютеолин (21 мг); О – гликозиды флавоноидов 3.23 цинарозид (14 мг), 3.24 гиперозид (16 мг), 3.26 рутин (17 мг). Указанные соединения идентифицированы методами ЯМР-спектроскопии, ТСХ, БХ, УФ-спекторметрии, сравнением состандартными образцами свидетелей.

Структуру выделенного вещества 3.35 определили методами хроматографии, сравнением со стандартным образцом свидетеля, на основании физико-химических свойств, методами УФ-спектроскопии с использованием диагностических и комплексообразующих реактивов.

Вещество 3.35, лютеолин (5,7,3',4'-тетраоксифлавон), кристаллическое вещество желтого цвета, $C_{21}H_{20}O_{11}$, т.пл. 266–268 С. UV spectrum (EtOH, λ, nm): 260,348. При добавлении алюминия хлорида наблюдался батохромный сдвиг (EtOH, λ, nm): 279, 388. Полученные результаты позволили предположить, что выделенное вещество лютеолин (3.35).

Фитостерины

Полученное вещество 3.42 представляло собой белые кристаллы с желтоватым оттенком. Для определения структуры вещества 3.42 использовались методы ЯМР ^{1}Н-, ЯМР ^{13}С- и УФ-спектроскопии. На рисунках 14–17 приведены спектры ЯМР ^{1}Н-, ^{13}С-, УФ-спектры указанного вещества.

В спектрах ЯМР^{13}С вещества 3.42 приведены сигналы двенадцати CH_2-групп, двух четвертичных атомов углерода, шести CH_3- и тринадцати СН-групп, одна двойная связь; сигналы карбоксильных и карбонильных групп отсутствуют.

Положения сигналов протонированных атомов углерода и их протонов определены на основании анализа спектров HSQC и COSY.

Характеристичными параметрами химических сдвигов ацетального центра глюкопиранозильной системы явились сигналы протон H-1’ (δ_H 4.22) и углеродного атома C-1’ (δ_C 101.26). Отнесения протонов H-2’, H-3’, H-4’, H-5’ и H-6’ проведены исходя от протона H-1’. Оставшиеся сигналы относятся к β-ситостеролу. Наличие в спектре HMBC пика корреляции C-3/ H-1’ говорит о том, что вещество относится к гликозидам. Таким образом, β-ситостерол связан через 1’/3-гликозидную связь с β-D-глюкопироназидом (рисунки 15, 16, приложения 12, 13).

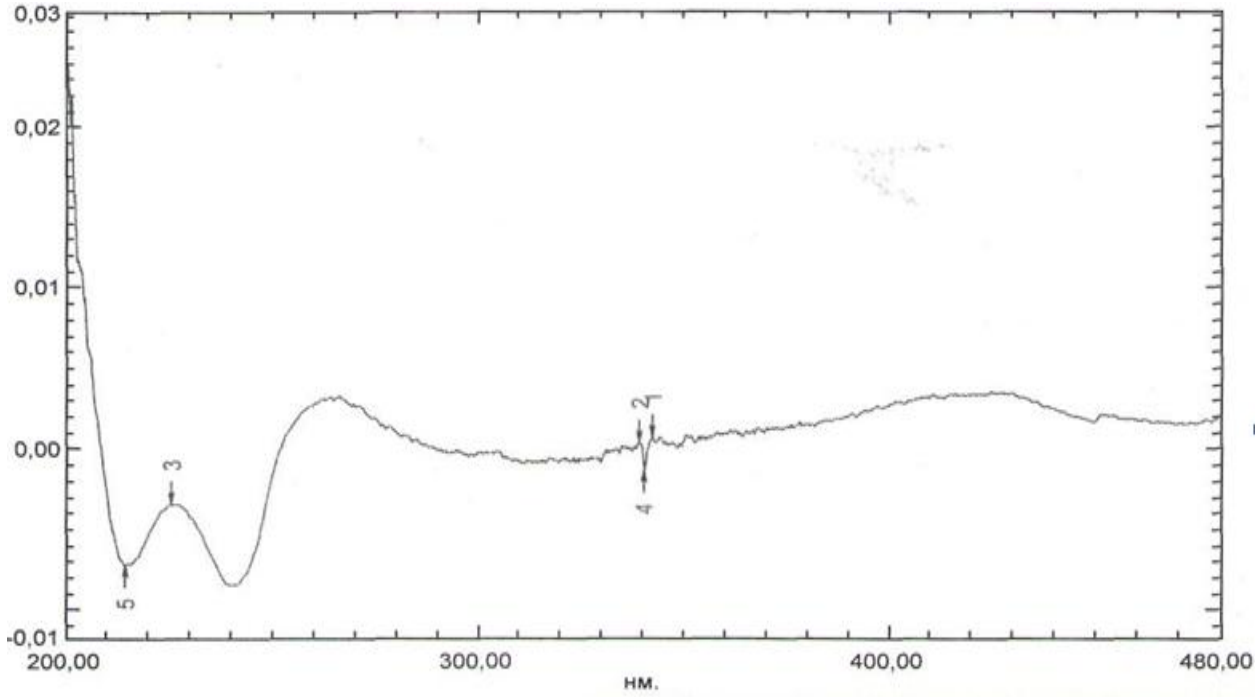


Рисунок 14 – Спектр раствора вещества
β-ситостерола-3-O-β-D-глюкопиранозида

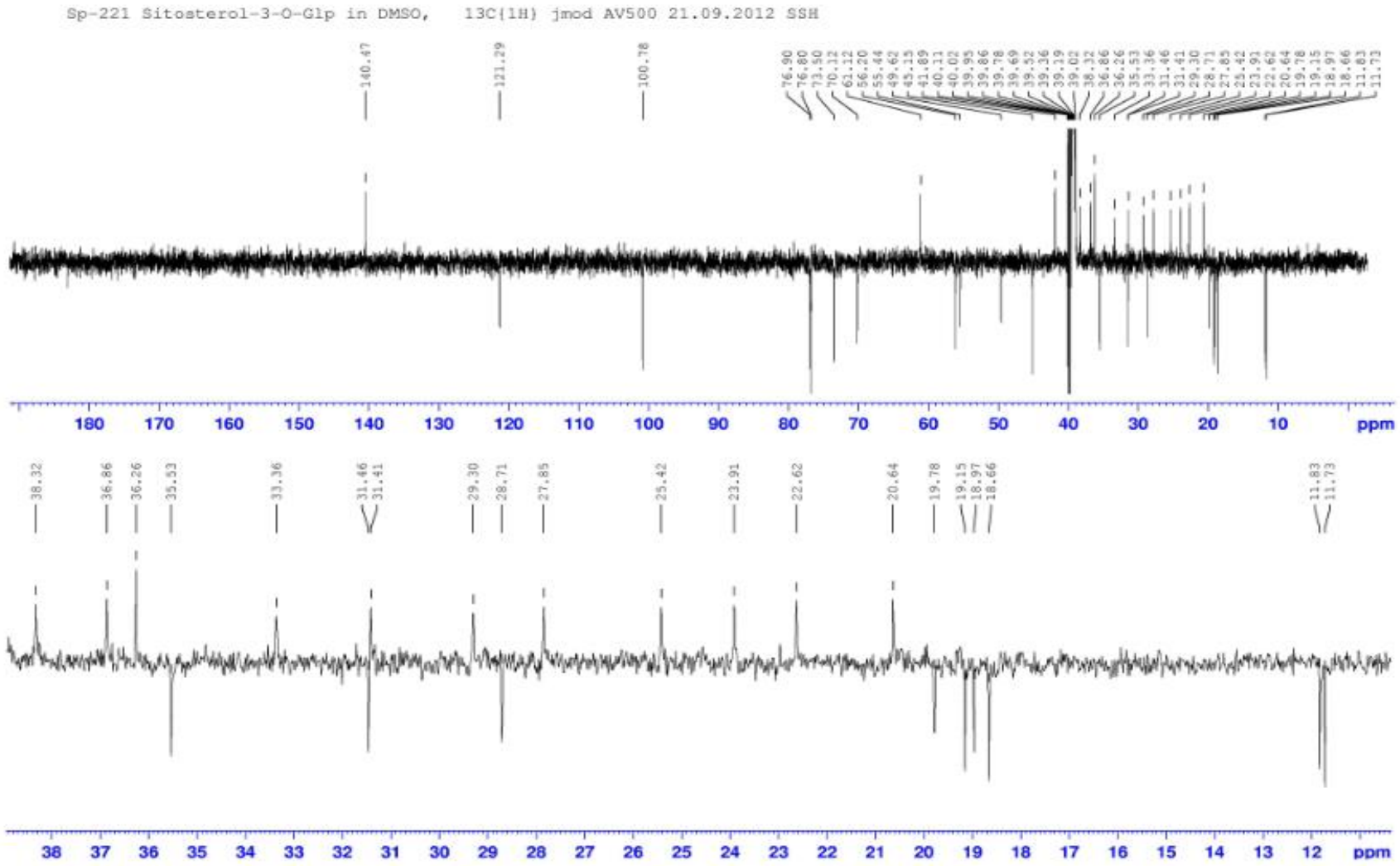


Рисунок 15 – Спектр ЯМР ^{13}C β-ситостерола-3-O- β-D-глюкопиранозида в DMSO

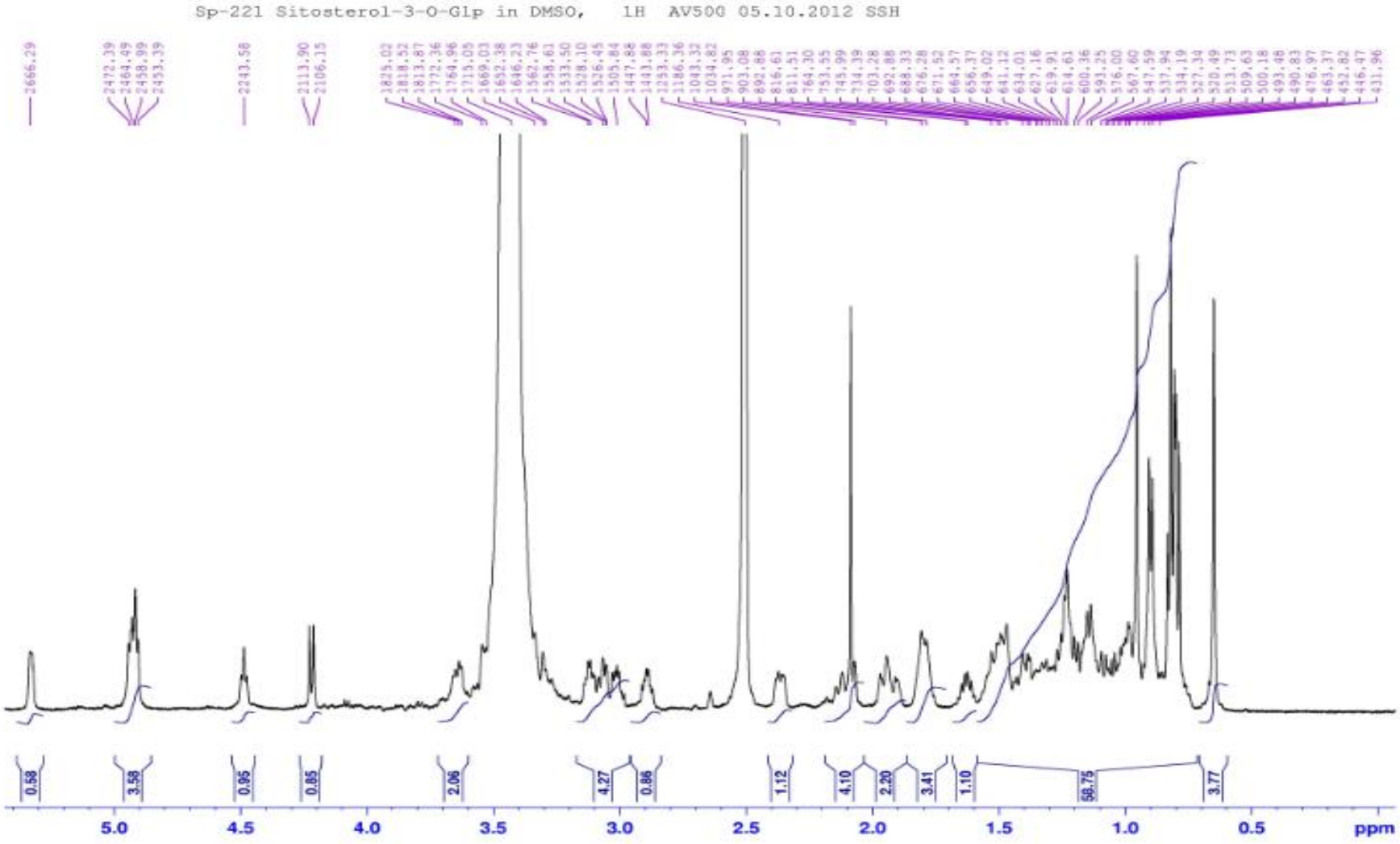


Рисунок 16 – Спектр ЯМР ^{1}H β-ситостерола-3-O- β-D-глюкопиранозида в DMSO

ЯМР ^{1}H (DMSO-d6, δ/м.д., *J*/Гц): 0.65 (3H, с, H-18), 0.78 (3H, д, *J*=7.0, H-26), 0.80 (3H, д, *J*=7.0, H-27), 0.81 (3H, д, *J*=7.0, H-29), 0.85 (1H, м, H-9), 0.98 (3H, д, *J*=6.5, H-21), 0.92 (1H, м, H-24), 0.94 (3H, с, H-19), 0.96 (1H, м, H-14), 0.98 (1H, м, H-1^{a}), 0.99 (1H, м, H-22^{a}), 1.03 (1H, м, H-15^{a}), 1.07 (1H, м, H-17), 1.13 (3H, м, H-23^{a}, H-23^{b}, H-12^{b}), 1.25 (3H, м, H-28^{a}, H-22^{b}, H-28^{b}), 1.29 (1H, м, H-16^{b}), 1.33 (1H, м, H-20), 1.37 (1H, м, H-8), 1.39 (1H, м, H-7^{a}), 1.41 (1H, м, H-11^{a}), 1.47 (2H, м, H-2^{a}, H-11^{b}), 1.55 (1H, м, H-15^{b}), 1.61 (1H, м, H-25), 1.79 (3H, м, H-16^{a}, H-2^{b}, H-1^{b}), 1.92 (2H, м, H-12^{a}, H-7^{b}), 2.12 (1H, дт, *J*=13.0, 1.8, H-4^{a}), 2.35 (1H, ддд, *J*=13.0, 4.5, 1.8, H-4^{b}), 2.89 (1H, дт, *J*=8.0, 4.5, H-2’), 3.00 (1H, дт, *J*=8.0, 4.5, H-4’), 3.05 (1H, дд, *J*=8.0, 4.5, H-5’), 3.11 (1H, дт, *J*=8.0, 4.5, H-3’), 3.40 (1H, дд, *J*=11.0, 5.5, H-6’^{b}), 3.45 (1H, м, H-3, 3.64 (1H, ддд, *J*=11.0, 5.5, 4.5, H-6’^{a}), 4.22 (1H, д, *J*=8.0, H-1’), 4.46 (1H, т, *J*=5.5, C$^{6’}$OH), 4.89 (1H, д, *J*=4.5, C$^{4’}$OH), 4.91 (1H, д, *J*=4.5, C$^{2’}$OH), 4.93 (1H, д, *J*=4.5, C$^{3’}$OH), 5.32 (1H, дд, *J*=3.7, 2.8, H-6).

ЯМР ^{13}C (DMSO-6, δ/м.д.): 12.21 (C-18), 12.31 (C-29), 19.14 (C-21), 19.45 (C-26), 19.63 (C-19), 20.63 (C-27), 21.12 (C-11), 23.10 (C-28), 24.39 (C-15), 25.90 (C-23), 28.33 (C-16), 29.19 (C-25), 29.78 (C-2), 31.89 (C-7), 31.94 (C-8), 33.84 (C-22), 36.01 (C-20), 36.74 (C-10), 37.34 (C-1), 38.80 (C-4), 39.50 (C-12), 42.37 (C-13), 45.63 (C-24), 50.11 (C-9), 55.92 (C-17), 56.69 (C-14), 61.60 (C-6’), 70.60 (C-4’), 73.98 (C-2’), 77.28 (C-5’), 77.29 (C-5’), 77.38 (C-3), 101.26 (C-1’), 121.78 (C-6), 140.96 (C-5).

Таким образом, нами определена структура вещества 3.42 из группы стеринов – β-ситостерол-3-O-β-D-глюкопироназид. На рисунке 17 представлена его структурная формула.

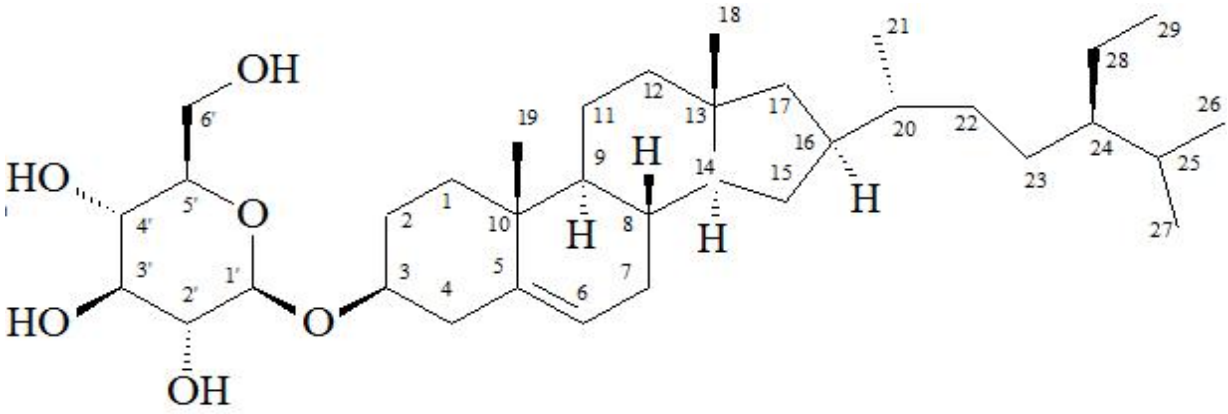
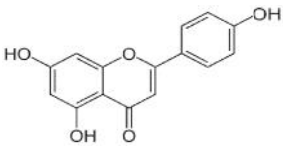
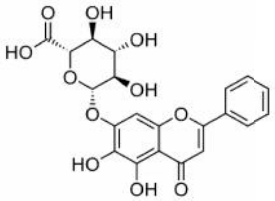
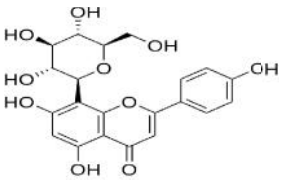
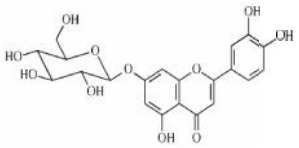
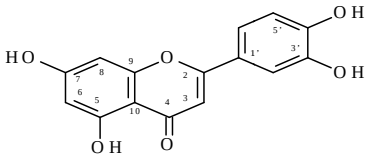
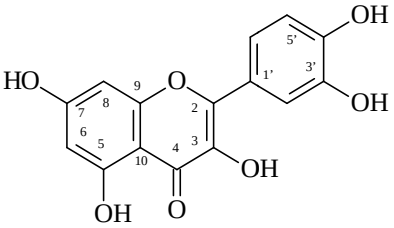
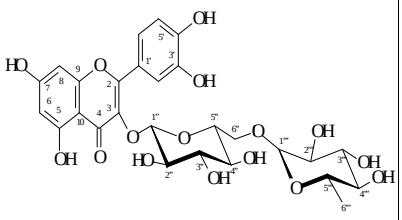
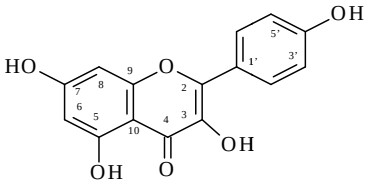


Рисунок 17 – Структурная формула β-ситостерол-3-O-β-D-глюкопироназида

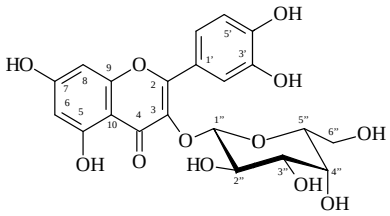
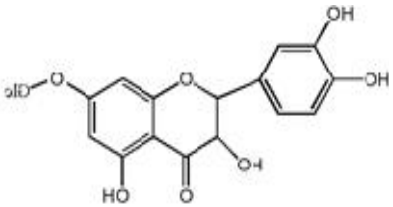
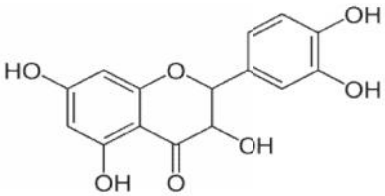
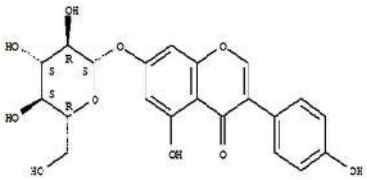
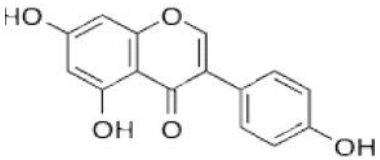
Таблица 9 – Выделенные и идентифицированные вещества фенольной природы из сырья растений рода первоцвет и рода хмель

№	Наименование вещества	Брутто-формула, молекулярная масса	Т пл.,° С	Сырьевые источники
1	2	3	4	5
1. Флавоноиды *1.1.Флавоны*				
1	Апигенин 	$C_{15}H_{10}O_5$, 270,24	341-344	П. весенний П. крупночашечный
2	Байкалин 	$C_{22}H_{21}O_{11}$, 461,10	220-222	П. весенний П. крупночашечный
3	Витексин 	$C_{21}H_{20}O_{10}$, 432,20	263-265	П. весенний П. крупночашечный

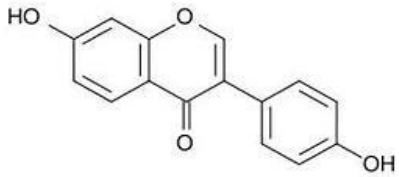
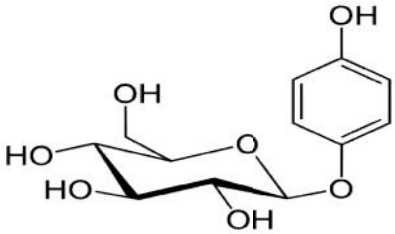
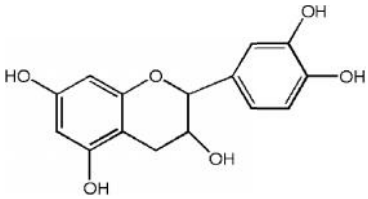
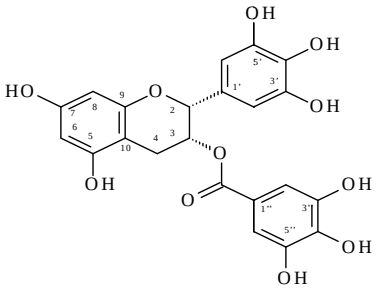
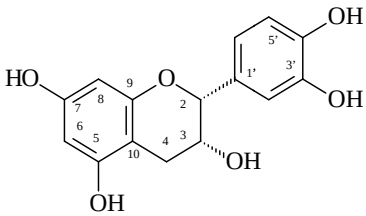
Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
4	Цинарозид 	$C_{12}H_{20}O_{11}$, 448,00	256-258	П. весенний Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
5	Лютеолин 	$C_{15}H_{10}O_6$, 286,24	228-330	Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
1.2. Флавонолы				
6	Кверцетин 	$C_{15}H_{10}O_7$, 302,00	310-312	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
7	Рутин 	$C_{27}H_{30}O_{16}$, 610,52	188-190	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
8	Кемпферол 	$C_{15}H_{10}O_6$, 286,23	276-277	П. весенний Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый

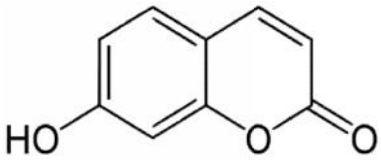
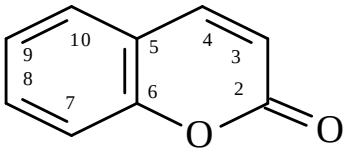
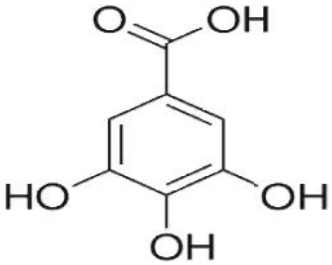
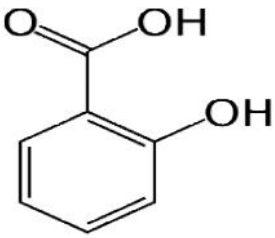
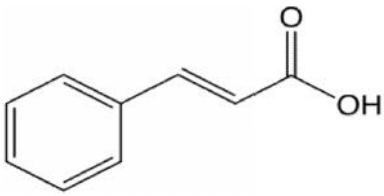
Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
9	Гиперозид 	$C_{21}H_{20}O_{12}$, 464,00	235-237	П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
10	Кверцимеритрин 	$C_{21}H_{20}O_{12}$, 464,00	247-249	П. крупночашечный
1.3. Флаванонолы				
11	Дигдрокверцетин, таксифолин 	$C_{15}H_{12}O_7$, 304,25	222-224	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
1.4. Изофлавоноиды				
12	Генистин 	$C_{21}H_{20}O_{10}$, 432,38	254	Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
13	Генистеин 	$C_{15}H_{10}O_5$, 270,24	297-298	Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый

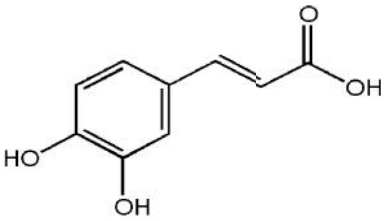
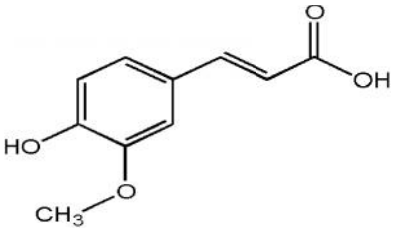
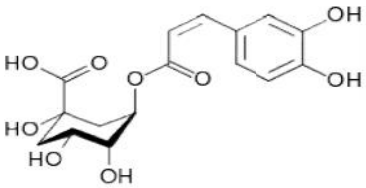
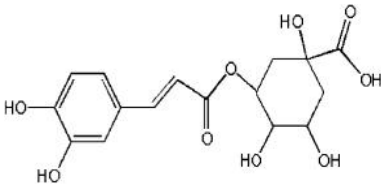
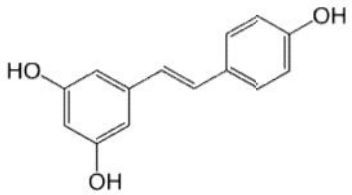
Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
14	Даидзеин 	$C_{15}H_{10}O_4$, 254,24	–	Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
2. Простые фенолы				
15	Арбутин 	$C_{12}H_{16}O_7$, 272,26	195-197	П. весенний П. крупночашечный
3. Дубильные вещества				
16	Катехин 	$C_{15}H_{14}O_6$, 308,28	93-96	П. крупночашечный
17	ЭГКГалат 	$C_{22}H_{18}O_{11}$, 458,37	–	Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
18	Эпикатехин 	$C_{15}H_{14}O_6$, 290,27	–	Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
4. Кумарины				
19	Умбеллиферон 	$C_9H_6O_3$, 162,88	233-234	П. весенний Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
20	Кумарин 	$C_9H_6O_2$, 146,89	67-68	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
5. Фенолокислоты				
21	Галловая кислота 	$C_7H_6O_5$, 170,00	254-256	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
22	Салициловая кислота 	$C_7H_6O_3$, 138,00	157-159	П. крупночашечный
6. Гидроксикоричные кислоты				
23	Коричная кислота 	$C_9H_8O_2$, 148,16	133	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
24	Кофейная кислота 	$C_9H_8O_4$, 184,30	193-195	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
25	Феруловая кислота 	$_{10}H_{10}O_4$, 94,19	167-169	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
26	Хлорогеновая кислота 	$C_{16}H_{18}O_9$, 353,08	203-205	П. весенний П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
27	Неохлорогеновая кислота 	$C_{16}H_{18}O_9$, 354,00	–	П. крупночашечный Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый
7. Стильбены				
28	Ресвератрол 	$C_{14}H_{12}O3$, 228,25	261-263	Х.О. дикорастущий Х.О. культивируемый

Примечание: П – первоцвет; Х.О. – хмель обыкновенный.

3.4. Сравнительное изучение состава основных групп биологически активных веществ растений рода первоцвет. Исследование полиметоксилированных флавоноидов

Согласно данным литературы и результатам наших исследований, полиметоксилированнные флавоноиды, производные флавонов специфичны для растений рода первоцвет разных видов. Поэтому представляло интерес провести сравнительный анализ по содержанию указанной группы БАВ в исследуемых видах первоцвета.

Компонентный состав выделенных липофильных флавоноидов был идентифицирован методами хромато-масс-спектрометрии, ЯМР ^{1}H-, ЯМР ^{13}C-спектроскопии (глава 2, раздел 2.2.6).

Идентификацию зарегистрированных масс-спектров выделенных веществ проводили с помощью библиотеки масс-спектров NIST-05. Относительное содержание компонентов смеси (количественный анализ) вычисляли из соотношений площадей хроматографических пиков (методом простой нормировки). Результаты исследований представлены на рисунках 18, 19, в таблице 10.

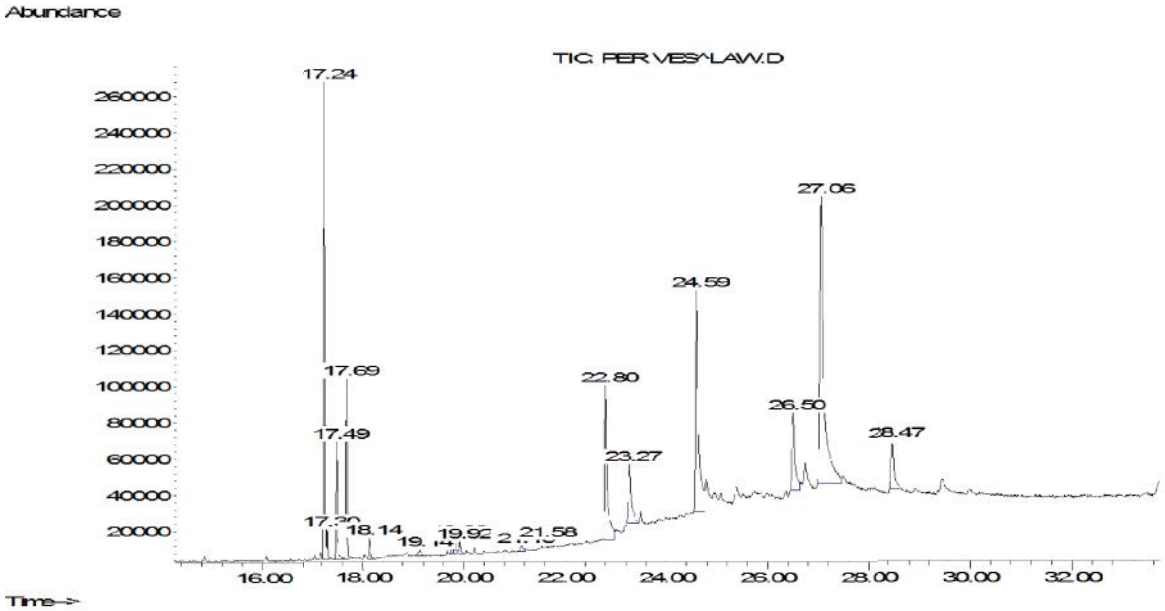


Рисунок 18. Хроматограмма липофильной фракции первоцвета весеннего

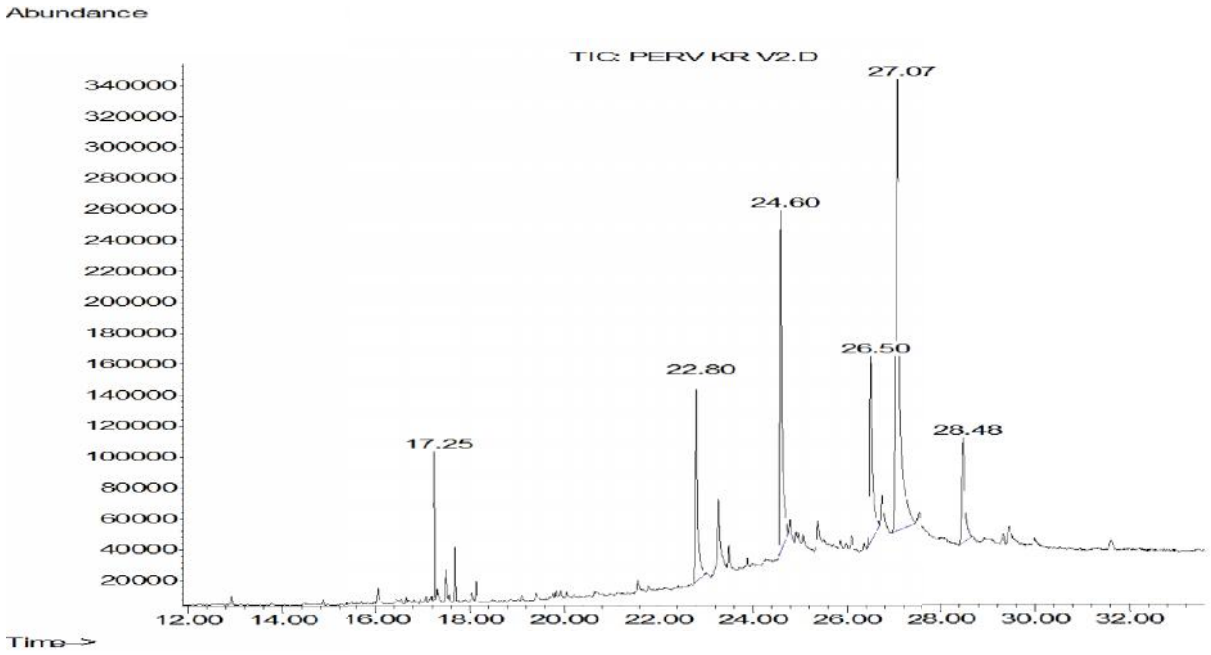


Рисунок 19 – Хроматограмма липофильной фракции первоцвета крупночашечного

Таблица 10 – Сравнительный анализ полиметоксилированных флавоноидов первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

№	Компоненты	Первоцвет весенний		Первоцвет крупночашечный	
		концентрация,% (внутренняя нормализация)	R_t, мин. (внутренняя нормализация)	концентрация,% (внутренняя нормализация)	R_t, мин. (внутренняя нормализация)
1	2	3	4	5	6
1	Флавон (2-фенил-4Н-хромен-4-он)	0,40	21,15	–	–
2	8-метокси-флавон (8-метокси-2-фенил-4Н-хромен-4-он)	10,38	22,80	10,58	22,80

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6
3	3’-метокси-флавон (3’-метокси-2-фенил-4Н-хромен-4-он)	4,12	23,27	3,79	23,27
4	3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавон (2-(3,4-метилендиокси-фенил)-3-гидрокси-4Н-хромен-4-он)	22,17	24,59	23,16	24,60
5	3-ацетил-7,8-диметокси-2-диметил-1Н-нафто(2,1-б)пиран-1-он (3-ацетил-7,8-диметокси-2-метил-1Н-бензо[f]хромен-1-он)	5,87	26,50	12,65	26,50
6	5, 6, 2’, 6’-тетраметоксифлавон (запо-тин, 2-(2,6диметксифенил)-5,6,-диметокси-4Н-хромен-4-он)	31,04	27,06	37,14	27,06
7	5,6,7,3’,4’, -пентаметоксифлавон (синенсетинт, 2-(3,4-диметоксифенил)-5,6,7-триметокси-4Н-бензопиран-4-он)	3,65	28,47	7,12	28,48

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа исследуемых образцов сырья показал наличие в траве первоцвета весеннего 7 полиметоксилированных флавоноидов, а в траве первоцвета крупночашечного – 6.

Учитывая проблемы стандартизации пищевого и лекарственного растительного сырья, выбор специфических маркерных соединений является актуальной задачей для практической фармации и пищевой промышленности [14, 15, 17].

По данным таблицы 10 и хроматограмм липофильных фракций первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного, установлено наибольшее содержание (22,17 и 23,16% соответственно) и наименьшее время удерживания вещества 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона в исследуемых образцах сырья. Поэтому вещество 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавон может быть использовано в качестве специфического маркера для стандартизации надземной части первоцвета весеннего (*Primula veris* L.), на что получен патент РФ на изобретение № 2532999 от 20.01.15 «Новое природное вещество из травы первоцвета весеннего». Таким образом, данное исследование расширит перечень специфических веществ-маркеров для стандартизации лекарственного растительного сырья.

Исследование липофильных веществ

Учитывая факт присутствия липофильных флавоноидов в растениях рода первоцвет, представляло интерес исследовать состав иных липофильных соединений. Для этого из образцов лекарственного растительного сырья травы первоцветов весеннего и крупночашечного были получены липофильные комплексы путем исчерпывающей экстракции органическим растворителем и проведен качественный, количественный анализ липофильных веществ, выделенных из сырья. Для этого нами был использован метод хроматографии с хромато-масс-спектрометрическим детектированием (глава 2, раздел 2.2.6).

Исследование липофильных фракций, полученных из указанных образцов сырья, показало наличие в них соединений различной химической природы: терпеноидов, насыщенных и ненасыщенных высокомолекулярных жирных

кислот, их производных и метиловых эфиров, стеринов, токоферолов, а также различных углеводородов. Результаты исследования липофильных соединений представлены в таблице 11 и на рисунках в приложениях 14–17. В таблице 11 указаны соединения, идентифицированные с вероятностью более 90%.

Таблица 11 – Сравнительный анализ липофильных веществ первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

№	Компоненты	Первоцвет весенний		Первоцвет крупночашечный	
		концентрация,% (внутренняя нормализация)	R_t, мин. (внутренняя нормализация)	концентрация,% (внутренняя нормализация)	R_t, мин. (внутренняя нормали-зация)
1	Фитол	13,71	17,24	3,19	17,24
2	6,10,14-триметил 2-пентадеканон	0,87	17,30	0,63	17,30
3	Изофитол	5,67	17,69	1,29	17,69
4	Метиловый эфир пальмитиновой кислоты	0,70	18,14	0,54	18,14
5	Метиловый эфир-9,12-октадекадиеновой кислоты	0,57	19,77	0,49	19,79
6	Метиловый эфир-9,12,15-октадекатриеновой кислоты	0,52	19,83	0,43	19,85
7	Генэйкозан	0,54	21,51	–	–

Содержание насыщенных, ненасыщенных жирных кислот и их производных в изучаемых образцах сырья практически одинаково. Характерным является наличие одноненасыщенного дитерпенового спирта фитол (в п. весеннем – 13,71%, в п. крупночашечном – 3,19%), входящего в состав хлорофилла, витамина Е и витамина K_1; изофитол (в п. весеннем – 5,67%, в п. крупночашечном – 1,29%). Отмечено наличие производных октадекадиеновой и октадекатриеновой кислот, что согласуется с литературными данными.

Исследование тритерпеновых сапонинов

Качественное определение кислоты урсоловой

Качественное обнаружение тритерпеновых сапонинов в водно-спиртовых извлечениях из сырья первоцветов проводили по реакции осаждения с раствором свинца ацетата 10%; а также с раствором меди сульфата 10% в присутствии кислоты серной концентрированной (реакция Лафона), наблюдалось появление сине-зеленого окрашивания. Проведенная реакция Сальковского (хлороформный слой окрасился в оранжевый цвет) также подтвердила наличие данной группы БАВ в исследуемых видах сырья (глава 2, раздел 2.2.4).

Для определения качественного состава тритерпеновых сапонинов использовали метод ТСХ на пластинках с кизельгелем («Kieselgel 40 F254», E.Merk, Darmstadt) в системе растворителей этилацетат – спирт метиловый – диэтиламин (70:20:15) с последующим проявлением раствором ванилина.

Для чего использовали водно-спиртовые извлечение из изучаемых видов сырья (экстрагент раствор спирта этилового 70%), гидролизаты водно-спиртовых извлечений, а также 1% спиртовый раствор СО кислоты урсоловой, методика приготовления описана в главе 2 (раздел 2.2.4).

Хроматографический анализ водноспиртовых извлечений и гидролизатов травы первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного показал наличие в извлечениях изучаемых видов растений по 5 зон адсорбции до гидролиза и по 3 зоны адсорбции после гидролиза. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты идентификации тритерпеновых сапонинов методом тонкослойной хроматографии в сырье первоцветов

РСО урсоловой кислоты (Rf зоны адсорбции, цвет)	Сырье первоцвета весеннего, (Rf зон адсорбции, цвет)		Сырье первоцвета крупночашечного (Rf зон адсорбции, цвет)	
	до гидролиза	после гидролиза	до гидролиза	после гидролиза
–	0,44 (сине-зеленый)	–	0,44 (сине-зеленый)	–
–	0,57(фиолетовый)	0,57 (фиолетовый)	0,57 (фиолетовый)	0,57(фиолетовый)
0,75 (фиолетовый)	0,75(фиолетовый)	0,75(фиолетовый)	0,75(фиолетовый)	0,75(фиолетовый)
–	0,82(жёлтый)	0,82 (жёлтый)	0,82(жёлтый)	0,82 (жёлтый)
–	0,99 (фиолетовый)	–	0,99 (фиолетовый)	–

Проведенные исследования показали наличие кислоты урсоловой в водно-спиртовых извлечениях исследуемых образцов сырья до и после гидролиза.

Количественное определение кислоты урсоловой

Для этого была использована методика спектрофотометрического определения кислоты урсоловой, основанная на реакции с кислотой серной коцентрированной.

Нами были сняты спектры поглощения окрашенных после взаимодействия комплексов СО кислоты урсоловой и водно-спиртовых извлечений из сырья с кислотой серной коцентрированной, как описано в главе 2 (раздел 2.2.4) в интервале длин волн 220–430 нм. Результаты представлены на рисунке 20.

Проведенные исследования показали, что спектры поглощения окрашенного комплекса СО у кислоты урсоловой имеет максимум поглощения при длине волны 306 нм, а максимумы поглощения комплексов водно-спиртовых

извлечений из травы первоцвета весеннего и крупночашечного с кислотой серной концентрированной составляют 310 нм и 311 нм соответственно.

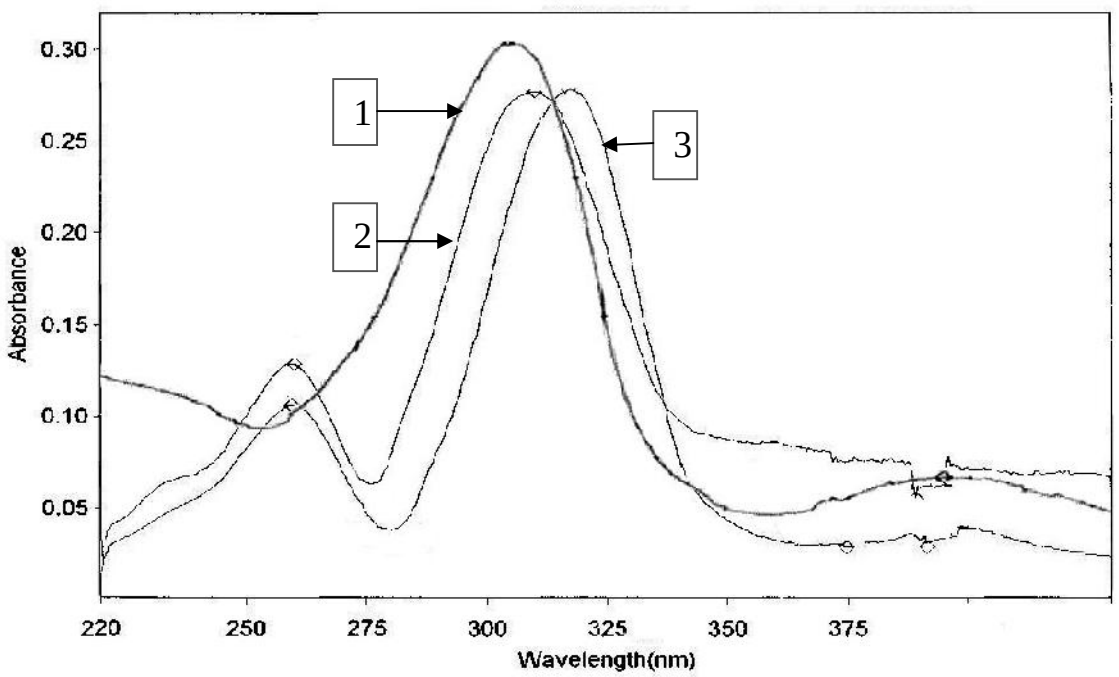


Рис. 20. Спектр окрашенного комплекса извлечений из сырья и СО кислоты урсоловой с кислотой серной концентрированной

1 – кислота урсоловая, 2 – извлечение из травы первоцвета весеннего,

3 – извлечение из травы первоцвета крупночашечного.

Таким образом, рекомендуемая длина волны для количественного определения кислоты урсоловой составляет 306±5 нм. Методика количественного определения кислоты урсоловой описана в главе 2 (раздел 2.2.4).

Количественное содержание кислоты урсоловой в абсолютно сухом сырье (X,%) определяли по формуле (2):

$$X = \frac{D^{*} \times M \times 0{,}8 \times 100 \times 100 \times 100}{D \times M^{*} \times 10 \times 100 \times 0{,}5 \times (100 - W)}, \qquad (2)$$

где D* – оптическая плотность испытуемого раствора,

D – оптическая плотность ГСО кислоты урсоловой ,

M* – масса сырья в граммах,

M – масса СО кислоты урсоловой в граммах,

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Результаты количественного определения тритерпеноидов в пересчете на урсоловую кислоту представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Метрологическая характеристика методики количественного определения тритерпеноидов в пересчете на кислоту урсоловую в сырье первоцветов

n	f	x ср.	S^2	S	P, %	t (P, f)	Δ x	E, %
Трава первоцвета весеннего								
6	5	3,29	0,00208	0,04560	95	2,57	0,12679	3,85
Трава первоцвета крупночашечного								
6	5	5,46	0,00448	0,06693	95	2,57	0,18607	3,41

В результате проведенного исследования установлено, что содержание тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту урсоловую в траве первоцвета весеннего составляет 3,29%, в траве первоцвета крупночашечного – 5,46%. Ошибка единичного определения с вероятностью 95% не превышает 3,85 и 3,41% соответственно.

Проведенные исследования показали, что растения рода первоцвет могут стать источником перспективного класса БАВ как тритерпены урсанового ряда, обладающие противовоспалительной, эндотелиопротектирующей, противовоспалительной и гепатопротекторной активностью. По количественному содержанию производных тритерпенов первоцвет крупночашечный превосходит первоцвет весенний.

Исследование аминокислот

Присутствие азотсодержащих соединений (в т. ч. аминокислот) в водных извлечениях из исследуемых видов сырья первоцвета установили, используя цветную реакцию с нингидрином (появлялось красно-фиолетовое окрашивание).

Качественное обнаружение аминокислот

Для определения качественного состава аминокислот использовали метод ТСХ как описано в главе 2 (раздел 2.2.2). Результаты исследования представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты исследования аминокислотного состава сырья первоцветов методом ТСХ в системе метилэтилкетон-пиридин-вода-аммиак (70:15:15:2)

№	РСО аминокислот	Значения R_f	Значения R_f (около)	
			первоцвет весенний	первоцвет крупночашечный
1	Аспарагин	0,28	0,28	0,28
2	Пролин	0,41	0,41	0,41
3	Глицин	0,48	0,48	0,48
4	Кислота глютаминовая	0,53	0,53	0,53
5	Серин	0,58	0,58	0,58
6	Цистеин	0,64	0,64	0,64
7	Гистидин	0,68	0,68	0,68
8	Треонин	0,74	0,74	0,74
9	Тирозин	0,84	0,84	0,84
10	Кислота аспарагиновая	0,89	0,89	0,89

Таким образом, методом хроматографии в тонком слое сорбента с использованием достоверных известных образцов аминокислот идентифицированы следующие аминокислоты: глютаминовая и аспарагиновая кислоты, глицин, серин, гистидин, цистеин, треонин, пролин, тирозин.

Количественное определение аминокислот

Определение количественного содержания аминокислот проведено на аминокислотном анализаторе «ААА-339» как описано в главе 2 (раздел 2.2.2).

Проведенные исследования показали близость качественного состава аминокислот изучаемых растений рода первоцвет (таблица 15). Имеются раз-

личия в отношении единичных аминокислот, по количественному содержанию трава первоцвета крупночашечного превосходит первоцвет весенний.

Таблица 15 – Содержание свободных аминокислот в сырье первоцветов

Наименование РСО	Содержание свободных аминокислот, мг%	
	сырье первоцвета весеннего	сырье первоцвета крупночашечного
Лизин*	0,46	0,28
Метионин*	0,03	0,27
Цистеин	0,37	0,30
Гистидин*	0,23	–
Аргинин	0,24	0,69
Треонин*	0,11	0,42
Серин	0,18	0,51
Пролин	1,06	1,59
Глицин	0,73	1,12
Валин*	1,75	1,83
Изолейцин*	–	0,16
Лейцин*	0,36	0,06
Тирозин	0,39	0,45
Фенилаланин*	0,25	0,55
Суммарное содержание	6,16	8,23

* – незаменимые аминокислоты.

Исследование органических кислот

Качественное определение органических кислот

Качественный состав органических кислот сырья исследуемых видов первоцветов исследовали методом ТСХ на пластинках «Sorbfil» с использованием достоверных образцов свидетелей, проявляемых в виде желтых адсорбционных зон на синем фоне (глава 2, раздел 2.2.2).

По данным таблицы 16 видно, что в траве первоцвета весеннего и траве первоцвета крупночашечного содержатся лимонная, янтарная, щавелевая, аскорбиновая кислоты.

Таблица 16 – Результаты исследования состава органических кислот сырья первоцветов методом ТСХ в системе петролейный эфир-хлороформ-кислота муравьиная (10:4:1)

№	СО органических кислот	Значения R_f	Значения R_f (около)	
			первоцвет весенний	первоцвет крупночашечный
1	Лимонная	0,16	0,16	0,16
2	Янтарная	0,32	0,32	0,32
3	Щавелевая	0,42	0,42	0,42
4	Аскорбиновая	0,53	0,53	0,53

В ходе дальнейших исследований был использован метод ВЭЖХ (глава 2, раздел 2.2.2). Результаты исследований представлены в таблице 17, в приложениях 11, 12.

Таблица 17 – Результаты исследования органических кислот сырья первоцветов методом ВЭЖХ

СО органических кислот	Трава первоцвета весеннего	Трава первоцвета крупночашечного
	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)
Щавелевая	7,06	7,07
Гидроксилимонная	7,85	–
Лимонная	8,82	8,84
Винная	9,54	–
Маликовая	10,50	–
Аскорбиновая	10,85	10,86
Янтарная	12,15	12,17
Фумаровая	17,34	–

В ходе проведенных исследований для изучаемых растений впервые идентифицированы щавелевая, лимонная, янтарная кислоты, а для первоцвета весеннего – также гидроксилимонная, винная, маликовая, фумаровая кислоты. Исследуемые виды сырья содержат аскорбиновую кислоту.

Количественное определение органических кислот

Определение количественного содержания свободных органических кислот проводили методом кислотно-основного титрования согласно методики ГФ-XI (глава 2, раздел 2.2.2), результаты исследования представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Метрологическая характеристика методики количественного определения свободных органических кислот в сырье первоцветов

n	f	x ср.	S^2	S	P, %	t (P, f)	Δ x	E, %
Трава первоцвета весеннего								
6	5	7,36	0,0122	0,11045	95	2,57	0,30706	4,17
Трава первоцвета крупночашечного								
6	5	6,76	0,00508	0,07127	95	2,57	0,19814	2,93

Содержание свободных органических кислот в траве первоцвета весеннего составило 7,36%, в траве первоцвета крупночашечного – 6,76%. Ошибка единичного определения с вероятностью 95% не превышает 4,17%.

3.5 Сравнительное изучение содержания основных групп биологически активных веществ дикорастущего вида и культивируемых сортов хмеля обыкновенного

Исследование фенольных соединений

Идентификацию разделенных БАВ проводили, сопоставляя времена удерживания пиков анализируемой пробы и стандартных образцов свидетелей.

В таблицах 19, 20 и в приложениях 3–8 отражены результаты проведенных исследований.

В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ в большинстве изучаемых образцов были идентифицированы 19 соединений фенольной природы, 13 из которых идентифицированы впервые. Вещества фенольной природы в основном представлены флавоноидами (рутин, цинарозид, гиперозид, лютеолин-7-гликозид, дигидрокверцетин, кверцетин, кемпферол, лютеолин), кумарином, производными фенолкарбоновых и оксикоричных кислот (галловая, хлорогеновая, цикоревая, кофейная, неохлорогеновая, феруловая, коричная) и дубильными веществами (танин, эпигаллокатехингаллат, эпикатехин).

Установлено, что во всех исследуемых образцах сырья из флавоноидных соединений содержатся рутин, гиперозид, кемпферол; из производных фенолкарбоновых и оксикоричных кислот – галловая, хлорогеновая, цикоревая, кофейная, неохлорогеновая, феруловая кислоты; из дубильных веществ – эпигаллокатехингаллат.

Из таблиц 19, 20 видно, что качественный состав различных образцов листьев хмеля обыкновенного весьма разнообразен, представлен соединениями основных групп фенольных веществ и близок по составу. Но наиболее богатыми оказались образцы дикорастущих растений, собранных в Уфимском и Давлекановском районах РБ, а также образец культивируемого сорта «Ранний», относящийся к ароматическому сортотипу. Так, в образцах листьев хмеля обыкновенного, собранного в Уфимском и Давлекановском районах РБ, обнаружено 17 и 16 фенольных соединений соответственно, а сорта «Ранний» – 17 соединений. В листьях хмеля обыкновенного горько-ароматического сортотипа «Крылатский» идентифицированы 14 фенольных соединений, горького сортотипа «Подвязный» – 15 соединений.

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье хмеля обыкновенного проводили по разработанной нами методике для сырья листьев хмеля обыкновенного, описанной в главе 5. Результаты количественного определения представлены в таблице 21.

Таблица 19 – Содержание полифенольных соединений в различных образцах листьев хмеля обыкновенного

Наименование СО	Образцы сырья			
	дикорастущее сырье, собранное в Давлекановском районе		дикорастущее сырье, собранное в Уфимском районе	
	соплодия	листья	соплодия	листья
	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)
1	2	3	4	5
Умбеллиферон	–	–	3,24	–
Танин	3,28	3,23	3,28	3,22
Галловая кислота	3,41	3,43	3,43	3,42
ЭГКГалат	3,92	3,96	3,81	3,87
Хлорогеновая кислота	4,38	4,31	4,38	4,35
Кофейная кислота	5,78	5,82	5,85	5,84
Цикориевая кислота	5,94	5,95	5,96	5,98
Феруловая кислота	7,98	7,96	7,95	7,97
Неохлорогеновая кислота	9,58	9,62	9,58	9,52
Цинарозид	10,83	10,94	10,86	10,88

Продолжение таблицы 19

1	2	3	4	5
Коричная кислота	–	–	11,04	11,07
Эпикатехин	12,78	12,75	12,64	–
Рутин	14,08	14,11	14,14	14,12
Гиперозид	16,39	16,38	16,38	16,41
Кумарин	21,12	21,09	21,08	21,09
Кверцетин	41,65	41,62	40,44	40,40
Кемпферол	58,52	58,49	58,76	58,78
Дигидрокверцетин	59,99	59,97	–	–
Лютеолин	69,29	69,32	69,35	69,34

Таблица 20 – Содержание полифенольных соединений в различных образцах листьев хмеля обыкновенного

Наименование СО	Образцы сырья					
	сорт «Ранний»		сорт «Крылатский»		сорт «Подвязный»	
	соплодия	листья	соплодия	листья	соплодия	листья
	время удержи-вания, мин (внут-ренняя нормализация)	время удер-живания, мин (внутренняя нор-мализация)	время удер-живания, мин (внут-ренняя нор-мализация)	время удер-живания, мин (внут-ренняя нор-мализация)	время удер-живания, мин (внутренняя нор-мализация)	время удержи-вания, мин (внутренняя нор-мализация)
1	2	3	4	5	6	7
Умбеллиферон	–	–	–	–	–	–
Таннин	–	–	–	–	–	–
Галловая кислота	3,39	3,44	3,38	3,36	3,54	3,59
ЭГКГалат	3,96	3,95	3,89	3,92	3,94	3,93
Хлорогеновая кислота	4,34	4,38	4,35	4,33	4,36	4,41
Кофейная кислота	5,76	5,77	5,78	5,81	5,74	5,76
Цикориевая кислота	6,02	5,98	6,05	6,07	6,04	6,04
Феруловая кислота	7,97	7,95	7,87	7,89	7,92	7,89
Неохлорогеновая к-та	9,56	9,39	9,75	9,69	8,85	8,76

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6	7
Цинарозид	10,83	10,88	10,87	10,92	–	–
Коричная кислота	11,12	11,09	–	–	–	–
Эпикатехин	12,63	12,52	–	–	–	–
Рутин	14,08	14,09	14,05	14,09	14,12	14,14
Гиперозид	16,36	16,44	16,45	16,49	16,43	16,45
Кумарин	21,14	21,17	–	–	21,15	21,17
Кверцетин	40,05	40,07	40,18	40,21	40,08	40,09
Кемпферол	58,73	58,69	58,76	58,79	58,76	58,77
Дигидрокверцетин	59,99	59,98	59,95	59,98	59,93	59,96
Лютеолин	–	–	69,29	69,34	69,41	69,43

Таблица 21 – Содержание суммы флавоноидов в различных образцах листьев хмеля

Образцы сырья	Содержание флавоноидов,%
Сорт «Ранний»	3,05±0,06
Сорт «Крылатский»	2,36±0,09
Сорт «Подвязный»	2,66±0,08
Дикорастущее сырье, собранное в Уфимском районе	3,23±0,11
Дикорастущее сырье, собранное в Давлекановском районе	2,97±0,10

Из данных таблицы видно, что содержание суммы флавоноидов в листьях хмеля достаточно высокое, колеблется в зависимости от сорта и составляет в исследованных нами образцах от 2,36 до 3,23%. Максимальное содержание флавоноидов отмечено в дикорастущем виде, собранном в Уфимском районе РБ, минимальное – в листьях культивируемого сорта «Крылатский».

Таким образом, сравнительное изучение качественного состава полифенольных соединений в образцах дикорастущего вида, собранного на территории РБ, и культивируемых сортов на территории республики Чувашия хмеля обыкновенного показало их практическую идентичность. По количественному содержанию флавоноидов дикорастущие виды сырья не уступают культивируемым сортам, а в некоторых случаях и превосходят их.

Исследования химического состава полифенольных соединений показали перспективность дальнейшего изучения листьев хмеля обыкновенного как дополнительного источника их получения.

Исследование ресвератрола

Согласно литературным данным соплодия хмеля обыкновенного содержат широко используемый в медицинской практике перспективный антиоксидант ресвератрол. Шрот соплодий хмеля обыкновенного, остающийся при производстве экстракта из соплодий хмеля обыкновенного, авторами [255] предла-

гается в качестве источника для получения класса полифенольных соединений группы стильбенов – ресвератрола. В связи с этим представляло большой интерес определить наличие данного вещества в листьях хмеля обыкновенного. Для чего нами был использован метод ВЭЖХ (глава 2, раздел 2.2.3). Результаты проведенных исследований приведены в приложениях 20, 21.

Количественное определение ресвератрола в сырье хмеля обыкновенного

Количественное определение ресвератрола в сырье хмеля обыкновенного проводили методом ВЭЖХ по методике, приведенной в главе 2 (раздел 2.2.3), методом абсолютной калибровки, используя в качестве стандарта СО ресвератрола. Расчёт количественного содержания ресвератрола в сухом сырье производили с помощью компьютерной программы «Мультихром» для «Windows» по формуле (X,%) (3):

$$X = \frac{S\ \text{иссл.} \cdot \times C\ \text{стандарта} \times V \times 100 \times 100}{S\ \text{стандарта} \times a \times (100 - W)}, \qquad (3)$$

где S иссл. – площадь пика ресвератрола в исследуемом растворе;

S стандарта – площадь пика СО ресвератрола;

C стандарта – концентрация СО ресвератрола, в г/мл;

a – масса навески образца в г;

W – потеря в массе при высушивании, в %;

V – объём разведения.

Результаты проведенных исследований показали наличие ресвератрола во всех исследуемых образцах сырья. Установлено, что содержание ресвератрола в соплодиях исследуемых растений колеблется от 0,0211 до 0,0380%, это несколько выше, чем у листьев – от 0,0182 до 0,0265% (таблица 22). Образцы дикорастущих растений по содержанию данного компонента не уступают культивируемым сортам хмеля.

Таблица 22 – Результаты количественного определения ресвератрола в сырье хмеля обыкновенного

Образец	Вид сырья	Найдено ресвератрола (в%)
Хмель обыкновенный (Давлекановский р-н)	соплодия	0,0250±0,0002
	листья	0,0211±0,0001
Хмель обыкновенный (Уфимский р-н)	соплодия	0,0380±0,0002
	листья	0,0252±0,0002
Сорт «Ранний»	соплодия	0,0284±0,0001
	листья	0,0242±0,0002
Сорт «Крылатский»	соплодия	0,0341±0,0002
	листья	0,0265±0,0001
Сорт «Подвязный»	соплодия	0,0211±0,0001
	листья	0,0182±0,0001

Исследование изофлавоноидов

Согласно литературным данным соплодия хмеля обыкновенного содержат фитоэстрогены. С точки зрения комплексного использования всего растения представляло интерес определить наличие данной группы БАВ в листьях хмеля обыкновенного. Для этого нами был использован метод ВЭЖХ (глава 2, раздел 2.2.3). Результаты проведенных исследований приведены в таблицах 23, 24, в приложениях 22, 23.

Таблица 23

Результаты исследования состава изофлавоноидов в сырье хмеля обыкновенного методом ВЭЖХ

Наименование СО	Сырье листьев хмеля обыкновенного	Сырье соплодий хмеля обыкновенного
	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)
Генистин	6,77	6,76
Даидзеин	11,14	11,12
Генистеин	22,12	22,12

Количественное определение изофлавоноидов в сырье хмеля обыкновенного

Количественное определение изофлавоноидов в сырье хмеля обыкновенного проводили методом ВЭЖХ по методике, приведенной в главе 2 (раздел 2.2.3), методом абсолютной калибровки, используя в качестве стандарта СО генистина, генистеина, даидзеина. Расчёт количественного содержания изофлавоноидов в сухом сырье производили с помощью компьютерной программы «Мультихром» для «Windows» по формуле (X, %) (4):

$$X = \frac{S\ \text{иссл.} \times C\text{стандарта} \times V \times 100 \times 100}{S\ \text{стандарта} \times a \times (100 - W)}, \qquad (4)$$

где S иссл. – площадь пика изофлавоноидов в исследуемом растворе;

S стандарта – площадь пика СО изофлавоноида;

С стандарта – концентрация СО соответствующего изофлавоноида, г/мл;

а – масса навески исследуемого образца, в г;

W – потеря в массе при высушивании, в%;

V – объём разведения.

Результаты проведенных исследований показали наличие генистина, генистеина, даидзеина во всех исследуемых образцах сырья. Установлено, что содержание генистина во всех исследуемых образцах сырья выше, чем генистеина и даидзеина (таблица 24). Так, содержание генистина в соплодиях исследуемых растений колеблется от 28 до 4100 мг%, это выше, чем у листьев – от 900 до 1900 мг%. Содержание генистеина колеблется в соплодиях от 31 мг% до 70 мг%, в листьях – от 12 мг до 21 мг%; содержание даидзеина составило в листьях от 10 мг% до 0 мг%, в соплодиях – от 50 мг% до 90 мг%. Образцы дикорастущих растений по содержанию изофлавоноидов не уступают культивируемым сортам. Данные исследования также показали перспективность использования листьев хмеля обыкновенного.

Таблица 24 – Результаты количественного определения изофлавоноидов в сырье хмеля обыкновенного

Образец сырья	Вид сырья	Найдено изофлавоноидов (в мг%)		
		генистин	генистеин	даидзеин
Хмель обыкновенный (Давлекановский р-н)	соплодия	4000±20,12	50±0,21	70±0,39
	листья	1900±8,21	18±0,13	60±0,18
Хмель обыкновенный (Уфимский р-н)	соплодия	2800±16,75	31±0,35	50±0,27
	листья	900±7,29	9±0,07	20±0,14
Сорт «Ранний»	соплодия	4100±26,16	60±0,21	90±0,28
	листья	1500±11,36	12±0,11	70±0,34
Сорт « Крылатский»	соплодия	3400±22,87	45±0,28	80±0,26
	листья	1100±9,34	13±0,12	60±0,18
Сорт «Подвязный»	соплодия	3900±18,45	70±0,19	40±0,12
	листья	1400±13,21	21±0,12	10±0,03

Исследование органических кислот

Качественное обнаружение органических кислот

Качественное определение органических кислот проводили хроматографированием водного извлечения в тонком слое сорбента (глава 2, раздел 2.2.2). Идентификацию органических кислот проводили с достоверными образцами, которые проявлялись в виде желтых пятен на синем фоне. В ходе предварительных исследований методом ТСХ во всех изучаемых образцах сырья обнаружены лимонная, янтарная, щавелевая и аскорбиновая кислоты.

Для подтверждения результатов идентификации органических кислот методом ТСХ проведено исследование методом ВЭЖХ (глава 2, раздел 2.2.2). Результаты проведенных исследований содержания органических кислот изучаемых образцов представлены в таблице 25, в приложениях 24–28.

Таблица 25 – Содержание органических кислот в различных образцах листьев хмеля обыкновенного

Наименование РСО	Образцы сырья				
	сорт «Ранний»	сорт «Крылатский»	сорт «Подвязный»	дикорастущее сырье (Далекановский р-н РБ)	дикорастущее сырье (Уфимский р-н РБ)
	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	время удерживания, мин (внутренняя нормализация)
Щавелевая кислота	9,90	9,89	9,56	9,92	9,54
Лимонная кислота	10,31	10,34	10,37	10,34	10,32
Винная кислота	11,19	11,42	-	11,24	11,22
Аскорбиновая кислота	12,25	12,27	12,30	12,33	12,21
Янтарная кислота	15,37	15,24	15,32	14,81	15,41
Неидентиф. вещество	18,7 2	18,61	18,75	18,79	18,72

Из таблицы 25 и рисунков в приложениях 24–28 видно, что все исследуемые образцы листьев различных сортов и дикорастущих видов хмеля обыкновенного содержат одинаковый качественный состав определяемых органических кислот: щавелевой, лимонной, винной, аскорбиновой и янтарной; за исключением листьев сорта «Подвязный», отличающихся отсутствием винной кислоты в своем составе.

Количественное определение органических кислот

Определение содержания свободных органических кислот проводили методом кислотно-основного титрования согласно методики ГФ СССР XI изд. (глава 2, раздел 2.2.2). Результаты количественного определения приведены в таблице 26.

Таблица 26 – Содержание органических кислот в различных образцах листьев хмеля

Образцы сырья	Содержание органических кислот, %
Сорт «Ранний»	2,48±0,12
Сорт «Крылатский»	2,38±0,11
Сорт «Подвязный»	2,65±0,09
Дикорастущее сырье, собранное в Уфимском районе	2,54±0,08
Дикорастущее сырье, собранное в Давлекановском районе	2,59±0,10

Содержание свободных органических кислот в листьях хмеля обыкновенного колеблется от 2,38 до 2,65%. Максимальное содержание отмечалось в культивируемом сорте «Подвязный», образцы дикорастущего вида хмеля незначительно превосходили по данному показателю культивируемые сорта «Ранний» и «Крылатский».

Исследование липофильных соединений

Учитывая все возрастающий интерес к терпеноидным соединениям, а также то, что растения рода хмель являются источником горечей, эфирных масел, обусловливающих их широкое применение в медицинской практике и пищевой промышленности, представляло интерес изучить терпеноидную фракцию исследуемых образцов сырья.

Из образцов лекарственного растительного сырья листьев и соплодий хмеля были получены липофильные комплексы путем исчерпывающей экстракции органическим растворителем и проведен качественный, количественный анализ липофильных веществ, выделенных из сырья.

Учитывая многокомпонентный состав липофильного комплекса хмеля обыкновенного, нами был использован метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (глава 2, раздел 2.2.6).

Использование данного метода позволяет фрагментировать сложные компоненты липофильных веществ по полученным хроматографическим пикам и сравнения с фондом библиотеки, по данным времен удерживания, существенно отличающихся даже у стереоизомеров.

Исследование липофильных фракций, полученных из образцов листьев и соплодий хмеля, показало наличие в них соединений различной химической природы: терпеноидов, насыщенных и ненасыщенных высокомолекулярных жирных кислот, их производных и метиловых эфиров, стеринов, токоферолов, а также различных углеводородов.

Анализ веществ терпеновой природы проводили с учетом аналитических характеристик компонентов эфирных масел, определенных для идентификации структуры моно- и сесквитерпеновых углеводородов.

Результаты исследования липофильных соединений, выделенных из листьев и соплодий исследуемого сырья, представлены на рисунках 21, 22 и в таблице 27.

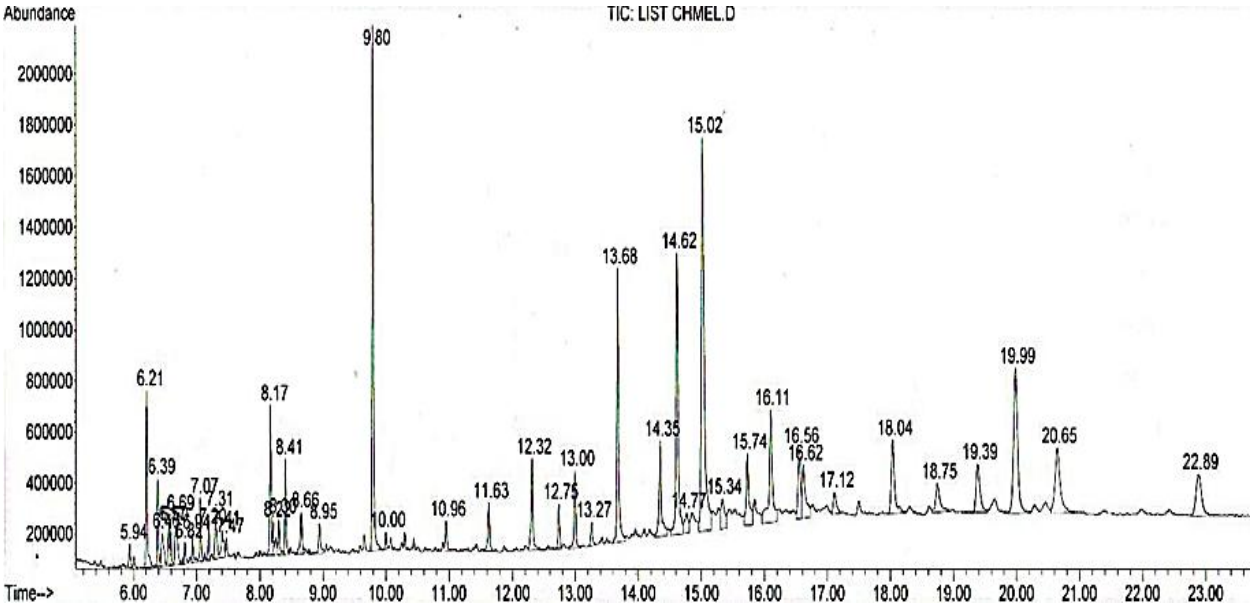


Рисунок 21 – Хроматограмма липофильной фракции листьев культивируемого хмеля обыкновенного

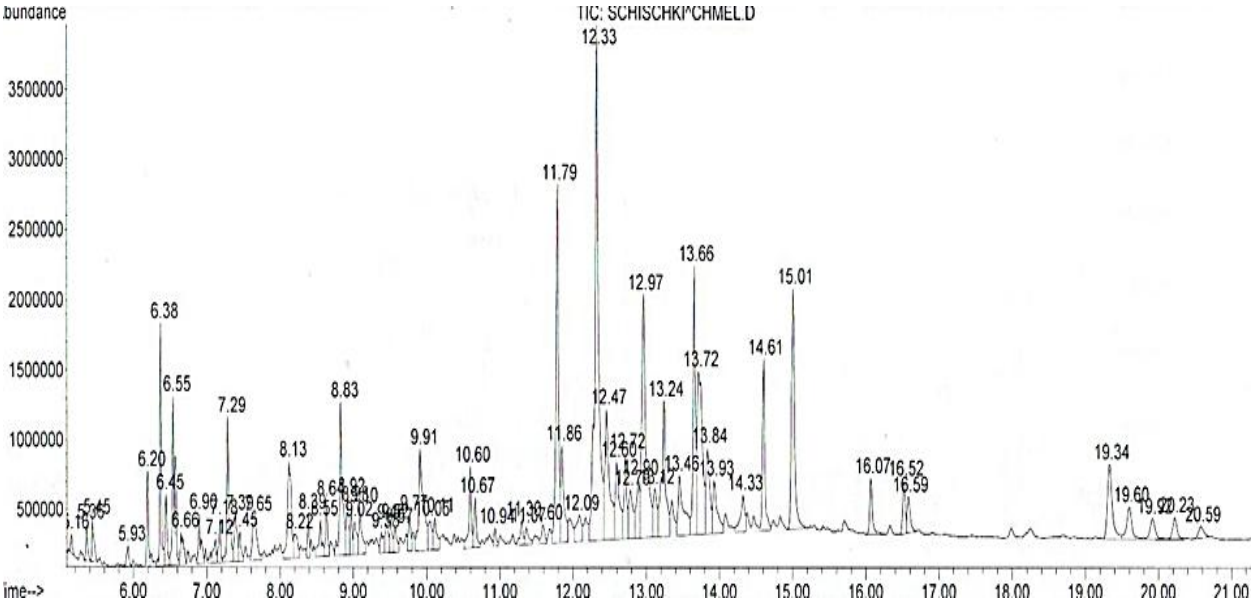


Рисунок 22 – Хроматограмма липофильной фракции соплодий культивирумого хмеля обыкновенного

Таблица 27 – Сравнительный анализ компонентного состава липофильных соединений листьев и соплодий хмеля обыкновенного

№ п/п	Название соединения	Образцы сырья			
		листья		соплодия	
		Rt, мин (внутренняя нормализация)	концентрация,% (внутренняя нормализация)	Rt, мин (внутренняя нормализация)	концентрация,% (внутренняя нормализация)
1	2	3	4	5	6
1	2-Ундеканон	–	–	5,37	0,33
2	Копаен	–	–	5,94	0,27
3	α-кубебен	5,94	0,43	5,94	0,27
4	Кариофиллен	6,22	2,78	6,21	0,93
5	α-кариофиллен	6,40	1,53	6,39	1,98
6	α-гумулен	6,41	1,54	6,41	1,99
7	Нафталин, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-октагидро-7-метил-4-метилен-1-(1-метилэтил)	6,47	0,97	6,46	0,87
8	Нафталин, декагидро-4a-метил-1-метилен-7(1-метилэтилиден)	6,59	0,58	6,56	2,61
9	2(4H)Бензофуранон, 5,6,7,7a-тетрагидро-4,4,7a-триметил	6,83	0,55	–	–

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5	6
10	Бензойная кислота	–	–	6,90	0,72
11	Кариофиллена оксид	7,07	0,93	–	–
12	2-Пентадеканон, 6,10,14-триметил	8,22	0,49	–	–
13	n-Гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота)	–	–	8,83	2,50
14	Дибутил фталат	8,95	0,85	8,93	0,79
15	Фитол	9,80	9,03	9,77	0,50
16	9,12-Октадекадиеновая кислота (линолевая кислота)	–	–	9,91	2,84
17	Тридекан	10,96	0,63	–	–
18	Тетрадекан	11,63	1,11	–	–
19	Пентадекан	12,32	2,19	–	–
20	Ди-изо-октил фталат	–	–	12,72	1,36
21	Ди-n-октил фталат	12,75	0,90	–	–
22	Гексадекан	13,00	1,64	–	–
23	Октадеканаль	13,27	0,55	–	–
24	Гексадецен (олефин C_{16})	–	–	13,66	3,41
25	Гептадекан	13,68	5,60	–	–
26	Нонадекан	13,68	5,60	–	–
27	16-Октадеканол	–	–	–	–
28	Сквален	14,62	7,82	14,61	6,45
29	Генэйкозан	15,02	14,05	15,01	10,35
30	Докозан	15,74	2,59	–	–

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5	6
31	Трикозан	15,73	2,59	–	–
32	Эйкозан	15,90	0,57	15,90	0,45
33	1,19-Эйкозадиен	16,11	4,69	16,08	0,90
34	Эйкозадеканол	–	–	16,07	0,90
35	Тетракозан	16,56	2,10	–	–
36	Циклотетракозан	–	–	16,59	0,65
37	1-Гексакозанол (цериловый спирт)	16,62	2,36	–	–
38	Витамин Е	17,12	0,87	–	–
39	1-Генэйкозанол	18,75	1,61	–	–
40	Стигмастерол	–	–	19,34	2,09
41	γ-Ситостерол	–	–	19,34	2,09
42	β-Ситостерол	–	–	19,34	2,09
43	β-Амирин	19,98	7,36	19,93	0,35
44	α-Амирин	19,99	7,36	19,93	0,62
45	Урс-12-ен	–	–	20,22	0,56

Анализируя полученные данные, можно отметить, что в липофильной фракции листьев хмеля обыкновенного идентифицировано 31 соединение, в соплодиях – 27. В таблице 27 указаны соединения, идентифицированные с вероятностью более 90%.

Из соединений сесквитерпеновой структуры в изучаемых образцах сырья листьев хмеля обыкновенного впервые определены характерные для соплодий хмеля, используемые для определения подлинности эфирного масла хмеля обыкновенного, α- гумулен, α-кубебен, кариофиллен и α-кариофиллен. Именно эти соединения и составляют в количественном выражении большую часть эфиромасличной фракции, α- гумулен (в листьях – 1,54%, в соплодиях –

1,99%), α-кубебен (в листьях – 0,43%, в соплодиях – 0,27%), кариофиллен (в листьях – 2,78%, в соплодиях – 0,93%) и α-кариофиллен (в листьях – 1,53%, в соплодиях – 1,98%). Однако такие специфические соединения копаен и 2-ундеканон в листьях хмеля обыкновенного не обнаружены. Проведенный сравнительный анализ трициклических сесквитерпенов показал, что соплодия хмеля содержат 6 соединений, а листья – 4. Из других представителей сесквитерпеновой природы были определены производные нафталена, а в листьях дополнительно – производное бензойной кислоты и кариофиллена оксид.

Кроме того, нам казалось интересным изучить не только терпеноидную фракцию липофильных веществ в изучаемых объектах, но и фракции высших жирных спиртов и стеринов.

Из производных высших жирных спиртов отмечено наличие в листьях хмеля 19 соединений, в соплодиях – 13. Содержание высомолекулярных насыщенных, ненасыщенных жирных кислот и их производных в изучаемых объектах разнится. Общим является наличие одноненасыщенного дитерпенового спирта фитол (в листьях – 9,03%, в соплодиях – 0,50%), входящего в состав хлорофилла, витамина Е и витамина K_1. В листьях и соплодиях хмеля обыкновенного отмечено наличие в достаточно высокой концентрации сквалена (в листьях – 7,82%, в соплодиях – 6,45%), промежуточного соединения в биологическом синтезе стероидов. Из производных ненасыщенных жирных кислот определены генэйкозан (в листьях – 14,05%, в соплодиях – 10,35%), эйкозан (в листьях – 0,57%, в соплодиях – 0,45%) и 1,19 – эйкозадиен (в листьях – 4,69%, в соплодиях – 0,90%). Причем количественное содержание указанных веществ в листьях хмеля выше, чем в соплодиях. В соплодиях хмеля обыкновенного отмечено содержание пальмитиновой и линолевой кислот в достаточно высоких концентрациях (2,50 и 2,84% соответственно), эйкозодеканола (0,90%).

В составе стеринов в листьях хмеля обыкновенного идентифицированы в высоких концентрациях α-амирин (7,36%) и β-амирин (7,36%), в меньших количествах – витамин Е (0,87%). В соплодиях хмеля идентифицированы

стигмастерол (2,09%), γ-ситостерол (2,09%), β-ситостерол (2,09%) как главные компоненты, в меньших количествах – α- и β-амирины (0,62 и 0,35% соответственно), а также идентифицировано соединение стероидной природы урс-12-ен (пик 20,22 мин) в концентрации 0,56% (рисунки в приложениях 29–38).

С целью оптимизации переработки сырья хмеля представляло интерес изучить состав липофильных веществ в листьях культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного. Результаты исследований представлены на хроматограммах (рисунок 23–26), в таблице 28.

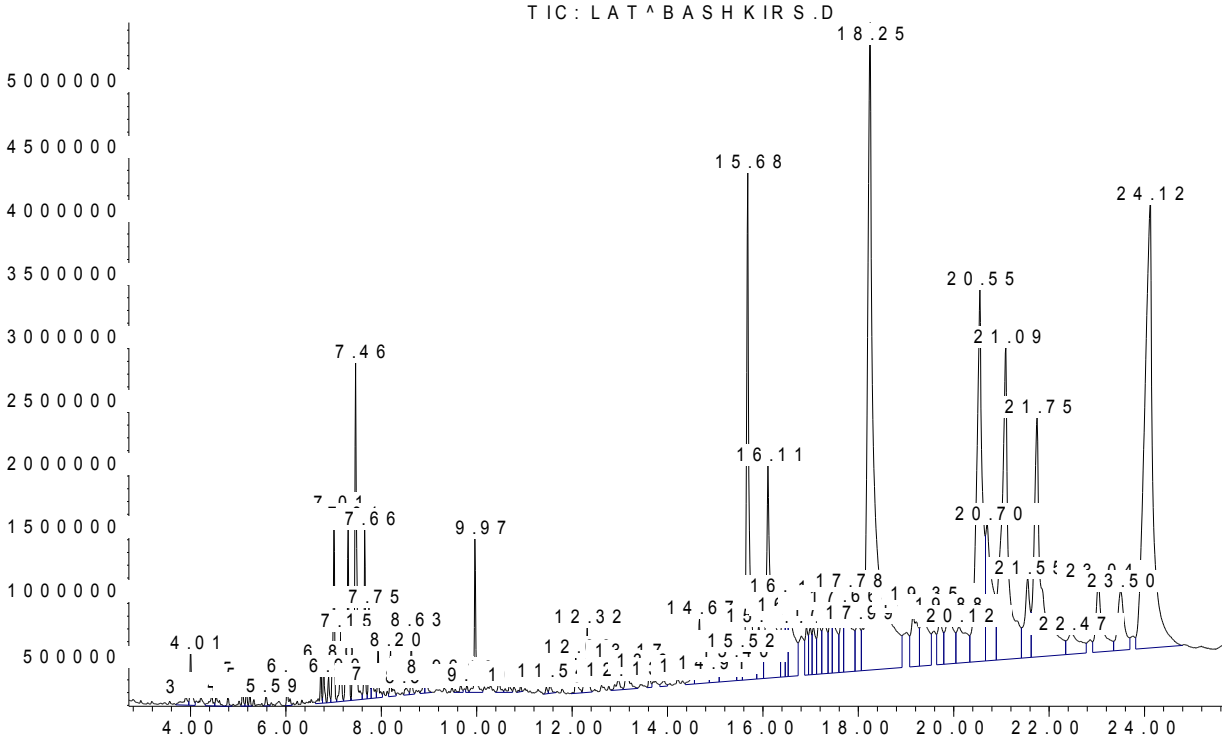


Рисунок 23 – Хроматограмма липофильной фракции листьев дикорастущего хмеля обыкновенного

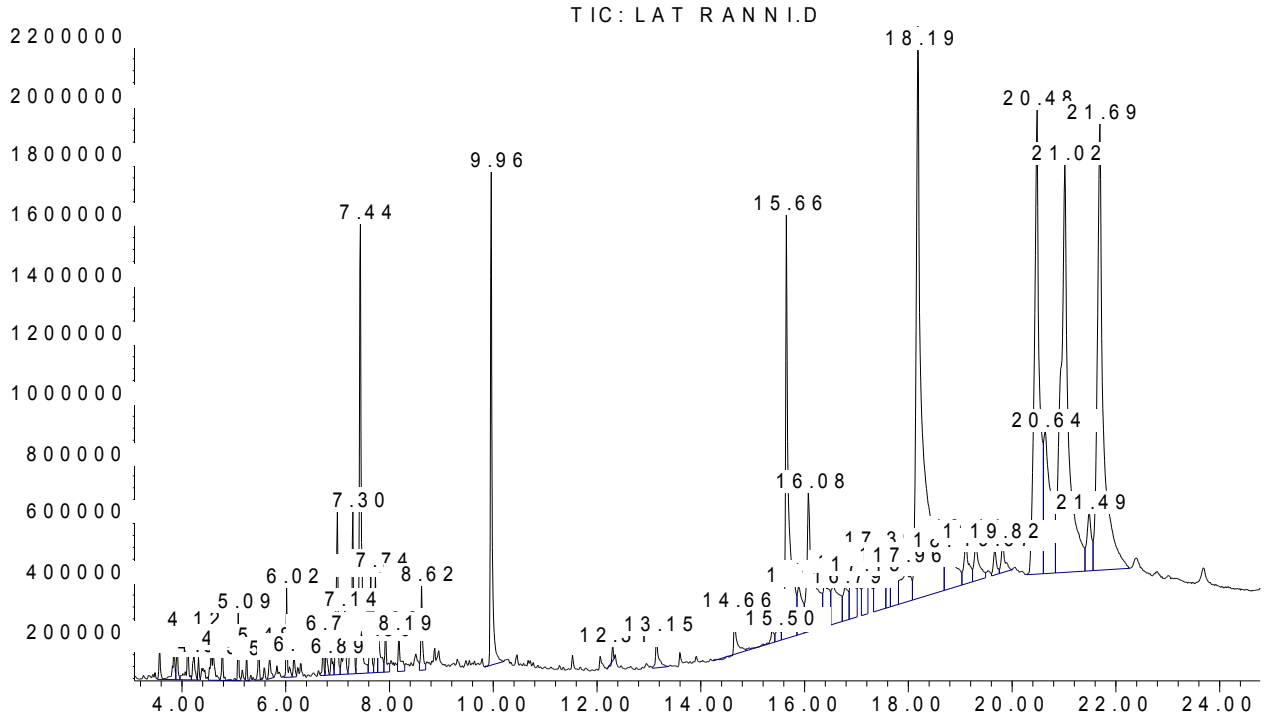


Рисунок 24 – Хроматограмма липофильной фракции листьев хмеля обыкновенного сорт «Ранний»

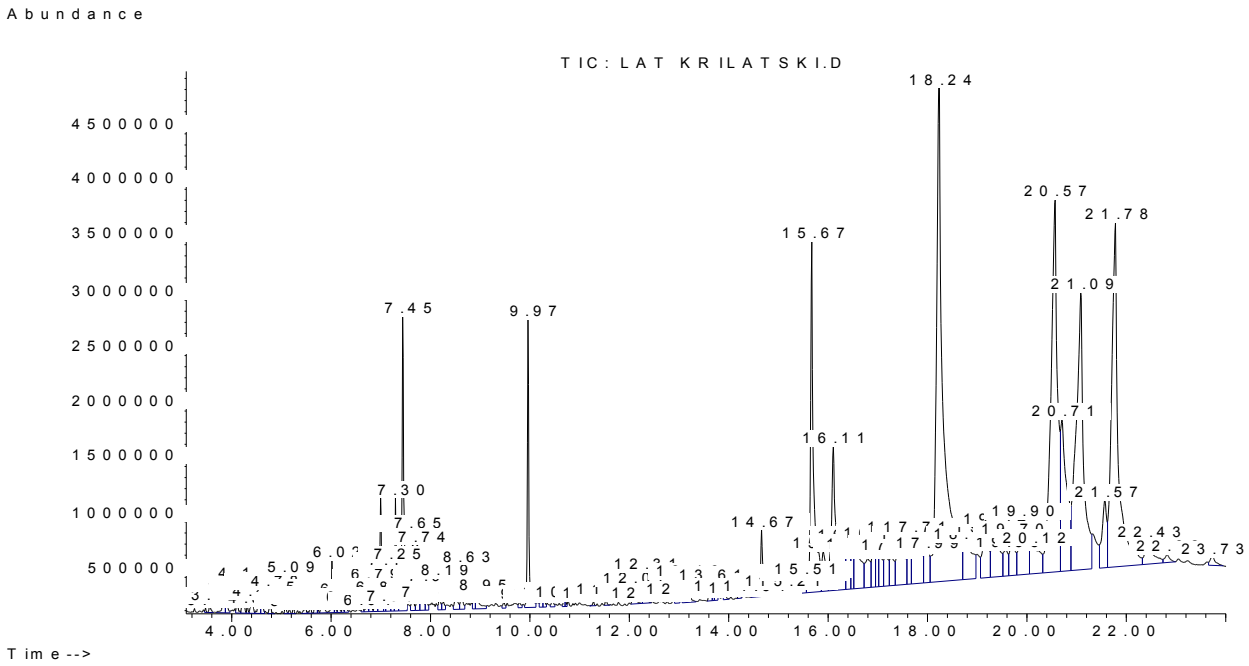


Рисунок 25 – Хроматограмма липофильной фракции листьев хмеля обыкновенного сорт «Крылатский»

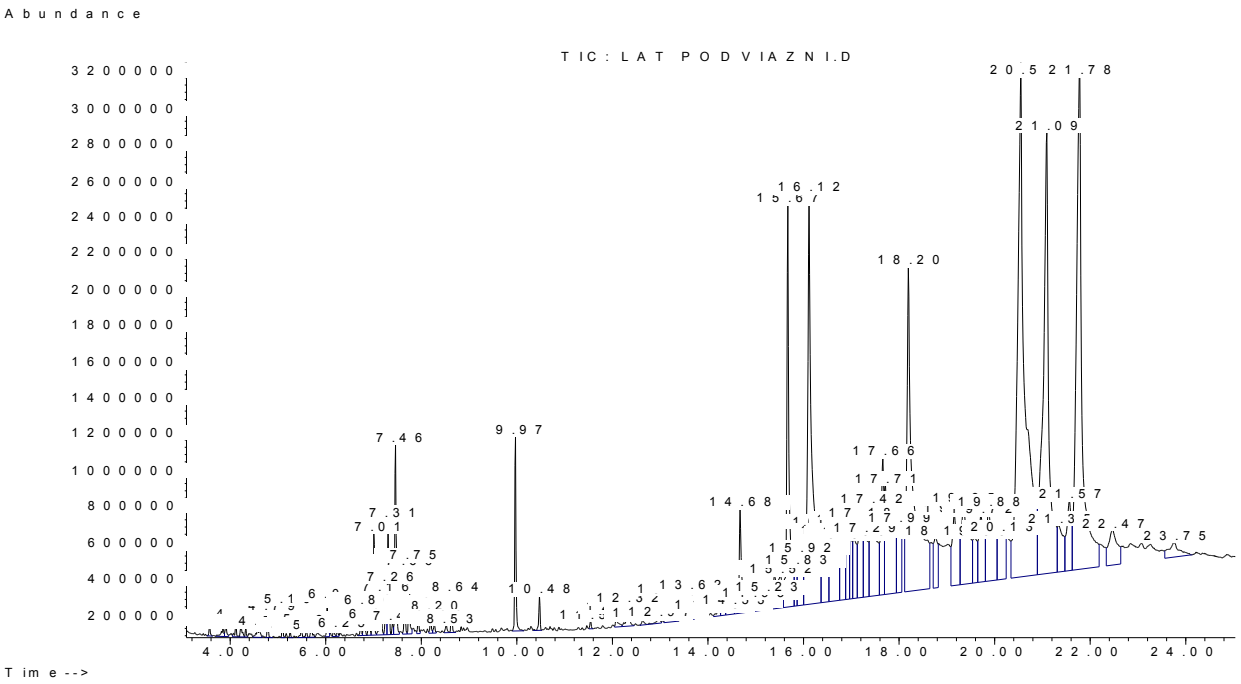


Рисунок 26 – Хроматограмма липофильной фракции листьев хмеля обыкновенного сорт «Подвязный»

Проведенный сравнительный анализ состава липофильных соединений в исследуемых образцах показал, что в количественном выражении фракция сесквитерпеновых соединений незначительна, общими явились кариофиллен, α-кариофиллен и кариофиллена оксид.

Из таблицы 28 видно, что состав производных высших жирных кислот весьма разнообразен. Основные вклады (более 2%) вносят следующие вещества фитол от 2,15% (сорт «Подвязный») до 5,22% (сорт «Ранний»); сквален от 5,78% (сорт «Подвязный») до 7,15% (сорт «Ранний»); витамин Е от 8,06% (сорт «Подвязный») до 21,56% (сорт «Крылатский»); γ-ситостерол от 10,11% (дикорастущий) до 23,75% (сорт «Подвязный»); α-амирин от 7,53% (дикорастущий) до 19,37% (сорт «Подвязный»); β-амирин от 6,01% (дикорастущий) до 14,71% (сорт «Ранний»). В указанных образцах сырья отмечено также содержание пальмитиновой и линолевой кислот.

Таблица 28 – Содержание липофильных соединений в различных образцах листьев хмеля обыкновенного

№ п/п	Название соединения	Время удерживания, мин (внутренняя нормализация)	Концентрация, % (внутренняя нормализация)			
			образцы сырья			
			дикорастущее сырье (Уфимский р-н РБ)	сорт «Ранний»	сорт «Крылатский»	сорт «Подвязный»
1	2	3	4	5	6	7
1	β-Бурбонен	3,56	–	0,26	0,12	0.11
2	Кариофиллен	3,91	0,16	0,33	0,22	0.13
3	β-Фарнезен	3,91	0,09	0,26	–	–
4	(+)-аромадендрен	4,01	0,47	–	–	–
5	α -Кариофиллен	4,11	0,25	0,39	0,28	0.13
6	β-Сесквифелландрен	4,41	–	–	0,22	–
7	Тау-Кадинен	4,56	–	0,33	0,33	0,14
8	(+)-β-Кадинен	4,60	–	–	0,30	–
9	Дигидроактинидиоид	4,77	0,09	0,31	0,26	0,25
10	Кариофиллен оксид	5,24	0,10	0,18	0,09	–
11	Тау-Кадинол	5,70	–	0,30	0,24	0,14

Продолжение таблицы 28

1	2	3	4	5	6	7
12	α-Кадинол	5,83	-	-	0,19	0,13
13	3-Метил-1-бутанол бензоат	7,00	1,66	0,67	1,41	1,32
14	Пентиловый эфир бензойной кислоты	7,14	–	0,55	0,61	0,61
15	Гексиловый эфир бензойной кислоты	7,64	1,12	–	0,69	0,63
16	Диэтил фталат	7,74	0,59	0,71	0,66	0,77
17	6,10,14-Триметил-5,9,13-пентадекатриен-2-он	8,18	0,30	0,30	0,23	0,19
18	Пальмитиновая кислота	8,53	0,13	0,21	0,17	–
19	Дибутил фталат	8,62	0,44	0,68	0,44	0,39
20	Фитол	9,96	1,13	5,22	3,30	2,15
21	Линолевая кислота	10,46	0,14	-	0,07	-
22	Диоктил фталат	13,61	0,18	0,18	0,26	0,47
23	Сквален	15,67	6,88	7,15	6,70	5,78
24	γ-Токоферол	17,40	0,40	0,62	0,60	0,80

Продолжение таблицы 28

1	2	3	4	5	6	7
25	Витамин Е	18,24	19,52	19,04	21,56	8,06
26	Кампастерол	19,34	–	0,21	0,42	1,68
27	Стигмастерол	19,70	–	0,36	0,57	1,81
28	γ-Ситостерол	20,57	10,11	13,90	16,47	23,75
29	β-Амирин	21,08	6,01	14,71	10,73	12,17
30	Циклоартенол	21,57	0,68	0,48	1,24	2,50
31	α-Амирин	21,78	7,53	15,97	15,84	19,37
32	Изофукостерол	20,70	3,22	1,31	2,80	–

Таким образом, листья хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов могут рассматриваться как источник получения фитостеринов.

Исследование производных ацилфлороглюцидов.
Сравнительное изучение содержания суммы производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот)

Качественное определение ацилфлороглюцидов показало их наличие во всех видах исследуемого сырья хмеля обыкновенного по образующемуся осадку при добавлении 1% раствора ацетата свинца.

Определение содержания суммы производных ацилфлороглюцидов проводили алкалиметрически, титрант – 0,01 М раствор едкого калия. Указанный метод используется для стандартизации препаратов на основе хмеля обыкновенного (экстракт шишек хмеля (ФС 42-2631-89), хмеля соплодия (ФС 42-0147-05).

Таблица 29 – Содержание суммы производных ацилфлороглюцидов в различных образцах листьев хмеля

Образцы сырья	Содержание производных ацилфлороглюцидов, %
Сорт «Ранний»	11,8±0,27
Сорт «Крылатский»	12,3±0,28
Сорт «Подвязный»	12,8±0,32
Дикорастущее сырье, собранное в Уфимском районе	12,4±0,26
Дикорастущее сырье, собранное в Давлекановском районе	12,6±0,30

Из таблицы 29 видно, что содержание производных ацилфлороглюцидов в разных образцах сырья колеблется от 11,8 до 12,8%. Максимальное содержание суммы производных ацилфлороглюцидов отмечено у горького сортотипа

«Подвязный», затем у горько-ароматического сортотипа «Крылатский», минимальное – у ароматического сортотипа «Ранний». Дикорастущие виды сырья и по данному показателю не уступают культивируемым сортам.

Количественное определение α-кислот методом кондуктометрии

Важнейшим компонентом, определяющим товарную ценность хмеля, являются α-кислоты. По содержанию α-кислот в соплодиях хмеля можно определить степень дозревания соплодий и точные сроки сбора сырья.

Однако, метод неводного титрования не является селективным для определения содержания α-кислот.

Более селективным является метод кондуктометрического определения α-кислот, основанный на измерении электропроводности титруемого раствора. Данный метод более точный, но сложный в выполнении, требующий специального оборудования (глава 2, раздел 2.2.5). Данным методом были проанализированы все образцы сырья хмеля обыкновенного с учетом показателей влажности сырья, определенных нами ранее. Для соплодий и листа хмеля обыкновенного массовая доля влаги составила 9–11% и 5–7%, соответственно. Исследованиями было показано наличие α-кислот в соплодиях, в то время как во всех образцах сырья листьев культивируемых сортов и дикорастущих видов хмеля обыкновенного их не обнаружено (рисунки 27 и 28). Результаты исследования содержания α-кислот обработаны статистически согласно ГФ СССР XI изд. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 5% для всех образцов сырья. Метрологические характеристики представлены в таблице 30. Результаты количественного содержания α-кислот в сырье представлены на рисунках 27 и 28. По данным таблицы 30 содержание α-кислот в изучаемом образце соплодий хмеля обыкновенного составило – 7,8%; в листьях хмеля обыкновенного содержание α-кислот методом кондуктометрии не обнаружено.

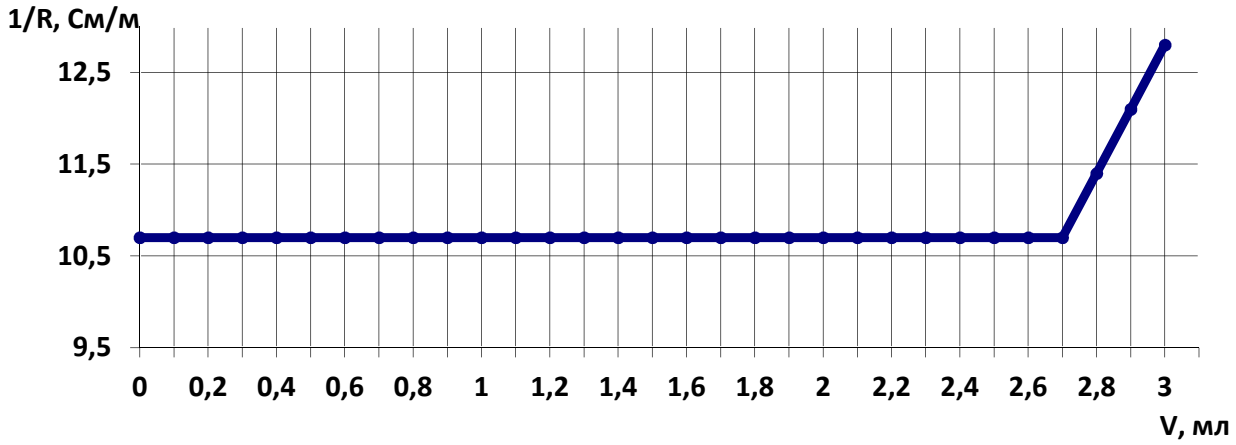


Рисунок 27 – Кондуктограмма титрования соплодий хмеля обыкновенного

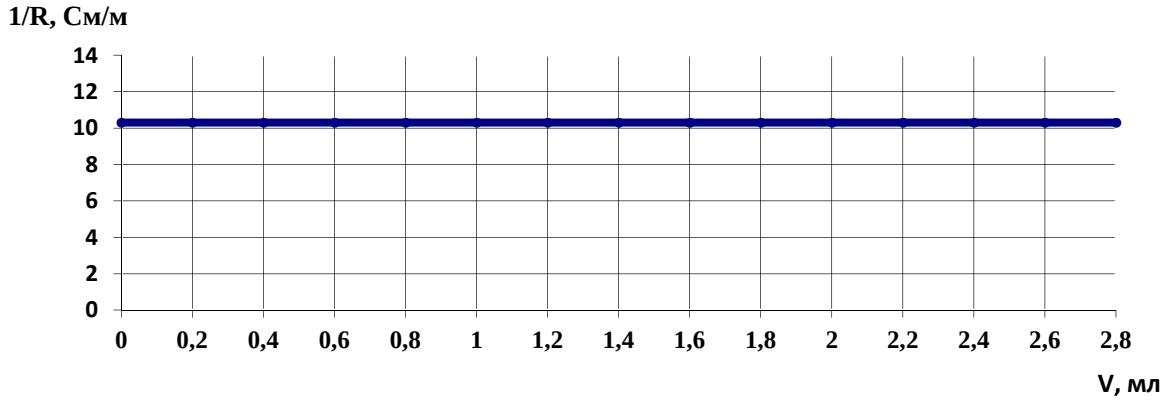


Рисунок 28 – Кондуктограмма титрования листьев хмеля обыкновенного

Таблица 30 – Метрологическая характеристика кондуктометрического метода количественного определения α-кислот в сырье хмеля обыкновенного

n	f	x ср.	S^2	S	P, %	t (P, f)	Δ x	E, %
Соплодия хмеля обыкновенного								
4	5	7,8	0,02071	0,14390	95	2,57	0,15112	1,93

Таким образом, на основании химического изучения растений рода первоцвет и рода хмель установлено, что имеющиеся в настоящее время данные по их химическому составу не учитывают содержание всех веществ, относящихся к различным классам соединений и вносящих вклад в фармакологическую активность. Впервые доказано, что растения рода первоцвет наряду

с гидрофильными веществами – тритерпеновыми сапонинами, определяющими отхаркивающие свойства препаратов на их основе, органическими кислотами и витаминами, определяющими пищевую ценность сырья, содержат и липофильные вещества. Впервые изучен их состав, выделены полиметоксилированные флавоноиды и производные жирных кислот (октадекадиеновой и октадекатриеновой) в первоцвете весеннем (таблица 31). Сравнительный анализ состава липофильных веществ близкородственных видов первоцветов, произрастающих на территории РФ, подтверждает данные зарубежной литературы о том, что полиметоксилированные флавоноиды являются специфическими хемотаксономическими индикаторными соединениями растений рода первоцвет.

Вещество 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавон предложено нами впервые в качестве специфического маркера для стандартизации надземной части первоцвета весеннего, что позволит расширить перечень специфических веществ-маркеров для стандартизации ЛРС (патент РФ № 2532999 от 20.01.15 «Новое природное вещество из травы первоцвета весеннего»).

Таблица 31 – Биологически активные соединения, выделенные и идентифицированные из растений рода первоцвет и рода хмель

Род	Липофильные биологически активные соединения	Гидрофильные биологически активные соединения
1	2	3
Primula L.	**Полиметоксилированные флавоноиды:** флавон и его производные: 8-метокси-флавон, 3’-метокси-флавон, 3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавон**,** 5, 6, 2’, 6’-тетраметоксифлавон (запотин),	**Флавоноиды** Агликоны флавоноидов (апигенин, кверцетин, кемпферол, таксифолин) Флавоноидные гликозиды (цинарозид, кверцимеритрин, рутин и др.) **Кумарины (**дигидрокумарин, О-метоксикумарин, кумарин, умбел-

	5,6,7,3’,4’-пентаметоксифлавон (синенсетинт)	лиферон) **Фенолокислоты и фенилпропаноиды** (галловая, салициловая; коричная, кофейная феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая, цикориевая кислоты) **Дубильные вещества** (танин, катехин)
	Дитерпены (фитол, изофитол)	**Тритерпеновые сапонины** (урсоловая кислота)
	Производные жирных кислот: метиловый эфир пальмитиновой кислоты, метиловый эфир-9,12-октадекадиеновой кислоты, метиловый эфир-9,12,15 октадекатриеновой кислоты, генэйкозан	**Органические кислоты** (аскорбиновая, лимонная, янтарная, щавелевая и др.) **Аминокислоты** (аспарагин, пролин, глицин, серин, цистеин и др.)
Humulus L.	**Сесквитерпены** (ундеканон, копаен, α-кубебен, α-гумулен, кариофиллен) **Дитерпены (**фитол) **Производные жирных кислот:** пальмитиновая кислота, метиловый эфир-9,12-октадекадиеновой	**Флавоноиды** Агликоны флавоноидов (кверцетин, кемпферол, таксифолин, лютеолин) Флавоноидные гликозиды (цинарозид, рутин, гиперозид) **Изофлавоноиды** (генистин, геистеин, даидзеин) **Кумарины (**кумарин, умбеллиферон) **Фенолокислоты и фенилпропаноиды** (галловая; коричная, кофейная, феруловая, хлорогеновая и др.) **Стильбены** (ресвератрол)

		Дубильные вещества (танин, эпикатехин, ЭГКГаллат)
	Стерины (стигмастерол, γ-, β – ситостеролы, α-, β-амирины, β-ситостерол-3-О-β-D-глюкопироназид)	**Органические кислоты** (аскорбиновая, лимонная, янтарная и др.)
	Производные ацилфлороглюцидов (α- и β- кислоты)	**Аминокислоты** (аспарагин, пролин, глицин, серин, цистеин и др.)

Впервые показано, что растения рода хмель наряду с производными ацилфлороглюцидов, терпеноидов, производных жирных кислот, содержат богатый комплекс фенольных соединений (таблица 31).

На основании чего доказано, что растения рода первоцвет и рода хмель могут служить источниками получения гидрофильных и липофильных веществ. Это позволило обосновать и предложить новые фитопрепараты «Экстракт первоцвета густой», «Экстракт листьев хмеля обыкновеннго густой». Результаты изучения химического состава свидетельствуют, что наряду с первоцветом весенним возможно использовать и первоцвет крупночашечный, а наряду с соплодиями хмеля – листья хмеля обыкновенного, являющимися отходами хмелепроизводства.

Выводы по главе 3

1. Исследован качественный состав ЛРС представителей рода первоцвет и рода хмель. В результате проведенных исследований выявлены полифенольные соединения, тритерпеновые сапонины, органические кислоты, производные ацилфлороглюцидов, аминокислоты, липофильные вещества.

Различными методами хроматографии (бумажной, тонкослойной, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрии) исследован состав фенольных соединений растений рода первоцвет и рода хмель. Идентифицировано 41 вещество фенольной природы, представленные флавоноидами, в том числе полиметоксилированны-

ми, простыми фенолами, дубильными веществами, кумаринами, фенолокислотами, оксикоричными кислотами, изофлавоноидами, стильбенами.

Впервые в траве первоцвета весеннего идентифицировано 10 веществ фенольной природы, первоцвета крупночашечного – 23, в листьях хмеля обыкновенного – 13.

2. Методами колоночной хроматографии и избирательной жидкостной экстракции проведено выделение 30 веществ фенольной природы, 1 – из группы фитостеринов. Методами хроматографии, ЯМР ^{1}H-, ЯМР ^{13}C-спектроскопии; корреляционной спектроскопии ЯМР ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQCED, HMBC, хромато-масс-спектрометрии, УФ-спектроскипии, сравнением со стандартными образцами веществ осуществлена идентификация фенольных соединений.

Разработаны методические приемы выделения специфических для рода первоцвет липофильных флавоноидов и разделения их на отдельные компоненты. Вещество 3´,4´-метилендиокси-5´-метоксифлавон впервые предложено в качестве специфического маркера для стандартизации надземной части первоцвета весеннего (патент РФ на изобретение № 2532999 от 20.01.15 «Новое природное вещество из травы первоцвета весеннего»).

3. Сравнительный анализ состава фенольных соединений близкородственных видов первоцветов показал практическую идентичность по содержанию основных групп полифенолов. Выделены и идентифицированы 7 полиметоксилированных флавоноидов, 9 флавоноидных соединений, отнесенных к агликонам, О- и С-гликозидам. Из группы агликонов флавоноидов охарактеризованы апигенин, кверцетин, кемпферол, таксифолин. Из О-гликозидов флавоноидов определены цинарозид, гиперозид, байкалин, рутин; из С-гликозидов – витексин. Общими и доминирующими флавоноидными соединениями являются рутин и гиперозид.

4. Наряду с фенольными соединениями в сырье первоцветов весеннего и крупночашечного методами ТСХ, УФ-спектроскопии, идентифицированы тритерпеновые сапонины, среди которых урсоловая кислота в исследуемых

объектах определена впервые. Содержание тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту урсоловую в среднем составляет в траве первоцвета весеннего 3,29%, в траве первоцвета крупночашечного – 5,46%. Установлено, что по содержанию тритерпеновых сапонинов первоцвет крупночашечный превосходит первоцвет весенний.

5. С помощью аминокислотного анализатора и методом ТСХ в сырье первоцветов определено наличие 13 аминокислот (аргинин, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, треонин, тирозин, фенилаланин). Содержание суммы свободных аминокислот составляет в среднем в первоцвете весеннем 6,2 мг%, в первоцвете – крупночашечном 8,2 мг%.

Методами ТСХ, ВЭЖХ в сырье первоцветов весеннего и крупночашечного определено наличие органических кислот, общими являются аскорбиновая, лимонная, щавелевая и янтарная кислоты. Содержание свободных органических кислот составляет в среднем в первоцвете весеннем 7,36%, в первоцвете крупночашечном – 6,76%.

Состав органических и аминокислот в траве первоцвета крупночашечного определен впервые.

Методом хромато-масс-спектрометрии впервые проведен сравнительный анализ состава липофильных веществ, определены фитол, изофитол, генэйкозан, метиловый эфир пальмитиновой кислоты, а также производные октадекадиеновой и октадекатриеновой кислот.

Проведенные исследования показали сходство качественного состава основных групп БАВ первоцвета весеннего и крупночашечного.

6. Сравнительный анализ состава фенольных соединений показал, что листья хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов не уступают соплодиям по содержанию основных групп полифенолов. Идентифицировано 23 вещества фенольной природы. Установлено строение 6 производных оксикоричных и фенолкарбоновых кислот – галловой, кофейной, феруловой, хлорогеновой, неохлорогеновой, коричной. Выделены и идентифицированы 7 флавоноидных соединений, отнесенных к агликонам и О-гликозидам. Из

группы агликонов флавоноидов охарактеризованы кверцетин, кемпферол, таксифолин, лютеолин; из О-гликозидов флавоноидов – цинарозид, гиперозид, рутин. В листьях хмеля обыкновенного впервые определены изофлавоноиды – генистин, генистеин, дайдзеин; стильбены – ресвератрол.

7. В сырье хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов идентифицированы фитостерины, эфирные масла, производные ацилфлороглюцидов. Из листьев хмеля обыкновенного впервые выделен и идентифицирован методами ЯМР ^{1}Н-, ЯМР ^{13}С-спектроскопии β-ситостерол-3-О-β-D-глюкопиранозид; методами хромато-масс-спектрометрии впервые определен состав эфирных масел, установлено наличие специфичных для соплодий хмеля α-гумулена, α-кубебена, кариофиллена и α-кариофиллена. Из производных высших жирных спиртов отмечено наличие в листьях хмеля 19 соединений, в соплодиях – 13. Общими являются фитол, сквален; из производных ненасыщенных жирных кислот – генэйкозан, эйкозан 1,19 – эйкозадиен. В соплодиях хмеля обыкновенного отмечено содержание пальмитиновой и линолевой кислот, эйкозодеканола. В составе стеринов в листьях и соплодиях хмеля обыкновенного идентифицированы в высоких концентрациях α-амирин, β-амирин; в соплодиях – γ-ситостерол и β-ситостерол; в листьях – витамин Е.

Проведенные исследования показали сходство качественного состава основных групп БАВ в листьях и соплодиях культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного.

ГЛАВА 4. РЕСУРСНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ РОДА ПЕРВОЦВЕТ И РОДА ХМЕЛЬ

Для расширения номенклатуры лекарственного растительного сырья и возможности введения в медицинскую практику малоизученного вида первоцвета крупночашечного, а также листьев хмеля обыкновенного, актуальным было проведение сравнительного морфолого-анатомического изучения первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного, а также листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов. На основании проведенных исследований были выявлены общие морфологические и микроскопические признаки. Результаты исследований представлены в таблицах 32, 33.

4.1. Сравнительное морфолого-анатомическое изучение первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

Исследование морфологических признаков первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

Изучение морфологических признаков исследуемых образцов сырья проводили в соответствии с ГФ СССР XI издания по свежесобранным и гербарным образцам растений [52, 53]. Результаты исследований представлены в таблице 32.

В результате проведенных исследований определены признаки, устанавливающие подлинность сырья.

Цельное сырье. При визуальном осмотре и рассмотрении под лупой (10×) и стереомикроскопом (8×, 16×) видны: смесь отдельных и измельченных листьев с черешками, фрагменты черешков. Длина листовой пластинки от 3 до 15 см, ширина от 2 до 8 см, длина черешка не более 14 см. Листья яйцевидные или яйцевидно-продолговатые, внезапно суженные в черешок, городчатые, неравномерно-городчатые или мелкозубчатые по краю, на верхушке тупые, морщинистые, с вдавленными сверху и выступающими снизу жилками, почти голые с верхней стороны пластинки, снизу также почти голые или тонко слабо-войлочные. У первоцвета весеннего листья имеют сравнительно короткую эллипсоидальную пластинку листа, внезапно суженную в узко-крылатый черешок; для первоцвета крупночашечного характерны более длинные пластинки листа и довольно постепенно суженные в крылатый, и, часто, зубчатый черешок. Черешки короче или равны листовой пластинке, снизу слабо железисто-опушенные.

Цвет листьев серовато-зеленый, нижняя сторона листа светлее верхней.

Цветоносы превышают листья, до 10–30 см длины, внутри полые. Соцветие зонтиковидное, цветки правильные, наклонены в одну сторону, цветоножки 5–20 мм длины, слабо железисто-опушенные. Прицветники линейно-ланцетные, острые, 5–10 мм длины. У первоцвета весеннего чашечка перепончатая, трубчато-колокольчатая, угловато-гранистая, 8–15 мм длины, до 1/3 рассечена на треугольные острые зубцы, вздувается лишь после цветения. У первоцвета крупночашечного чашечка широко-колокольчатая (вздутая до цветения), 12–18 мм длины, до 1/3 рассечена на треугольные острые зубцы. Лепестки венчика с не широким отгибом до 0,8–1,5 см в диаметре, с обратносердцевидными выемчатыми долями, ярко-желтые, внутри с оранжевым пятном у основания долей.

Запах слабый, слегка медовый. Вкус водного извлечения сначала сладкий, затем горьковатый.

Таблица 32 – Сравнительная характеристика морфологических признаков травы первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

Название признаков		Исследуемые образцы сырья	
		трава первоцвета весеннего	трава первоцвета крупночашечного
1		2	3
Лист	Размеры	Длина листовой пластинки 3–15 см, ширина 2–6 см	Длина листовой пластинки 3–20 см, ширина 2–8 см
	Форма	Яйцевидная, яйцевидно-продолговатая, сравнительно короткая эллипсоидальная, внезапно суженная в узко-крылатый черешок. На верхушке тупая, морщинистая с вдавленными сверху и выступающими снизу жилками. С верхней стороны пластинки почти голые, снизу почти голые или тонко слабо-войлочные	Яйцевидная, яйцевидно-продолговатая, более длинная и довольно постепенно суженная в крылатый, и, часто, зубчатый черешок. На верхушке тупая, морщинистая с вдавленными сверху и выступающими снизу жилками. С верхней стороны пластинки почти голые, снизу почти голые или тонко слабо-войлочные
	Окраска	Серовато-зеленая, нижняя сторона листа светлее верхней	Серовато-зеленая, нижняя сторона листа светлее верхней
	Край листа	Городчатый или неравномерно-городчатый	Городчатый или неравномерно-городчатый
Черешок	Размеры	Короче или равен листовой пластинке	Короче или равен листовой пластинке
	Форма	Узко-крылатая	Крылатая
	Окраска	Серовато-зеленая	Серовато-зеленая

Продолжение таблицы 32

1		2	3
Цветонос	Размеры	Длина превышает листья, 10–25 см	Длина превышает листья, 10–30 см
	Форма	Округлая, внутри полая	Округлая, внутри полая
	Окраска	Светло-зеленая	Светло-зеленая
Цветок	Соцветие	Зонтиковидное, цветки наклонены в одну сторону	Зонтиковидное, цветки наклонены в одну сторону
	Цветоножки	Цветоножки длиной 5–20 мм, слабо железисто-опушенные	Цветоножки длиной 5–20 мм, слабо железисто-опушенные
	Прицветники	Линейно-ланцетные, острые, 5–10 мм длины	Линейно-ланцетные, острые, 5–10 мм длины
	Чашечка	Перепончатая, трубчато-колокольчатая, угловато-гранистая, 8–15 мм длины, до 1/3 рассечена на треугольные острые зубцы, вздувается лишь после цветения; опушена железистыми волосками	Широко-колокольчатая (вздутая до цветения), 12–18 мм длины, до 1/3 рассечена на треугольные острые зубцы; опушена железистыми волосками
	Лепестки	С нешироким отгибом до 0,8–1,5 см в диаметре, с обратно-сердцевидными выемчатыми долями, ярко-желтые, внутри с оранжевым пятном у основания долей	С нешироким отгибом до 1–1,7 см в диаметре, с обратно-сердцевидными выемчатыми долями, ярко-желтые, внутри с оранжевым пятном у основания долей

Проведенные исследования показали близость морфологического строения изучаемых видов. Различаются они по следующим признакам: листья первоцвета весеннего короткой эллипсоидальной формы, внезапно суженные в узко-крылатый черешок; листья первоцвета крупночашечного более длинной формы, постепенно суженные в крылатый, и часто, зубчатый черешок. Чашечка у первоцвета весеннего трубчато-колокольчатая, перепончатая, угловато-гранистая, 8–15 мм длины, вздувается лишь после цветения. Чашечка у первоцвета крупночашечного широко-колокольчатая, 12–18 мм длины, вздувается до цветения.

Сравнительное анатомическое исследование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

Известны некоторые анатомические исследования первоцвета весеннего. Так, Борисовой Д.А. описаны отдельные микроскопические характеристики корневищ с корнями и надземных органов первоцвета лекарственного, собранного на Кавказе [26]. Информационно-аналитический поиск, проведенный нами, показал отсутствие данных по анатомическому строению первоцвета крупночашечного. В связи с этим нами впервые проведены следующие исследования: изучение анатомического строения надземных органов первоцвета крупночашечного, сравнительный анализ анатомического строения близкородственных видов первоцветов. Результаты исследований представлены в таблице 33 и на рисунках 29–33.

Цельное сырье. Из части аналитической пробы готовили препараты по методике (ГФ СССР XI изд., вып. 1, С. 278).

При рассмотрении препаратов листа первоцвета с поверхности видно, что на верхней и нижней сторонах листа имеется однослойный эпидермис. Клетки верхнего эпидермиса имеют слегка извилистые контуры с тонкими оболочками. Клетки нижнего эпидермиса имеют сильноизвилистые контуры. Размеры клеток верхнего эпидермиса листа первоцвета весеннего: длина 30–60 мкм, ширина 20–30 мкм; первоцвета крупночашечного: длина 30–60 мкм,

ширина 20–40 мкм; нижнего эпидермиса листа первоцвета весеннего: длина 40–80 мкм, ширина 20–30 мкм; первоцвета крупночашечного: длина 30–60 мкм, ширина 20–40 мкм. Кутикула на внешней стороне клеток эпидермиса тонкая, лежит ровным слоем.

Устьица аномоцитного типа, длиной 23–29 мкм, шириной 18–22 мкм, имеются на верхней и нижней сторонах листа. Устьица овальной или округлой формы, расположены в основном на нижней стороне листа, изредка – на верхней стороне листа. Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму.

В эпидермисе обеих сторон листа во множестве отмечены волоски двух типов – простые (изредка) и железистые (преимущественно). Простые волоски 2–3 клеточные, длиной до 230 мкм, расширены у основания и заострены на конце, с тонкими стенками, с гладкой поверхностью, располагаются главным образом по краю листа. У первоцвета весеннего повсеместно встречаются железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками различной величины (от 15 до 22 мкм в диаметре), расположенные на 3-клеточной ножке длиной до 100 мкм. Содержимое головок зачастую заполнено серовато-бурой массой. У первоцвета крупночашечного встречаются повсеместно железистые волоски (диаметр головки 15–20 мкм) длиной до 130 мкм, расположенные на трехклеточной ножке. Головки волосков – без содержимого.

Проводящие пучки представлены сосудами, образующими в листе проводящую систему (жилкование) на верхней и нижней сторонах листа.

При рассмотрении препаратов черешка листа первоцвета с поверхности видно, что имеется однослойный эпидермис. Клетки эпидермиса прозенхимной формы, с наклонными боковыми стенками, тонкими оболочками. Размеры клеток эпидермиса: длина до 250 мкм, ширина до 45 мкм. Изредка отмечаются устьица. В эпидермисе черешка листа первоцвета отмечены волоски – простые и железистые. Простые волоски 2–3 клеточные, длиной до 210 мкм, расширены у основания и заострены на конце, с тонкими стенками, с гладкой поверхностью. У первоцвета весеннего встречаются железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками различной величины (от 15 до 20 мкм в диаметре), расположен-

ные на 3-клеточной ножке длиной до 90 мкм, головки волосков зачастую заполнены серовато-бурой массой. У первоцвета крупночашечного железистые волоски (диаметр головки 15–20 мкм) длиной до 120 мкм, расположенные на трехклеточной ножке, головки волосков ничем не заполнены.

Форма черешка – треугольная, с роговидными выростами по бокам. Механическая ткань представлена уголковой колленхимой, расположенной в 5–7 слоев. Проводящая система представлена одним крупным пучком, расположенным в центре, и четырьмя – в латеральных выростах.

Фрагменты листа, черешка первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного представлены на рисунках 30–34.

При рассмотрении препаратов цветоносной стрелки первоцвета с поверхности видно, что в ней имеется однослойный эпидермис. Клетки таблитчатой формы, с наклонными боковыми стенками, тонкими оболочками, кутикула не отмечена. Размеры клеток эпидермиса цветоносной стрелки первоцвета весеннего: длина 150–250 мкм, ширина 21–25 мкм; первоцвета крупночашечного: длина 150–380 мкм, ширина 20–27 мкм. Устьица немногочисленны, аномоцитного типа. Размеры устьиц цветоносной стрелки: длина 30–50 мкм, ширина 25–30 мкм. Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. В эпидермисе цветоносной стрелки первоцвета имеются волоски двух типов – простые и железистые. Простые волоски 2–3 клеточные, длиной до 130 мкм, расширены у основания и заострены на конце, с тонкими стенками, с гладкой поверхностью. Железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками различной величины (от 20 до 25 мкм в диаметре), расположенными на 3-клеточной ножке длиной до 300 мкм.

При рассмотрении препаратов чашелистика первоцвета с поверхности видно, что имеется однослойный эпидермис. Клетки эпидермиса имеют извилистую форму, с тонкими оболочками. Кутикула не отмечена. Устьица немногочисленны, аномоцитного типа, длиной 21–35 мкм, шириной 16–30 мкм. Замыкающие клетки устьиц имеют почковидную форму. В эпидермисе отмечены многочисленные волоски простого типа, 2–3 клеточные, длиной до 130 мкм, расширенные у основания и заостренные на конце, с тонкими стенками, глад-

кой поверхностью. Железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками различной величины (от 20 до 25 мкм в диаметре), расположенными на 3-клеточной ножке длиной до 150 мкм. Отмечены проводящие пучки, представленные сосудами.

При рассмотрении препаратов венчика первоцвета с поверхности видно, что имеется однослойный эпидермис. Клетки эпидермиса лепестка неопределенной формы. Размеры клеток эпидермиса лепестка первоцвета весеннего: длина 130–180 мкм, ширина 50–60 мкм; первоцвета крупночашечного: длина 120–170 мкм, ширина 40–50 мкм. Кутикула не отмечена. В области жилки лепестка имеются единичные проводящие пучки, представленные сосудами.

Фрагменты чашелистика, цветочной стрелки, венчика первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного представлены в приложении 27.

Таблица 33 – Сравнительная характеристика анатомических признаков травы первоцветов весеннего и крупночашечного

		Исследуемые образцы сырья	
		Трава первоцвета весеннего	**Трава первоцвета крупночашечного**
1		2	3
Листовая пластинка	Клетки верхнего эпидермиса	Стенки слегка извилистые, с тонкими оболочками; длина – 30–60 мкм, ширина – 20–30 мкм	Стенки слегка извилистые, с тонкими оболочками; длина – 30–60 мкм, ширина – 20–40 мкм
	Клетки нижнего эпидермиса	Стенки сильно извилистые, длина – 40–80 мкм, ширина – 20–30 мкм	Стенки сильно извилистые, длина – 30–60 мкм, ширина – 20–40 мкм
	Кутикула	Кутикула на внешней стороне клеток эпидермиса тонкая, лежит ровным слоем	Кутикула на внешней стороне клеток эпидермиса тонкая, лежит ровным слоем
	Устьица	Устьица аномоцитного типа (овальной или округлой формы с замыкающими почковидными клетками), длина 23–29 мкм, ширина 18–22 мкм, расположены преимущественно на нижней стороне листа	Устьица аномоцитного типа (овальной или округлой формы с замыкающими почковидными клетками), длина 23–29 мкм, ширина 18–22 мкм, расположены преимущественно на нижней стороне листа
	Волоски	Изредка отмечены 2–3 клеточные простые волоски, длина до 230 мкм, расширены у основания и заострены на конце, располагаются преимущественно по краю листа. Преимущественно отмечены 3–4 клеточные же-	Изредка отмечены 2–3 клеточные простые волоски, длина до 230 мкм, расширены у основания и заострены на конце, располагаются преимущественно по краю листа. Преимущественно отмечены 3–4 клеточные

		лезистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (15–22 мкм в диаметре), длина до 100 мкм. Содержимое головок чаще заполнено серовато-бурой массой	железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (15–20 мкм в диаметре), длина до 130 мкм. Содержимое головок не заполнено
	Проводящие пучки	Представлены сосудами, образуют жилкование на верхней и нижней сторонах листа	Представлены сосудами, образуют жилкование на верхней и нижней сторонах листа
Черешок	Клетки эпидермиса	Прозенхимной формы, с наклонными боковыми стенками, тонкими оболочками, длина до 250 мкм, ширина до 45 мкм	Прозенхимной формы, с наклонными боковыми стенками, тонкими оболочками, длина до 250 мкм, ширина до 45 мкм
	Устьица	Устьица аномоцитного типа	Устьица аномоцитного типа
	Волоски	2-3 клеточные простые волоски, длина до 210 мкм, расширены у основания и заострены на конце. 3-4 клеточные железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (15-20 мкм в диаметре), длина до 90 мкм. Содержимое головок чаще заполнено серовато-бу	2–3 клеточные простые волоски, длина до 210 мкм, расширены у основания и заострены на конце. 3-4 клеточные железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (15–20 мкм в диаметре), длина до 120 мкм. Содержимое головок не заполнено
	Форма и строение в поперечном срезе	Треугольная, с роговидными выростами по бокам. Механическая ткань представлена уголковой колленхимой, расположенной в 5–7 рядов	Треугольная, с роговидными выростами по бокам. Механическая ткань представлена уголковой колленхимой, расположенной в 5–7 рядов

	Проводящая система	Один крупный пучок, расположенный в центре, четыре пучка – в латеральных выростах	Один крупный пучок, расположенный в центре, четыре пучка – в латеральных выростах
Цветонос	Клетки эпидермиса	Таблитчатой формы, с наклонными боковыми стенками, тонкими оболочками, длина 150–250 мкм, ширина 21–25 мкм	Таблитчатой формы, с наклонными боковыми стенками, тонкими оболочками, длина 150–380 мкм, ширина 20–27 мкм
	Устьица	Устьица аномоцитного типа с замыкающими почковидными клетками, немногочисленны. Длина 30-50 мкм, ширина 25–30 мкм	Устьица аномоцитного типа с замыкающими почковидными клетками, немногочисленны. Длина 30–50 мкм, ширина 25–30 мкм
	Волоски	2–3 клеточные простые волоски, длина до 130 мкм, расширены у основания и заострены на конце. 3–4 клеточные железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (20–25 мкм в диаметре), длина до 300 мкм. Содержимое головок чаще заполнено серовато-бурой массой	2–3 клеточные простые волоски, длина до 130 мкм, расширены у основания и заострены на конце. 3–4 клеточные железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (20–25 мкм в диаметре), длина до 300 мкм. Содержимое головок не заполнено
Чашелистик	Клетки эпидермиса	Извилистой формы с тонкими оболочками. Кутикула не отмечена	Извилистой формы с тонкими оболочками. Кутикула не отмечена

210

	Устьица	Аномоцитного типа с замыкающими почковидными клетками, немногочисленны. Длина 21–35 мкм, ширина 16–30 мкм	Аномоцитного типа с замыкающими почковидными клетками, немногочисленны. Длина 21–35 мкм, ширина 16–30 мкм
	Волоски	2–3 клеточные простые волоски, длина до 130 мкм, расширены у основания и заострены на конце. 3–4 клеточные железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (20–25 мкм в диаметре), длина до 150 мкм. Содержимое головок чаще заполнено серовато-бурой массой	2–3 клеточные простые волоски, длина до 130 мкм, расширены у основания и заострены на конце. 3–4 клеточные железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками (20-25 мкм в диаметре), длина до 150 мкм. Содержимое головок не заполнено
Венчик	Клетки эпидермиса	Неопределенной формы, длина 130–180 мкм, ширина 50–60 мкм. Кутикула не отмечена	Неопределенной формы, длина 120–170 мкм, ширина 40–50 мкм. Кутикула не отмечена

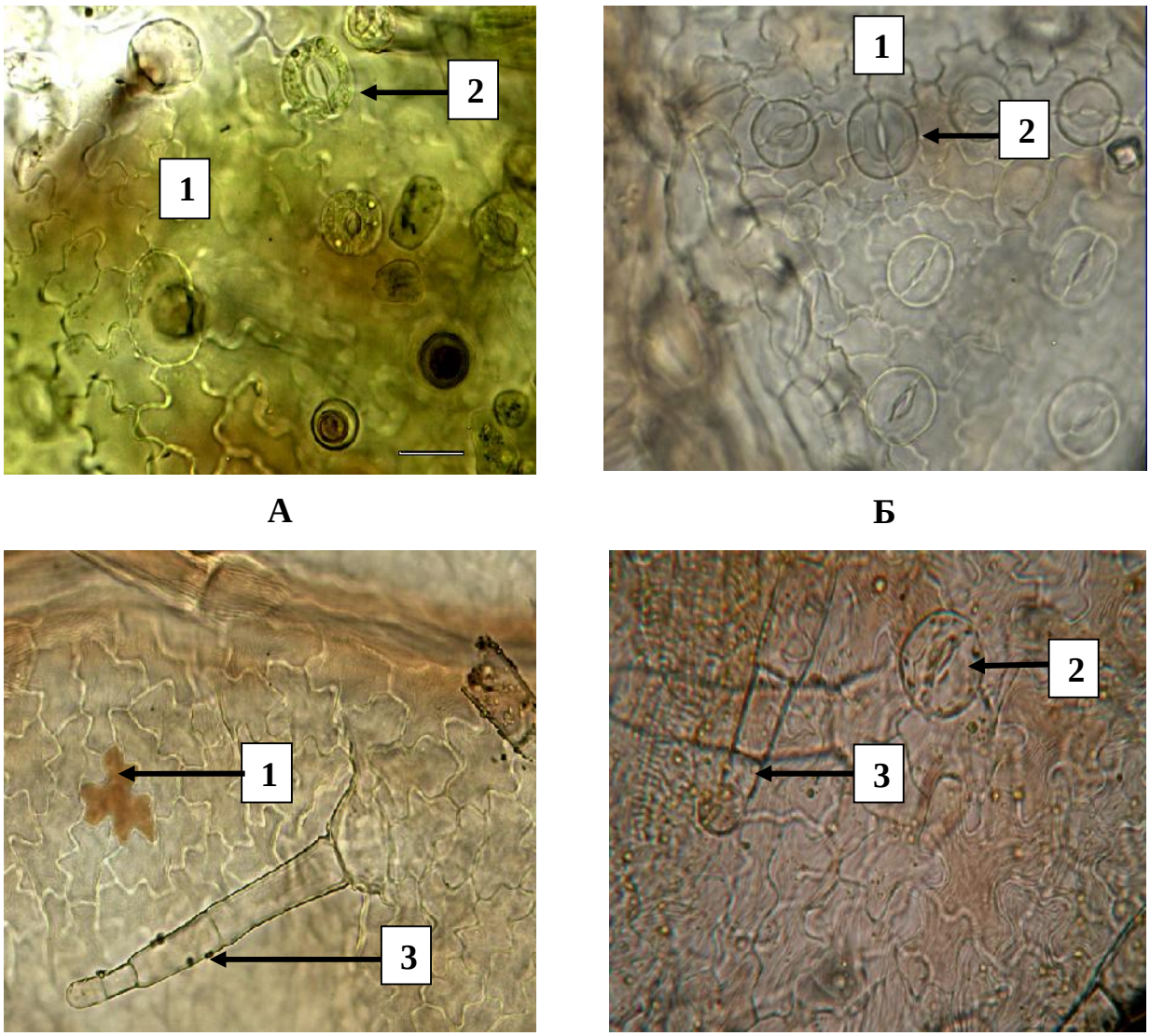


Рисунок 29 – Фрагменты верхнего и нижнего эпидермиса листьев первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

А, В – верхний и нижний эпидермис листа первоцвета весеннего (увел. х×400).

Б, Г – верхний и нижний эпидермис листа первоцвета крупночашечного (увел. × 400).

1 – клетки эпидермиса, 2 – устьице, 3 – головчатый волосок.

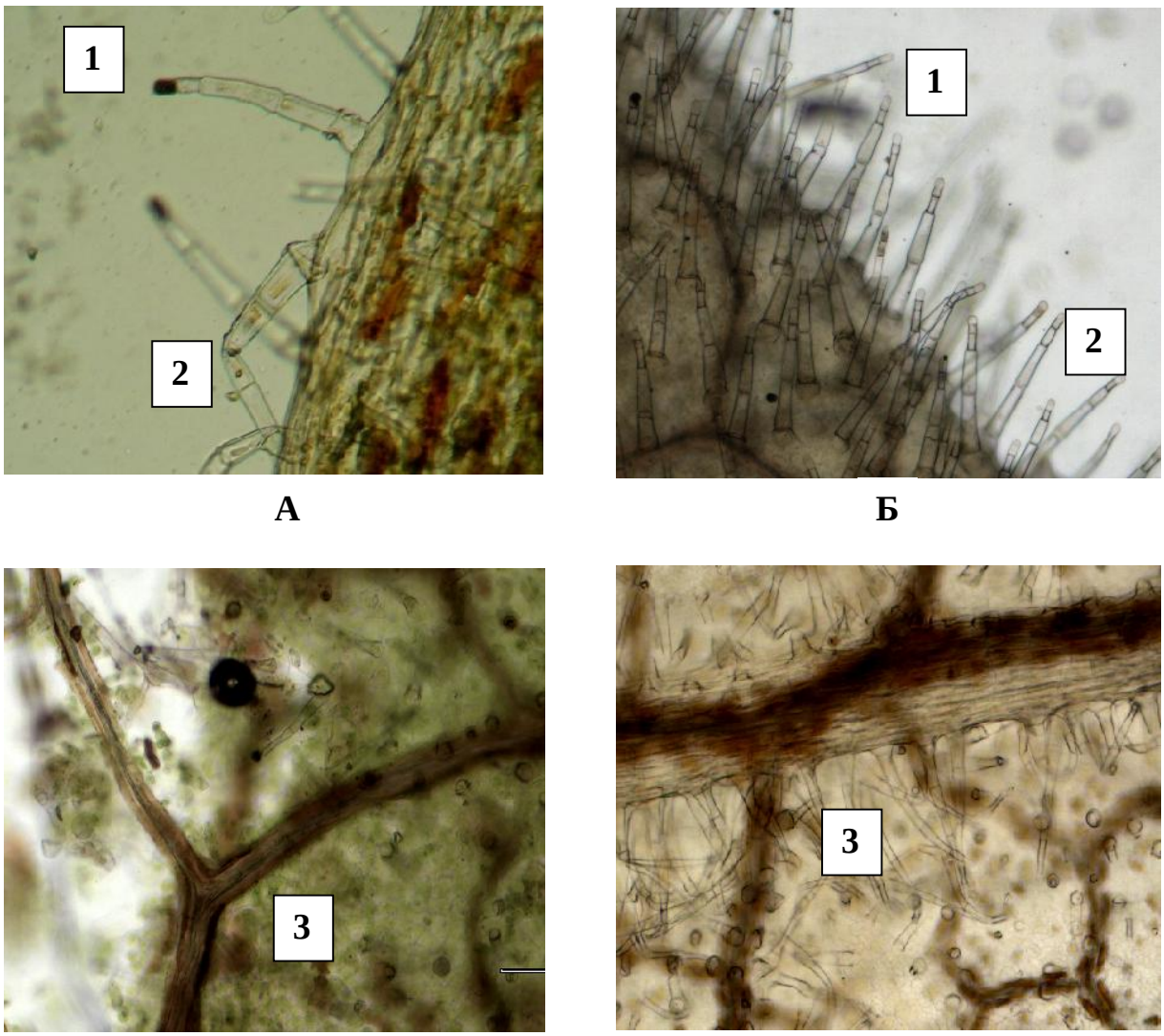


Рисунок 30 – Фрагменты листьев первоцвета весеннего
и первоцвета крупночашечного
А, В – край листа и жилка первоцвета весеннего (увел. × 100).
Б, Г – край листа и жилка первоцвета крупночашечного (увел. × 100).
1– головчатый волосок, 2 – простой волосок, 3 – жилка.

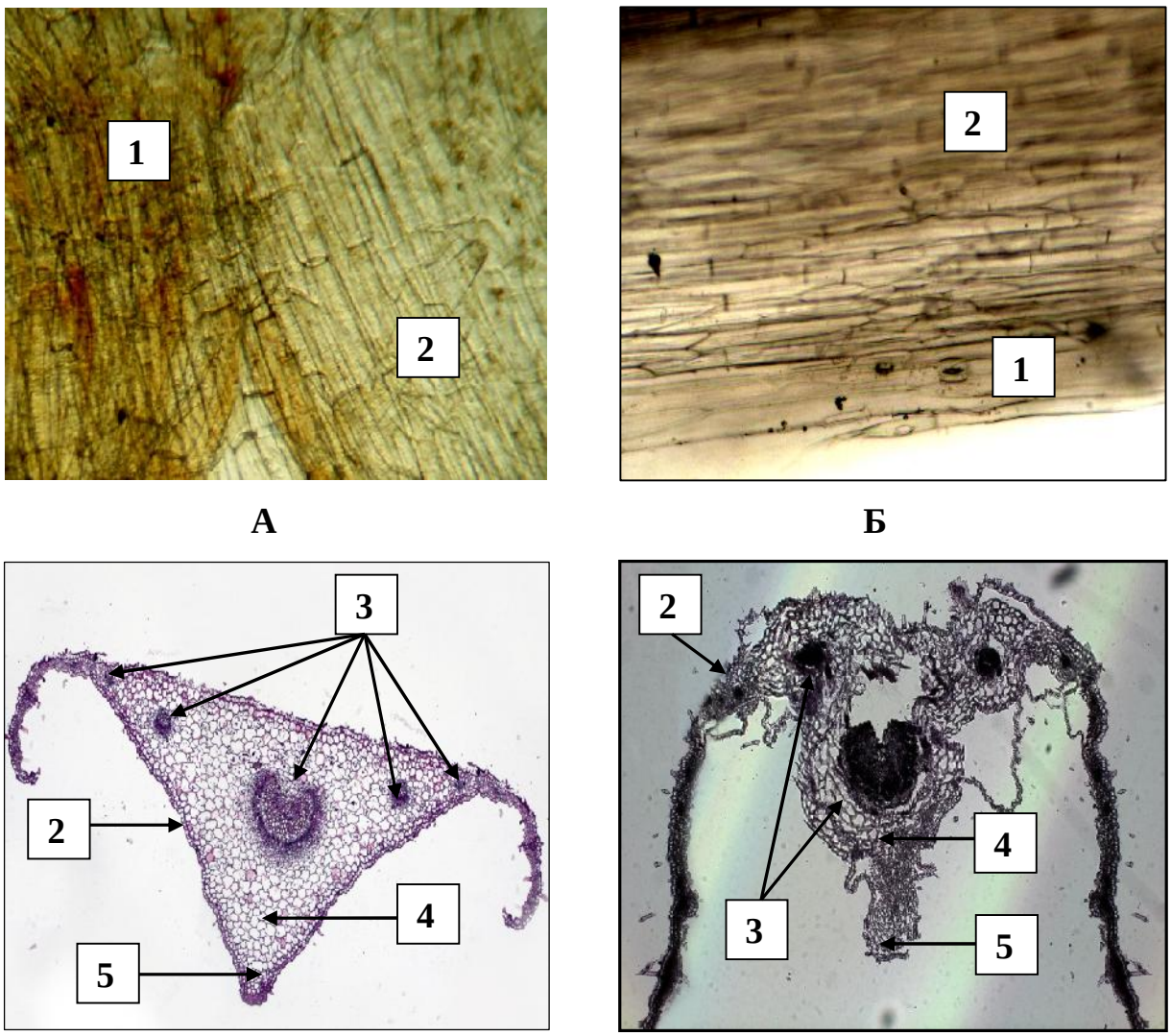


Рисунок 31 – Фрагменты черешков первоцвета весеннего
и первоцвета крупночашечного

А, В – эпидермис и поперечный срез черешка первоцвета весеннего (увел. ×100).

Б, Г – эпидермис и поперечный срез черешка первоцвета крупночашечного (увел. × 100).

1– устьице, 2 – эпидермис, 3 – проводящие пучки, 4 – основная паренхима, 5 – уголковая колленхима.

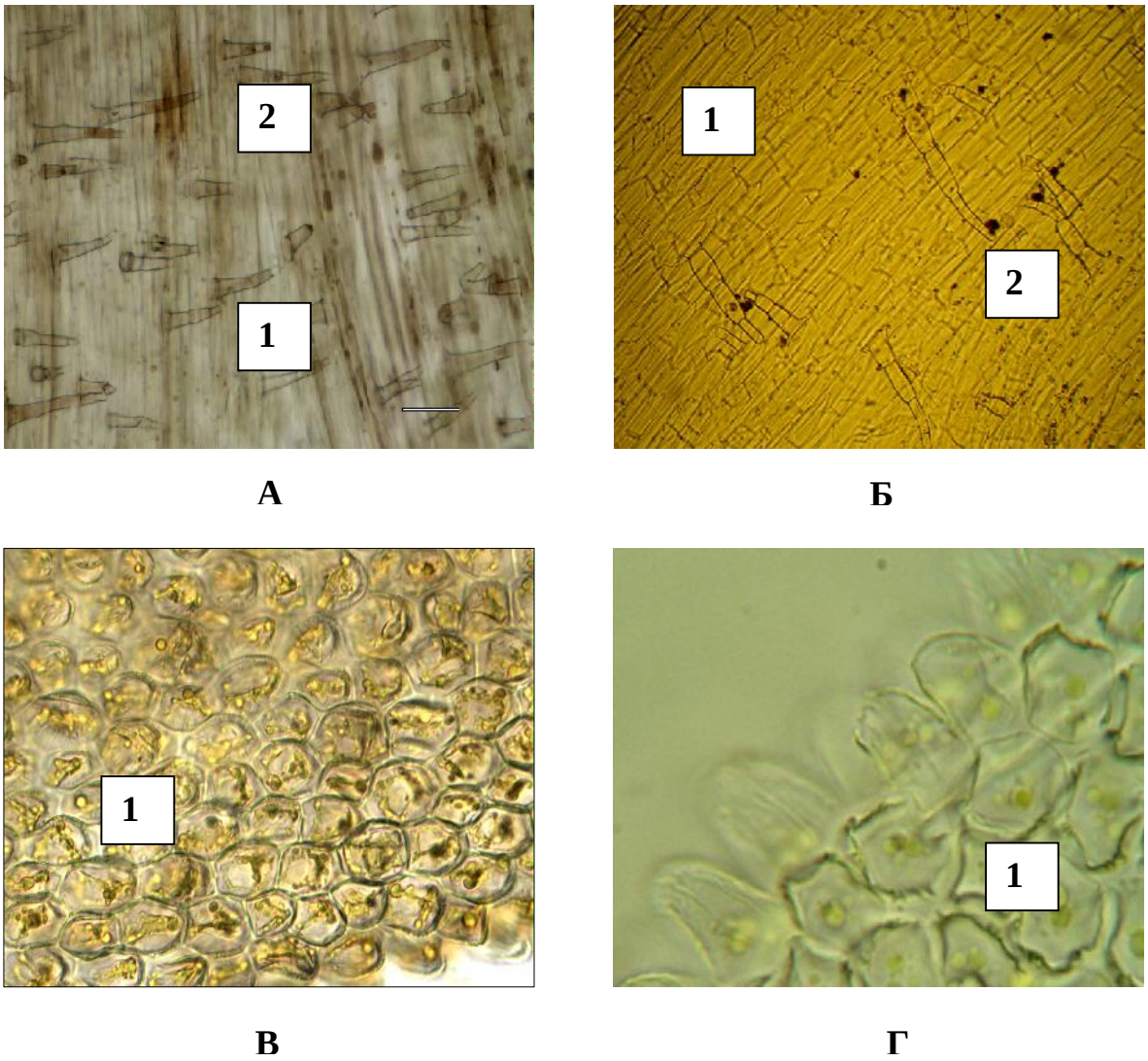
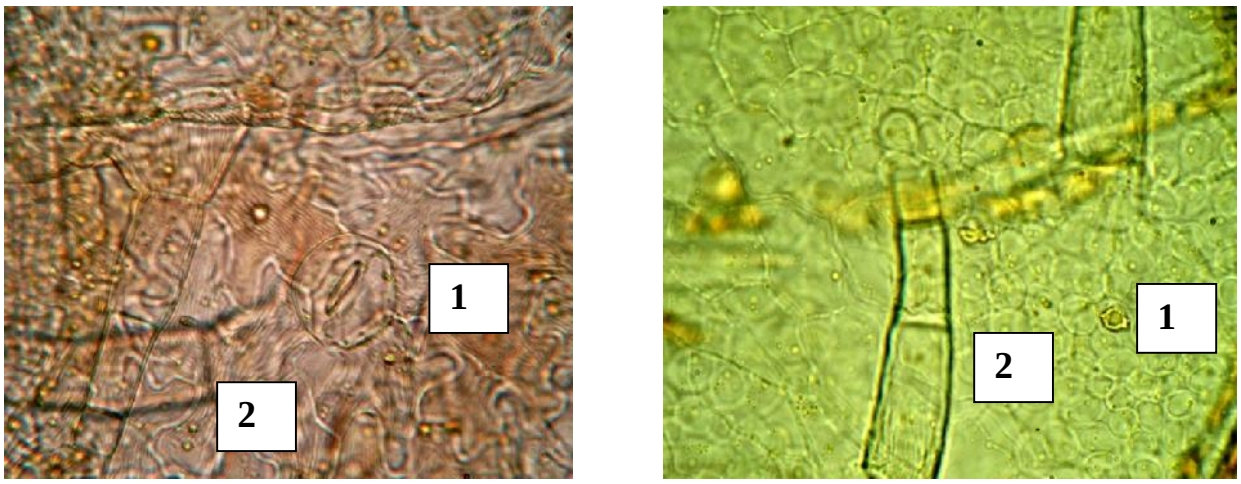


Рисунок 32 – Фрагменты цветоносных стрелок и венчиков первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

А, В – эпидермис цветоноса (увел. × 100) и венчика (увел. × 400) первоцвета весеннего.

Б, Г – эпидермис цветоноса (увел. × 100) и венчика (увел. × 400) первоцвета крупночашечного.

1 – клетки эпидермиса, 2 – волоски.



А **Б**

Рисунок 33 – Фрагменты чашелистиков первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного

А –эпидермис чашелистика первоцвета весеннего (увел. × 400), Б – эпидермис чашелистика первоцвета крупночашечного (увел. × 400).

1 – устьице, 2 – волосок.

В ходе проведенных анатомических исследований установлено сходство значимых диагностических признаков. Имеется следующее отличие исследуемых видов первоцвета, заключающееся в строении железистых волосков: у первоцвета весеннего железистые волоски с шаровидными одноклеточными головками, головки волосков чаще заполнены серовато-бурой массой. У первоцвета крупночашечного головки железистых волосков не заполнены.

Описания и микрофотографии диагностических признаков цельных, измельченных и порошка листьев первоцвета весеннего включены в раздел «Микроскопия» проекта ФС «Первоцвет листья».

4.2 Ресурсные исследования первоцвета крупночашечного в Республике Башкортостан

Проведенные нами исследования показали идентичность химического состава близкородственных видов первоцвета. Учитывая широкую распространенность первоцвета крупночашечного на территории Республики Башкортостан, были проведены ресурсные исследования.

Согласно литературным данным [95, 96, 97] первоцвет крупночашечного имеет широкий ареал распространения в РБ (рисунок 34).

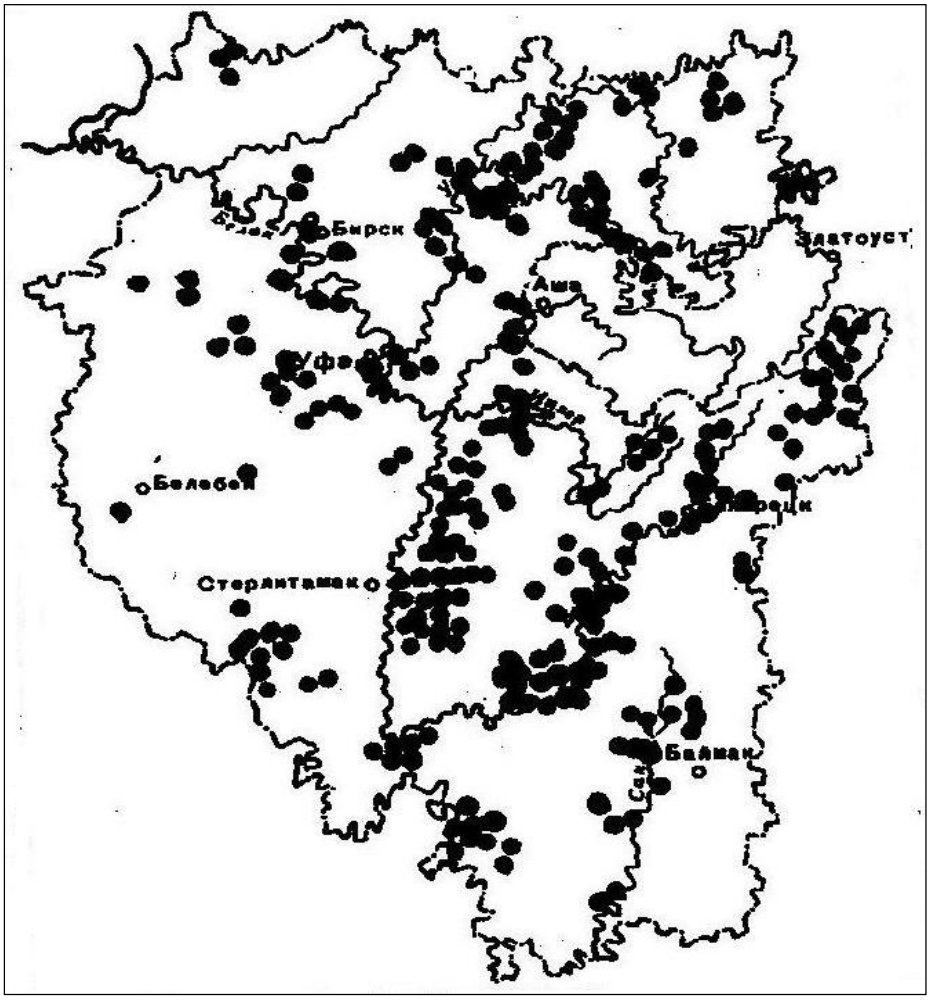


Рисунок 34 – Ареал распространения первоцвета крупночашечного в Башкирии (по Кучерову Е.В., 1990 г.)

Первоцвет часто отмечается в районе западных, восточных предгорий и в центральной части Южного Урала (Гафурийский, Ишимбайский, Караидельский, Бурзянский, Белорецкий, Учалинский, Абзелиловский районы). В северо-западных районах и в некоторых районах Зауралья он встречается реже. Первоцвет чаще всего растет в сообществах по опушкам лесов, на довольно богатых по экологическим шкалам почвах.

Площади произрастания первоцвета крупночашечного в отдельных районах РБ составляют 11,0–158,5 га. Биологические запасы корневищ с корнями первоцвета крупночашечного в отдельных районах РБ составляют около 18,974 т. Рекомендуемые ежегодные заготовки – 7,582 т [96]. Для травы первоцвета крупночашечного эксплуатационные, биологические запасы и рекомендуемые объемы ежегодных заготовок на территории РБ ранее не определялись.

При количественном анализе ресурсных запасов травы первоцвета крупночашечного использовались данные литературы, материалы научных картографических и экспедиционных исследований, предоставленные ИБ УНЦ РАН (г. Уфа).

Нами проведены собственные исследования в Уфимском, Иглинском, Мелеузовском, Ишимбайском, Абзелиловском, Аургазинском, Белорецком, Бурзянском, Гафурийском, Дуванском, Учалинском районах. Исследования проводили в весенне-летний периоды, в фазу начала цветения первоцвета крупночашечного в течение 2005–2010 гг. Ресурсные исследования проводились на конкретных зарослях, в связи с чем ресурсная характеристика указывалась только для исследуемых зарослей без дальнейшей экстраполяции на РБ (приложение 39).

В ходе проведенных исследований установлено, что первоцвет крупночашечный имеет промысловые заросли в сосновых и широколиственных лесах, особенно в дубняках и березняках, на опушках лесов и полянах, на злаково-разнотравных и остепененных лугах. Определены ключевые промышленные заросли в северо-восточных, центральных и юго-восточных районах РБ.

Объем возможных ежегодных заготовок составляет от 0,039 т до 0, 263 т в пересчете на воздушно-сухую массу сырья.

4.3 Морфолого-анатомическое изучение листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида

Морфологическое исследование листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида

Для определения общих морфолого-анатомических признаков листьев хмеля обыкновенного дикорастущего и культивируемого сырья нами было проведено изучение перечисленных признаков сырья различных образцов «Ранний», «Крылатский», «Подвязный», предоставленных ООО «АгроРесурсы», г. Чебоксары (п.г.т. Урмары), а также дикорастущего вида, собранного в РБ. На основании проведенных исследований были выявлены общие морфологические и микроскопические признаки.

Нами были изучены морфологические признаки цельного, измельченного и порошкованного сырья листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида, выявлены общие диагностические признаки, которые можно использовать для установления подлинности и стандартизации листьев хмеля. Полученные результаты макроскопического изучения листьев хмеля включены в раздел «Внешние признаки» проекта ФС «Хмеля обыкновенного листья». Результаты исследований приведены в сводной таблице 34.

Таблица 34 – Сравнительная характеристика морфологических признаков листьев хмеля обыкновенного культивируемых видов и дикорастущих сортов

Название признаков		Исследуемые образцы сырья			
		Сорт «Ранний»	Сорт «Крылатский»	Сорт «Подвязный»	Дикорастущее сырье (собранное в Уфимском р-не)
1		2	3	4	5
Стебель	Форма	Округлая с крючкообразные шипами	Округлая с крючкообразные шипами	Округлая с крючкообразные шипами	Округлая с крючкообразные шипами
	Окраска	От светло-зеленой до темно-зеленой	От зеленой до темно-зеленой	От зеленой до фиолетовой с промежуточны-ми оттенками	От светло-зеленой до темно-зеленой
	Расположение листьев	Супротивное	Супротивное	Супротивное	Супротивное
	Характерные признаки	Наличие узлов в местах прикрепления листьев. Сердцевина у основания стебля заполненная, выше – полая.	Наличие узлов в местах прикрепления листьев. Сердцевина у основания стебля заполненная, выше – полая.	Наличие узлов в местах прикрепления листьев. Сердцевина у основания стебля заполненная, выше – полая.	Наличие узлов в местах прикрепления листьев. Сердцевина у основания стебля заполненная, выше – полая.
Ли	Размеры	Длина с черешком до	Длина с черешком до 20	Длина с черешком до 20	Длина с черешком до 20

		20 см; ширина до17 см.	см; ширина до 16 см.	см; ширина до 14 см.	см; ширина до 10 см.
	Форма	Пальчатораздельная или сердцевидная. Встречаются листья трех-, пяти-, реже семидольной и цельной формы.	Пальчатораздельная или сердцевидная. Встречаются листья трех-, пяти-, реже семидольной и цельной формы.	Преимущественно сердцевидная, реже пальчатораздельная. Встречаются листья преимущественно цельной, реже трех-, пятидольной формы.	Пальчатораздельная или сердцевидная. Встречаются листья трех-, четырех-, пяти-, семидольной формы и реже цельные.
	Окраска	От светло-зеленой до темно-зеленой	От зеленой до темно-зеленой	От зеленой до фиолетовой с промежуточными оттенками	От светло-зеленой до темно-зеленой
	Край листа	Неравно-пильчато-зазубренный	Неравно-пильчато-зазубренный	Неравно-пильчато-зазубренный	Неравно-пильчато-зазубренный
	Жилкование	Сетчатое	Сетчатое	Сетчатое	Сетчатое
	Характерные признаки	На нижней стороне видны выступающие жилки, в форме ребер, на которых имеются шипы. Вся поверхность листовой пла-	На нижней стороне видны выступающие жилки, в форме ребер, на которых имеются шипы. Вся поверхность листовой	На нижней стороне видны выступающие жилки, в форме ребер, на которых имеются шипы. Вся поверхность листовой пла-	На нижней стороне видны выступающие жилки, в форме ребер, на которых имеются шипы. Вся поверхность листовой пла-

		стинки, особенно верхняя ее сторона, покрыта жесткими волосками.	пластинки, особенно верхняя ее сторона, покрыта жесткими волосками.	стинки, особенно верхняя ее сторона, покрыта жесткими волосками.	стинки, особенно верхняя ее сторона, покрыта жесткими волосками.
Черешок	Форма	Округлая	Округлая	Округлая	Округлая
	Окраска	От светло-зеленой до темно-зеленой	От зеленой до темно-зеленой	От зеленой до фиолетовой	От светло-зеленой до темно-зеленой
	Характерные признаки	Заполненный внутри с четко выраженным желобком (выемкой) с лицевой стороны листа, на поверхности имеются крючкообразные шипы. У основания черешка имеются небольшие прилистники.	Заполненный внутри с четко выраженным желобком (выемкой) с лицевой стороны листа, на поверхности имеются крючкообразные шипы. У основания черешка имеются небольшие прилистники.	Заполненный внутри с четко выраженным желобком (выемкой) с лицевой стороны листа, на поверхности имеются крючкообразные шипы. У основания черешка имеются небольшие прилистники.	Заполненный внутри с четко выраженным желобком (выемкой) с лицевой стороны листа, на поверхности имеются крючкообразные шипы. У основания черешка имеются небольшие прилистники.

Микроскопическое исследование листьев хмеля обыкновенного

Нами были изучены микроскопические признаки цельного, измельченного и порошкованного сырья листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида, включенные в общий проект ФС «Хмеля обыкновенного листья». Результаты исследований приведены в сводной таблице 35 и на рисунках 35–42.

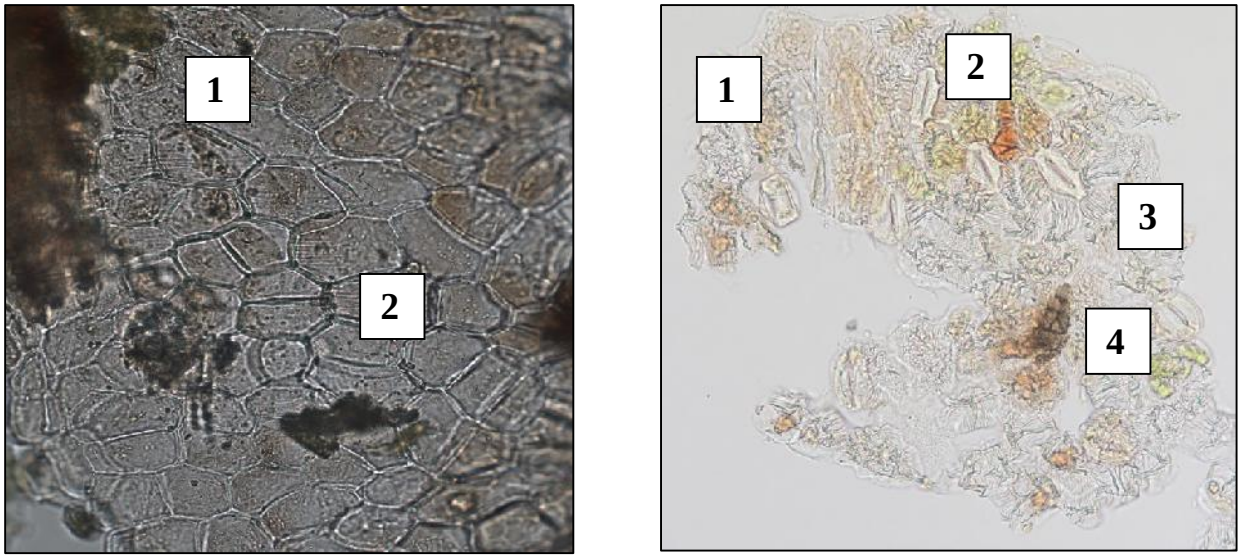


Рисунок 35 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного сорт «Ранний» (цельное сырье) (увел. × 400)
1 – клетки верхнего эпидермиса, 2 – устьица, 3 – кутикула, 4 – железка.

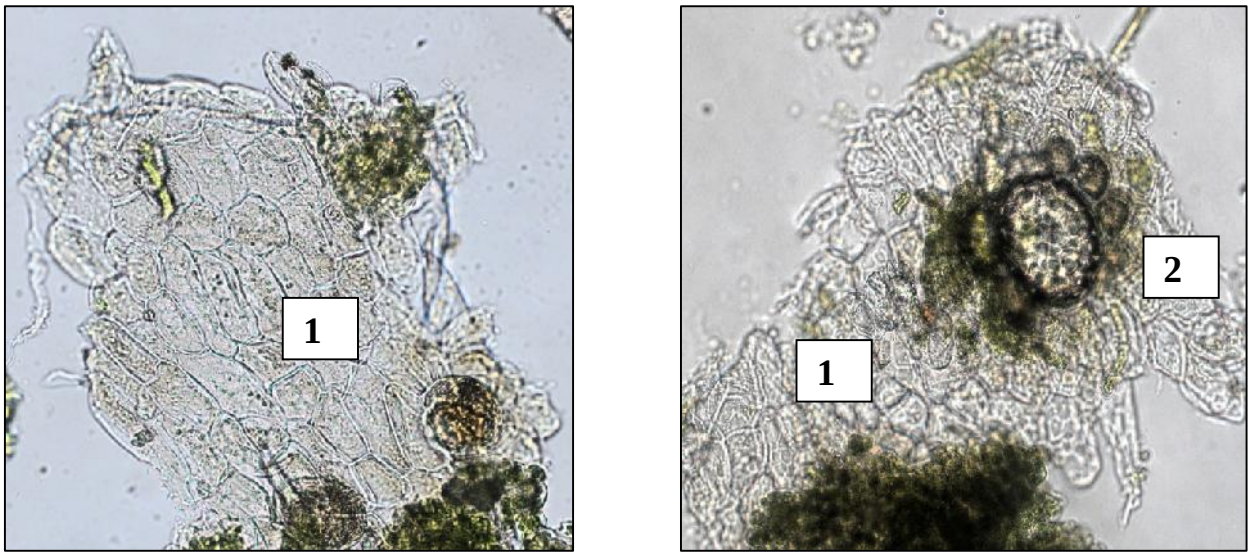


Рисунок 36 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного сорт «Ранний» (цельное сырье) (увел. × 400)
1 – клетки нижнего эпидермиса, 2 – желёзка.

Результаты исследований анатомического строения листьев хмеля обыкновенного сорта «Ранний» представлены в таблице 34 и на рисунках 35, 36.

Результаты исследований анатомического строения листьев хмеля обыкновенного сорта «Крылатский» представлены в таблице 35 и на рисунках 37, 38.

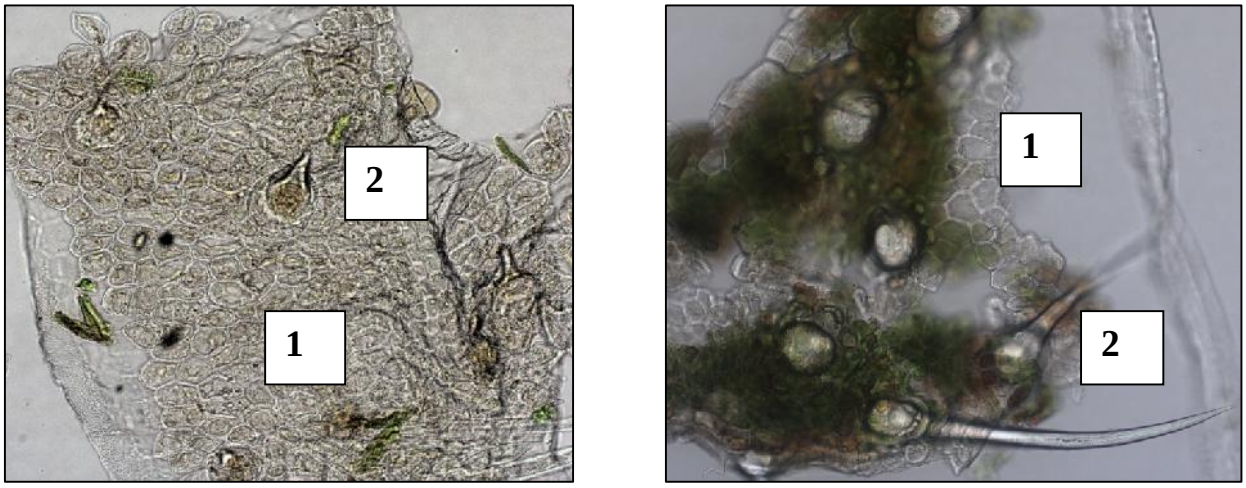


Рисунок 37 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного сорт «Крылатский» (цельное сырье) (увел. × 400)

1 – клетки верхнего эпидермиса, 2 – волоски.

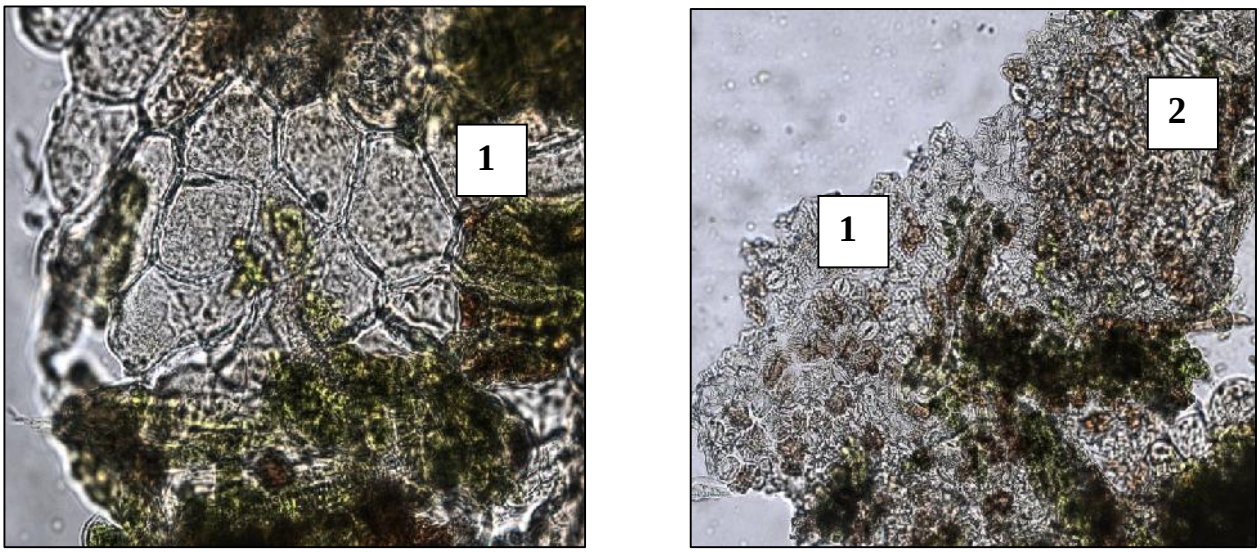


Рисунок 38 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного сорт «Крылатский» (цельное сырье) (увел. × 400, увел. × 100)

1 – клетки нижнего эпидермиса, 2 – устьица.

Результаты исследований анатомического строения листьев хмеля обыкновенного сорта «Подвязный» представлены в таблице 35 и на рисунках 39, 40.

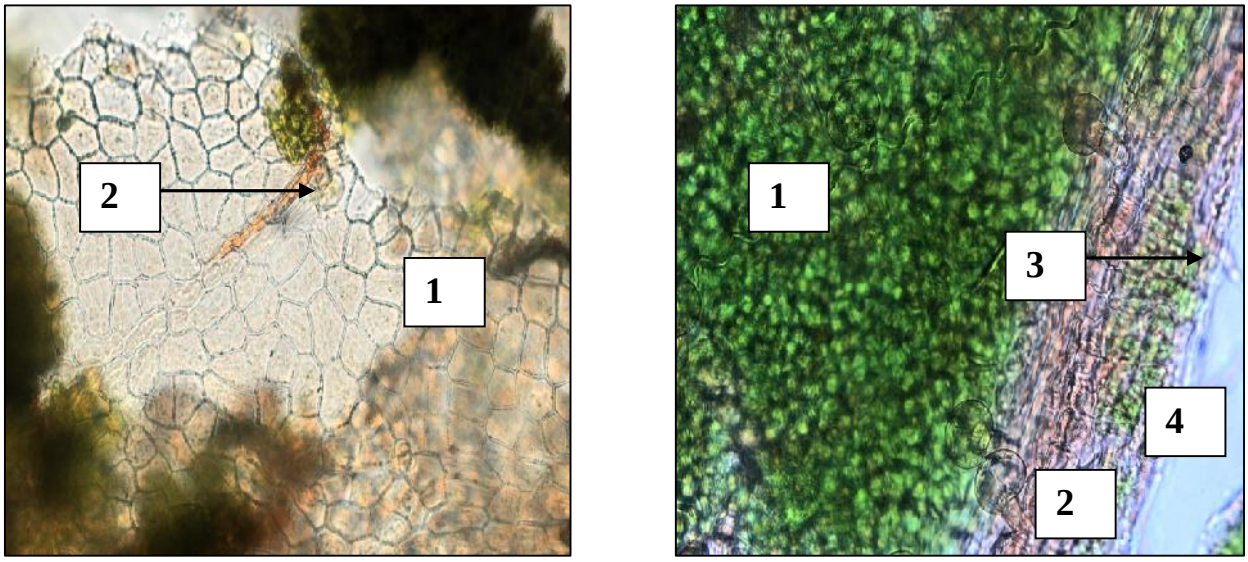


Рисунок 39 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного сорт «Подвязный» (цельное сырье) (увел. × 400)

1 – клетки верхнего эпидермиса, 2 – волоски головчатые, 3 – волоски простые, 4 – жилка.

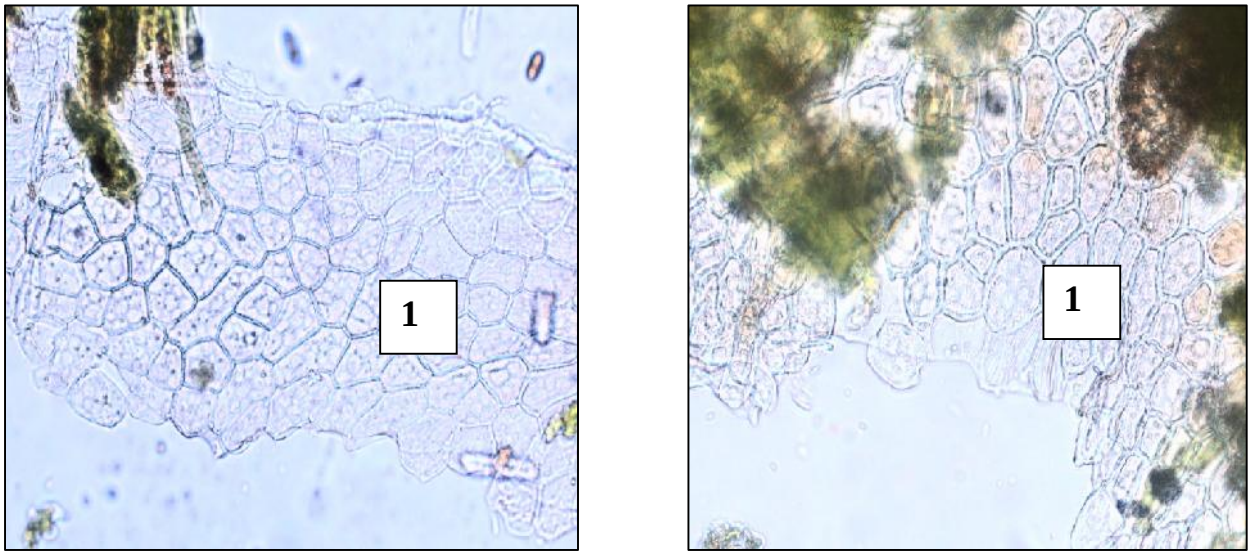


Рисунок 40 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного сорт «Подвязный» (цельное сырье) (увел. × 400)

1 – клетки нижнего эпидермиса.

Результаты исследований анатомического строения листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида представлены в таблице 35 и на рисунках 41, 42.

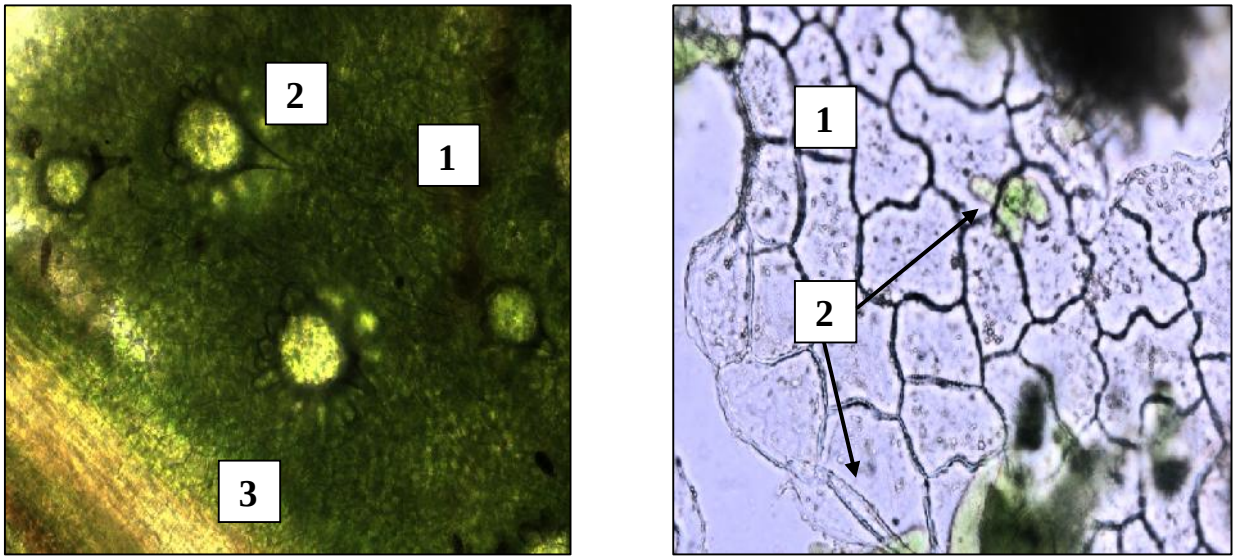


Рисунок 41 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного дикорастущего вида (цельное сырье) (увел. × 100, увел. × 400)

1 – клетки верхнего эпидермиса, 2 – волоски, 3 – жилка.

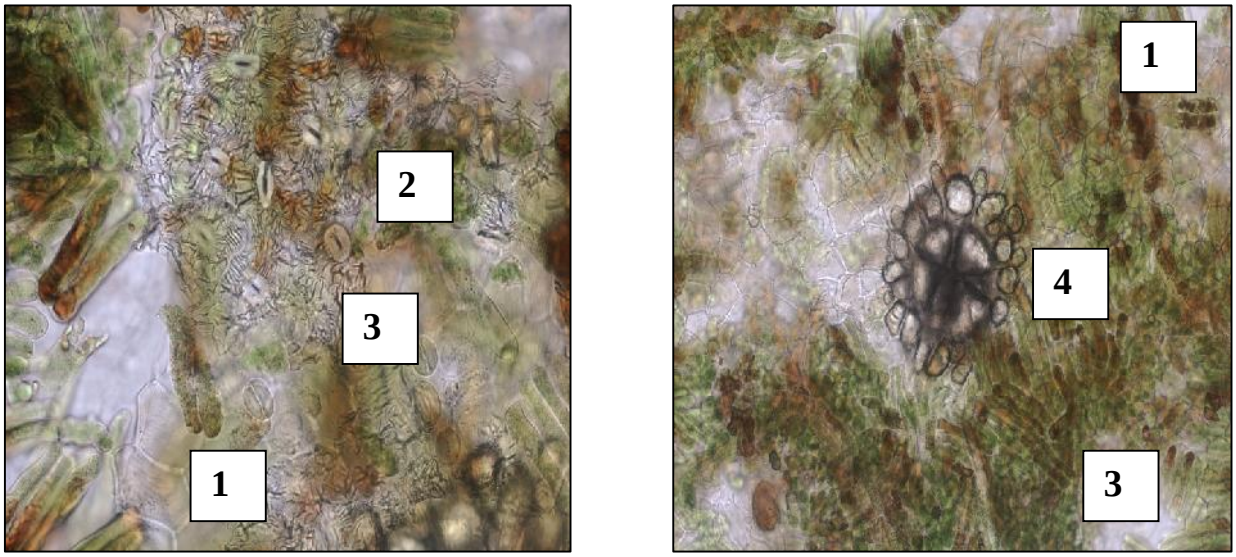


Рисунок 42 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного дикорастущего вида (цельное сырье) (увел. × 400)

1 – клетки нижнего эпидермиса, 2 – устьица, 3 – кутикула, 4 – желёзка.

Таблица 35 – Сравнительная характеристика морфолого-анатомических признаков листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов и дикорастущего вида

Название признаков		Исследуемые образцы сырья			
		сорт «Ранний»	сорт «Крылатский»	сорт «Подвязный»	дикорастущее сырье (собранное в Уфимском р-не)
Листовая пластинка	Клетки верхнего эпидермиса	многоугольные, вытянутые со слабоизвилистыми стенками; длина – 54-60 мкм; ширина – 33-52 мкм	многоугольные, изодиаметрические со слабоизвилистыми стенками; длина – 48-55 мкм; ширина – 28-50 мкм	многоугольные, изодиаметрические со слабоизвилистыми стенками; длина – 37-56 мкм; ширина – 27-39 мкм	многоугольные, изодиаметрические со слабоизвилистыми стенками; длина – 43-56 мкм; ширина – 23-43 мкм
	Клетки нижнего эпидермиса	многоугольные с более извилистыми стенками; длина – 51-90 мкм; ширина – 31-52мкм	многоугольные с более извилистыми стенками; длина – 49-83 мкм; ширина – 24-27 мкм	многоугольные с более извилистыми стенками; длина – 42-86 мкм; ширина – 22-47 мкм	многоугольные с более извилистыми стенками; длина – 45-76 мкм; ширина – 30-47 мкм
	Кутикула	продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая	продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая	продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая	продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая

	Устьица	аномоцитного типа, овальной или округлой формы	аномоцитного типа, овальной или округлой формы	аномоцитного типа, овальной или округлой формы	аномоцитного типа, овальной или округлой формы
	Волоски	простые одноклеточные, головчатые, шиповидные	простые одноклеточные, головчатые	простые одноклеточные, головчатые, многоклеточные	простые одноклеточные, головчатые
	Желёзки	тип яснотковые	тип яснотковые, булавовидные	тип яснотковые	тип яснотковые, булавовидные
Черешок	Клетки эпидермиса	прозенхимной формы; длина – 90-100 мкм; ширина – 15-20 мкм	прозенхимной формы; длина – 85-95 мкм; ширина – 13-17 мкм	прозенхимной формы; длина – 79-95 мкм; ширина – 13-20 мкм	прозенхимной формы; длина – 95-100 мкм; ширина – 15-20 мкм
	Волоски	простые одноклеточные, Т-образные	простые одноклеточные, Т-образные	простые одноклеточные, Т-образные	простые одноклеточные, Т-образные
	Желёзки	булавовидные	булавовидные	булавовидные	булавовидные
	Проводящая система	пять сосудисто-волокнистых пучков	пять сосудисто-волокнистых пучков	пять сосудисто-волокнистых пучков	пять сосудисто-волокнистых пучков

На основании проведенных микроскопических исследований четырех образцов сырья листьев хмеля обыкновенного выявлены общие диагностические признаки, которые можно использовать для установления подлинности и стандартизации листьев хмеля: многоугольные клетки изодиаметрической формы; волоски простые одноклеточные, головчатые и Т-образные; многочисленные железки тип «яснотковые», реже булавовидные желёзки.

Показатели подлинности сырья «хмеля обыкновенного листья». Морфологические признаки лекарственного растительного сырья «хмеля обыкновенного листья»

Цельное сырье. Смесь отдельных и измельченных листьев с черешками и кусочками стеблей.

Стебель округлой формы, с крючкообразными шипами. Окраска стебля, боковых ветвей и черешков листа хмеля светло-зеленого, зеленого, темно-зеленого, фиолетового цвета с промежуточными оттенками. В местах прикрепления листьев имеются узлы. На узлах стеблей и боковых побегах супротивно расположены простые черешковые листья с небольшими прилистниками у основания. Стебли у основания имеют заполненную сердцевину, выше – полые.

Листья с черешком до 20 см длины, 14–17 см ширины, пальчатораздельной или сердцевидной формы, неравно-пильчато-зазубренные по краю, жилкование листьев сетчатое. Встречаются листья трех-, четырех-, пяти-, семидольной и цельной формы. Окраска листовых пластинок светло-зеленого, зеленого, темно-зеленого, фиолетового с промежуточными оттенками. На нижней стороне листьев видны выступающие жилки, в форме ребер, на которых имеются шипы. Вся поверхность листовой пластинки, особенно верхняя ее сторона, покрыта жесткими волосками.

Черешок округлой формы, заполненный внутри с четко выраженным желобком (выемкой) с лицевой стороны листа, на поверхности имеются крючкообразные шипы. Окраска черешка светло-зеленого, зеленого, темно-

зеленого, фиолетового с промежуточными оттенками. У основания черешка имеются небольшие прилистники.

При рассмотрении под лупой (10х) и стереомикроскопом (16×) видна смесь отдельных и измельченных листьев, черешков. Листья с черешком до 20 см длины, 14–17 см ширины, пальчатораздельной или сердцевидной формы, неравно-пильчато-зазубренные по краю, жилкование листьев сетчатое. Встречаются листья трех-, четырех-, пяти-, семидольной и цельной формы. На нижней стороне листьев видны выступающие жилки, в форме ребер, на которых имеются шипы. Вся поверхность листовой пластинки, особенно верхняя ее сторона, покрыта жесткими волосками.

Запах специфический хмелевой. Вкус водного извлечения может быть кислым, слегка горьковатым; горьким, вяжущим.

Измельченное сырье. Смесь кусочков стеблей, листьев и черешков хмеля обыкновенного, проходящих сквозь сито с отверстиями размером **7** мм**.** Цвет кусочков стеблей, листьев и черешков светло-зеленого, зеленого, темно-зеленого, фиолетового с промежуточными оттенками.

При рассмотрении под лупой (10х) и стереомикроскопом (8×, 16×) видны кусочки стеблей, листьев и черешков светло-зеленого, зеленого, темно-зеленого, фиолетового с промежуточными оттенками. Кусочки листовой пластинки, особенно с верхней стороны, покрыты жесткими волосками; с нижней стороны видны выступающие жилки. Запах специфический хмелевой. Вкус водного извлечения может быть кислым, слегка горьковатым; горьким, вяжущим.

Порошок. Смесь кусочков стеблей, листьев, черешков, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет может быть светло-зеленым, зеленым, темно-зеленым, фиолетовым с промежуточными оттенками.

При рассмотрении порошка под лупой (10х) и стереомикроскопом (8х, 16х) видны кусочки стеблей, листьев и черешков светло-зеленого, зеленого, темно-зеленого, фиолетового цвета, покрытые жесткими волосками. Запах специфический хмелевой. Вкус водного извлечения может быть кислым, слегка горьковатым; горьким, вяжущим.

Микроскопические признаки лекарственного растительного сырья «хмеля обыкновенного листья»

Результаты анатомических исследований представлены в таблице 35 и на рисунках 43–48.

Цельное сырье. При рассмотрении препаратов листа хмеля с поверхности видно, что на верхней и нижней сторонах листа имеется однослойный эпидермис. Клетки верхнего эпидермиса многоугольные изодиаметрические, реже со слабоизвилистыми стенками, иногда вытянутые, длиной 37–60 мкм, шириной 23–52 мкм. Клетки нижнего эпидермиса многоугольные со слабоизвилистыми стенками, длиной 42–90 мкм, шириной 22–52 мкм. Кутикула с обеих сторон тонкая местами продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая. Стенки клеток четко видно утолщенные.

На обеих сторонах листа расположены устьица аномоцитного типа, длиной 16–26 мкм, шириной 11–19 мкм. Устьица овальной или округлой формы, расположены в одной плоскости с эпидермисом. Замыкающие клетки устьиц имеют чечевидную форму.

В эпидермисе обеих сторон листа отмечены волоски простые одноклеточные, головчатые, шиповидные, реже многоклеточные. Простые одноклеточные волоски, длиной до 382 мкм, расширены у основания и заострены на конце, с тонкими стенками, с гладкой поверхностью, располагаются по всей поверхности листа. У хмеля обыкновенного встречаются железистые волоски с шаровидными 2-клеточными головками различной величины от 29 до 37 мкм в диаметре, расположенные на 2-клеточной ножке длиной до 60 мкм (головчатые). При рассмотрении эпидермиса листа хмеля отмечено наличие желёзок тип «яснотковые» (круглые, с различным количеством клеток), размером от 59 до 76 мкм в диаметре. Также имеются булавовидные желёзки длиной до 50 мкм.

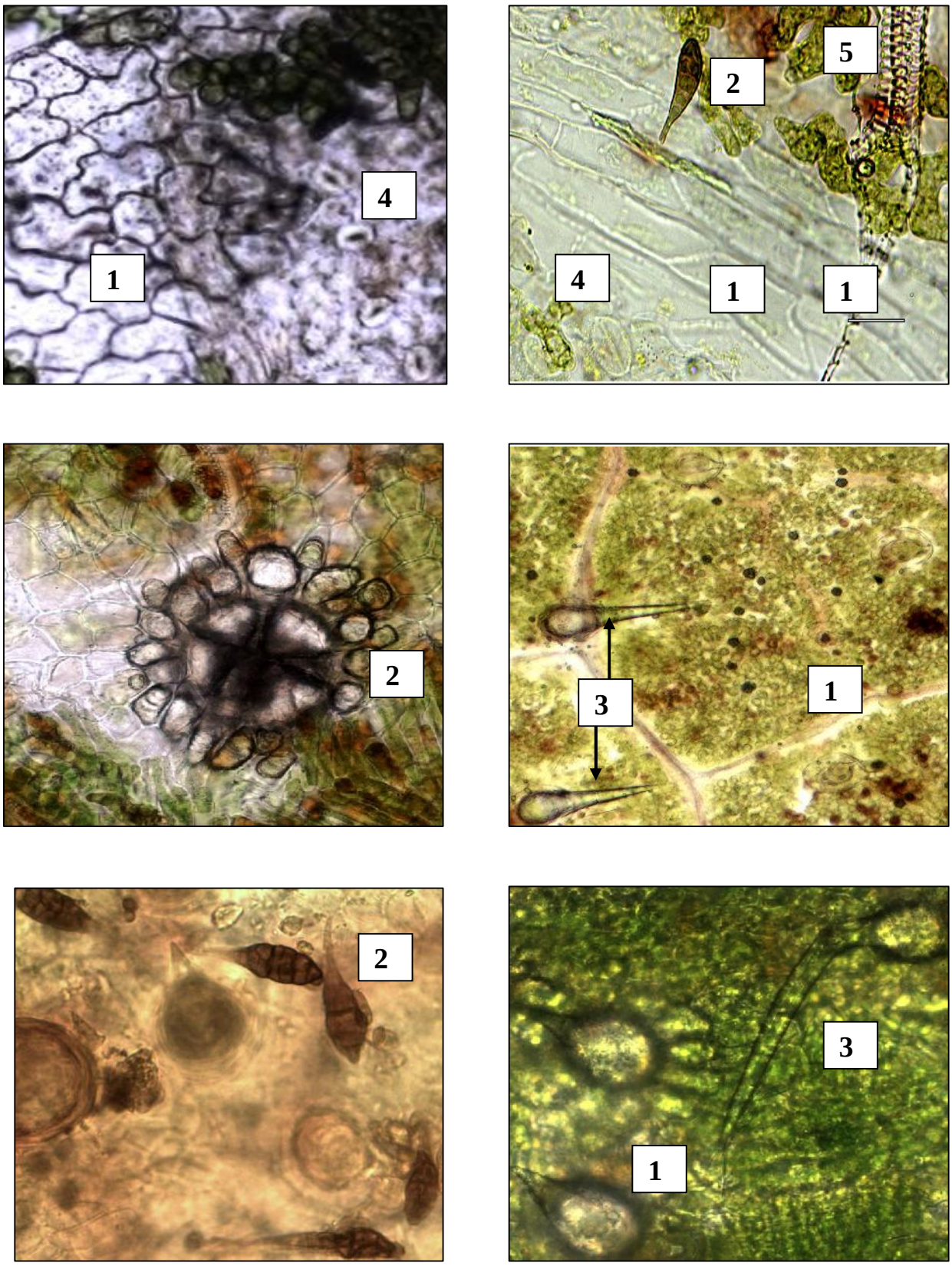


Рисунок 43 – Фрагмент верхнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного (цельное сырье) (увел. × 400)

1 – клетки верхнего эпидермиса, 2 – желёзки, 3- волоски простые, 4 – устьица, 5 –жилка.

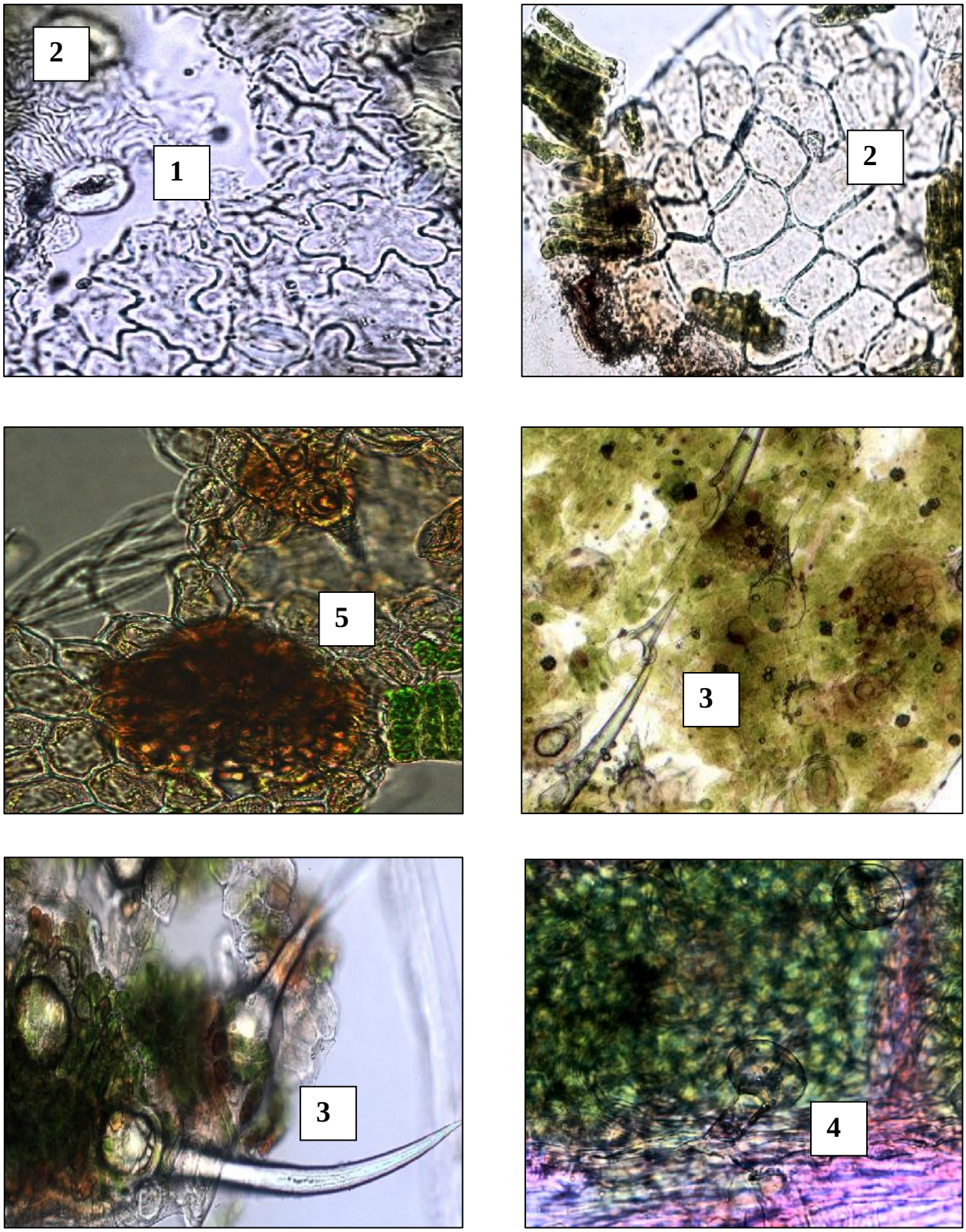


Рисунок 44 – Фрагмент нижнего эпидермиса листа хмеля обыкновенного (цельное сырье) (увел. × 400)

1 – устьице, 2 – кутикула; 3 – волоски простые, 4 – волоски головчатые, 5 –железки.

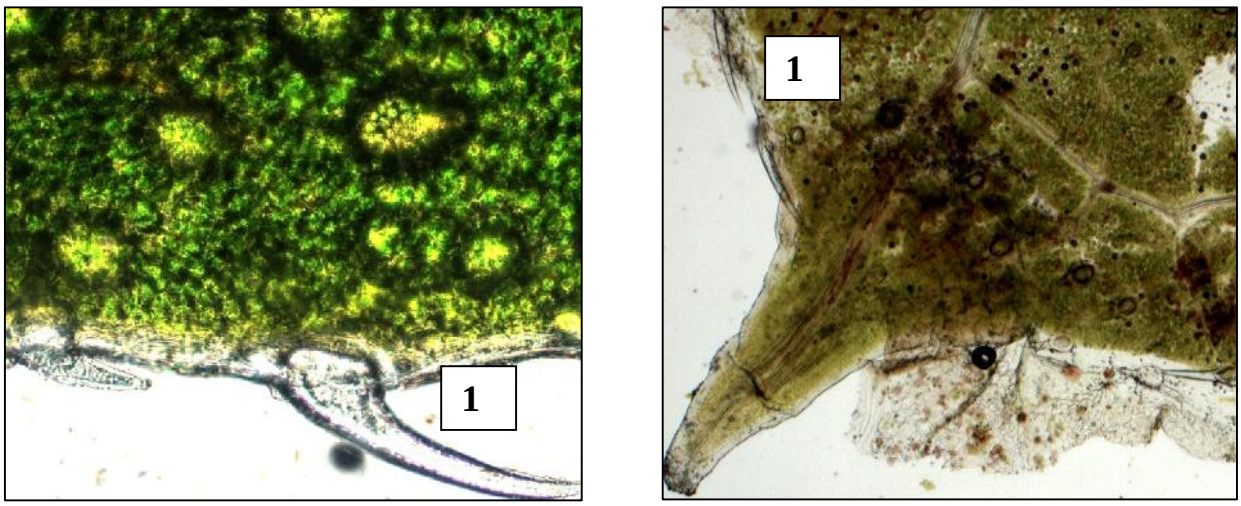


Рисунок 45 – Фрагмент края листа хмеля обыкновенного (цельное сырье) (увел. × 400, увел. × 100)

1 – волоски простые.

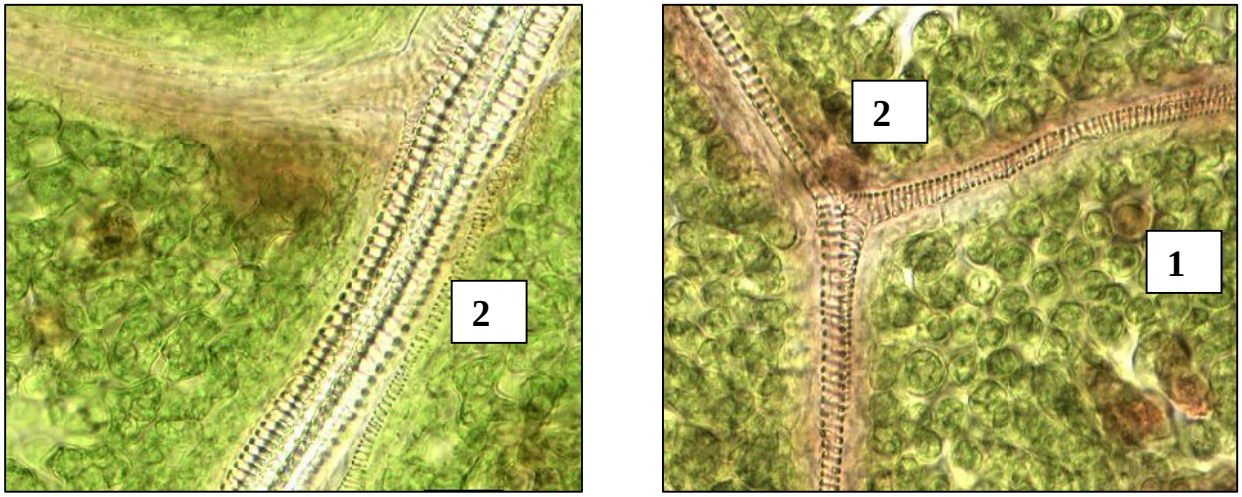


Рисунок 46 – Фрагмент эпидермиса вдоль жилки листа хмеля обыкновенного (цельное сырье) (увел. × 100)

1 – волоски простые, 2 – жилка.

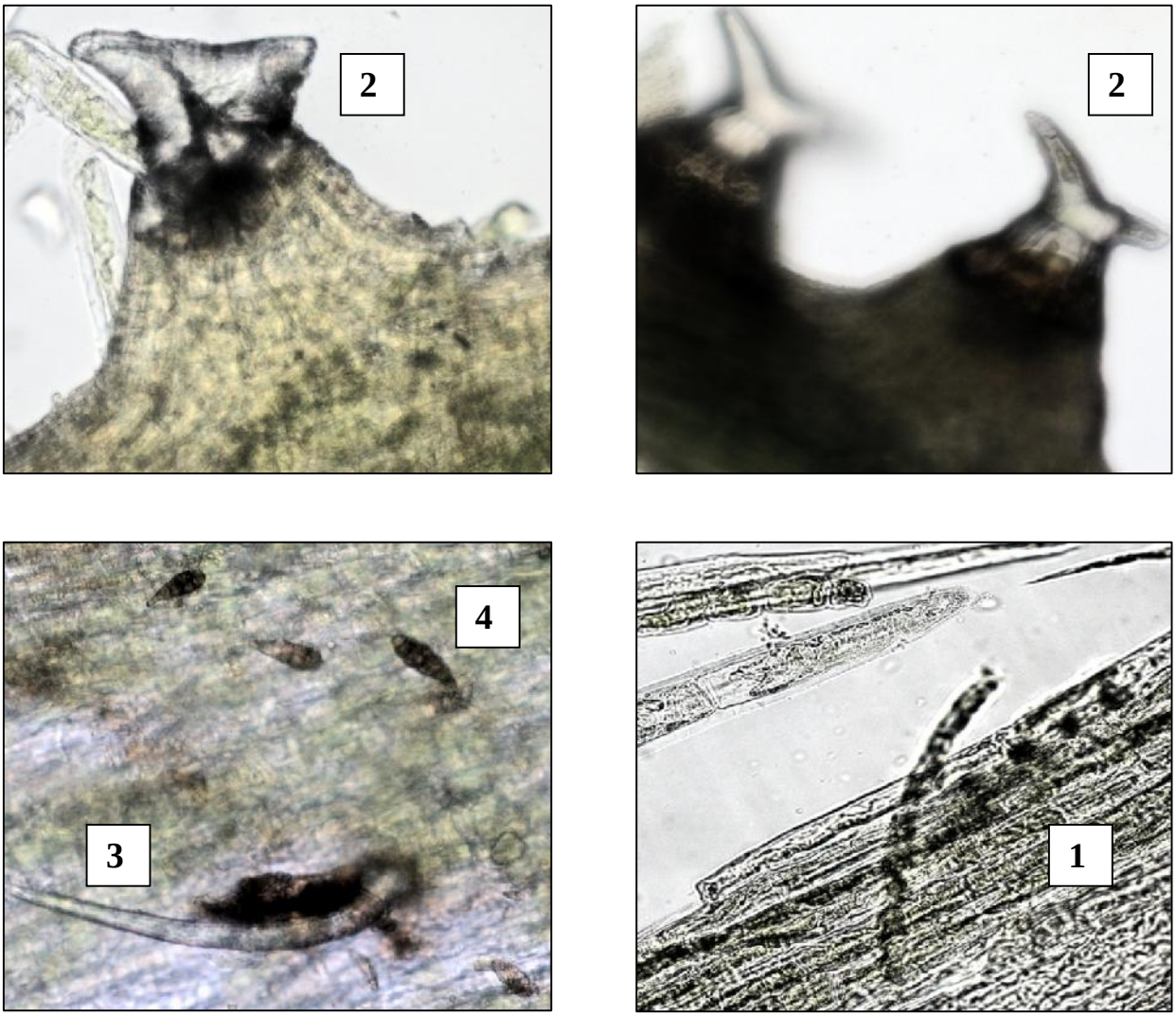


Рисунок 47 – Фрагмент эпидермиса черешка листа хмеля обыкновенного (цельное сырье) (увел. × 100)

1 – клетки эпидермиса, 2 – волоски Т-образные , 3 –волоски простые, 4 – железки.

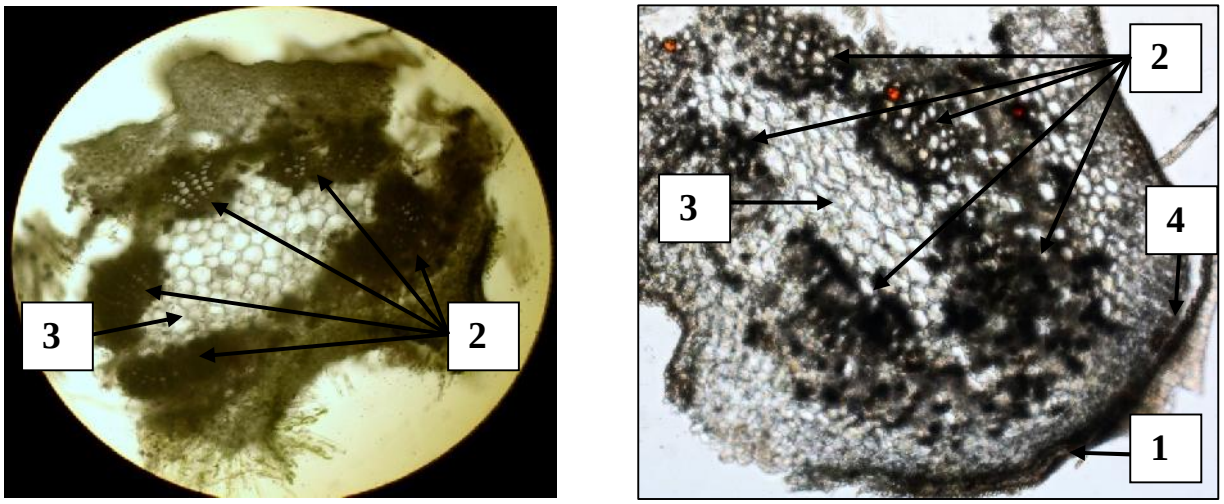


Рисунок 48 – Фрагмент поперечного среза черешка листа хмеля обыкновенного (цельное сырье) (увел. × 100)
1 – эпидермис, 2 – проводящие пучки, 3 – основная паренхима, 4 – уголковая колленхима.

Под верхним эпидермисом находится слой палисадной паренхимы, содержащей хлоропласты, обеспечивающие фотосинтез. Ниже палисадной паренхимы имеется губчатая паренхима из рыхло-соединенных между собой клеток. К ней примыкает эпидермис нижней поверхности листа с множеством устьиц и выростов в виде волосков и щетинок.

При рассмотрении препаратов черешка листа хмеля с поверхности видно, что имеется однослойный эпидермис. Клетки эпидермиса прозенхимной формы. Размеры клеток эпидермиса: длина до 100 мкм, ширина до 20 мкм. В эпидермисе черешка хмеля обыкновенного отмечены простые одноклеточные волоски длиной до 220 мкм, расширенные у основания и заостренные на конце, с тонкими стенками и гладкой поверхностью. Встречаются Т-образные многоклеточные волоски длиной до 175 мкм. Также на поверхности эпидермиса черешка имеются булавовидные железки длиной до 50 мкм.

Форма черешка округлая. Механическая ткань представлена уголковой колленхимой, расположенной в 5–7 слоев, переходящая в паренхиму. Прово-

дящая система представлена пятью сосудисто-волокнистыми пучками (3 маленьких и 2 крупных), расположенными по окружности.

Измельченное сырье. Из части аналитической пробы готовят препараты по методике приготовления препаратов из цельного сырья листьев (ГФ СССР XI изд., вып. 1, С. 278 (листья).

При рассмотрении под микроскопом препаратов листа видны фрагменты верхнего эпидермиса с многоугольными изодиаметрическими, реже со слабоизвилистыми стенками, иногда вытянутыми, длиной 37–60 мкм, шириной 23–52 мкм; фрагменты нижнего эпидермиса с многоугольными клетками со слабоизвилистыми стенками, длиной 42–90 мкм, шириной 22–52 мкм. Четко видна тонкая продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая кутикула. Устьица аномоцитного типа, длиной 16–26 мкм, шириной 11–19 мкм. Устьица овальной или округлой формы, замыкающие клетки устьиц имеют чечевидную форму. Встречаются простые одноклеточные волоски, расширенные у основания и заостренные на конце, с тонкими стенками и гладкой поверхностью, длиной до 382 мкм. Также встречаются железистые волоски с шаровидными 2-клеточными головками различной величины от 29 до 37 мкм в диаметре, расположенные на 2-клеточной ножке длиной до 60 мкм (головчатые). Встречаются волоски шиповидные, реже многоклеточные. Отмечено наличие желёзок тип «яснотковые» (круглые, с различным количеством клеток), размером от 59 до 76 мкм в диаметре. Могут встречаться булавовидные желёзки длиной до 50 мкм.

Фрагменты черешка листа с клетками эпидермиса прозенхимной формы, длиной до 100 мкм, шириной до 20 мкм. Отмечено наличие простых одноклеточных волосков длиной до 220 мкм, расширенных у основания и заостренных на конце, с тонкими стенками и гладкой поверхностью. Встречаются Т-образные многоклеточные волоски длиной до 175 мкм. Могут встречаться булавовидные железки длиной до 50 мкм (рисунок 49).

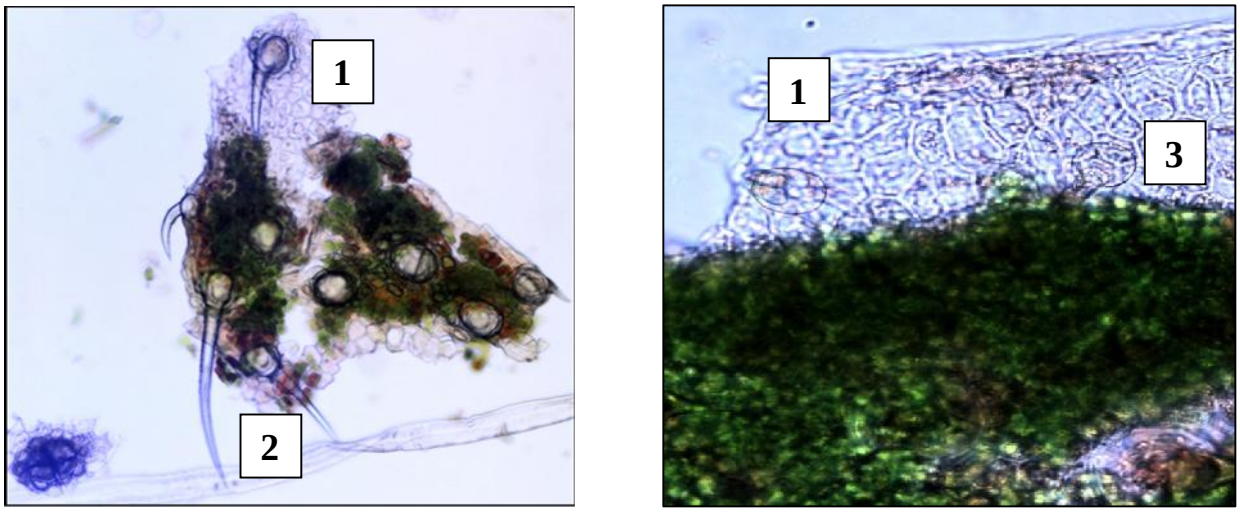


Рисунок 49 – Фрагмент эпидермиса листа хмеля обыкновенного (измельченное сырье) (увел. × 100)
1 – эпидермис, 2 – волоски простые, 3 – волоски головчатые.

Порошок. Часть аналитической пробы просеивают сквозь сито с размером отверстий 0,25 мм. Из сырья, оставшегося на сите, готовят препараты листа, из просева – препараты порошка листа (ГФ СССР XI изд., вып. 1, С. 278).

При рассмотрении под микроскопом препаратов листа видны фрагменты верхнего эпидермиса с многоугольными изодиаметрическими, реже со слабоизвилистыми стенками, иногда вытянутыми, длиной 37–60 мкм, шириной 23–52 мкм; фрагменты нижнего эпидермиса с многоугольными клетками со слабоизвилистыми стенками, длиной 42–90 мкм, шириной 22–52 мкм.

Кутикула тонкая продольно-морщинистая, вокруг устьиц лучисто-морщинистая. Устьица аномоцитного типа, длиной 16–26 мкм, шириной 11–19 мкм. Устьица овальной или округлой формы, замыкающие клетки устьиц имеют чечевидную форму.

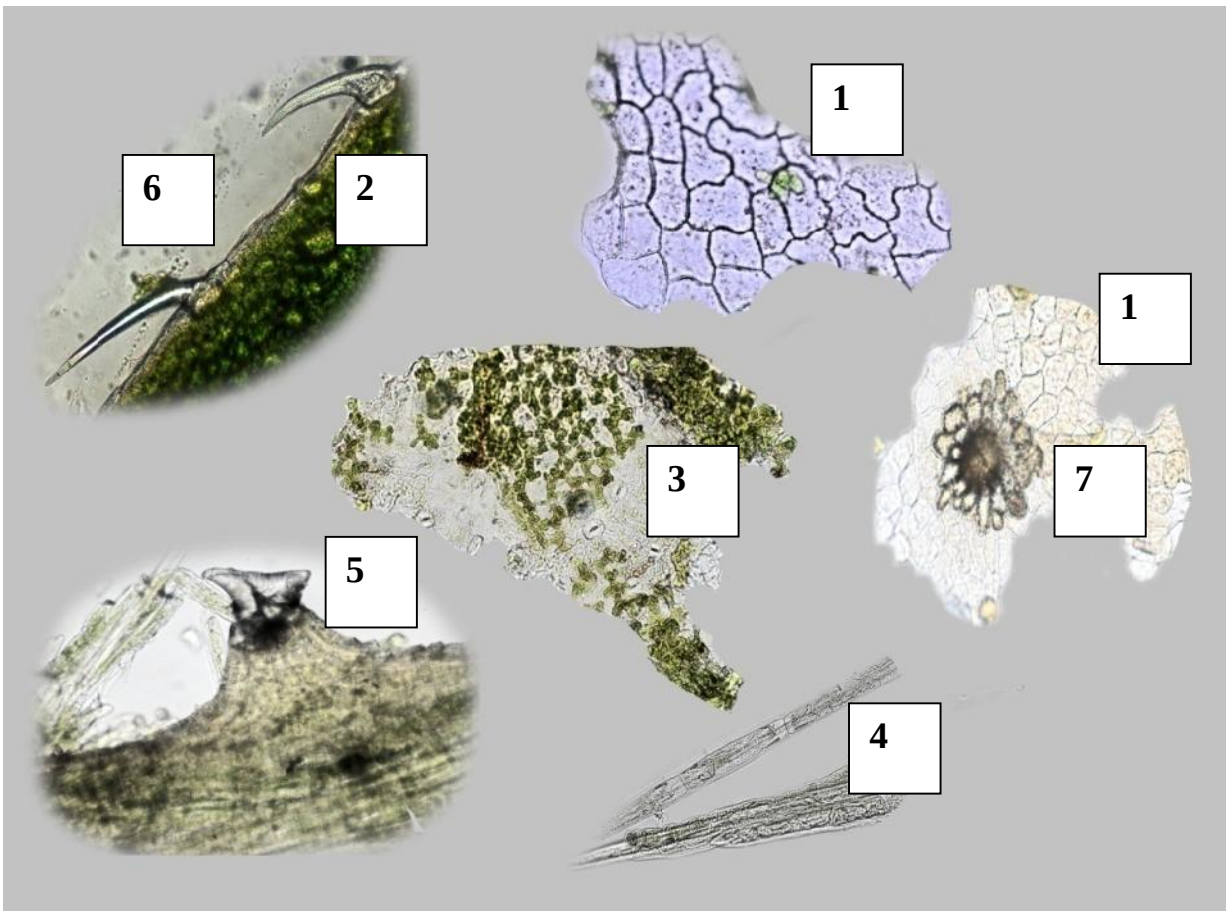


Рисунок 50 – Фрагмент мелкой фракции листа хмеля обыкновенного (порошок) (увел. × 100)
1 – верхний эпидермис листа, 2 – край листа, 3 – нижний эпидермис листа, 4 – эпидермис вдоль жилки листа, 5 – волосок Т-образный, 6 – волоски простые, 7 – железка.

Встречаются простые одноклеточные волоски, расширенные у основания и заостренные на конце, с тонкими стенками и гладкой поверхностью, длиной до 382 мкм. Также отмечены железистые волоски с шаровидными 2-клеточными головками различной величины от 29 до 37 мкм в диаметре, расположенные на 2-клеточной ножке длиной до 60 мкм (головчатые). Встречаются волоски шиповидные, реже многоклеточные. Отмечено наличие желёзок тип «яснотковые» (круглые, с различным количеством клеток), размером от 59 до 76 мкм в диаметре. Могут встречаться булавовидные желёзки длиной до 50 мкм.

Фрагменты черешка листа с клетками эпидермиса прозенхимной формы, длиной до 100 мкм, шириной до 20 мкм. Отмечено наличие простых одноклеточных волосков длиной до 220 мкм, расширенных у основания и заостренных на конце, с тонкими стенками и гладкой поверхностью. Встречаются Т-образные многоклеточные волоски длиной до 175 мкм (рисунок 50).

Описания и микрофотографии диагностических признаков цельных, измельченных и порошка листьев хмеля включены в раздел «Микроскопия» проекта ФС «Хмеля обыкновенного листья».

Выводы по главе 4

1. Проведено морфолого-анатомическое исследование первоцвета весеннего и близкородственного первоцвета крупночашечного, определены диагностические признаки для цельного, измельченного и порошкованного сырья. Морфолого-анатомическое изучение первоцвета крупночашечного проведено впервые.

2. Впервые проведено сравнительное изучение морфологических признаков близкородственных видов первоцветов, которое показало их практическую идентичность. Определены диагностические признаки: листья яйцевидные или яйцевидно-продолговатые, внезапно или постепенно суженные в черешок, городчатые или неравномерно-городчатые по краю, на верхушке тупые, морщинистые, с вдавленными сверху и выступающими снизу жилками, серовато-зеленого цвета. Цветоносы округлой формы, внутри полые, по длине превышают листья. Соцветие зонтиковидное, цветки правильные, наклонены в одну сторону. Прицветники линейно-ланцетные, острые. Чашечка от трубчато- до широко-колокольчатой формы, перепончатая, угловато-гранистая. Лепестки венчика ярко-желтые, внутри с оранжевым пятном у основания долей.

3. Проведен сравнительный анатомо-гистологический анализ строения первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного. Впервые проведено микроскопическое исследование поперечного среза черешка листа первоцвета весеннего методом петиолярной анатомии. Полное микроскопическое исследова-

ние травы первоцвета крупночашечного также проведено впервые. Выявлены количественно охарактеризованные микродиагностические признаки, определяющие подлинность сырья.

4. Впервые проведено морфологическое исследование листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов «Ранний», «Крылатский», «Подвязный». Выявлены общие характерные признаки, позволяющие провести диагностику сырья. Стебель округлой формы, заполненный у основания, выше полый, с крючкообразными шипами, характерно наличие узлов в местах прикрепления листьев. На нижней стороне листовых пластинок видны выступающие жилки в форме ребер с многочисленными шипами. Вся поверхность листовых пластинок, особенно верхняя сторона, покрыта многочисленными жесткими волосками. Черешок округлой формы с четко выраженным желобком с лицевой стороны листа, заполненный внутри, у основания имеются прилистники. Окраска стеблей, листьев, черешков от светло-зеленой до темно-зеленой и фиолетовой с промежуточными оттенками.

5. Впервые проведено анатомо-гистологическое исследование листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов «Ранний», «Крылатский», «Подвязный». Впервые проведено микроскопическое исследование листовых пластинок, черешков исследуемых растений методом петиолярной анатомии. Выявлены количественно охарактеризованные микродиагностические признаки, определяющие подлинность сырья.

6. Проведены ресурсные исследования травы первоцвета крупночашечного на территории РБ. Определены ключевые промышленные заросли в северо-восточных, центральных и юго-восточных районах РБ. Объем возможных ежегодных заготовок составляет от 0,039 т до 0, 263 т в пересчете на воздушно-сухую массу сырья.

7. Результаты проведенных исследований включены в соответствующие разделы ТУ 9700-014-26795008-2005 «Трава первоцвета весеннего (ангро), цельное сырье», проектов ФС «Первоцвета листья», ФСП «Хмеля обыкновенного листья».

ГЛАВА 5 СТАНДАРТИЗАЦИЯ И РАЗРАБОТКА НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА СЫРЬЕ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО И ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Проблема совершенствования стандартизации ЛРС, создания современной НД на сырье является актуальной задачей [12, 15, 17, 129, 174, 176, 184, 275, 347].

«Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» (ОСТ 91500.05. 001-00) предусматривают нормирование всех видов лекарственного растительного сырья, используемого для изготовления лекарственных средств, цельного, измельченного и порошкованного, что должно быть отражено в соответствующих разделах НД: внешние признаки, микроскопия, числовые показатели. Показатели качества, включаемые в проект НД, определяются в зависимости от путей использования ЛРС.

5.1 Стандартизация и разработка нормативной документации на сырье «Первоцвета весеннего трава»

Существующая в РФ отечественная нормативная документация (НД) на первоцвет весенний по ГОСТ 3166-76 «Листья первоцвета весеннего (ангро), цельное сырье, поставляемого на экспорт» предусматривает определение некоторых числовых показателей (общая зола, влажность, доля примесей) и содержание кислоты аскорбиновой (методом титрования). Данный ГОСТ не предусматривает определение таких важных показателей качества сырья, как со-

держание экстрактивных веществ; золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной; микробиологической чистоты и радионуклидов. Указанный документ не содержит полного описания морфологических признаков; описание анатомических признаков сырья вовсе отсутствует [51]. Таким образом, разработка ФС «Первоцвета листья», удовлетворяющей современным требованиям, взамен устаревшего ГОСТ 3166-76, является актуальной задачей.

Учитывая возможность применения первоцвета весеннего в качестве пищевого растительного сырья, нами разработаны и утверждены ТУ 9700-014-26795008-2005 «Трава первоцвета весеннего (ангро), цельное сырье».

Проведенные нами исследования и данные литературы показали, что основными группами БАВ первоцвета весеннего являются флавоноиды, кислота аскорбиновая, тритерпеновые сапонины. Использование первоцвета весеннего в качестве пищевого поливитаминного сырья позволили нам определить основными показателями для стандартизации сырья содержание флавоноидов и кислоты аскорбиновой.

5.1.1 Разработка методик качественного и количественного определения суммы флавоноидов в траве первоцвета весеннего

Для качественного анализа флавоноидов в траве первоцвета весеннего использовали метод ТСХ, характеризующийся высокой селективностью, чувствительностью, быстротой выполнения анализа [92].

Для качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в траве первоцвета изучены системы: этилацетат-кислота муравьиная-вода (70:15:15); этилацетат-кислота уксусная ледяная-вода (5:1:1); н-бутанол-кислота уксусная ледяная-вода (4:1:2); гексан-ацетон-кислота уксусная (20:10:0,1); хлороформ-спирт метиловый-вода (26:14:3); этилацетат-кислота уксусная (80:20); гексан-ацетон (8:2); хлороформ-спирт метиловый-вода (26:14:3) [30, 31].

Нами экспериментально определено, что оптимальной системой растворителей, обеспечивающей лучшее разделение флавоноидов растений рода первоцвет, явилась: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2).

Методика качественного обнаружения флавоноидов в траве первоцвета весеннего

Испытуемый раствор. Раствор А, полученный для количественного определения (см. раздел «Количественное определение суммы флавоноидов»).

Раствор стандартного образца. Раствор Государственного стандартного образца рутина (см. раздел «Количественное определение суммы флавоноидов»).

На линию старта хроматографической пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ или аналогичного качества) размером 100×100 мм в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносили 20 мкл испытуемого раствора А и 20 мкл раствора стандартного образца рутина.

Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе в течение 10 минут и хроматографировали в системе растворителей: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2) восходящим способом (камеру со смесью растворителей предварительно насыщали 1 час). Когда фронт растворителей проходил 8 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, высушивали в вытяжном шкафу до удаления следов растворителей и просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме стандартного образца рутина обнаруживалась темно-коричневая зона рутина с R_f около 0,65–0,75, принятая за R_S=1,0. На хроматограмме испытуемого раствора определялась темно-коричневая зона адсорбции с R_S (по рутину) около 1,0 и темно-коричневая зона с R_S (по рутину) около 1,1 (гиперозид); допускается обнаружение дополнительных зон.

Валидацию методики качественного определения флавоноидов проводили по специфичности хроматографической системы. Специфичность методики определяли по совпадению основных зон адсорбций между собой, по их соответствию указанной методике в различных образцах сырья, собранных в разных районах, в разные годы.

В наших исследованиях использовались 5 образцов сырья. Приемлемость оценивалась по совпадению зон адсорбций различных исследуемых об-

разцов сырья описанию методики. Проведенные исследования показали, что зоны адсорбции исследуемых образцов совпали между собой и соответствовали описанной методике.

Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов

Для количественного определения флавоноидов в фитопрепаратах и ЛРС применяют объемные, весовые, спектрофотометрические, фотоколориметрические, полярографические и др. методы. Более популярным является метод спектрофотометрического анализа в УФ-области спектра самостоятельно или в сочетании с хроматографией в тонких слоях сорбента, на бумаге [211, 338].

Оптические методы анализа в видимой области спектра используют после выполнения реакций с хромогенными реактивами.

Для определения содержания флавоноидов в сырье первоцвета весеннего нами разработана методика спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в извлечениях из исследуемого сырья.

Методика количественного определения суммы флавоноидов основана на принципе дифференциальной спектрофотометрии (реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в среде спирта этилового 70% при подкислении кислотой уксусной) [84, 166, 167].

В исследуемых образцах травы первоцвета весеннего с алюминия хлоридом появлялся максимум поглощения при длине волны 410 нм, что совпадало с максимумом поглощения спектра ГСО рутина с хромогенным реактивом (рисунок 51), поэтому ГСО рутин был выбран нами в качестве основного стандартного образца [171, 174, 198, 203].

Указанная область спектра поглощения отдалена от спектров сопутствующих веществ. Раствором сравнения служил исходный раствор извлечений без хромогенного реактива, что также исключает влияние сопутствующих БАВ [142, 178].

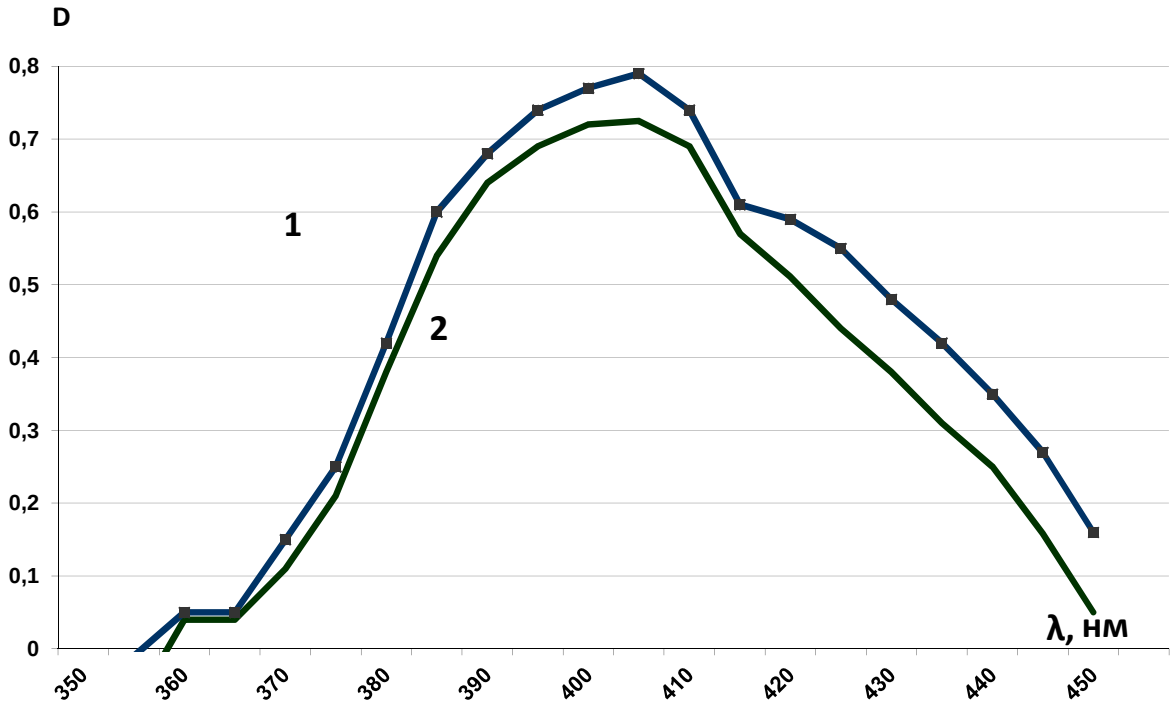


Рисунок 51 – Дифференциальные спектры спиртоводных извлечений листьев первоцвета весеннего (1) и ГСО рутина (2) с раствором алюминия хлорида

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в траве первоцвета весеннего были изучены оптимальные параметры экстракции (таблица 36).

Таким образом, оптимальным экстрагентом для сырья выбран раствор спирта этилового 70%, степень измельчения сырья 1 мм, соотношение сырья и экстрагента 1:10, время экстракции 30 мин.

Также было установлено, что стабильность флавоноидного комплекса с алюминия хлоридом достигается через 30 мин от начала реакции и сохраняется в течение двух часов, а оптимальное количество 2% раствора указанного реагента составляет 2 мл.

Таблица 36 – Выбор параметров экстракции для извлечения суммы флавоноидов из травы первоцвета весеннего

Параметры экстракции	Содержание суммы флавоноидов,%
Концентрация спирта этилового,%	
40	3,96±0,13
70	4,21±0,15
96	2,43±0,18
Степень измельчения, мм	
1	5,46±0,14
2	4,68±0,19
3	3,58±0,18
Соотношение сырье – экстрагент	
1:3	3,15 ± 0,06
1:5	4,09 ± 0,11
1:10	4,21 ± 0,09
1:15	4, 17 ± 0,14
1:20	4,15 ± 0,08
Время экстракции, мин	
20	4,95±0,13
30	5,49±0,17
45	5,44±0,14
60	5,41±0,16
90	5,35±0,19

Методика количественного определения суммы флавоноидов

Около 10,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта этилового 70% и взвешивали с погрешностью ± 0,01 г. Колбу соединяли с обратным холодильником, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут,

периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной массы спиртом этиловым 70%. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

Раствор стандартного образца. Около 0,05 г (точная навеска) высушенного стандартного образца ГСО рутина (ФС 42-2508-87) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 85 мл спирта этилового 70% при нагревании на кипящей водяной бане, охлаждали, доводили объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивали.

Раствор сравнения. К 2,0 мл раствора А добавляли 0,1 мл кислоты уксусной разведенной и доводили спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Через 30 мин измеряли оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца (1 мл) на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, использовали раствор сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X,%) вычисляли по формуле (5):

$$X = \frac{D \times m_o \times 1 \times 100 \times 100}{D_o \times m \times 2 \times (100 - W)}, \qquad (5)$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_o – оптическая плотность раствора стандартного образца рутина;

m – масса сырья, в граммах;

m_o – масса ГСО рутина, в граммах, в 1 мл раствора ГСО;

W – влажность сырья, в процентах.

Предложенной методикой проанализировано пять партий сырья. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 4,25% (таблица 37).

Таблица 37 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в траве первоцвета весеннего (в пересчете на рутин)

N п/п	n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	Еотн
1	5	5,05	0,00292	0,05403	95	2,78	0,15022	2,97%
2	5	3,58	0,00228	0,04774	95	2,78	0,13274	3,71%
3	5	3,13	0,00092	0,03033	95	2,78	0,08432	2,69%
4	5	5,48	0,00132	0,03633	95	2,78	0,10100	1,85%
5	5	4,78	0,00628	0,079246	95	2,78	0,22031	4,61%

Методика количественного определения суммы флавоноидов валидирована по следующим характеристикам: правильность, прецизионность, специфичность, линейность [2, 7, 56, 121, 154, 158].

Правильность методики определяли на модельных смесях с ГСО рутина. В предлагаемой нами методике средний% восстановления в модельных смесях с заданным содержанием рутина составил 99,63%.

В опытах с добавками ГСО рутина относительная ошибка находилась в пределах случайной ошибки методики и не превышала 5% (0,40–2,94%), что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

Прецизионность определяли по двум показателям – сходимость и воспроизводимость. В условиях сходимости показатель относительного стандартного отклонения составил 0,40% в первый день, 1,67% во второй день и не превышал допустимого значения (RSD не более 10%).

В условиях воспроизводимости величина RSD в лаборатории № 1 составила 1,09%, в лаборатории № 2 – 1,36%.

Для определения линейности проводили определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемых образцах в пяти концентрациях ГСО рутина – 80, 90, 100, 110, 120% от теоретического уровня. Линей-

ность метода сохраняется в интервале концентраций от 4,8 до 7,2 мкг/мл и охватывает нижний предел содержания суммы флавоноидов в исследуемом сырье, коэффициент корреляции составил 0,998341 (таблица 38, приложение 40).

Таблица 38 – Таблица результатов валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в траве первоцвета весеннего

№	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	Правильность	% от ожидаемого значения 100,0±5,0%	Относительная ошибка: 0,40–2,94% (<5%)
2	Сходимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 10%	1-ый день RSD=0,40% 2-ой день RSD=1,67%
3	Воспроизводимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 15%	Лаборатория № 1 RSD=1,09%, лаборатория № 2 RSD=1,36%
4	Специфичность	Совпадение спектров поглощения	Доказана совпадением спектров поглощения окрашенных комплексов извлечения и ГСО рутина
5	Линейность и диапазон применения	Коэффициент корреляции r≥0,99	Коэффициент корреляции r=0,998341 в интервале 4,8–7,2 мкг/мл рутина

Таким образом, исследования показали, что разработанная методика доступна, легко воспроизводима, проста в исполнении, не требует особых временных и денежных затрат.

Разработанной методикой были проанализированы пять партий сырья первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного.

Таблица 39 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в траве первоцвета крупночашечного (в пересчете на рутин)

№ п/п	n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	Еотн
1	5	3,98	0,00108	0,03286	95	2,78	0,09136	2,30%
2	5	3,35	0,00152	0,03899	95	2,78	0,10838	3,23%
3	5	4,25	0,00100	0,03162	95	2,78	0,08791	2,07%
4	5	3,08	0,00068	0,02608	95	2,78	0,07249	2,36%
5	5	3,72	0,00068	0,02608	95	2,78	0,07249	1,94%

Содержание суммы флавоноидов в траве первоцвета весеннего находилось в пределах – 3,13–5,48%, первоцвета крупночашечного – 3,08–4,25% (таблицы 37, 39).

Результаты исследований образцов цельного, измельченного и порошкованного сырья представлены в приложения 41 («Числовые показатели»). Из данных таблиц видно, что содержание суммы флавоноидов находилось в пределах от 3,13 до 5,48%.

Проведенные исследования стабильности сырья при хранении позволили установить норму содержания флавоноидов в траве первоцвета весеннего не менее 2% (приложение 41).

5.1.2 Разработка методики качественного и количественного определения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего

Методика качественного обнаружения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего методом ТСХ

Приготовление смеси проявляющего реагента. В мерную колбу объемом 100 мл помещали 0,075 г бромкрезолового зеленого, 0,025 г бромфенолового синего, 50 мл спирта этилового 70%, после растворения веществ объем смеси доводили раствором спирта этилового 70% до метки (раствор А). В мерную колбу объемом 100 мл вносили 0,5 г натрия карбоната, 0,25 г калия перманганата, растворив в 50 мл воды очищенной, объем смеси доводили водой до метки (раствор Б). Для проявления пластинок готовили смесь реактивов: 9 частей раствора А и 1 часть раствора Б; смесь стабильна не более 15 мин.

Испытуемый раствор. 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 1 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл дистиллированной воды, перемешивали, настаивали 15 мин, отфильтровывали.

Раствор стандартного образца. Раствор стандартного образца кислоты аскорбиновой (см. раздел «Количественное определение кислоты аскорбиновой»).

На линию старта хроматографической пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ или аналогичного качества) размером 100×100 мм в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносили 50 мкл испытуемого раствора и 20 мкл раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты.

Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе в течение 10 минут и хроматографировали в системе растворителей: этилацетат-кислота уксусная ледяная (80:20) (камеру со смесью растворителей предварительно насыщали 1 час). Когда фронт растворителей проходил 8 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, высушивали в вытяжном шкафу до удаления следов растворителей, опрыскивали раствором для детектирования смесь рас-

творов бромкрезолового зеленого и калия перманганата с последующим нагреванием при температуре 120°С около 1 мин.

На хроматограмме обнаруживалась зона адсорбции голубого цвета на участке с извлечением из сырья с R_f около 0,45–0,55, идентичная зоне адсорбции кислоты аскорбиновой.

Валидацию методики качественного определения кислоты аскорбиновой проводили по специфичности хроматографической системы. Специфичность методики определяли по совпадению основных зон адсорбций между собой, соответствие различных образцов сырья, собранных в разные годы, описанию методики.

В наших исследованиях использовались 5 образцов сырья. Приемлемость оценивалась по совпадению зон адсорбций различных исследуемых образцов сырья описанию методики. Проведенные исследования показали, что зоны адсорбции исследуемых образцов совпали между собой и соответствовали описанной методике.

Разработка методики количественного определения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего

Для количественного определения кислоты аскорбиновой нами использован спектрофотометрический метод, основанный на цветной реакции аскорбиновой кислоты с фосфорно-молибденовым комплексом [45, 182].

Для разработки методики количественного определения аскорбиновой кислоты в траве первоцвета весеннего были изучены оптимальные параметры экстракции (таблица 40).

Таблица 40 – Выбор параметров экстракции для извлечения кислоты аскорбиновой из травы первоцвета весеннего

Параметры экстракции	Содержание аскорбиновой кислоты, %
Экстрагент	
вода дистиллированная	2,08 ± 0,09
спирт этиловый 40%	3,45 ± 0,07
спирт этиловый 70%	1,95 ± 0,08
Степень измельчения, мм	
1	3,42 ± 0,12
2	2,11 ± 0,09
3	1,75 ± 0,11
Время экстракции, мин	
20	2,13± 0,08
30	3,45 ± 0,07
60	3,05 ± 0,06

Оптимальным экстрагентом для сырья выбран раствор спирта этилового 40%, степень измельчения сырья 1 мм, время экстракции 30 мин.

Методика количественного определения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего

Около 2 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 40%, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на водяной бане в течение 30 мин. Экстракцию спиртом этиловым 40% повторяли еще два раза по 50 мл в течение 30 мин каждый раз. Полученные извлечения объединяли, фильтровали через бумажный фильтр (раствор А). В колбу вместимостью 50 мл помещали 20 мл раствора А, прибавляли 20 мл спирта этилового 96%, перемешивали и через 10 мин фильтровали через бумажный

фильтр (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мл раствора Б и доводили объем раствора до метки, перемешивали (раствор В).

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещали около 0,05 г (точная навеска) кислоты аскорбиновой (ФС 42-2668-95), высушенной до постоянной массы при температуре от 100° до 105°С, растворяли в 30 мл воды, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 1). Раствор стандартного образца хранят в плотно закрытой емкости из темного стекла в прохладном, защищенном от света месте не более 3 суток.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 5 мл раствора 1, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали (раствор 2). Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор натрия фосфорномолибдата. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещали 0,05 г натрия фосфата двузамещенного, растворяли в 100 мл воды, прибавляли 10 мл кислоты серной концентрированной, 50 мл воды и 0,8 г аммония молибдата. Объем раствора доводили водой до метки и тщательно перемешивали. Раствор натрия фосфорномолибдата хранят в плотно закрытой емкости из темного стекла в прохладном, защищенном от света месте не более 3 месяцев.

В три колбы вместимостью по 50 мл помещали: в первую – 10 мл раствора В, во вторую – 10 мл раствора рабочего стандартного образца кислоты аскорбиновой и в третью – 10 мл воды. В каждую колбу прибавляли по 10 мл раствора натрия фосфорномолибдата, нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 10 мин и быстро охлаждали под струей холодной воды. Оптическую плотность испытуемого раствора (колба 1) и раствора СО кислоты аскорбиновой (колба 2) измеряли на спектрофотометре при длине волны 730 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор из третьей колбы.

Содержание кислоты аскорбиновой в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (Х) вычисляли по формуле (6):

$$X = \frac{D \times m_o \times 150 \times 40 \times 100 \times 510 \times 100 \times 100}{D_o \times m \times 20 \times 10 \times 10 \times 50 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{D \times m_o \times 150 \times 40 \times 5}{D_o \times m \times (100 - W)}, \quad (6)$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_o – оптическая плотность раствора СО кислоты аскорбиновой;

m – масса сырья в граммах;

m_o – масса СО кислоты аскорбиновой в граммах;

W – влажность сырья в процентах.

Предложенной методикой проанализировано пять партий сырья. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 4,19% (таблица 41).

Таблица 41 – Метрологическая характеристика методики количественного определения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего

N п/п	n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	Еотн
1	5	2,14	0,00088	0,02967	95	2,78	0,08245	3,85%
2	5	3,61	0,00172	0,04147	95	2,78	0,11529	3,19%
3	5	2,53	0,00068	0,02608	95	2,78	0,07249	2,86%
4	5	2,01	0,00092	0,03033	95	2,78	0,08432	4,19%
5	5	2,15	0,00100	0,03162	95	2,78	0,08791	4,08%

Методика количественного определения аскорбиновой кислоты валидирована по следующим характеристикам: правильность, прецизионность, специфичность, линейность [2, 60, 121].

Правильность методики определяли на модельных смесях с СО кислоты аскорбиновой. В предлагаемой нами методике средний % восстановления в модельных смесях с заданным содержанием аскорбиновой кислоты составил 100,14%.

В опытах с добавками СО кислоты аскорбиновой относительная ошибка находилась в пределах случайной ошибки методики и не превышала 5% (0,61–1,61%), что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки (приложение 40).

Прецизионность определяли по двум показателям – сходимость и воспроизводимость. В условиях сходимости показатель относительного стандартного отклонения составил 0,90% в первый день, 1,20% во второй день и не превышал допустимого значения (RSD не более 10%).

В условиях воспроизводимости величина RSD в лаборатории № 1 составила 1,13%, в лаборатории № 2 – 1,58%.

Для определения линейности проводили определение содержания аскорбиновой кислоты в исследуемых образцах в пяти концентрациях СО аскорбиновой кислоты – 80, 90, 100, 110, 120% от теоретического уровня. Линейность метода сохраняется в интервале концентраций от 2,4 до 3,6 мкг/мл и охватывает нижний предел содержания аскорбиновой кислоты в исследуемом сырье. Коэффициентом корреляции составил 0,99643. Результаты валидации представлены в таблице 42 и приложении 40.

Таким образом, исследования показали, что разработанная методика доступна, легко воспроизводима, проста в исполнении.

Разработанной методикой были проанализированы пять партий сырья первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного. Результаты исследований образцов цельного, измельченного и порошкованного сырья представлены в приложении 41 («Числовые показатели»). Проведенные исследования стабильности сырья при хранении позволили установить норму содержания кислоты аскорбиновой в листьях первоцвета весеннего не менее 0,5% (приложение 41).

Таблица 42 – Таблица результатов валидации методики количественного определения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего

№	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	Правильность	% от ожидаемого значения 100,0±5,0%	Относительная ошибка: 0,65 – 1,61% (<5%)
2	Сходимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 10%	1-ый день RSD=0,90% 2-ой день RSD=1,20%
3	Воспроизводимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 15%	Лаборатория № 1 RSD=1,13%, лаборатория № 2 RSD=1,58%
4	Специфичность	Отсутствие отклика при отсутствии анализируемого вещества	Отсутствие синего окрашивания с раствором натрия фосфорномолибдата в отсутствии аскорбиновой кислоты
5	Линейность и диапазон применения	Коэффициент корреляции r≥0,99	Коэффициент корреляции r=0,99643 в интервале 2,4-3,6 мкг/мл аскорбиновой кислоты

Таблица 43 –Метрологическая характеристика методики количественного определения кислоты аскорбиновой в траве первоцвета крупночашечного

N п/п	n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	Еотн
1	5	1,78	0,00100	0,03162	95	2,78	0,08791	4,94%
2	5	3,54	0,00052	0,02280	95	2,78	0,06339	1,79%
3	5	2,56	0,00048	0,02191	95	2,78	0,06091	2,38%
4	5	1,56	0,00052	0,02280	95	2,78	0,06339	4,07%
5	5	1,88	0,00068	0,02608	95	2,78	0,07249	3,86%

Из данных таблиц видно, что содержание суммы кислоты аскорбиновой находилось в сырье первоцвета весеннего от 2,01 до 3,61%, первоцвета крупночашечного – 1,56–3,54%.

5.1.3 Установление числовых показателей качества и сроков годности травы первоцвета весеннего

В исследуемых образцах сырья нами были определены числовые показатели влажность, зола общая и нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте по ГФ СССР XI изд. и XII изд. (приложение 41). Как видно из таблиц, влажность сырья не превышает 13%, общая зола – не более 12%, зола, нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте – не более 3,5%.

Также были определены: содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, составило не менее 30% и содержание экстрактивных веществ, извлекаемых раствором спирта этилового 70% – не менее 40%.

Все числовые показатели для измельченного и порошкованного сырья травы первоцвета весеннего установлены впервые и включены в проект ФС «Первоцвета листья» и ТУ 9700-014-26795008-2005 «Трава первоцвета весеннего (ангро), цельное сырье».

Исследование сроков годности листьев и травы первоцвета весеннего (приложение 41), показало что хранение сырья в сухом проветриваемом помещении при температуре 18–20°С в течение 2,5 лет практически не влияет на содержание основных групп БАВ, что позволило определить срок годности сырья 2 года.

Микробиологическая чистота. Определение микробиологической чистоты исследуемого сырья проводили по ОФС 42-0067-07, ГФ XII изд., часть 1, категория 4А с использованием следующих сред: N1 (Аэробные бактерии); N 2 (Сабуро) (дрожжевые и плесневые грибы); N 3 (среда обогащения для энтеробактерий); N 4 (Эндо) (семейство *Enterobacteriaceae*); N 5 (Висмут-сульфит-агар) (*Salmonella*); N 8 (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*) [69, 138].

По результатам исследований во всех образцах сырья содержание микроорганизмов колебалось: аэробных бактерий не более $1{,}0 \cdot 10^5$ в 1 мл настоя, дрожжевых и плесневых грибов не более $1{,}3 \cdot 10^2$ в 1 мл настоя, *Escherichia coli* не более 10 в 1 мл настоя. Отмечено отсутствие в исследуемых образцах представителей Семейства *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella* (приложение 41).

Результаты исследований показали, что все образцы сырья относятся к категории 4А лекарственного растительного сырья, подвергаемого обработке и нагреванию для приготовления лекарственной формы.

Препарат исследуемого растительного сырья в условиях проведения испытания (1:10) не обладает антимикробным действием.

Раздел «Хранение» разработан в соответствии с требованиями статьи ГФ XI, вып. 1: «Хранение лекарственного растительного сырья» (стр. 296) с указанием соответствующих ГОСТов и в соответствии с ОСТ 91500.05.001–00 [180].

Определение радионуклидов. Определение радионуклидов проводили на гамма-бета спектрометрическом комплексе «Прогресс» № 346 (НПП «Доза», 2000 г.). В основе методики лежит регистрация сцинтилляционных спектров

гамма-излучения, испускаемого сырьем. Результаты исследования показали, что все исследуемые образцы сырья соответствуют требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 с изменениями 1,2,5 пп.1.6.10 [136].

Для определения срока годности сырья использовали образцы, хранившиеся в течение 3 лет в сухом, защищенном от света месте, хорошо проветриваемом помещении. Сырье хранилось в бумажных мешках по ГОСТ 17768-90 в условиях лаборатории. В сырье каждые шесть месяцев определялись числовые показатели. По результатам исследований, представленных в приложении 41, рекомендуем определить срок годности листьев первоцвета весеннего – 2 года.

С целью оптимизации заготовки сырья первоцвета весеннего было определено время сбора сырья. Для чего изучали динамику накопления основных групп действующих веществ суммы флавоноидов и кислоты аскорбиновой кислоты в зависимости от фазы вегетации растений.

Количественное определение флавоноидов и кислоты аскорбиновой проводили по разработанным нами методикам. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 44.

Таблица 44 – Динамика накопления флавоноидов и кислоты аскорбиновой в траве первоцветов в зависимости от фазы вегетации

Вегетативные фазы	Первоцвет весенний		Первоцвет крупночашечный	
	сумма флаво-но-идов в пересчете на рутин	кислота аскорбиновая	сумма флавонои-дов в пересчете на рутин	кислота аскорбиновая
Фаза бутонизации	3,49±0,11	1,84±0,09	2,91±0,13	1,32±0,14
Фаза начала цветения	4,09±0,14	2,59±0,07	3,35±0,09	1,58±0,11
Фаза массового цветение	3,82±0,08	2,27±0,07	3,28 ±0,08	1,43±0,09
Конечная фаза вегетации	2,58±0,09	1,63±0,09	2,12±0,14	1,12±0,15

Результаты исследования показали, что максимальное содержание указанных групп БАВ в траве первоцвета весеннего отмечено в период начала и массового цветения. Так как период цветения первоцветов непродолжительный и составляет 2–3 недели, поэтому заготовку сырья рекомендуем проводить в период от начала до массового цветения растения.

Таблица 45

Показатели и нормы качества травы первоцвета весеннего

Показатели	Методы	Норма
Внешние признаки	ГФ XI, ГОСТ 3166-76	Данные ГОСТА частично дополнены
Микроскопия	ГФ XI	**Разработана впервые, соответствует описанию и рисункам ФС**
Качественные реакции	**С 2% спиртовым раствором алюминия хлорида ТСХ**	**Зеленовато-желтое окрашивание (флавоноиды). Обнаруживается две зоны адсорбции на уровне рутина и гиперозида**
	ТСХ	**Обнаруживается зона адсорбции на уровне аскорбиновой кислоты**
Числовые показатели		
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	**Спектрофотометрия**	**Не менее 2,0%**
Аскорбиновая кислота	**Спектрофотометрия**	**Не менее 0,5%**
Экстрактивные вещества, извлекаемые водой	ГФ XI	**Не менее 30%**

Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом этиловым	ГФ XI	**Не менее 40%**
Влажность	ГФ XI, ГОСТ 3166-76	Не более 13%
Зола общая	ГФ XII, ГОСТ 3166-76	Не более 12%
Зола нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ XI	Не более 3,5%
Пожелтевшие листья и черешки	ГФ XI, ГОСТ 3166-76	Не более 3%
Органическая примесь	ГФ XI, ГОСТ 3166-76	Не более 0,5%
Минеральная примесь	ГФ XI, ГОСТ 3166-76	Не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ XII	**Категория 4 А**

Примечание: жирным шрифтом выделены показатели, предложенные впервые.

5.2 Стандартизация и разработка нормативной документации на сырье «Хмеля обыкновенного листья»

Согласно проведенным нами исследованиям и данным литературы листья хмеля обыкновенного являются богатейшим источником БАВ, однако применение в фармацевтической и пищевой промышленности нашли только соплодия хмеля, листья же являются неиспользуемыми отходами. Задача ком-

плексного использования растения хмеля обыкновенного в целом является актуальной и представляет практический интерес для предприятий по культивированию и переработке сырья.

В связи с этим нами поставлена задача стандартизации сырья и разработка НД проект ФСП «Хмеля обыкновенного листья». Проведенные нами исследования показали, что основными группами БАВ листьев хмеля обыкновенного являются флавоноиды и производные ацилфлороглюцидов, поэтому стандартизацию сырья проводили по их содержанию.

5.2.1 Разработка методик качественного и количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного

Для качественного анализа флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного использовали метод ТСХ, обладающей высокой селективностью и чувствительностью [92].

Для качественного обнаружения флавоноидов методом ТСХ в листьях первоцвета изучены системы: н-бутанол-кислота уксусная ледяная-вода (4:1:1); этилацетат-кислота уксусная ледяная-вода (5:1:1); этилацетат-муравьиная кислота-вода (10:4:1); гексан-ацетон-кислота уксусная ледяная (20:10:0,1) [30, 31].

Нами экспериментально установлено, что оптимальной системой растворителей, обеспечивающей лучшее разделение флавоноидов хмеля обыкновенного, явилась: этилацетат – кислота уксусная ледяная – вода (5:1:1).

Методика качественного обнаружения флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного методом ТСХ

Испытуемый раствор. Раствор А, полученный для количественного определения (см. раздел «Количественное определение суммы флавоноидов»).

Раствор стандартного образца. Раствор стандартного образца рутина (см. раздел «Количественное определение суммы флавоноидов»).

На линию старта хроматографической пластинки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ или аналогичного качества) размером 100×100 мм в виде полос длиной 10 мм, шириной не более 3 мм наносили 10 мкл испытуемого раствора А и 2 мкл 0,1% спиртового раствора государственного стандартного образца рутина. Высушенную на воздухе пластинку хроматографировали восходящим способом в предварительно насыщенной камере в системе растворителей: этилацетат – кислота уксусная ледяная – вода (5:1:1). По достижении фронтом растворителя 10 см, пластинку вынимали, высушивали в вытяжном шкафу и просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме появлялись три зоны адсорбции, одна из которых темно-коричневого цвета на уровне зоны ГСО рутина с Rf 0,33, вторая темно-коричневого цвета с Rs около 0,68, третья – светло-бурого цвета с Rs около 0,56.

Валидацию методики качественного определения флавоноидов проводили по специфичности хроматографической системы. Специфичность методики определяли по совпадению основных зон адсорбций между собой, соответствие различных образцов сырья, собранных в разные годы, описанию методики.

В наших исследованиях использовались 5 образцов сырья. Приемлемость оценивалась по совпадению зон адсорбций различных исследуемых образцов сырья описанию методики. Проведенные исследования показали, что зоны адсорбции исследуемых образцов совпали между собой и соответствовали описанной методике.

Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного

Методика количественного определения суммы флавоноидов основана на принципе дифференциальной спектрофотометрии (реакция комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в среде спирта этилового 70% при подкислении кислотой уксусной) [30, 31].

В исследуемых образцах листьев хмеля обыкновенного дикорастущих видов и культивируемых сортов появлялся максимум поглощения при длине

волны 408–410 нм, что совпадало с максимумом поглощения спектра ГСО рутина 410 нм (рис. 52) поэтому ГСО рутин был выбран нами в качестве основного стандартного образца [171, 174, 198, 203].

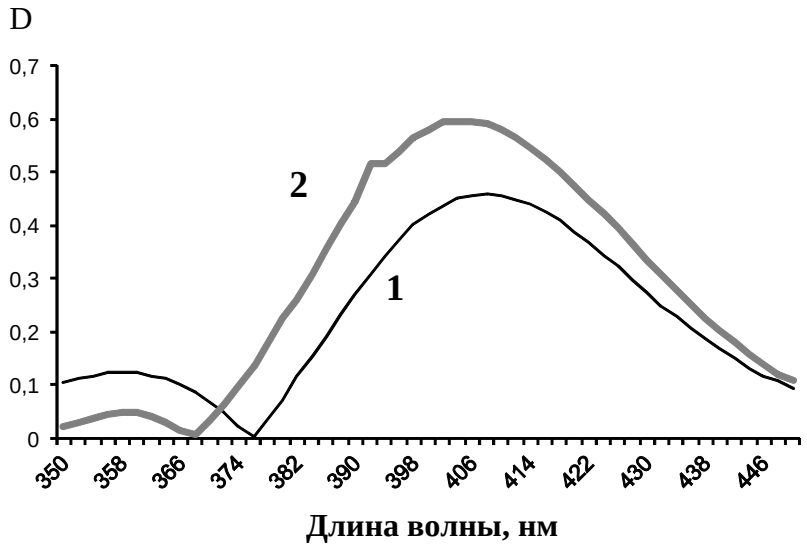


Рисунок 52 – Дифференциальные спектры ГСО рутина (1) и спиртового извлечения листьев хмеля обыкновенного (2) с раствором алюминия хлорида

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного были изучены оптимальные параметры экстракции (таблица 46).

Оптимальным экстрагентом для сырья выбран спирт этиловый 70%, степень измельчения сырья 3 мм, соотношение сырья и экстрагента 1:10, время экстракции 45 мин.

Также было установлено, что стабильность флавоноидного комплекса с алюминием хлоридом достигается через 30 мин от начала реакции и сохраняется в течение двух часов, а оптимальное количество 8% раствора указанного реагента составляет 10 мл.

Таблица 46 – Выбор параметров экстракции для извлечения суммы флавоноидов из листьев хмеля обыкновенного

Параметры экстракции	Содержание суммы флавоноидов,%
Концентрация спирта этилового,%	
40	1,91±0,05
50	3,06±0,06
70	3,25±0,13
96	0,63±0,12
Степень измельчения, мм	
1	1,89±0,12
2	3,07±0,07
3	3,24±0,11
4	2,98±0,13
5	2,75±0,08
Соотношение сырье – экстрагент	
1:3	2,15 ± 0,06
1:5	2,38 ± 0,05
1:10	3,25 ± 0,11
1:15	3,21 ± 0,10
1:20	2,34 ± 0,05
Время экстракции, мин	
20	2,15±0,07
30	2,36±0,11
45	3,25±0,09
60	3,19±0,10
90	3,17±0,12

Методика количественного определения флавоноидов

Точную навеску сырья 10,0 г, измельченного до частиц размером 3 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта этилового 70%, колбу взвешивали с погрешность ±0,01 г. Колбу соединяли с обратным водяным холодильником, нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 минут, периодически встряхивали для смывания частиц сырья со стенок. Колбу охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и при необходимости доводили до первоначальной массы спиртом этиловым 70%. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, смоченный тем же спиртом, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

Раствор стандартного образца. Около 0,05 г (точная навеска) высушенного стандартного образца рутина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 85 мл спирта этилового 70% при нагревании на кипящей водяной бане, охлаждали, доводили объем раствора до метки тем же спиртом и перемешивали.

Раствор сравнения. К 1 мл раствора А добавляли 0,1 мл кислоты уксусной разведенной и доводили спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

1,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл 8% раствора алюминия хлорида в спирте этиловом 70% и 0,1 мл кислоты уксусной разведенной. Объем раствора доводили тем же спиртом до метки и оставляли на 30 минут (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО (1 мл), использовали раствор сравнения.

Содержание суммы флавоноидов в процентах (X) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляется по формуле (7):

$$X = \frac{D \times m_0 \times 1 \times 100 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 1 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{D \times m_0 \times 1 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \cdot 1 \times (100 - W)}, \qquad (7)$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина;

m – масса сырья в граммах;

m_0 – масса ГСО рутина в граммах, в 1 мл раствора ГСО;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах,%;

Приготовление 8% раствора алюминия хлорида в спирте. 8 г алюминия хлорида растворяли в 100 мл спирта этилового 70% и тщательно перемешивали.

Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 месяца в колбе со шлифом.

Предложенной методикой проанализировано пять партий сырья. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 3,27% (таблица 47).

Методика количественного определения суммы флавоноидов валидирована по следующим характеристикам: правильность, прецизионность, специфичность, линейность [30, 31].

Правильность методики определяли на модельных смесях с ГСО рутина. В предлагаемой нами методике средний % восстановления в модельных смесях с заданным содержанием рутина составил 100,05%.

В опытах с добавками ГСО рутина относительная ошибка находилась в пределах случайной ошибки методики и не превышала 5% (0,55% – 1,33%), что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

Прецизионность определяли по двум показателям – сходимость и воспроизводимость. В условиях сходимости показатель относительного стандартного отклонения составил 0,72% в первый день, 0,94% во второй день и не превышал допустимого значения (RSD не более 10%).

В условиях воспроизводимости величина RSD в лаборатории № 1 составила 1,64%, в лаборатории № 2 – 1,22%.

Линейность методики определялась коэффициентом корреляции, который составил 0,997737, линейность метода сохранялась в интервале 4,8 до 7,2 мкг/мл (приложение 42).

Данной методикой проанализированы образцы цельного, измельченного и порошкованного сырья (приложение 43 «Числовые показатели»). Из данных таблиц видно, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов находилось от 2,37% до 3,25%. Исследования стабильности сырья при хранении (приложение 43), позволили рекомендовать норму содержания суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного не менее 1,5%.

Таблица 47 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного (в пересчете на рутин)

Образцы сырья	n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	E отн., %
Дикорастущее Давлеканов-ский р-н РБ)	5	2,96	0,00052	0,02280	95	2,78	0,06339	2,14
Дикорастущее (Уфимский р-н РБ)	5	3,25	0,00112	0,03347	95	2,78	0,09304	2,85
Сорт «Подвязный»	5	2,69	0,00040	0,02000	95	2,78	0,05560	2,07
Сорт «Крылатский»	5	2,37	0,00100	0,03162	95	2,78	0,08791	3,71
Сорт «Ранний»	5	3,12	0,00088	0,02967	95	2,78	0,08247	2,64

Таблица 48 – Таблица результатов валидации методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного

№	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	Правильность	% от ожидаемого значения 100,0±5,0%	Относительная ошибка: 0,55–1,33% (<5%)
2	Сходимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 10%	1-ый день RSD=0,72% 2-ой день RSD=0,94%
3	Воспроизводимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 15%	Лаборатория № 1 RSD=1,64%, лаборатория № 2 RSD=1,22%
4	Специфичность	Совпадение спектров поглощения	Доказана совпадением спектров поглощения окрашенных комплексов извлечения и ГСО рутина
5	Линейность и диапазон применения	Коэффициент корреляции r≥0,99	Коэффициент корреляции r=0,997737 в интервале 4,8-7,2 мкг/мл рутина

5.2.2 Разработка методик качественного и количественного определения производных ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного

Качественное обнаружение производных ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного

Измельченное сырье (1,0 г), помещенное в колбу емкостью 100 мл, экстрагировали в течение получаса 80 мл ацетона, периодически встряхивая, пере-

мешивая и доводя до метки объем раствора, фильтровали через бумажный фильтр «красная лента». К 1 мл полученного извлечения добавляли 1 мл 1% раствора ацетата свинца, наблюдалось образование хлопьевидного осадка белого цвета.

Разработка методики количественного определения производных ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного

По данным литературы одним из методов количественного определения производных ацилфлороглюцидов является метод неводного титрования. Нами был адаптирован метод неводного титрования, используемый для определения ацилфлороглюцидов в соплодиях хмеля обыкновенного, экспериментально определена навеска сырья и количество титранта [46, 47].

Методика количественного определения ацилфлороглюцидов Точную навеску измельченного сырья (0,2 г) экстрагировали 5 мл ацетона, просушенного над натрием сернокислым. Экстрагирование проводили в пробирке с притертой пробкой в горизонтальном положении в течение 15 минут. К 2 мл полученного экстракта прибавляли 2 капли спиртового раствора фенолфталеина 0,1% и титровали спиртовым раствором калия едкого 0,01 М до появления красной неисчезающей окраски.

Количество суммы ацилфлороглюцидов (X) в процентах определяли по формуле (8):

$$X = \frac{V \times 0.004 \times 5 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W)} = \frac{V \times 200}{m \times (100 - W)}, \qquad (8)$$

где 0,004 – количество ацилфлороглюцидов (лупулон, гумулон,
гулупон – среднее значение), соответствующее 1 мл раствора калия едкого (0,01М), г;

V – объем раствора калия едкого (0,01 М), пошедшего на титрование, мл;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах,%;

Приготовление 0,01 М спиртового раствора калия едкого.

Ампулу фиксанала едкого калия (0,1 М) разводили в мерной колбе вместимостью 1 л и доводили до метки спиртом этиловым 90%, перемешивали. Получали 0,1 М основной раствор калия едкого.

100 мл основного раствора доводили до метки спиртом этиловым 95% в мерной колбе вместимостью 1 л и перемешивали.

Титр раствора проверяли раствором хлористоводородной или серной кислоты известной концентрации в присутствии фенолфталеина.

Приготовление безводного ацетона.

В 1 л ацетона добавляли 59 г прокаленного при температуре 100°С в течение 5 ч сернокислого натрия и настаивали при взбалтывании 10 ч или оставляли на ночь. Для анализа отбирали ацетон над осадком.

Адаптированной методикой проанализировано пять партий сырья. Результаты исследований приведены в таблице 49. Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 3,03%.

Таблица 49 – Метрологическая характеристика методики количественного определения производных ацилфлороглюцидов

Образцы сырья	n	x ср.	S^2	S	P,%	t (P,f)	Δx	E отн., %
Дикорастущее (Давлекановский р-н РБ)	5	12,71	0,01172	0,10823	95	2,78	0,30096	2,37
Дикорастущее (Уфимский р-н РБ)	5	12,50	0,00788	0,088769	95	2,78	0,24678	1,97
Сорт «Подвязный»	5	12,92	0,03568	0,188892	95	2,78	0,52511	4,07
Сорт «Крылатский»	5	12,41	0,01820	0,13491	95	2,78	0,37504	3,03
Сорт «Ранний»	5	11,70	0,013320	0,115412	95	2,78	0,32085	2,74

Данной методикой проанализированы образцы цельного, измельченного и порошкованного сырья листьев хмеля обыкновенного (приложение 43). Из данных таблиц видно, что содержание ацилфлороглюцидов в листьях хмеля достаточно высокое, колеблется в зависимости от местообитания и сортотипа от 11,70 до 12,92%. Содержание ацилфлороглюцидов в исследуемых видах сырья дикорастущих растений не уступает культивируемым, даже растениям горького сортотипа, а для культивируемых растений максимальное содержание 12,92% отмечено у листьев горького сорта «Подвязный», затем 12,41% у горько-ароматического сорта «Крылатский», наименьшее количество 11,70% у ароматического сорта «Ранний». Исследования стабильности сырья при хранении (приложение 43) позволили рекомендовать норму содержания производных ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного не менее 10%.

5.2.3 Установление числовых показателей качества и сроков годности листьев хмеля обыкновенного

В исследуемых образцах сырья нами были определены числовые показатели влажность, зола общая и нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте по ГФ СССР XI изд. и XII изд. (приложение 43). Как видно из таблиц, влажность сырья не превышает 13%, общая зола – не более 12%, зола, нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте – не более 3,5%.

Также были определены: содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, составило не менее 30% и содержание экстрактивных веществ, извлекаемых раствором спирта этилового 70% – не менее 40%.

Все числовые показатели для цельного, измельченного и порошкованного сырья листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов установлены впервые и включены в проект ФС «Хмеля обыкновенного листья» (приложение 44).

Микробиологическая чистота. Определение микробиологической чистоты исследуемого сырья проводили по ОФС 42-0067-07, ГФ XII, часть 1, категория 4А с использованием следующих сред: N 1 (Аэробные бактерии);

N 2 (Сабуро) (дрожжевые и плесневые грибы); N 3 (среда обогащения для энтеробактерий); N4 (Эндо) (семейство Enterobacteriaceae); N 5 (Висмут-сульфит-агар) (Salmonella); N 8 (Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus) [69, 138].

По результатам исследований во всех образцах сырья содержание микроорганизмов колебалось: аэробных бактерий не более $1{,}0\times10^5$ в 1 мл настоя, дрожжевых и плесневых грибов не более $1{,}3\times10^2$ в 1 мл настоя, Escherichia coli не более 10 в 1 мл настоя. Отмечено отсутствие в исследуемых образцах представителей Семейства Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonella (приложение 43).

Результаты исследований показали, что все образцы сырья относятся к категории 4А лекарственного растительного сырья, подвергаемого обработке и нагреванию для приготовления лекарственной формы.

Препарат исследуемого растительного сырья в условиях проведения испытания (1:10) не обладает антимикробным действием.

Раздел «Хранение» разработан в соответствии с требованиями статьи ГФ XI, вып. 1: «Хранение лекарственного растительного сырья» (стр. 296) с указанием соответствующих ГОСТов и в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 [135].

Определение радионуклидов. Определение радионуклидов проводили на гамма-бета спектрометрическом комплексе «Прогресс» № 346 (НПП «Доза», 2000 г.). В основе методики лежит регистрация сцинтилляционных спектров гамма-излучения, испускаемого сырьем. Результаты исследования показали, что все исследуемые образцы сырья соответствуют требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 с изменениями 1, 2, 5 пп. 1.6.10 [136].

Для определения срока годности сырья использовали образцы, хранившиеся в течение 3,5 лет в сухом, защищенном от света месте, в хорошо проветриваемом помещении. Сырье хранилось в бумажных мешках по ГОСТ 17768-90 в условиях лаборатории. В сырье каждые шесть месяцев определялись числовые показатели. По результатам исследований, представленным

в приложении 43, рекомендуем определить срок годности листьев хмеля обыкновенного – 3 года.

Возможность комплексной переработки сырья хмеля обыкновенного предполагает определение оптимального срока заготовки. С этой целью нами была изучена динамика накопления основных групп БАВ (суммы флавоноидов и ацилфлороглюцидов) по фазам вегетации растений. Определение количественного содержания указанных групп БАВ проводили по разработанным нами методикам. Результаты исследования приведены в таблице 50.

Таблица 50 – Динамика накопления флавоноидов и ацилфлороглюцидов в листьях хмеля обыкновенного в зависимости от фазы вегетации

Фаза вегетации растения	Содержание суммы ацилфлороглюцидов, %	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Неполное созревание соплодий (июль месяц)	12,72±0,13	3,25±0,09
Полное созревание соплодий (конец августа–начало сентября месяцев)	12,91±0,16	2,93±0,08
Конец вегетации (конец сентября–начало октября месяцев)	12,63±0,18	1,86±0,06

Результаты исследований показали, что содержание основных групп БАВ, особенно флавоноидов, в исследуемом сырье максимально в фазу неполного созревания соплодий. В период же полного созревания плодов содержание ацилфлороглюцидов увеличивается, а флавоноидов уменьшается незначительно, поэтому с целью оптимизации производственного процесса заготовку лекарственного растительного сырья рекомендуем проводить в период полного созревания плодов.

Выводы по главе 5

1. Впервые проведена стандартизация травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного по содержанию флавоноидов. Разработаны методики качественного обнаружения флавоноидов в сырье первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного методом ТСХ.

2. Разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом. Содержание суммы флавоноидов в траве первоцвета весеннего находилось в пределах 3,13–5,48%, первоцвета крупночашечного – 3,08–4,25%, что позволило установить норму содержания флавоноидов в траве первоцветов не менее 2%.

Содержание суммы флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного в исследованных образцах дикорастущего вида и культивируемых сортов в пересчете на рутин находится в пределах от 2,37 до 3,25%, что позволило установить норму содержания флавоноидов в листьях хмеля обыкновенного не менее 1,5%.

Разработанные методики количественного определения флавоноидов валидированы, определены параметры правильности, линейности, воспроизводимости; апробированы в ООО «Травы Башкирии», ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств», ОАО «Агрофирма «Ресурсы» (г. Чебоксары).

3. Разработана методика количественного определения кислоты аскорбиновой в сырье первоцвета весеннего спектрофотометрическим методом, основанном на цветной реакции кислоты аскорбиновой с фосфорномолибденовым комплексом. Установлено, что содержание аскорбиновой кислоты составило в сырье первоцвета весеннего от 2,01 до 3,61%, первоцвета крупночашечного – 1,56–3,54%, что позволило установить норму содержания аскорбиновой кислоты в сырье первоцвета весеннего не менее 0,5%.

Разработанная методика количественного определения кислоты аскорбиновой в сырье первоцвета весеннего валидирована, определены параметры правильности, линейности, воспроизводимости; апробирована в ООО «Травы

Башкирии», ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств».

4. Адаптирована методика количественного определения суммы производных ацилфлороглюцидов методом титрования. Содержание суммы производных ацилфлороглюцидов в исследованных образцах дикорастущего вида и культивируемых сортов хмеля обыкновенного составляет от 11,70 до 12,92%, что позволило установить норму содержания суммы производных ацилфлороглюцидов не менее 10%.

5. Проведен товароведческий анализ, определены числовые показатели качества сырья. Для травы первоцвета весеннего, листьев первоцвета весеннего (измельченное и порошкованное сырье) все числовые показатели установлены впервые. Для цельного сырья листьев первоцвета весеннего впервые определены: содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой и раствором спирта этилового 70%; зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте 10%.

Для листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов хмеля обыкновенного (измельченное и порошкованное сырье) все числовые показатели установлены впервые.

6. Определена микробиологическая чистота для сырья первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов (цельное, измельченное и порошкованное сырье). Определено, что исследуемые образцы сырья соответствуют требованиям, предъявляемым к микробиологической чистоте ЛРС, и позволяют отнести их к категории 4А.

7. Установлено содержание радионуклидов в сырье первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов (цельное, измельченное и порошкованное сырье). Определено, что сырье соответствуют санитарным нормам и требованиям ОФС 42-0011-03 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном сырье. Стронций-90, цезий – 137. Отбор проб, анализ, оценка результатов».

8. Исследовано влияние сроков хранения сырья первоцвета весеннего на содержание суммы флавоноидов и кислоты аскорбиновой, листьев хмеля обыкновенного на содержание суммы флавоноидов и производных ацилфлороглюцидов. Установлено, что срок хранения травы первоцвета весеннего составляет 2 года, листьев хмеля обыкновенного – 3 года.

9. Изучена динамика накопления основных групп биологически активных веществ в сырье в зависимости от фазы вегетации растений. Определены рациональные сроки заготовки сырья: для сырья первоцвета весеннего – в период от начала до массового цветения растения; для листьев хмеля обыкновенного в фазу полного созревания соплодий.

10. На основании выполненных исследований разработаны и утверждены ТУ 9700-014-26795008-2005 «Трава первоцвета весеннего (ангро), цельное сырье», разработан и принят к рассмотрению для включения в ГФ XII издания проект ФС «Первоцвета листья». Разработан и подготовлен к рассмотрению проект ФСП «Хмеля обыкновенного листья».

ГЛАВА 6 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЫРЬЯ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО И ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Результаты экспериментальных исследований показали, что доминирующими группами БАВ первоцвета весеннего являются флавоноиды, фенилпропаноиды, органические кислоты, тритерпеновые сапонины, дубильные вещества. В листьях хмеля обыкновенного содержатся флавоноиды и сумма АФГ. Поиск дополнительных источников получения препаратов на основе перечисленных БАВ является актуальной задачей практической фармации [122, 128]. Установлены следующие свойства флавоноидов: антиоксидантные, гепатопротекторные, мембраностабилизирующие, спазмолитические, противоаллергические и др. [10, 117, 185, 332]. Флавоноиды обладают гипохолестеринемической, гипотензивной активностью, способны расширять коронарные сосуды, нормализовать обмен веществ [20, 37, 90]. Производные АФГ обладают антимикробной и желчегонной активностью.

В связи с вышеизложенным перспективной представлялась разработка лекарственных форм, содержащих полифенольные соединения, органические кислоты, тритерпеновые сапонины, АФГ и, предположительно, обладающих антиоксидантным, антигипоксантным, капилляропротекторным, антимикробным и желчегонным действиями.

6.1. Разработка технологии и стандартизация лекарственных форм – густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

6.1.1 Разработка технологии густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Считается, что рациональной лекарственной формой для полифенольных соединений из ЛРС являются водно-спиртовые экстракты [145, 190]. С целью их получения были определены оптимальные условия экстракции суммы флавоноидов, экстрактивных веществ, аскорбиновой кислоты для травы первоцвета весеннего и суммы флавоноидов и АФГ для листьев хмеля обыкновенного (вид экстрагента, степень измельчения сырья, соотношение сырье – экстрагент). Для чего использовали спирт этиловый различных концентраций. Контроль за процессом экстрагирования осуществляли по показателям: содержание суммы экстрактивных веществ (по ГФ XI), содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и кислоты аскорбиновой по разработанным нами методикам для травы первоцвета весеннего (глава 5, разделы 5.1.1 и 5.1.2); содержание суммы флавоноидов и производных АФГ по разработанным и адаптированным нами методикам для сырья хмеля обыкновенного (глава 5, раздел 5.2.1 и 5.2.2).

Результаты определения параметров экстракции травы первоцвета весеннего представлены в таблице 51 и листьев хмеля обыкновенного в таблице 53.

Таблица 51 – Влияние типа экстрагента и степени измельчения на выход основных групп биологически активных веществ из травы первоцвета весеннего

Параметры	Экстрагент			Степень измельчения, мм (экстрагент спирт этиловый 70%)			
	спирт этиловый 40%	спирт этиловый 70%	спирт этиловый 96%	0,5	1,0	2,0	3,0
Экстрактивные вещества	36,8 ± 1,09	44,95 ± 0,96	35,27 ± 0,88	31,53 ± 1,11	44,76 ± 1,12	40,13 ± 1,35	38,79 ± 0,99
Кислота аскорбиновая	2,57 ± 0,08	2,09 ± 0,05	1,14 ± 0,11	1,84 ± 0,04	2,08 ± 0,05	2,05 ± 0,07	1,95 ± 0,07
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	3,87 ± 0,15	4,13 ± 0,17	2,45 ± 0,89	3,77 ± 0,13	4,24 ± 0,13	3,52 ± 0,09	3,08 ± 0,12

Из таблицы 51 следует, что наибольшее количество кислоты аскорбиновой извлекается спиртом этиловым 40%, а экстрактивных веществ и суммы флавоноидов – спиртом этиловым 70%. Учитывая качественный и количественный состав БАВ полученного экстракта, доминирующей группой которого являются полифенольные соединения, нами определен в качестве оптимального экстрагента спирт этиловый 70%. Из данных той же таблицы следует, что оптимальная степень измельчения сырья, при которой обеспечивается максимальный выход изучаемых показателей, составляет 1 мм.

Таблица 52 – Влияние соотношения сырье – экстрагент на выход основных групп биологически активных веществ из травы первоцвета весеннего

Соотношение сырье – экстрагент	Экстрактивные вещества, %	Кислота аскорбиновая, %	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %
1:3	47,15 ± 0,74	2,55 ± 0,05	3,16 ± 0,04
1:5	46,09 ± 0,80	2,34 ± 0,06	4,08 ± 0,07
1:10	44,93 ± 0,91	2,07 ± 0,04	4,22 ± 0,11
1:15	42,85 ± 0,96	1,85 ± 0,04	4,16 ± 0,09
1:20	41,25 ± 0,88	1,45 ± 0,03	4,14 ± 0,06

Как видно из таблицы 52, наибольший выход экстрактивных веществ и кислоты аскорбиновой наблюдается при максимальном содержании сырья в соотношении с экстрагентом. Однако, выход суммы флавоноидов максимален при соотношении 1:10. Поэтому в качестве оптимального было выбрано соотношение сырье – экстрагент 1:10.

Таблица 53 – Влияние типа экстрагента и степени измельчения на выход основных групп биологически активных веществ из листьев хмеля обыкновенного

Параметры	Экстрагент					Степень измельчения, мм (экстрагент спирт этиловый 70%)					
	вода очищенная	спирт этиловый 40%	спирт этиловый 50%	спирт этиловый 70%	спирт этиловый 90%	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	0,47 ±0,02	1,92 ±0,08	3,05 ±0,09	3,23 ±0,11	0,58 ±0,04	1,91 ±0,06	3,08 ±0,05	3,23 ±0,04	2,97 ±0,09	2,56± 0,08	1,84 ±0,07
Сумма АФГ	9,01 ±0,15	11,21 ±0,10	12,03 ±0,13	12,42 ±0,11	7,25 ±0,12	11,64 ±0,11	11,81 ±0,10	12,54 ±0,12	12,32 ±0,09	9,13 ±0,12	7,66 ±0,14

Таблица 54 – Влияние соотношения сырье – экстрагент на выход основных групп биологически активных веществ из листьев хмеля обыкновенного

Соотношение сырье – экстрагент	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, %	Сумма АФГ, %
1:3	2,79±0,11	9,15±0,16
1:5	2,98±0,10	11,79±0,18
1:10	3,21±0,08	12,45±0,11
1:15	3,15±0,09	11,86±0,13
1:20	2,65±0,12	10,88±0,15

Результаты исследования свидетельствуют о максимальном извлечении суммы флавоноидов и АФГ при использовании в качестве экстрагента раствора спирта этилового 70% и измельчении сырья до 2–3 мм. Оптимальное соотношение сырья и экстрагента составляет 1:10.

Перед процессом экстрагирования необходимо провести подготовку растительного сырья – определить его технологические свойства. Нами были определены основные технологические свойства травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. Результаты представлены в таблице 55.

Важным в технологии экстрактов является выбор способа экстрагирования сырья, который определяет полноту выхода БАВ. Также показателями эффективности метода являются продолжительность процесса и затраты экстрагента [3, 30, 65, 66, 67, 122, 128, 161]. Для оптимизации технологического процесса нами были сравнительно изучены традиционные методы экстрагирования, применяемые при получении густых экстрактов: ремацерация, перколяция и реперколяция [70, 118].

Ремацерацию проводили в два этапа (бисмацерация), продолжительность первого этапа составляла трое суток, второго этапа – 24 часа. Полученные вытяжки объединяли.

Таблица 55 – Технологические свойства травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Показатель	Трава первоцвета весеннего	Листья хмеля обыкновенного
Насыпная масса (Нμ), г/см^3	0,208	0,230
Угол естественного откоса (φ),^{o}	20	32
Степень набухания в воде	2,446	2,520
Степень набухания в спирте этиловом 70%	0,443	2,101
Коэффициент поглощения воды	3,447	3,521
Коэффициент поглощения в спирте этиловом 70%	1,443	3,102
Влажность,%	10	8

Перколяцию осуществляли по традиционной схеме [70, 118, 175].

Реперколяцию проводили, используя батарею из трех перколяторов, по схеме завершенного цикла.

Полученные перечисленными методами извлечения отстаивали при температуре 8°С в течение трех суток, фильтровали для отделения липофильных и смолистых веществ. Затем упаривали на роторном испарителе модели «ИР-1М» для получения ГЭТПВ и ГЭЛХО с влажностью не более 25%.

Для оценки эффективности экстрагирования использовали следующие показатели: содержание кислоты аскорбиновой и суммы флавоноидов для травы первоцвета; суммы флавоноидов и АФГ для листьев хмеля обыкновенного. Определение количественного содержания указанных БАВ проводили по разработанным методикам (глава 5, разделы 5.1.1, 5.1.2, 5.2.1, 5.2.2). Результаты исследований представлены в таблицах 56 и 57.

Таблица 56 – Влияние метода экстрагирования на выход основных групп биологически активных веществ из травы первоцвета весеннего

Метод экстрагирования	Аскорбиновая кислота,%	Сумма флавоноидов,%
Бисмацерация	3,04 ± 0,06	7,00 ± 0,08
	2,95 ± 0,08	6,44 ± 0,10
	2,59 ± 0,09	5,88 ± 0,12
Перколяция	3,45 ± 0,05	7,68 ± 0,09
	3,50 ± 0,06	7,50 ± 0,10
	3,61 ± 0,07	7,39 ± 0,07
Реперколяция	3,21 ± 0,04	6,47 ± 0,08
	3,16 ± 0,06	7,05 ± 0,09
	2,88 ± 0,08	6,80 ± 0,10

Таблица 57 – Влияние метода экстрагирования на выход основных групп биологически активных веществ из листьев хмеля обыкновенного

Метод экстрагирования	Выход суммы флавоноидов,%	Выход суммы АФГ,%
Бисмацерация	2,23 ± 0,09	11,81 ± 0,11
	2,26 ± 0,13	10,42 ± 0,15
	1,75 ± 0,15	11,13 ± 0,09
Перколяция	3,35 ± 0,09	12,42 ± 0,07
	3,12 ± 0,11	12,91 ± 0,13
	2,88 ± 0,07	12,62 ± 0,15
Реперколяция	3,15 ± 0,09	11,15 ± 0,17
	2,43 ± 0,15	10,73 ± 0,18
	2, 26 ± 0,13	9,48 ± 0,16

В ходе проведенных исследований определено, что оптимальным методом экстрагирования травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного является перколяция. Эффективность экстрагирования перколяцией составляет 96%.

Схема получения ГЭТПВ и ГЭЛХО в лабораторных условиях представлена на рисунке 54.

Были определены органолептические, физико-химические и технологические свойства полученных экстрактов. ГЭТПВ представляет собой густую вязкую массу темно-зеленого цвета со специфическим запахом, горьковатого вкуса. Густой экстракт из травы первоцвета весеннего хорошо растворим в воде, спирте этиловом, не растворим в эфире, хлороформе, бутаноле, этилацетате. Влажность составляет 24,5%.

Густой экстракт из листьев хмеля обыкновенного представляет собой густую вязкую массу темно-зеленого цвета со специфическим запахом, горьковатого вкуса. Экстракт умеренно растворим в воде с образованием мутного раствора (1г ГЭЛХО растворяется в 10 мл теплой воды с образованием мутного раствора), спирте этиловом, не растворим в эфире, хлороформе, бутаноле, этилацетате. Влажность составляет 24,5%.

Рисунок – 54. Схема получения густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

6.1.2 Стандартизация густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Стандартизация густого экстракта из травы первоцвета весеннего по содержанию суммы флавоноидов

Качественное обнаружение полифенольных соединений в ГЭТПВ методом ТСХ

Для качественного анализа ГЭТПВ использовали метод ТСХ восходящим способом на пластинках марки «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ или аналогичного качества) в системах растворителей: спирт бутиловый – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2), этилацетат-кислота муравьиная – вода (70:15:15) [67]. Для этого использовали 0,5% раствор ГЭТПВ, СО рутина, гиперозида в спирте этиловом 70%. Пластинки просматривались в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме стандартного образца рутина обнаруживалась темно-коричневая зона рутина с R_f около 0,65–0,75, принятая за R_S=1,0. На хроматограмме испытуемого раствора ГЭТПВ определялась темно-коричневая зона адсорбции с R_S (по рутину) около 1,0 и темно-коричневая зона с R_S (по рутину) около 1,1 (гиперозид).

Количественное определение суммы флавоноидов в ГЭТПВ методом дифференциальной спектрофотометрии

Дифференциальный спектр спиртового раствора ГЭТПВ имел максимум поглощения при длине волны 410 нм, что практически совпало с максимумом поглощения раствора СО рутина. Поэтому количественное определение суммы флавоноидов проводили при λ=410 нм.

Для этого точную навеску ГЭТПВ (0,5 г) растворяли в 80 мл спирта этилового 70% в мерной колбе объемом 100 мл и доводили указанным растворителем до метки. 2 мл спиртового раствора ГЭТПВ переносили в мерную колбу объемом 25 мл и анализировали по методике, приведенной в главе 5 (раздел 5.1.1). Данной методикой было проанализировано 5 серий по пять об-

разцов ГЭТПВ (таблице 58). Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 3,19%.

Таблица 58 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в густом экстракте из травы первоцвета весеннего

n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	Еотн
5	7,31	0,00300	0,05477	95	2,78	0,15227	2,08%
5	7,19	0,00512	0,07155	95	2,78	0,19892	2,77%
5	6,93	0,00200	0,04472	95	2,78	0,12432	1,79%
5	6,68	0,00588	0,07668	95	2,78	0,21317	3,19%
5	7,19	0,00448	0,06693	95	2,78	0,18607	2,58%

Результаты исследований показали, что содержание суммы флавоноидов в ГЭТПВ находится в пределах от 6,68 до 7,31%.

Стандартизация густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного по содержанию суммы флавоноидов

Качественное обнаружение полифенольных соединений в ГЭЛХО

Качественный анализ ГЭЛХО проводили методами ТСХ на пластинках «Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А-УФ) с применением достоверных образцов свидетелей (глава 5, раздел 5.2.1). Для этого использовали 0,5% раствор ГЭЛХО в растворе спирта этилового 70% и 0,1% спиртовые растворы СО флавоноидных соединений, различные хроматографические системы растворителей, описанные в главе 5 (раздел 5.2.1). Хроматограммы просматривали в УФ-свете при λ=254 нм. На хроматограмме определялись три зоны адсорбции, одна из которых темно-коричневого цвета на уровне зоны ГСО рутина с R_f 0,33, вторая темно-коричневого цвета с R_s около 0,68, третья – светло-бурого цвета с R_s около 0,56.

Количественное определение суммы флавоноидов в ГЭЛХО

Дифференциальный спектр спиртового раствора ГЭЛХО имел максимум поглощения при длине волны 410 нм, что совпало с максимумом поглощения

раствора ГСО рутина, поэтому количественное определение суммы флавоноидов проводили при λ = 410 нм.

Для этого точную навеску ГЭЛХО (0,5 г) растворяли в 80 мл спирта этилового 70% в мерной колбе объемом 100 мл и доводили указанным растворителем до метки. 5 мл спиртового раствора ГЭЛХО переносили в мерную колбу объемом 25 мл и анализировали по методике, приведенной в главе 5 (раздел 5.2.1). Данной методикой было проанализировано 5 серий по пять образцов ГЭЛХО (таблица 59). Ошибка единичного определения с 95% вероятностью не превышает 3,23%.

На основании проведенных исследований разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в густом экстракте из листьев хмеля обыкновенного.

Таблица 59 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) в густом экстракте из листьев хмеля обыкновенного

n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P, f)	Δx	E отн., %
5	3,32	0,00128	0,03578	95	2,78	0,09946	2,99
5	4,73	0,00092	0,03033	95	2,78	0,08432	1,78
5	5,96	0,00148	0,03847	95	2,78	0,10694	1,80
5	5,25	0,00412	0,06419	95	2,78	0,17844	3,39
5	6,51	0,00448	0,06693	95	2,78	0,18607	2,86

Из данных таблицы 59 видно что, содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в образцах ГЭЛХО составляет от 3,32 до 6,51%.

Для возможного дальнейшего внедрения ГЭЛХО в медицинскую практику необходимо проведение исследований по изучению его биологической активности.

6.2 Разработка технологии получения и стандартизация лекарственной формы гранул на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

6.2.1 Разработка технологии получения гранул на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

С целью получения гранул из густого экстракта первоцвета весеннего и густого экстракта хмеля обыкновенного их высушивали в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60°С до остаточной влажности 5%. Полученный высушенный экстракт первоцвета весеннего представляет собой аморфный темно-коричневый порошок, гигроскопичный, со слабым слегка медовым запахом; вкус сначала сладкий, затем горьковатый. Высушенный экстракт из листьев хмеля обыкновенного представляет собой аморфный темно-коричневый порошок, гигроскопичный. Запах специфический хмелевой, вкус горький, слегка вяжущий.

Далее проведены исследования по разработке технологии гранул на основе ГЭТПВ и ГЭЛХО и стандартизации полученных гранул по основным параметрам, предъявляемым к этой лекарственной форме [65, 66, 67, 70, 153].

При подборе наполнителей в производстве гранул сравнительно изучались крахмал картофельный, лактоза и глюкоза. Готовили смеси указанных наполнителей с высушенными экстрактами в различных соотношениях. Экспериментально определено, что оптимальным наполнителем является лактоза, соотношение лактозы и высушенного экстракта составило 1:1.

Для выбора оптимальной связывающей жидкости, необходимой для приготовления гранул из исследуемых густых экстрактов, изучали водные растворы крахмала (5% раствор), метилцеллюлозы (3% раствор), желатина (1% раствор), сахарный сироп, воду очищенную и спирт этиловый 70%. Для получения массы для гранулирования смесь высушенного экстракта и лактозы увлажняли вышеперечисленными жидкостями. Пригодной для гранулирова-

ния выбирали увлажненную нелипкую массу, однородную, обладающую хорошей пластичностью. Результаты представлены в таблице 60.

Таблица 60 Результаты исследований по выбору гранулирующей жидкости

№ п/п	Вид гранулирующей жидкости	Результаты
1	Вода очищенная	Вязкая, клейкая, оплывающая, плохо гранулируемая масса
2	Раствор крахмала 5%	Вязкая, клейкая, оплывающая, плохо гранулируемая масса
3	Раствор метилцеллюлозы 3%	Вязкая, клейкая, оплывающая, плохо гранулируемая масса
4	Раствор желатина 1%	Вязкая, клейкая, оплывающая, плохо гранулируемая масса
5	Сироп сахарный	Вязкая, клейкая, оплывающая, плохо гранулируемая масса
6	Этиловый спирт 70%	Пластичная неклейкая масса, пригодная для гранулирования

Результаты сравнительного изучения гранулирующих жидкостей показали, что спирт этиловый 70% наиболее подходит для увлажнения высушенных экстрактов.

Нами были разработаны технологии гранул из ГЭТПВ и ГЭЛХО, состоящая из этапов: предварительно высушенные лактозу и высушенные экстракты просеивали через сито № 35, смешивали до однородности, добавляли постепенно при постоянном быстром перемешивании спирт этиловый 70%, готовую пластичную массу продавливали через сито из нержавеющей стали с диаметром отверстий 2 мм. Влажные гранулы сушили тонким слоем в вытяжном шкафу, просеивали с целью отделения мелких и крупных фракций и упаковывали в банки из темного стекла, герметично закрывали.

На рисунке 54 представлена технологическая схема получения гранул на основе исследуемых густых экстрактов.

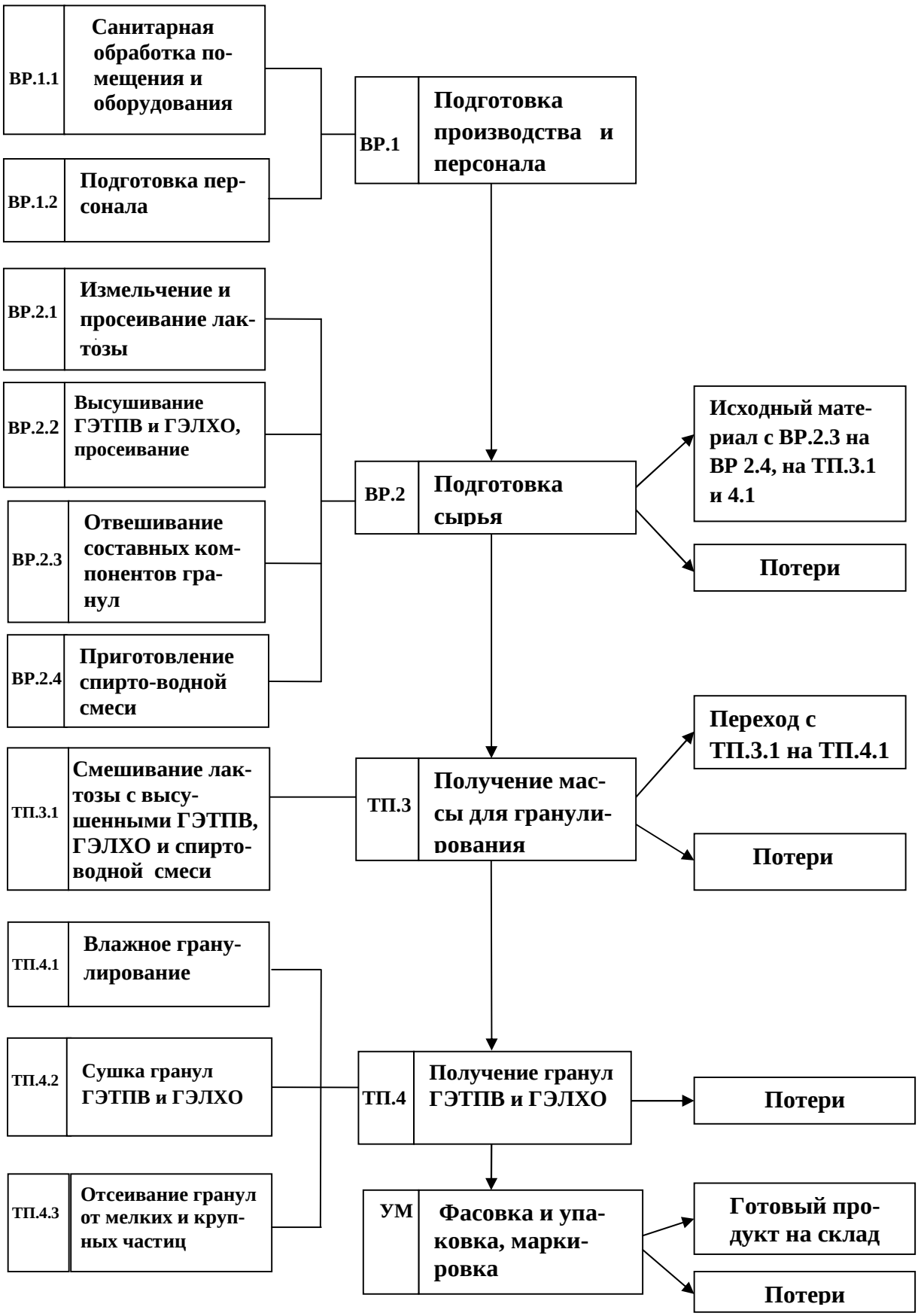


Рисунок 54 – Технологическая схема получения гранул на основе исследуемых густых экстрактов

6.2.2 Стандартизация гранул на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Стандартизация гранул на основе густого экстракта из травы первоцвета весеннего

Стандартизация гранул ГЭТПВ, определение условий хранения и срока годности. Полученные гранулы ГЭТПВ представляют собой крупинки круглой, цилиндрической и неправильной формы, однородные, светло-коричневого цвета, с приятным специфическим запахом, горьковатого вкуса. Гранулы ГЭТПВ хорошо растворимы в воде, в спирте этиловом 70%, нерастворимы в эфире, хлороформе, бутаноле, этилацетате.

Количественное определение кислоты аскорбиновой и суммы флавоноидов проводили по методикам, описанным в главе 6 (разделы 6.1.2, 6.1.3).

Таблица 61 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в гранулах из густого экстракта травы первоцвета весеннего

n	x ср.	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	Eотн
5	6,23	0,00148	0,03847	95	2,78	0,10695	1,71%
5	5,85	0,00132	0,03633	95	2,78	0,10100	1,73%
5	5,75	0,00228	0,04774	95	2,78	0,13274	2,31%
5	5,86	0,00180	0,04243	95	2,78	0,11794	2,01%
5	7,19	0,00328	0,05727	95	2,78	0,15921	2,21%

По результатам исследований следует, что содержание суммы флавоноидов в гранулах ГЭТПВ находится в пределах от 5,75 до 6,27% (таблица 61).

Различные серии гранул исследовали и стандартизировали для определения подлинности, срока и условий хранения. На лабораторном идентификаторе процесса распадаемости марки «545Р-АК-1» определяли время распадаемости гранул ГЭТПВ. Прочность гранул на истирание определяли на барабан-

ном истирателе (фриабиляторе), тест «растворение» – на приборе типа «вращающаяся корзинка» марки «545Р-АК-7». Сыпучесть определяли – на виброустройстве марки «ВП 12А», фракционный состав – ситовым анализом, влажность по ГФ XII изд. Количество перешедших в раствор флавоноидов определяли в соответствии с методикой, разработанной нами для ГЭТПВ (глава 5, раздел 5.2.1). Результаты представлены в приложении 45, 46.

Определение микробиологической чистоты полученных гранул проводили по ОФС 42-0067-07, ГФ XII изд., часть 1, категория 3А. Результаты исследований показали, что по числу аэробных бактерий, общему числу грибов и отсутствию *Escherichia coli* микробиологическая чистота отвечает требованиям фармакопеи.

Как видно из представленных данных, разработанные гранулы отвечают требованиям ГФ СССР XI изд. (вып. 2, с. 139) по показателям качества. Для сохранения прочности гранул содержание остаточной влаги рекомендовано в пределах 8–10%. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в гранулах установлено от 5,75 до 6,27%.

Контроль стабильности гранул ГЭТПВ в процессе хранения и установление сроков годности проводили по количественному содержанию действующих веществ (суммы флавоноидов в пересчете на рутин), времени распадаемости, содержанию влаги, прочности, микробиологической чистоте. Результаты исследований представлены в приложении 46.

Результаты анализа 5 серий препаратов, помещенных в банки из темного стекла с винтовой горловиной типа БВ-100-40-ОС-1, навинчиваемыми полиэтиленовыми крышками с прокладками по ОСТ 64-2-87-81 и хранившихся в сухом месте при комнатной температуре, представлены в приложении 31. Срок годности гранул ГЭТПВ на основании полученных данных установлен 2 года. Способ применения: одну чайную ложку гранул, содержащую около 2 г ГЭТПВ, растворить в 1/2 стакана теплой воды (100 мл) и принимать внутрь 2–3 раза в день.

Стандартизация гранул на основе густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного

Стандартизация гранул ГЭЛХО, определение условий хранения и срока годности. Полученные гранулы ГЭЛХО представляют собой крупинки круглой, цилиндрической и неправильной формы, однородные, светло-коричневого цвета, с приятным специфическим запахом, горьковатого вкуса. Гранулы ГЭЛХО хорошо растворимы в воде, в спирте этиловом 70%, не растворимы в эфире, хлороформе, бутаноле, этилацетате.

Количественное определение суммы флавоноидов проводили по методикам, описанным в главе 6 (раздел 6.1.3).

Таблица 62 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в гранулах из густого экстракта листьев хмеля обыкновенного

n	X ср.	S^2	S	P, %	t (P, f)	Δ x	Еотн.
5	2,83	0,00100	0,03162	95	2,78	0,08791	3,11%
5	4,14	0,00172	0,04147	95	2,78	0,11529	2,79%
5	5,05	0,00448	0,06693	95	2,78	0,18607	3,69%
5	4,42	0,00188	0,04336	95	2,78	0,12054	2,72%
5	5,46	0,00228	0,04775	95	2,78	0,13274	2,43%

По результатам исследований следует, что содержание суммы флавоноидов в гранулах ГЭЛХО находится в пределах от 2,83 до 5,46% (таблица 62).

Различные серии гранул исследовали и стандартизировали для определения подлинности, срока и условий хранения. Изучались следующие показатели качества гранул ГЭЛХО: время распадаемости, прочность гранул, тест «растворение», сыпучесть, фракционный состав, содержание влаги, микробиологическая чистота. Количество перешедших в раствор флавоноидов определяли в соответствии с методикой, разработанной нами для ГЭЛХО (глава 5, раздел 5.2.1). Результаты представлены в приложениях 47, 48.

Определение микробиологической чистоты полученных гранул проводили по ОФС 42-0067-07, ГФ XII изд., часть 1, категория 3А. Результаты исследований показали, что по числу аэробных бактерий, общему числу грибов и отсутствию *Escherichia coli* микробиологическая чистота гранул ГЭЛХО отвечает требованиям фармакопеи.

Как видно из представленных данных, разработанные гранулы отвечают требованиям ГФ СССР XI изд. (вып. 2, с. 139) по показателям качества. Для сохранения прочности гранул содержание остаточной влаги рекомендовано в пределах 8–10%. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в гранулах установлено от 2,83 до 5,46%.

Контроль стабильности гранул ГЭЛХО в процессе хранения и установление сроков годности проводили по количественному содержанию действующих веществ (суммы флавоноидов в пересчете на рутин; суммы АФГ), времени распадаемости, содержанию влаги, прочности, микробиологической чистоте.

Результаты анализа 5 серий препаратов, помещенных в банки из темного стекла с винтовой горловиной типа БВ-100-40-ОС-1, навинчиваемыми полиэтиленовыми крышками с прокладками по ОСТ 64-2-87-81 и хранившихся в сухом месте при комнатной температуре, представлены в приложении 44. Срок годности гранул ГЭЛХО на основании полученных данных установлен 3 года. Способ применения: одну чайную ложку гранул, содержащую около 2 г ГЭЛХО, растворить в 1/2 стакана теплой воды (100 мл) и принимать внутрь 2–3 раза в день.

6.3 Исследование фармакологических свойств экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Проведенные нами фитохимические исследования показали, что полученные нами густые экстракты из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля

обыкновенного содержат богатый комплекс БАВ: флавоноиды, дубильные вещества, фенилпрованоиды и фенолокислоты. Экстракт из травы первоцвета весеннего дополнительно содержит полиметоксилированные флавоноиды и тритерпеновые сапонины; экстракт из листьев хмеля обыкновенного дополнительно содержит фитоэстрогены, ресвератрол, производные ацилфлороглюцидов.

На основании данных литературы и результатов проведенного нами фитохимического исследования сделано предположение, что ГЭТПВ будет обладать антигипоксантным, ангиопротекторным, эндотелиопротекторным действиями и антиоксидантной активностью. У ГЭЛХО представляло интерес определить антигипоксантную, антиоксидантную, ноотропную активность; а также изучить влияние ГЭЛХО на деятельность ЦНС.

6.3.1. Исследование острой токсичности густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

В серии предварительных опытов была изучена острая токсичность ГЭТПВ и ГЭЛХО по методике, описанной в главе 2, раздел 2.2.8.

ГЭТПВ и ГЭЛХО в указанных дозах растворяли в воде очищенной, вводили животным и наблюдали за ними в течение 14 дней, оценивая клиническую картину интоксикации. В результате проведенных исследований по изучению острой токсичности исследуемых экстрактов ГЭТПВ и ГЭЛХО во всех указанных дозах гибели экспериментальных животных в течение всего периода наблюдения не отмечалось. Исследуемые экстракты в указанных дозах не вызывали никаких признаков интоксикации, все животные были живы, подвижны, имели хороший аппетит.

Максимальная доза введения ГЭТПВ и ГЭЛХО составила 3000 мг/кг, из-за невозможности дальнейшего введения их per os. Таким образом, LD_{50} в проведенных опытах не определена, так как при введении максимально допустимой дозы по объему вводимого экстракта, гибели животных не наблюдалось.

Таким образом, согласно полученным данным исследуемые экстракты ГЭТПВ и ГЭЛХО можно отнести к группе V класса токсичности «Практически нетоксично» согласно классификации Е.А. Лужникова [108].

6.3.2 Изучение антигипоксантного действия густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

Гипоксия, или кислородная недостаточность, развивается в организме при действии экстремальных факторов (гиподинамии и др.) и при различных патологических состояниях (инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, бронхиальная астма, черепно-мозговые травмы, сахарный диабет и т. д.). Изучение растительных средств с антигипоксантной активностью и внедрение их в медицинскую практику представляет большой интерес.

Многочисленные фармакологические эффекты лекарственных растений связаны с наличием в них различных БАВ, в том числе и компонентов цикла лимонной кислоты, которые в сочетании с витаминами и микроэлементами вмешиваются в процессы биоэнергетики и повышают устойчивость организма к гипоксии [140].

В связи с этим были проведены исследования по изучению антигипоксантной активности ГЭТПВ.

Исследование противогипоксических свойств при профилактическом введении изучаемых экстрактов проводили по методике описанной в главе 2, раздел 2.2.8.

Для этого были сформированы 6 групп экспериментальных животных по 8 в каждой: I группа – интактный контроль, II группа – животные, получавшие воду очищенную, III группа – животные, получавшие препарат сравнения дигидрохлорид триметазидина («Предуктал»), IY группа – животные, получавшие водный раствор ГЭТПВ, Y группа – животные, получавшие водный раствор ГЭЛХО, YI группа – животные, получавшие препарат сравнения природного происхождения (экстракт плодов боярышника). Исследуемые растворы вводили животным 14 дней. Исследуемые экстракты вводились в дозе 21 мг/кг

в виде водного раствора (выбор дозы основан на суточной норме потребления в пересчете на рутин). В качестве препарата сравнения использовали предуктал в дозе 1 мг/кг.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 63.

Таблица 63 – Влияние густых экстрактов травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного при нормобарической гипоксии с гиперкапнией (M±m)

№ п/п	Группа животных	n	Время выживания, мин	МДА, нМоль/мг
1	Интактный контроль	8	–	0.098 ± 0.004
2	Контроль (гипоксия)	8	17.0 ± 1.1	0.165 ± 0.007*
3	Получавшая дигидрохлорид триметазидина («Предуктал»)	8	25.3 ± 2.0#	0.142 ± 0.005*#
4	Получавшая ГЭТПВ	8	36.4 ± 3.8#	0.134 ± 0.008*
5	Получавшая ГЭЛХО	8	42.0 ± 2.3#	0.121 ± 0.010#
6	Получавшая экстракт из плодов боярышника	8	29.8 ± 2.7#	0.110 ± 0.003*#

* – МДА достоверно по отношению к интактному контролю, p<0,05;

#– достоверно по отношению к контрольной (гипоксия) группе, p<0,05.

Из данных таблицы видно, что продолжительность жизни животных в условиях экспериментальной нормобарической гипоксии с гиперкапнией составляла 17.0±1.1 мин (контроль гипоксия). Введение экспериментальным животным всех исследуемых экстрактов и препаратов сравнения (предуктал и отвар плодов боярышника) в течение 14 дней достоверно увеличивало время выживания. Продолжительность жизни животных, получавших растворы ГЭЛХО и ГЭТПВ, была в 2.5 и 2.1 раза соответственно выше, чем в группе

контроля (гипоксия). ГЭЛХО повышал выживаемость животных лучше, чем препараты сравнения «Предуктал» и экстракт из плодов боярышника.

Результаты исследований показали, что нормобарическая гипоксия с гиперкапнией сопровождалась увеличением МДА в клетках головного мозга экспериментальных животных.

Уровень МДА в тканях головного мозга в группах животных, получавших исследуемые растворы ГЭТПВ, ГЭЛХО и препараты сравнения – «Предуктал» и экстракт из плодов боярышника, достоверно был ниже, чем в группе животных контроль (гипоксия). Уровень МДА в клетках головного мозга в группах животных, получавших экстракт из плодов боярышника и ГЭЛХО, был достоверно ниже, чем в группе животных, получавших предуктал. Таким образом, проведенные исследования выявили наличие антигипоксантного действия у исследуемых экстрактов.

6.3.3 Изучение антиоксидантных свойств густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного

В последние годы отмечен широкий интерес к препаратам с антиоксидантной активностью. Нарушение процессов перекисного и свободнорадикального окисления, особенно липидов, лежит в основе патогенеза практически всех заболеваний, в частности, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, атеросклероза, инсульта, токсических поражений печени, онкологических заболеваний [15, 97, 134, 190, 191].

Известны фармакологические препараты, являющиеся синтетическими аналогами природных антиоксидантов (α-токоферол, аскорбиновая кислота, пропиловый, октиловый и додециловый эфиры галловой кислоты) и большая группа искусственных антиокислителей на основе серусодержащих и фенольных соединений (дибунол, бутилоксианизол) [156]. Перечень фармакопейных средств, используемых как антиоксиданты, весьма ограничен – это лишь аскорбиновая кислота (причем в единственной форме – L аскорбата), витамин Е (и, как правило, только α-токоферол), отдельные биофлавоноиды – кверцетин,

рутин. Синтетические фенолы не нашли широкого применения в лечебной практике. Отчасти это связано с наличием у некоторых из них побочных действий и определенной токсичности.

Перспективными антиоксидантами являются препараты, изготовленные из природного сырья. Их действие обусловлено синергическим эффектом входящих в них биологически активных соединений [151, 152, 253].

В последние годы отмечены антиоксидантные свойства у растений, содержащих протоантоцианидины и антоцианы [285, 341], халконы [114, 228], танины [114, 273, 294], дитерпеновые и тритерпеновые соединения [313]. Причем предпочтение отдается не индивидуальным веществам с антиоксидантной активностью, а экстракционным препаратам из растительного сырья [42, 115].

Таким образом, расширение арсенала природных антиоксидантных средств является актуальной задачей.

В ходе проведенного нами информационно-аналитического поиска сведения об антиоксидантной активности травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного не обнаружены. Известны антиоксидантные свойства соплодий хмеля обыкновенного, что используется в медицинской практике, пищевой и пивоваренной промышленностях. В связи с этим, исследование антиоксидантных свойств изучаемых экстрактов представлял интерес.

С целью определения общей антиоксидантной активности нами применены тест-системы, инициирующие СРО – образование АФК и ПОЛ, процессы, непрерывно протекающие в организме человека [59, 274, 278, 315].

Для этого использовали хемилюминесцентный (ХЛ) анализ, методика выполнения которого изложена в главе 2, раздел 2.2.8.

Исследуемые экстракты разводили в физиологическом растворе, отбирали от 0.05 мл до 1.0 мл раствора и прибавляли в тест-системы.

В 20 мл указанных модельных систем вводили 1% растворы исследуемых экстрактов в различных дозах (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 и 1,0 мл, что в пересчете на густой экстракт соответствует: 0,5 мг; 1,0 мг; 2 мг; 3 мг; 5 мг и 10 мг). Число опытов для каждой модельной системы составляло 6.

Изучение антиоксидантных свойств густого экстракта из травы первоцвета весеннего

Исследования влияния ГЭТПВ на Fe^{2+} -индуцированную хемилюминесценцию в тест-системе, генерирующей АФК представлены на рисунке в приложении 49, в таблице 63.

Прибавление сульфата железа (II) в тест-систему вызывало быструю вспышку, за которой возникала медленная вспышка свечения. Более информативным, интегральным показателем ХЛ является светосумма свечения (S_L), определяемая за выбранный промежуток времени, а также максимальная интенсивность свечения – H_L [192]. Из данных хемилюминограммы видно, что прибавление в тест-систему раствора ГЭТПВ приводило к дозозависимому угнетению свечения, что говорит о зависимости интенсивности ХЛ и СРО.

По данным таблицы 64 и приложения 49 видно, что снижение показателей светосуммы и амплитуды свечения отмечалось при прибавлении раствора ГЭТПВ в дозах от 0.1 мл до 1 мл, а максимальное снижение их – при дозе 0.5 мл раствора исследуемого экстракта.

Таблица 64 – Показатели хемилюминесценции в тест-системе, генерирующей активные формы кислорода

Доза раствора ГЭТПВ, мл (количество высушенногоэкстракта, мг)	Показатели хемилюминесценции	
	S_L	H_L
0.05 мл (0,5 мг)	38.74 ± 0.85*	19.24 ± 0.61*
0.1 мл (1 мг)	34.94 ± 1.21*	17.04 ± 0.74*
0.2 мл (2 мг)	24.86 ± 1.05*	16.88 ± 0.92*
0.3 мл (3 мг)	24.65 ± 0.96*	14.54 ± 1.01*
0.5 мл (5 мг)	23.72 ± 0.72*	13.57 ± 0.84*
1 мл (10 мг)	27.24 ± 0.84*	12.69 ± 0.60*
Контроль (модельные системы без ГЭТПВ)	36.35 ± 0.84	18.52 ± 0.65

Показатели S_L и H_L выражены в у. е. от контрольных опытов.

* $p<0,05$ – статистически достоверные различия между контролем и опытом.

Исследования влияния ГЭТПВ на Fe^{2+}-индуцированную хемилюминесценцию в тест-системе, имитирующей ПОЛ в суспензии липосом, представлены на рисунке в приложении 50, в таблице 65.

Таблица 65 – Показатели хемилюминесценции в модельной системе с липосомами

Доза раствора ГЭТПВ, мл (количество высушенного экстракта, мг)	Показатели хемилюминесценции	
	S_L	H_L
0.05 мл (0,5 мг)	235.40 ± 1.01*	38.87 ± 0.58*
0.1 мл (1 мг)	217.18 ± 0.86*	38.62 ± 0.79*
0.2 мл (2 мг)	205.67 ± 0.35*	43.52 ± 0.85*
0.3 мл (3 мг)	199.64 ± 0.74*	41.77 ± 0.70*
0.5 мл (5 мг)	127.71 ± 0.92*	22.81 ± 0.95*
1 мл (10 мг)	72.74 ± 0.75*	11.60 ± 0.67*
Контроль (модельные системы без ГЭТПВ)	273.74 ± 0.65	42.22 ± 0.53

Показатели S_L и H_L выражены в у. е. от контрольных опытов.

* $p<0,05$ – статистически достоверные различия между контролем и опытом.

Результаты проведенных исследований, представленные в таблицах 64, 65 и на рисунках в приложениях 49, 50 показали, что добавление в тест-системы с разными антиоксидантными статусами, раствора ГЭТПВ вызывает угнетение основных параметров ХЛ – светосуммы и амплитуды свечения. Был отмечен статистически значимый антиоксидантный эффект при введении раствора ГЭТПВ в дозах 0.1–1 мл, а в системе с липосомами – 0.05–1 мл по сравнению с контролем. Кроме того, отмечено, что в тест-системе, генерирующей АФК, максимальное снижение показателей ХЛ наблюдалось при добавлении раствора ГЭТПВ в дозе 0.5 мл; а в тест – системе с липосомами повышение дозы раствора ГЭТПВ усиливало антиоксидантный эффект.

Таким образом, раствор ГЭТПВ в различных тест-системах проявлял прямое антиоксидантное действие. На что получен патент на изобретение № 2342942 от 10.01.2009 «Средство растительного происхождения, обладающее антиоксидантной активностью» [141].

Изучение антиоксидантных свойств густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного

Исследования влияния ГЭЛХО на Fe^{2+} – индуцированную хемилюминесценцию в тест – системе, генерирующей АФК представлены на рисунке в приложении 51, в таблице 66.

По данным таблицы 66 и рисунка приложения 51 видно, что снижение показателей светосуммы и амплитуды свечения отмечалось при прибавлении раствора ГЭЛХО во всех дозах от 0.05 мл до 1 мл, а максимальное снижение их – при дозе 1 мл раствора исследуемого экстракта.

Исследования влияния ГЭТПВ на Fe^{2+} – индуцированную хемилюминесценцию в тест-системе, имитирующей ПОЛ в суспензии липосом, представлены на рисунке в приложении 52, в таблице 67.

Таблица 66 – Показатели хемилюминесценции в тест-системе, генерирующей активные формы кислорода

Доза раствора ГЭЛХО, мл (количество высушенного экстракта, мг)	Показатели хемилюминесценции	
	S_L	H_L
0.05 мл (0,5 мг)	16.05 ± 0,15*	2.28 ± 0.11*
0.1 мл (1 мг)	8.50 ± 0,11*	1.97 ± 0.14*
0.2 мл (2 мг)	8.60 ± 0,05*	1.80 ± 0.12*
0.3 мл (3 мг)	6.78 ± 0,16*	1.56 ± 0.11*
0.5 мл (5 мг)	6.51 ± 0,12*	1.45 ± 0.14*
1 мл (10 мг)	3.53 ± 0,14*	0.67 ± 0.10*
Контроль (модельные системы без ГЭЛХО)	19.35 ± 0.14	8.85 ± 0.15

Показатели S_L и H_L выражены в у. е. от контрольных опытов.

* $p<0,05$ – статистически достоверные различия между контролем и опытом.

Таблица 67 – Показатели хемилюминесценции в модельной системе с липосомами

Доза раствора ГЭЛХО, мл (количество высушенного экстракта, мг)	Показатели хемилюминесценции	
	S_L	H_L
0.05 мл (0,5 мг)	16.01 ± 0.11*	1.76 ± 0.18*
0.1 мл (1 мг)	15.80 ± 0.16*	1.45 ± 0.19*
0.2 мл (2 мг)	14.70 ± 0.15*	1.32 ± 0.15*
0..3 мл (3 мг)	11.00 ± 0.14*	0.94 ± 0.10*
0.5 мл (5 мг)	9.85 ± 0.12*	0.86 ± 0.15*
1 мл (10 мг)	6.18 ± 0.15*	0.43 ± 0.17*
Контроль (модельные системы без ГЭЛХО)	89.00 ± 0.15	17.60 ± 0.13

Показатели S_L и H_L выражены в у. е. от контрольных опытов.

* $p<0,05$ – статистически достоверные различия между контролем и опытом.

Результаты исследований в тест-системе с липосомами (таблица 67 и рисунок приложения 52) видно также показали уменьшение показателей S_L и H_L при добавлении раствора ГЭЛХО во всех дозах от 0.05 мл до 1 мл, а максимальное снижение указанных показателей – при дозе 1 мл раствора исследуемого экстракта.

Полученные данные показали, раствор ГЭЛХО в дозах 0,05–1 мл в обеих тест-системах достоверно угнетал основные параметры ХЛ – светосуммы и амплитуды свечения по сравнению с контрольными образцами. При этом, отмечено, что с увеличением дозы раствора ГЭЛХО антиоксидантный эффект усиливался.

Таким образом, раствор ГЭЛХО в различных тест-системах проявлял прямое антиоксидантное действие. На что получен патент на изобретение № 2372931 от 20.11.2009 «Антиоксидантное средство растительного происхождения» [142].

6.3.4 Изучение влияния на проницаемость капилляров густого экстракта из травы первоцвета весеннего

В возникновении и течении ряда патологических процессов, в том числе и воспаления, проявляющихся в виде геморрагических синдромов, большое значение имеет фактор сосудистой проницаемости.

Присутствие в ГЭТПВ высоких концентраций флавоноидов, тритерепеновых сапонинов и кислоты аскорбиновой позволило предположить наличие у него ангиопротекторной активности.

Из данных литературы известно, что механизм ангиопротекторного действия указанных флавоноидов заключается в их способности ингибировать гиалуронидазу – фермент, осуществляющий гидролиз гиалуроновой кислоты и нарушающий ее связь с белками и тем самым повышающий проницаемость эндотелия сосудов [197].

Исследование влияния исследуемого экстракта на проницаемость капилляров проводили с помощью модифицированного метода К.Н. Монаковой (глава 2, раздел 2.2.8).

Для проведения экспериментальных исследований были сформированы 4 группы (по 6 экспериментальных животных в каждой): I – интактный контроль (не получавшие ГЭТПВ); II – интактный опыт (получавшие ГЭТПВ); III – контроль – животные, подвергшиеся воздействию комбинированного стресса (не получавшие ГЭТПВ); IY – животные, подвергшиеся воздействию комбинированного стресса (получавшие ГЭТПВ)

С целью снижения сосудистой резистентности у животных вызывали комбинированный стресс (12 часовое голодание, охлаждение в металлических контейнерах при t+5°С, 2-х часовая иммобилизация в них при +20°С).

Эпиляцию кожи передней брюшной стенки животных проводили за 2 суток до опыта. Животным опытных групп внутрижелудочно вводили раствор ГЭТПВ в дозе 21 мг/кг в течение 5 дней, контрольные группы животных получали эквивалентный объём дистиллированной воды. После этого всем животным в вену хвоста вводили 0.5% раствора трепанового синего в изотоническом

растворе из расчета 1 мл/100 г, через 30 сек на кожу передней брюшной стенки наносили каплю ксилола. Затем регистрировали время появления петехий и отчётливого их прокрашивания. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 68.

Из таблицы 68 видно, что комбинированный стресс в группе животных, не получавших раствор ГЭТПВ, приводил к уменьшению времени появления петехий и времени отчётливого их прокрашивания по сравнению с контрольной интактной группой. В группе интактных и стрессированных животных, получавших раствор ГЭТПВ, достоверно увеличилось время появления петехий и время отчётливого их прокрашивания ($p<0,001$) относительно групп контроля (интактных и стрессированных). Раствор ГЭТПВ существенно повысил резистентность сосудов кожи.

Проведенные исследования показали наличие ангиопротекторных свойств экстракта из травы первоцвета весеннего.

Таблица 68 – Влияния густого экстракта из травы первоцвета на нарушение сосудистой проницаемости у крыс

Группа	Интактные животные		Стрессированные животные	
	время, мин			
	появления петехий	отчётливого прокрашивания	появления петехий	отчётливого прокрашивания
Контроль	1,86±0,10*	6,00±0,45*	0,83±0,09*	4,60±0,24*
Получавшая ГЭТПВ	6,15±0,38*	9,92±0,56*	5,87±0,36*	26,76±0.34*

*– достоверно относительно контрольной группы ($p<0,001$).

5.3.5 Изучение эндотелиопротекторной активности густого экстракта из травы первоцвета весеннего

Перспективными эндотелиопротекторами являются препараты, изготовленные из природного сырья. Их действие обусловлено синергическим эффектом входящих в них биологически активных соединений. Так, терапевтическое действие растительных эндотелиопротекторов обусловлено фармакологически активными флавоноидами, антоцианидинами, тритерпеновыми гликозидами и кумаринами, обладающими как эндотелиопротекторным действием, так и антиоксидантной активностью. В связи с этим представляло интерес изучить наличие данного вида активности у экстракта из травы первоцвета весеннего.

Исследования проводили на модели дисфункции эндотелия на фоне аллоксанового диабета, описанной в главе 2, раздел 2.2.8.

Были сформированы следующие четыре группы: I группа – интактные животные (без лечения и без диабета); II группа – контрольная группа – рживотные с экспериментальным диабетом, не получавшие лечения; III группа – животные с экспериментальным диабетом, получавшие препарат сравнения раствор препарата «Аантистакс»; IY группа – животные с экспериментальным диабетом, получавшие раствор ГЭТПВ в дозе 21 мг/кг.

Исследуемые препараты вводили внутрижелудочно на протяжении трех месяцев с момента введения аллоксана ежедневно.

Аллоксановый диабет вызывал смертность животных в экспериментальных группах, которая отражена в таблице 69.

Таблица 69 – Масса тела и смертность животных в группах крыс с экспериментальным диабетом

Группы	Масса тела, г	Выжило/Пало	Выжившие животные, %
Интактная	214±6	15/0	100
Контрольная	221 ±6	6/9	40
Получавшая «Антистакс»	220±9	9/6	60
Получавшая ГЭТПВ	220±7	8/7	54

Результаты исследований по оценке антиоксидантной активности исследуемого препарата, показателей эндотелина и метаболитов NO в плазме крови представлены в таблице 70.

По данным таблиц видно, что антиоксидантный статус крыс на фоне экспериментального сахарного диабета значительно изменился. Достоверно увеличились показатели интенсивности ПОЛ в плазме крови при снижении активности СОД, ГПО и ОАА. На фоне применения ГЭТПВ концентрация ТБК-РП достоверно снижалась, приближаясь к уровню интактных животных, а содержание СОД, ГПО и ОАА достоверно повышалось по сравнению с препаратом сравнения и с контролем. Показатели ПОЛ на фоне лечения экспериментального сахарного диабета ГЭТПВ не уступали показателям в группе сравнения (на фоне лечения препаратом «Антистакс»).

Таблица 70 – Изменение интенсивности показателей ПОЛ, эндотелина и метаболитов NO у крыс с экспериментальным диабетом и при применении густого экстракта из травы первоцвета весеннего

Группы	СОД усл. ед./г Hb	ГПО усл. ед./г Hb	ОАА ммоль/л	ТБК мкмоль/л	Эндотелин фмоль/мл (медиана)	Метаболиты NO мкмоль/л
Интактная n=15	1602±21*	1,12±0,11	9,6±1,1	5,2±0,2*	0,6±0,14*	30,28±0,23*
Контрольная n=12	714±37	0,82±0,18	7,4±1,1	10,2±1,3	1,79±0,15	21,8±1,62
Получавшая «Антистакс» n=11	1743±25*#	1,44±0,09*#	11,9±0,7*#	6,4±0,7*#	1,23±0,1*#	28,4±1,04*#
Получавшая ГЭТПВ n=12	1790±41*#	1,79±0,16*#	15,7±2,6*#	6,2±0,5*#	1,27±0,1*#	27,7±1,26*#

* – различия статистически значимы по сравнению с интактной группой, при $p \leq 0,05$, # – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, при $p \leq 0,01$.

Одной из составляющих эндотелиопротекторного действия исследуемого экстракта является его ангиопротекторная активность, описанная нами ранее.

Таким образом, раствор ГЭТПВ существенно улучшает вазодилатирующую функцию при эндотелиальной дисфункции у животных с экспериментальным сахарным диабетом, о чем свидетельствуют улучшение антиоксидантного статуса, снижение уровня эндотелина и увеличение содержания метаболитов NO. Экстракт первоцвета весеннего оказывает эндотелиопротекторное действие, сопоставимое с препаратом сравнения «Антистакс».

6.3.6 Изучение влияния густых экстрактов из листьев и соплодий хмеля обыкновенного на ориентировочно-исследовательское поведение крыс

Учитывая седативное действие соплодий хмеля обыкновенного, представляло интерес провести сравнительную оценку влияния экстрактов из листьев и соплодий хмеля обыкновенного на ориентировочно-исследовательское поведение крыс.

Для этого были сформированы следующие группы: I – животные, получавшие раствор ГЭЛХО в дозе 21 мг/кг; II – животные, получавшие раствор ГЭЛХО в дозе 42 мг/кг; III – животные, получавшие раствор ГЭЛХО в дозе 21 мг/кг; IY – животные, получавшие раствор ГЭЛХО в дозе 42 мг/кг;
Y – животные контрольной группы, получавшие эквивалентный объем воды очищенной.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 71.

Результаты исследований показали, что при курсовом введении исследуемых экстрактов в ориентировочно-исследовательском поведении подопытных крыс выявлен предположительный седативный эффект у группы животных, получавших ГЭЛХО в дозе 21 мг/кг по всем исследуемым показателям. В остальных группах значимых достоверных изменений не наблюдали

Таблица 71 – Влияние исследуемых экстрактов хмеля на ориентировочноисследовательское поведение крыс, (n=8)

№	Серия опытов	Вертикальные стойки			Норковый рефлекс			Стереотипное поведение		
		до опы-та	10 дней	21 день	до опы-та	10 дней	21 день	до опыта	10 дней	21 день
1	ГЭЛХО (21мг/кг)	2,9±0,5	4,9±1,2	0,7±0,2 p*<0,01	4,5±0,2	4,2±0,8	4,0±1,8	1,5±0,3	0,3±0,2 p*<0,01 p#<0,02	0,14±0,15 p*<0,01 p#<0,05
2	ГЭЛХО (42мг/кг)	2,5±0,2	4,3±0,9	3,1±0,9	4,5±0,3	4,1±0,9	1,7±0,8 p*<0,01	1,2±0,2	1,1±0,5	0,9±0,5
3	ГЭСХО (21мг/кг)	2,7±0,5	6,2±0,9 p*<0,01 p#<0,02	1,5±0,	4,7±0,2	8,0±1,7 $p^{\#}$<0,05	5,5±1,5	1,7±0,5	2,5±0,7	1,6±0,5
4	ГЭСХО (42мг/кг)	3,0±1,5	9,0±1,5 p*<0,02 p#<0,01	2,9±0,9	4,3±0,5	10,3±1,4 p*<0,01 p#<0,001	5,7±1,4	2,0±0,4	1,3±0,5	0,9±0,5
5	Контроль	2,5±0,4	3,3±0,6	2,0±0,8	4,9±0,9	3,9±0,6	4,2±1,2	1,1±0,5	1,3±0,3	0,9±0,3

Примечание: p* – относительно исходных данных, p# – относительно контроля периода исследования

6.3.7. Исследование ноотропной активности густых экстрактов из листьев и соплодий хмеля обыкновенного

Согласно последним исследованиям Н.В. Кабачук с соавторами (2011) соплодия хмеля обыкновенного обладают ноотропной активностью. В связи, с чем представляло интерес провести исследования в сравнительном аспекте.

Изучение ноотропной активности экстрактов включает оценку антиамнестического эффекта. Для чего использовали методику условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) с последующим использованием электрошока в качестве амнезирующего фактора по модифицированной методике Буреша, описанной в главе 2, разделе 2.2.8. Все препараты вводились за 30 минут до обучения внутрибрюшинно в равных объемах.

Для выполнения эксперимента сформированы следующие группы: I – животные контрольной группы, получавшие эквивалентный объем физиологического раствора; II – животные, получавшие раствор пирацетама; III – животные, получавшие раствор ГЭЛХО в дозе 21 мг/кг; IY – животные, получавшие раствор ГЭЛХО в дозе 42 мг/кг; Y – животные, получавшие раствор ГЭСХО в дозе 21 мг/кг; YI – животные, получавшие раствор ГЭСХО в дозе 42 мг/кг.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 72.

Как видно из таблицы, изучаемые экстракты в исследуемых дозах, достоверно увеличивали латентный период захода в темный отсек по сравнению с первым днем. ГЭСХО (42 мг/кг) и ГЭЛХО (42 мг/кг) снижали время нахождения в темном отсеке во второй день эксперимента по сравнению с контролем, что предположительно может свидетельствовать о наличии у них ноотропной активности.

ГЭСХО (42 мг/кг) не уступал по всем показателям эталонному препарату – пирацетаму. На второй день эксперимента ГЭСХО (42 мг/кг) превосходил действие пирацетама по количеству заходов в темную камеру в 3 раза, а по времени нахождения в темной камере в 1,6 раза. Таким образом, ГЭСХО (42 мг/кг) улучшал первую стадию (влияние на процесс ввода и первоначальной обработки информации) выработки условного рефлекса пассивного избегания, обладая, предположительно, ноотропным эффектом.

Таблица 72

Влияния исследуемых экстрактов на процесс ввода и первоначальной обработки информации в тесте УРПИ (n=8)

№	Вещества	Первый день эксперимента (обучение)		Второй день эксперимента (воспроизведение)		
		количество заходов	латентный период (сек)	количество заходов	латентный период (сек)	время в темной камере (сек)
1	Контроль	1,14± 0,15	17,4± 8,1	1,0 ± 0,51	109,7±50,71 p#<0,001	93,8±4,08
2	Пирацетам, 400 мг/кг	1,0 ± 0,16	16,2 ± 2,31	0,6±0,12	239±11,76*# p*<0,05 p#<0,001	30,0 ± 6,3* p*<0,001
3	ГЭЛХО (21 мг/кг)	6.0 ±1,2* p*<0,05	43,2±14,5	0,57±0,3# p#<0,001	177,1±44,4# p#<0,02	104,6±21,2
4	ГЭЛХО (42 мг/кг)	1,3±0,2	6,9±2,3	0,42±0,2	219,1±49,3 p#<0,001	52,7±27,5
5	ГЭСХО (21 мг/кг)	1.0 ±0,17	11,5±3,74	1.33±0,51	155,8±45,9* p#<0,02	114,0±18,5
6	ГЭСХО (42 мг/кг)	1,3 ±0,17	5,2±2,2	0,2±0,17	269,2±31,5*# p*<0,05 p#<0,001	19,2±1,9* p*<0,001

p*– (по сравнению с данными контроля; $p^{\#}$<0,001 – (по сравнению первым днем обучения)

Выводы по главе 6

1. Изучены технологические свойства сырья, экспериментально обоснованы оптимальные параметры экстракции доминирующих групп биологически активных веществ из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного.
2. На основании результатов сравнительного изучения выбран оптимальный метод экстрагирования сырья первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного – перколяция.
3. Разработаны технологии получения густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. Проведена их стандартизация по содержанию основных групп действующих веществ.
4. Предложены лекарственные формы – гранулы на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного. Разработаны технологическая схема получения, методы стандартизации, изучена стабильность при хранении, установлены сроки годности и условия хранения.
5. Густые экстракты из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного являются практически нетоксичными веществами.
6. Исследуемые густые экстракты из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного проявляют антигипоксантное действие, сопоставимое с препаратами сравнения «Предуктал» и экстракта из плодов боярышника.
7. Густые экстракты из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного обладают прямым антиоксидантным действием, что доказано на модели Fe^{2+}-индуцированной хемилюминесценции в различных тест-системах. Получены патенты РФ на изобретение № 2342942 от 10.01.2009 «Средство растительного происхождения, обладающее антиоксидантной активностью», № 2372931 от 20.11.2009 «Антиоксидантное средство растительного происхождения».
8. Густой экстракт из травы первоцвета весеннего обладает ангиопротекторным свойством.

9. Густой экстракт из травы первоцвета весеннего существенно улучшает вазодилатирующую функцию при эндотелиальной дисфункции у животных с экспериментальным сахарным диабетом, улучшает антиоксидантный статус, а также снижает уровень эндотелина и увеличивает содержания метаболитов NO. Эндотелиопротекторное действие исследуемого экстракта сопоставимо с препаратом сравнения «Антистакс».

10. Сравнительные экспериментальные исследования по изучению влияния густых экстрактов листьев и соплодий хмеля обыкновенного на ориентировочно-исследовательское поведение крыс выявил предположительный седативный эффект по всем исследуемым показателям.

11. Густые экстракты из листьев и соплодий хмеля обыкновенного оказывали равноценно положительное влияние на воспроизведение сохранности навыка, достоверно увеличивая латентный период захода в темный отсек по сравнению с периодом обучения, а в дозе 42 мг/кг снижали время нахождения в темном отсеке по сравнению с контролем, что предположительно может свидетельствовать о наличии у них ноотропной активности.

12. Густые экстракты из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного являются перспективными источниками для создания фитопрепаратов на их основе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненных теоретических и экспериментальных исследований позволили определить научно-методические подходы к поиску перспективных малоизученных видов растений, требующих рационального использования и комплексной переработки (на примере растений родов *Primula* L. И *Humulus* L.) для создания на их основе фитопрепаратов.

Рекомендуемые методические подходы основаны на проведении комплекса теоретических, химических, технологических и биологических исследований (рисунок 55).

На первом этапе выполняется информационно-аналитический поиск по распространённости растений, требующих рационального использования во флоре РФ, в том числе в Республике Башкортостан, и оценке их ресурсной базы. В ходе поиска учитываются социально-экономические аспекты, в том числе включающие проблемы нерациональности использования сырья и несовершенства технологий переработки в ряде отраслей народного хозяйства. Для решения данной проблемы можно предложить целесообразное использование отходов агротехнического производства (на примере хмелеводства) в качестве источника получения БАВ и одновременное применение нескольких частей растения (желательно всего растения в целом). На основании проведенного анализа отбираются перспективные объекты и проводится оценка изученности их химического состава, ресурсного потенциала, использования в научной и народной медицине, обосновывается перспективность использования растений рода первоцвет и рода хмель.

На следующих этапах проводится экспериментальное обоснование рационального использования и применения растений рода первоцвет и рода хмель.

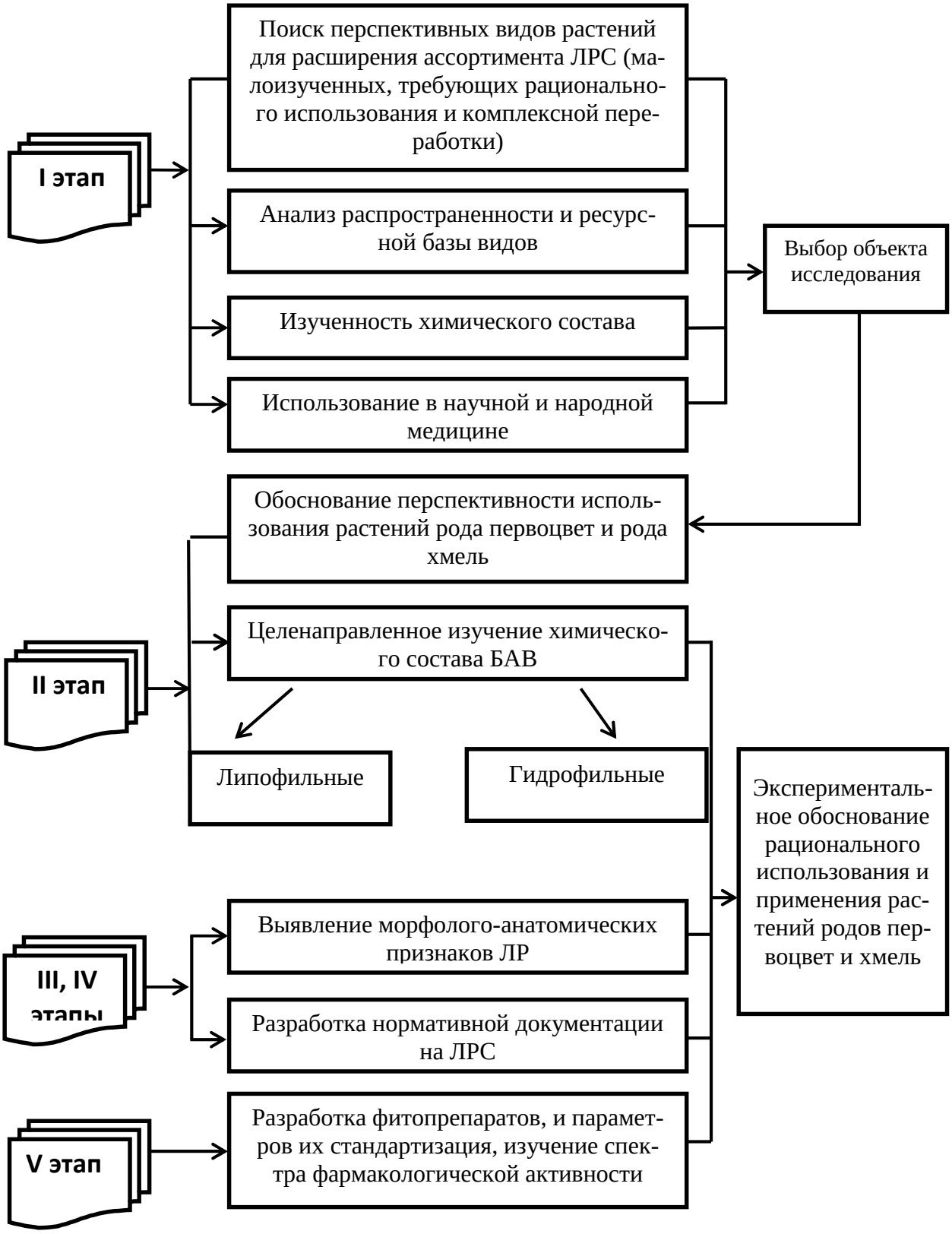


Рисунок 55 – Схема научно-методического обоснования рационального использования и применения растений рода первоцвет и рода хмель

На втором этапе проводится целенаправленное изучение химического состава. На основании химического изучения растений рода первоцвет и рода хмель установлено, что имеющиеся в настоящее время данные по их химическому составу не учитывают содержание всех веществ, относящихся к различным классам соединений и вносящих вклад в фармакологическую активность. Впервые доказано, что растения рода первоцвет наряду с гидрофильными соединениями содержат и липофильные, впервые изучен их состав, выделены полиметоксилированные флавоноиды и производные жирных кислот. Показано что липофильные вещества обуславливают эндотелиопртекторную, ангиопротекторную активность густого экстракта из травы первоцвета весеннего и дано соотнесение с полученными данными по химическому составу.

Впервые установлено, что растения рода хмель наряду с производными ацилфлороглюцидов, терпеноидов, производных жирных кислот, содержат богатый комплекс фенольных соединений. Показано, что фенольные соединения вносят вклад в антигипоксантные и антиоксидантные свойства густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного.

На основании чего доказано, что растения рода первоцвет и рода хмель могут служить источниками получения гидрофильных и липофильных веществ с разноплановой фармакологической активносттью. Это позволило обосновать и предложить новые фитопрепараты «Экстракт первоцвета густой», «Экстракт листьев хмеля обыкновенного густой». Результаты изучения химического состава свидетельствуют, что наряду с первоцветом весенним возможно использовать и первоцвет крупночашечный, а наряду с соплодиями хмеля – листья хмеля обыкновенного, являющимися отходами хмелепроизводства.

В аспекте решения вопросов стандартизации выявленных перспективных видов ЛРС проводится морфолого-анатомическое изучение исследуемых объектов (этап III), выявляются наиболее значимые макро- и микродиагностические признаки сырья.

На четвертом этапе проводится разработка нормативной документации на новые виды растительного сырья и совершенствуется существующая до-

кументация в соответствии с современными требованиями. Разрабатываются методики качественного и количественного анализа основных групп БАВ, определяются числовые показатели сырья, проводится валидация разработанных методик. На основе проведенных исследований разрабатывается нормативная документация на исследуемые виды сырья.

На завершающем V этапе выполняется изучение технологических свойств сырья, экспериментально обосновываются оптимальные параметры экстракции целевых групп БАВ, разрабатываются технологические способы получения густых экстрактов из исследуемых растений. В результате проведенных исследований химического состава, разработанных методов стандартизации густых экстрактов, предлагаются лекарственные формы – гранулы на основе густых экстрактов, разрабытываются технологические схемы получения и методы стандартизации полученных форм с использованием принципов сквозной стандартизации.

В последующем проводится исследование фармакологических свойств, подтверждающее безопасность и выявляющее спектр специфической фармакологической активности предложенных средств.

Методические подходы, направленные на расширение отечественной номенклатуры официнального растительного сырья за счет комплексного использования растений, а также отходов производства, могут служить теоретическим и экспериментальным обоснованием рационального использования растений рода первоцвет и рода хмель.

Результаты проведенных исследований аргументируют целесообразность введения в отечественную номенклатуру официнального растительного сырья траву первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного, что существенно, на наш взгляд, расширит сырьевую базу РФ. Комплексное использование надземной части растений рода первоцвет и листьев культивируемых сортов и дикорастущего вида хмеля обыкновенного позволит оптимизировать процесс переработки сырья и эффективно решить задачу рационального использования растительных ресурсов РФ.

ВЫВОДЫ

1. Проведено комплексное исследование гидрофильных и липофильных биологически активных веществ лекарственного растительного сырья представителей рода первоцвет (первоцвета весеннего, первоцвета крупночашечного) и рода хмель (хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов). Установлено наличие полифенольных соединений, тритерпеновых сапонинов, органических и аминокислот, липофильных веществ (полиметоксилированных флавоноидов, терпеноидов, производных жирных кислот и ацилфлороглюцидов).
2. При исследовании состава фенольных соединений представителей рода первоцвет и рода хмель идентифицировано 41 вещество, отнесенное к флавоноидам (полиметоксилированным и изофлавоноидам), простым фенолам, дубильным веществам, кумаринам, фенолокислотам, оксикоричным кислотам, стильбенам, из которых в индивидуальном виде выделено 30 веществ фенольной природы, а также одно – из группы стеринов. Структура выделенных веществ установлена методами ЯМР ^{1}H-, ЯМР ^{13}C-спектроскопии; корреляционной спектроскопии ЯМР ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{13}C HSQCED, HMBC, хромато-масс-спектрометрии, УФ-спектроскопии.
3. В сырье первоцветов весеннего и крупночашечного методами ТСХ, УФ-спектроскопии идентифицированы тритерпеновые сапонины, среди которых урсоловая кислота определена впервые. С помощью аминокислотного анализатора и ТСХ установлено наличие 13 аминокислот. Изучен состав органических кислот. Установлено сходство качественного состава основных групп биологически активных веществ изученных близкородственных видов первоцветов.
4. В сырье хмеля обыкновенного дикорастущего вида и культивируемых сортов идентифицированы фитостерины, эфирные масла, производные ацилфлороглюцидов. Из листьев хмеля обыкновенного впервые выделен и иденти-

фицирован β-ситостерол-3-O-β-D-глюкопиранозид; определен качественный состав терпеноидов, установлено наличие специфичных для соплодий хмеля α-гумулена, α-кубебена, кариофиллена и α-кариофиллена. Установлено сходство состава основных групп биологически активных веществ листьев и соплодий культивируемых сортов и дикорастущего хмеля обыкновенного.

5. Впервые проведено морфолого-анатомическое изучение травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного культивируемых сортов «Ранний», «Крылатский», «Подвязный» и дикорастущего вида, выявлены макро- и микродиагностические признаки, позволяющие установить подлинность сырья. Проведены ресурсные исследования первоцвета крупночашечного на территории Республики Башкортостан.

6. Обоснованы подходы к стандартизации сырья первоцветов и хмеля обыкновенного: разработаны методики качественного анализа (метод ТСХ) и количественного определения флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии (трава первоцветов, листья хмеля обыкновенного), методики качественного анализа (метод ТСХ) и спектрофотометрического определения кислоты аскорбиновой (трава первоцветов), оптимизирована методика алкалиметрического определения суммы ацилфлороглюцидов (листья хмеля обыкновенного). Разработаны критерии оценки качества сырья первоцветов, листьев хмеля обыкновенного. Впервые вещество 3´,4´-метилендиокси-5´-метоксифлавон предложено в качестве специфического маркера для стандартизации надземной части первоцвета весеннего.

7. Разработаны способы получения густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного и методы их стандартизации. Предложены лекарственные формы – гранулы на основе густых экстрактов из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного, методы их стандартизации, изучена стабильность при хранении, установлены сроки годности и условия хранения.

8. Густые экстракты из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного являются практически нетоксичными веществами. Для густого экс-

тракта из травы первоцвета весеннего впервые установлено наличие антиоксидантного, антигипоксантного, ангиопротекторного, эндотелипротекторного видов действия. Для густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного впервые определены антиоксидантное, антигипоксантное, седативное и ноотропное действия. Густые экстракты из травы первоцвета весеннего и листьев хмеля обыкновенного являются перспективными источниками для создания фитопрепаратов на их основе.

9. Обоснована целесообразность введения в отечественную номенклатуру официнального растительного сырья надземной части первоцвета весеннего в качестве источника антиоксидантных, антигипоксантных, ангио- и эндотелиопротекторных средств; показаны пути использования в медицинской практике гранул на основе густого экстракта из травы первоцвета весеннего.

10. Теоретически обоснована и экспериментально доказана целесообразность комплексного использования хмеля обыкновенного, введения в отечественную номенклатуру официнального растительного сырья «Хмеля обыкновенного листья», разработки лекарственной формы гранул на основе густого экстракта, что позволит оптимизировать процесс переработки сырья хмеля обыкновенного.

Выявлены дополнительные источники сырья официнальных видов первоцвета крупночашечного и хмеля обыкновенного во флоре Башкортостана.

11. Разработаны и утверждены ТУ «Трава первоцвета весеннего» № 9700-014-26795008-2005 (ООО «Травы Башкирии», г. Уфа). Разработан и принят к рассмотрению проект ФС «Первоцвета листья», разработан проект ФСП «Хмеля обыкновенного листья».

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования включают в себя следующие направления, имеющие важное практическое значение: введение в отечественную номенклатуру растительного сырья травы первоцвета весеннего, крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного; углубленное изучение их фармакологической активности; проведение исследований по разработке препаратов на основе изученных видов сырья и их стандартизация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФГ – ацилфлороглюциды

АФК – активные формы кислорода

БАВ – биологически активные вещества

БХ – бумажная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОСТ – государственный отраслевой стандарт

ГРЛС – государственный реестр лекарственных средств

ГФ – Государственная Фармакопея

ГХ – газовая хроматография

ГЭТПВ – густой экстракт из травы первоцвета весеннего

ГЭЛХО – густой экстракт из листьев хмеля обыкновенного

ЛРС – лекарственное растительное сырье

МДА – малоновый диальдегид

МС – масс-спектрометрия

НД – нормативный документ

ОАА – общая антиоксилительная активность

ОКК – отдел контроля качества

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СО – стандартный образец

СРО – свободно-радикальное окисление

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТУ – технические условия

ТХУ – трихлоруксусная кислота

УФ – ультрафиолетовый

ФС – фармакопейная статья

ХЛ – хемилюминесценция

ЦНС – центральная нервная система

S_L – светосумма свечения

H_L – амплитуда свечения

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, В.Б. Браславский [и др.] // Человек и лекарство: доклады XIV Российского национального конгресса (16-20 апр. 2007 г., г. Москва). – М., 2007. – С. 839.

2. Аладышева, Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляева, В.В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9-14.

3. Александрова, А.Е. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / А.Е. Александрова, А.П. Арзамасцев, В.Л. Багирова. – СПб.: СпецЛит, 2001. – 223 с.

4. Алексеев, Ю.Е. Определитель высших растений Башкирской АССР / Ю.Е. Алексеев, А.Х. Галеева, И.А. Губанов. – М.: Наука, 1989. – 375 с.

5. Алексеева, М.А. Исследования биологически активных флавоноидных компонентов хмеля обыкновенного Humulus lupulus: автореф. дис. ... канд. фармац. наук : 15.00.02 / Алексеева Мария Александровна. – М., 2005. – 24 с.

6. Ареалы лекарственных и родственных им растений СССР: атлас / под ред. В.М. Шмидта. – 2-е изд., испр. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. – 224 с.

7. Арзамасцев, А.П. Валидация фармакопейных методов (проект общей фармакопейной статьи / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Ведомости научного центра экспертизы и контроля качества лекарственных средств. – 2001. – № 1. – С. 28-29.

8. Арзамасцев, А.П. Определение полифенольных компонентов хмеля с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ / А.П. Арзамасцев, М.А Алексеева, К.И. Эллер // Хим.-фармац. журн. – 2004. – № 12. – С. 39–41.

9. Арзамасцев, А.П. Оценка показателей антиоксидантной активности препаратов на основе лекарственного растительного сырья / А.П. Арзамасцев, Е.И. Шкарина, Т.В. Максимова // Хим.–фармац. журн. – 1999. – № 11. – С. 17–20.

10. Астамирова, М.А.-М. Инвентаризация и анализ рода primula l. (primula ceae vent.) Терскокого Кавказа и Дагестана: автореф. дис. … канд. биол. наук : 03.02.01 / Астамирова Маржан Абдул-Межидовна. – Астрахань, 2010. – 22 с.

11. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / под ред. П.С. Чикова. – М.: Изд-во ГУК, 1983. – 340 с.

12. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / под ред. П.С. Чикова. – М.: Изд-во ГУК, 1976. – 340 с.

13. Атлас лекарственных растений СССР / под ред. Н.В. Цицина. – М.: Госкомиздат, 1962. – 703 с.

14. Багирова, В.Л. О стандартизации лекарственных средств на современном этапе / В.Л. Багирова, Е.Л. Ковалева, Н.П. Садчикова // Хим.-фармац. журн. – 2000. – Т. 34, № 5. – С. 47–48.

15. Багирова, В.Л. Совершенствование экспертизы и стандартизации лекарственных средств на современном этапе в РФ / В.Л. Багирова, Е.Л. Ковалева, К.С. Шахназаров // Всероссийский Съезд фармацевтических работников (5-7 июня 2005 г., г. Сочи). – Сочи, 2005. – С. 49-50.

16. Бакин, О.В. Сосудистые растения Татарстана / О.В. Бакин, Т.В. Рогова, А.П. Ситников. – Казань: Изд-во Казанского ун-та, 2000. – 496 с.

17. Баландина, И.А. Совершенствование принципов и методов фармакопейного анализа в системе стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных средств на его основе: автореф. дис. … д-ра фармац. наук : 15.00.02 : 15.00.01 / Баландина Ирина Анатольевна. – М., 2004. – 38 с.

18. Балыкина, Е.С. Сравнительная оценка методов ориентировочной реакции крыс в токсикологическом эксперименте / Е.С. Балыкина, И.В. Березовская // Фармакол. и токсикол. – 1976. – № 5. – С. 635–638.

19. Бандюкова, В.А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды / В.А. Бандюкова // Химия природ. соединений. – 1983. – № 3. – С. 263-273.

20. Барнаулова, С.О. Пищевые лекарственные растения как ангиопротекторы / С.О. Барнаулова, О.Д. Барнаулов // Нейроиммунология: материалы Юбил. X науч.-практич. конф. (28–31 мая 2001 г., г. Москва). – Т. 2. – С. 223–297.

21. Батталова, Г.М. Биологически активные добавки к пище: состав и применение: учеб. пособие / Г.М. Баталова, Г.В. Аюпова, Г.Р. Иксанова. – Уфа: «Здравоохранение Башкортостана», 2008. – 140 с.

22. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. – Л.: Наука, 1963. – 436 с.

23. Биологически активные вещества растительного происхождения в 3 т. / Б.Н. Головнин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова, А.И. Шретер; отв. ред. В.Ф. Семихов. – М.: Наука, 2001. – Т. 1: А-К. – 350 с.

24. Биологически активные вещества растительного происхождения в 3 т. / Б.Н. Головнин, Р.Н. Руденская, И.А. Трофимова,

А.И. Шретер; отв. ред. В.Ф. Семихов. – М.: Наука, 2001. – Т. 2: Л-Я. – 764 с.

25. Борисова, Д.А. Аминокислоты сырья первоцвета лекарственного / Д.А. Борисова // Фармация. – 2011. – № 8. – С. 11-13.

26. Борисова, Д.А. Микроскопическое исследование сырья первоцвета лекарственного / Д.А. Борисова, О.Г. Потанина, Д.М. Попов // Фармация. – 2012. – № 6. – С. 17-19.

27. Борисова, Д.А. Определение аскорбиновой кислоты в первоцвете лекарственном методом ВЭЖХ / Д.А. Борисова, Д.М. Попов // Фармация. – 2013. – № 3. – С.22-24.

28. Борисова, Д.А. Сравнительное исследование химического состава цветков, листьев и корневищ с корнями первоцвета лекарственного с целью контроля качества и стандартизации сырья: автореф. дис. … канд. фармац. наук : 14.04.02 / Борисова Дарья Алексеевна. – М., 2013. – 20 с.

29. Брезгин, Н. Лекарственные растения центральной части России / Н. Брезгин. – М.: Медицина, 1993. – 320 с.

30. Бубенчиков, Р.А. Флавоноиды фиалки трехцветной / Р.А. Бубенчиков, И.Л. Дроздова // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 11–12.

31. Бубенчикова, В.Н. Разработка методов анализа растительного сырья, содержащего флавоноиды / В.Н. Бубенчикова, Т.В. Точкова // Состояние и перспективы развития фармации в Сибири и на Дальнем Востоке: тез. докл. науч.-практич. конф.– Томск, 1991. – С. 117–118.

32. Васильев, А.С. Лекарственные средства растительного происхождения: справ. пособие / А.С. Васильев, Г.И. Калинкина, В.Н. Тихонов. – Томск, 2007. – 124 с.

33. Владимиров, Ю.А. Определение антиоксидантной активности методами хемилюминесценции / Ю.А. Владимиров, О.Б. Любицкий,

Д.Ю. Измайлов // Растение и здоровье: материалы 9 Междунар. съезда «Фитофарм – 2005» и конф. молодых ученых Европ. фитохим. об-ва (22-25 июня 2005 г., г. Санкт-Петербург). – СПб., 2005. – С. 67-73.

34. Влияние соплодий хмеля обыкновенного (Humus lupulus L.) на функциональное состояние нервной системы у белых крыс / Я.Г. Разуваева, С.М. Николаев, Н.В. Кабачук, О.В. Нагаслаева // Сиб. мед. журн. – 2010. – № 1. – С. 115-117.

35. Вышковский, Г.Л. Регистр лекарственных средств России / Г.Л. Вышковский. – М., 2010. – 19-й вып. – 1368 с.

36. Гацура, В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В.В. Гацура. – М.: Медицина, 1974. – 143 с.

37. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.

38. Герасимчук, В.И. Хмель в медицине, быту и народном хозяйстве / В.И. Герасимчук, И.Т. Рейтман, И.С. Ежов. – Киев: Урожай, 1994. – 352 с.

39. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078-01. – М., 2001.

40. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.2351-08. Дополнения № 7, 8 к СанПиН 2.3.2.1078-01 от 01.05.2008. – М., 2008.

41. Гигиенические требования к организации производства и оборота биологически активных добавок к пище. СанПиН 2.3.2.1290-03. – М., 2003. – 35 с.

42. Гичев, Ю.Ю. Новое руководство по микронутриентологии (биологически активные добавки к пище и здоровье человека) / Ю.Ю. Гичев, Ю.П. Гичев. – М.: «Триада-Х», 2012. – 317 с.

43. Гоглова, О.О. Этика работы с экспериментальными животными / О.О. Гоглова, А.Ф. Богомолов // Медицинское право и этика. – 2003. – № 4.

44. Годованный, А.А. Хмель и его использование / А.А. Годованный. – Киев, 1990. – 330 с.

45. Гонтарь, Э.М. Витаминоносность некоторых видов Primula L. Алтая / Э.М. Гонтарь // Эколого-морфологические и биологические особенности полезных растений дикорастущей флоры Сибири. – Новосибирск: Медицина, 1970. – С. 262–264.

46. Горошко, О.А. Исследования состава шишек хмеля / О.А. Горошко, В.П. Пахомов, И.А. Самылина // Фармация. – 2000. – № 4. – С. 48–50.

47. Горошко, О.А. Фармакогностическое исследование соплодий хмеля: автореф. дис. … канд. фармац. наук : 15.00.02 / Горошко Ольга Александровна. – М., 2005. – 24 с.

48. Горячева, Н.Г. Фенольные соединения в хмелепродуктах различных сортов хмеля / Н.Г. Горячева, Е.Ф. Шаненко, Т.В. Пичугина // Пиво и напитки. – 2002. – № 2. – С. 28–29.

49. ГОСТ 17768-90. Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортировка и хранение. – М., 1990. – 24 с.

50. ГОСТ 21948-76. Хмель – сырец и хмель прессованный» технические условия и методы испытаний. – М., 1976. – 23 с.

51. ГОСТ 3166-76. Листья первоцвета весеннего. Технические требования на продукцию, поставляемую на экспорт. Взамен ГОСТ 3166-46; введ. 01.07.1977. – М., 1977. – С. 51–53.

52. Государственная фармакопея Российской Федерации / Минздравсоцразвития России. – 12-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств применения, 2008. – 704 с.

53. Государственная фармакопея СССР / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1: Общие методы анализа. – 336 с.

54. Государственная фармакопея СССР / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – 400 с.

55. Государственный реестр лекарственных средств. – М.: Минздрав России, 2008. – Т. 1. – 1247 с.

56. Государственный стандарт Российской Федерации. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. ГОСТ РИСО 5725-1-2002. – М., 2002.

57. Гриневич, Ю.А. Хемилюминесцентный метод в иммунологии / Ю.А. Гриневич, В.А. Барабой, В.Э. Орел // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1986. – № 1. – С. 91–97.

58. Дикорастущие полезные растении России / отв. ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. – 663 с.

59. Дремина, Е.С. Определение антиоксидантной активности биологических и лекарственных препаратов: методологические аспекты / Е.С. Дремина, В.С. Шаров, Ю.А. Владимиров // Пульмонология. – 1995. – № 1. – С. 73–75.

60. Евдокимова, О.В. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в столбиках с рыльцами кукурузы / О.В. Евдокимова // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 14-17.

61. Евсюкова, Т.В. Формы первоцвета сибторпа и его гибриды как исходный селекционный материал / Т.В. Евсюкова // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2009. – Т. 42, № 1. – С. 182-187.

62. Запрометов, М.Н. Основы биохимии фенольных соединений / М.Н. Запрометов. – М.: Высш. Шк., 1974. – 214 с.

63. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования / М.Н. Запрометов // Биохимические методы в физиологии растений. – М., 1971. – С. 185-207.

64. Зенкевич, И.Г. Аналитические параметры компонентов эфирных масел для их хроматографической и хромато-масс-спектрометрической идентификации. Кислородсодержащие производные моно- и сесквитепеновых углеводородов / И.Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. – 1997. – Т. 33, вып. 1. – С. 16–26.

65. Зенкевич, И.Г. Обзор физико-химических методов стандартизации настоек, экстрактов и эликсиров в ведущих странах Европы и Америки / И.Г. Зенкевич, В.Л. Багирова, Т.А. Сокольская // Фармация. – 2002. – № 1. – С. 43–45.

66. Зенкевич, И.Г. Обзор физико-химических методов стандартизации настоек, экстрактов и эликсиров в ведущих странах Европы и Америки (продолжение) / И.Г. Зенкевич, В.Л. Багирова, Т.А. Сокольская // Фармация. – 2002. – № 2. – С. 45–48.

67. Зенкевич, И.Г. Обзор физико-химических методов стандартизации настоек, экстрактов и эликсиров в ведущих странах Европы и Америки (продолжение) / И.Г. Зенкевич, В.Л. Багирова, Т.А. Сокольская // Фармация. – 2002. – № 3. – С. 45–46.

68. Зузук, Б.М. Хмель вьющийся (син. Хмель обыкновенный) (Humulus lupulus L. (Аналитический обзор) / Б.М. Зузук, Р.В. Куцик // Провизор. – 2004. – № 13, 14, 15. – С. 36–41.

69. Изменение №3 от 19.06.2003 г. к статье ГФ XI издания «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» // Фармация. – 2003. – № 3. – С. 3-4.

70. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства / Н.В. Меньшутина, Ю.В. Мишина, С.В. Алвес [и др.]. –М.: Издательство БИНОМ, 2013. – Т. 1-2. – 480 с.

71. Кабачук, Н.В. Антигипоксическое действие соплодий Humulus lupulus L. / Н.В. Кабачук, Я.Г. Разуваева, О.В. Нагаслаева // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – № 3 (67). – С. 185-186.

72. Калужская флора: аннотированный список сосудистых растений Калужской области / отв. ред. А.С. Демидов. – М.: КМК, 2011. – 548 с.

73. Каратаева, О.Г. Перспективы развития отрасли хмелеводства Чувашской республики / О.Г. Каратаева // Вестн. ФГОУ ВПО МГАУ. – 2009. – № 8-1. – С. 78-80.

74. Касумханлы, Р.А. Клиническое испытание местного Primula macrocalyx как отхаркивающего средства / Р.А. Касумханлы // Научные труды / Азерб. пед. ин-т. – Баку, 1945. – Т. 1. – С.165–166.

75. Киселева, Т.Л. Краткая энциклопедия современной фитотерапии с основами гомеопатии: справочник практического врача / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова, И.Л. Блинков. – М., 2010. – 592 с.

76. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. – М.: Изд-во Проф. Ассоц. натуротерапевтов, 2009. – 295 с.

77. Киселева, Т.Л. Отечественные фармакопейные растения и сырье: учеб. пособие / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова, А.А. Карпеев. – М., 2009. – 108 с.

78. Киселева, Т.Л. Хмель / Т.Л. Киселева // Мед. помощь. – 1993. – № 2. – С. 51–52.

79. Клебанов, Г.И. Оценка антиоксидантной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов, М.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин // Лаб. дело. – 1988. – № 5. – С. 59–62.

80. Клеопов, Ю.Д. Анализ флоры широколиственных лесов европейской части СССР / Ю.Д. Клеопов. – Киев: Наукова думка, 1990. – 352 с.

81. Клуген, А.Г. Влияние особенностей строения и химического состава горьких и ароматических сортов на их послеуборочную обработку и хранение / А.Г. Клуген, Б.В. Лесин, Н.Г. Рейтман // Интенсификация технологии производства и хранения технических культур на Украине. – Киев, 1998. – С. 52–57.

82. Клышев, Л.К. Флавоноиды растений / Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина. – Алма-Ата: Наука, 1978. – 220 с.

83. Коваленко, Л.В. Биохимические основы химии биологически активных веществ / Л.В. Коваленко. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 229 с.

84. Коломиец, Н.Э. Вопросы стандартизации травы хвоща полевого / Н.Э. Коломиец, Г.И. Калинкина // Фармация. – 2007. – № 1. – С. 11–14.

85. Кондаков, М.С. О методике определения горьких веществ в воздушно-сухом хмеле / М.С. Кондаков // Культура хмеля: труды. – М.: Пищепромиздат, 1954. – Вып. 1. – С. 100–109.

86. Копытько, Я.Ф. Исследование аминокислотного состава настоек гомеопатических матричных мяты перечной, мелиссы лекарственной, душицы обыкновенной и шалфея лекарственного / Я.Ф. Копытько, З.П. Костенникова, Е.А. Тимохина // Фармация. – 1997. – № 6. – С. 31-34.

87. Косман, В.М. Информационное обеспечение для идентификации фенольных соединений в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Флавоны, флавонолы и их гликозиды / В.М. Косман, И.Г. Зинкевич // Раст. ресурсы. – 1997. – Т. 33, вып. 2. – С. 14-26.

88. Кострица, М.Ю. Хміль та пиво в Україні з давнини до сьогодення / М.Ю. Кострица, Й.Г. Рейтман. – Житомир: «М. А. К.» Лтд., 1997. – 240 с.

89. Костюк, В.А. Антиокислительная активность флавоноидов в различных системах перекисного оксиления липидов / В.А. Костюк, А.И. Потапович, С.М. Терещенко // Биохимия. – 1988. – Т. 53, № 8. – С. 1365–1370.

90. Крикова, А.В. Биологическая активность растительных источников флавоноидов / А.В. Крикова, Н.С. Ляхова, В.С. Давыдов // Фармация. – 2006. – № 3. – С. 36–37.

91. Куликов, П.В. Конспект флоры Челябинской области (сосудистые растения) / П.В. Куликов. – Екатеринбург; Миасс: «Геотур», 2005. – 537 с.

92. Куркин, В.А. Современные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов, содержащих флавоноиды / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, В.Б. Браславский // Всероссийский Съезд фармацевтических работников (5-7 июня 2005, г. Сочи). – Сочи, 2005. – С. 95-96.

93. Куркин, В.А. Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений / В.А. Куркин // Фармация. – 2002. – Т. 50, № 2. – С. 16.

94. Куркин, В.А. Фармакогнозия / В.А. Куркин. – Самара: Офорт, 2004. – 1180 с.

95. Кучеров, Е.В. Дикорастущие пищевые растения и их использование / Е.В. Кучеров. – Уфа: РИО Госкомиздата БССР, 1990. – 160 с.

96. Кучеров, Е.В. Ресурсы основных видов дикорастущих лекарственных растений в Башкирии / Е.В. Кучеров, А.Х. Галеева. – Уфа, 1991. – 114 с.

97. Кучеров, Е.В. Целебные растения и их применение / Е.В. Кучеров, Д.Н. Лазарева. – Уфа, 1993. – 287 с.

98. Лавренов, В.К. Важнейшие лекарственные растения / В.К. Лавренов, Г.В. Лавренова. – М.: «Издательство Аст», 2004. – 510 с.

99. Ладынина, Е.А. Фитотерапия / Е.А. Ладынина, Р.С. Морозова. – Л., 1990. – 304 с.

100. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев. – М.: БИНОМ, 2003. – 493 с.

101. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия / под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб.: СпецЛит., 2004. – 765 с.

102. Лекарственные растения государственной фармакопеи. Фармакогнозия / под ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева. – М., 2003. – 534 с.

103. Лекарственные растения. Изучение и рациональное использование / С.С. Хайретдинов, Х.З. Галиахметов, Р.Г. Минибаев, Г.Г. Кутлуева. – Уфа, 2002. – 10 с.

104. Ликине, С. Идентификация сортов хмеля на основе результатов анализа эфирного масла методом газовой хроматографии / С. Ликине, Б. Никерсон // Новое в возделывании за рубежом: сб. переводов. – М., 1970. – С. 22–25.

105. Литвиненко, В.И. Некоторые принципы и методические разработки в исследовании фенольных соединений / В.И. Литвиненко // Современные проблемы науки и практики: тез. докл. II Съезда фармацевтов УССР. – Киев, 1972. – С. 674-676.

106. Литвиненко, В.И. Химия природных флавоноидов и создание препаратов при комплексной переработке растительного сырья: автореф. дис. ... д-ра хим. наук : 02.00.10; 15.00.02 / Литвиненко Владимир Иванович. – Харьков, 1990. – 80 с.

107. Лобанчикова, Н.В. Разработка и стандартизация седативных растительных сборов: автореф. дис. … канд. фармац. наук : 15.00.02 / Лобанчикова Наталия Викторовна. – М., 1991. – 20 с.

108. Лужников, Е.А. Клиническая токсикология / Е.А. Лужников. – М.: Медицина, 2000. – 416 с.

109. Лысенко, Т.А. Эколого-биологические особенности Primula veris L. В лесостепи Украины / Т.А. Лысенко // Раст. ресурсы. – 1994. – Вып. 3. – С. 15–24.

110. Лященко, Н.И. Биохимия хмеля и хмелепродуктов / Н.И. Лященко. – Житомир: Полісся, 2002. – 385 с.

111. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России / П.Ф.Маевский. – 10-е изд. – М.: КМК, 2006. – 600 с.

112. Мазурець, С.І. Фітохімічне вивчення ліпофільної фракції з листя хмелю звичайного / С.І. Мазурець, С.В. Ковальов, А.М. Рудник // Запорож. мед. журн. – 2012. – № 3 (72). – С. 96-99.

113. Макарова, М.Н. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами / М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, И.Г. Зенкевич // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 30–32.

114. Макарова, М.Н. Молекулярная биология флавоноидов (химия, биология, фармакология): руководство для врачей / М.Н. Макарова, В.Г. Макаров. – СПб., 2010. – 428 с.

115. Мартинчик, А.Н. Общая нутрициология / А.Н. Мартинчик, И.В. Маев, О.О. Якушевич. – М.: МЕДпресс-информ, 2005. – 392 с.

116. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – 1200 с.

117. Меньшикова, Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных оксилительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 442–455.

118. Меньшутина, Н.В. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства / Н.В. Меньшутина, Ю.В. Мишина, С.В. Алвес. – М.: Издательство БИНОМ, 2013. – Т. 2. – 480 с.

119. Методические рекомендации по санитарному контролю за содержанием радиоактивных веществ в объектах внешней среды. – М., 1980. – 12 с.

120. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. – Л., 1987. – 430 с.

121. Мешковский, А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Мешковский // Современные требования к организации и деятельности контрольно-аналитических лабораторий отделов контроля качества фармацевтических предприятий. – М., 2002. – С. 26-30.

122. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 560 с.

123. Минчик, О.Ю. Методы получения сухих экстрактов из лекарственного растительного сырья / О.Ю. Минчик // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2004. – Вып. 59. – С. 101-102.

124. Мичник, О.В. Разработка технологии сухого гранулированного напитка с экстрактом примулы / О.В. Мичник // Фармация: материалы 49-ой регион. конф. – Пятигорск, 1994. – С. 51.

125. Мичник, О.В. Химический состав первоцвета крупночашечкового / О.В. Мичник // Раст. ресурсы. – 1976. – Т. 12, вып. 3. – С. 391-394.

126. Муравьев, И.А. Спектрофотометрический метод количественного определения урсоловой кислоты / И.А. Муравьев, В.В. Шатило, В.Ф. Семенченко // Химия природ. соединений – 1972. – № 6. – С. 738.

127. Муравьева, В.И. Исследования растений, применяемых в народной медицине, на содержание аскорбиновой кислоты / В.И. Муравьева, А.И. Баньковский // Научные труды / ВНИИ лек. и аром. раст. – М., 1974. – Вып. 9. – С. 39-118.

128. Мусина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учеб. пособие / С.А. Мусина, И.Е. Каухова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 560 с.

129. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / под ред. В.Л. Багировой, А.В. Северцева. – СПб.: СпецЛит, 2001. – 223 с.

130. Никонов, Г.К. Основы современной фитотерапии / Г.К. Никонов, Б.М. Мануйлов. – М.: Медицина, 2005. – 520 с.

131. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации: методические рекомендации МР 2.3.1.2432-08. – М., 2008.

132. Определитель высших растений Башкирской АССР. – М.: Наука, 1989. – 375 с.

133. Определитель сосудистых растений Среднего Урала. – М.: Наука, 1994. – 525 с.

134. Особенности компонентного состава эфирного масла надземной части phlomis tuberose l. и humulus lupulus l. / Л.С. Соколова, Е.В. Павлова, А.М. Шушеначева, А.А. Ефремов // Химия раст. сырья. – 2012. – № 2. – С.101-104.

135. ОСТ 91500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. – М., 2000. – 55 с.

136. ОФС 42-0011-03. Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье. Стронций-90, цезий-137. Отбор проб, анализ, оценка результатов. – М., 2003. – 27 с.

137. ОФС 42-0013-03. Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб // Фармация. – 2003. – № 6. – С. 3–8.

138. ОФС 42-0067-07. Методы микробиологического контроля лекарственных растительных средств, состоящих из одного вида сырья или нескольких (сборов) – фасованная продукция, а также растительного сырья «ангро». – М., 2007.

139. Оценка безопасности лекарственного растительного сырья в БАДах и фитопрепаратах / В.А. Тутельян, И.А. Самылина, С.А. Хотимченко [и др.] // Фармация. – 2009. – № 1. – С. 3–5.

140. Пастушенков, Л.В. Растения – антигипоксанты / Л.В. Пастушенков, Е.Е. Лесиовская. – СПб., 1991. – 96 с.

141. Пат. 2342942 Российская Федерация, МПК51 А61К 36/185, А61Р 39/06. Средство растительного происхождения, обладающее антиоксидантной активностью / Латыпова Г.М., Романова З.Р., Соколов Г.В. [и др.]; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО БГМУ Росздрава. – № 2007144096/15; заявл. 16.11.07; опубл. 10.01.09, Бюл. № 1. – 8 с. с ил.

142. Пат. 2372931 Российская Федерация, МПК51 А61К 36/185, А61Р 43/00. Антиоксидантное средство растительного происхождения / Латыпова Г.М., Шафикова С.Ф., Гильмутдинова Л.Т. [и др.]; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО БГМУ Росздрава. – № 2008125593/15; заявл. 23.06.08; опубл. 20.11.09, Бюл. № 32. – 8 с.

143. Пахомов, В.П. Определение in vitro фитоантиоксидантного потенциала лекарственных растений / В.П. Пахомов, А.В. Копейкина, А.А. Макарян // Рос. аптеки. – 2003. – № 5. – С. 64–66.

144. Погорелый, В.Е. Исследование эффективности антигипоксантов и антиоксидантов при ишемических нарушениях мозгового

кровообращения: автореф. … дис. д-ра биол. наук: 14.00.25 / Погорелый Василий Ефимович. – Купавна, 2001. – 47 с.

145. Практикум по технологии лекарственных форм: учеб. пособие / под ред. И.И. Краснюка, Г.В. Михайловой. – М.: ИЦ «Академия», 2007. – 432 с.

146. Практикум по фармакогнозии: учеб. пособие для студ. вузов / В.Н. Ковалев, Н.В. Попова, В.С. Кисличенко [и др.]; под ред. В.Н. Ковалева. – Харьков: Изд-во НФаУ: МТК – Книга, 2004. – 512 с.

147. Растения рода «первоцвет» как перспективные источники профилактических и лекарственных средств / Г.М. Латыпова, В.Н. Бубенчикова, В.А. Катаев, З.Р. Романова. – Уфа: «Здравоохранение Башкортостана», 2011. – 108 с.

148. Растительные ресурсы России и сопредельных государств / под ред. Л.М. Беленовской, Л.И. Медведева. – СПб.: Мир и семья–95, 1996. – 571 с.

149. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность / отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – Т. 2. Семейства Actinidiaceae-Malvaceae, Euphorbiaceae-Haloragaceae. – 513 с.

150. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность / отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – Т. 1. Семейства Magnoliaceae-Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabinaceae, Urticaceae. – 421 с.

151. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Paeoniaceae – Thimelaeaceae / отв. ред. П.Д. Соколов. – Л.: Наука, 1986. – С. 175–176.

152. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Rutaceae – Eleagnaceae / отв. ред. П.Д. Соколов. – Л.: Наука, 1988. – 357 с.

153. Редченкова, В.Н. Анализ требований некоторых фармакопей, предъявляемых к экстрактам / В.Н. Редченкова, О.М. Хишова // Хим.-фармац. журн. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 37–40.

154. Рекомендации по межгосударственной стандартизации. РМГ 61-2003. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. – 41 с.

155. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ-МР 2.3.1.1915-04. – М., 2004.

156. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободнорадикальному окислению / И.В. Сорокина [и др.]. – Новосибирск, 1997. – С. 20-26.

157. Романова, З.Р. Фармакогностическое исследование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного: автореф. дис. … канд. фармац. наук : 14.00.02 / Романова Земфира Рашитовна. – Курск, 2011. – 22 с.

158. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: метод. рекомендации. – М.: Спорт и культура-2000, 2007. – 192 с.

159. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2000. – 153 с.

160. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

161. Сампиев, А.М. Экспериментально-теоретическое обоснование технологии препаратов с сапонино-флавоноидными компози-

циями при комплексной переработке растительного сырья: автореф. дис. … д-ра фармац. наук : 15.00.01 / Сампиев Абдулмуталип Магаметович. – Пятигорск, 1998. – 47 с.

162. Самылина, И.А. Лекарственные растения, обладающие гормональной активностью: проблема безопасности / И.А. Самылина, В.М. Булаев, Е.В. Ших // Фармация. – 2011. – № 1. – С. 38–41.

163. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 39-41.

164. Самылина, И.А. Фармакогнозия: атлас: учеб. пособие: в 3-х т. / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2010. – Т. 2. – 384 с.

165. Самылина, И.А. Фармакогнозия: атлас: учеб. пособие: в 3-х т. / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т. 1. – 192 с.

166. Селиванчикова, И.Б. Изучение компонентного состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в гомеопатических настойках методом ВЭЖХ. Сообщение 2 / И.Б. Селиванчикова, З.П. Костенникова // Фармация. – 2001. – № 4. – С. 21–22.

167. Селиванчикова, И.Б. Количественное определение флавоноидов в гомеопатических настойках туи методом спектрофотометрии. Сообщение 3 / И.Б. Селиванчикова, М.Н. Лякина, З.П. Костенникова // Фармация. – 2001. – № 6. – С. 14–16.

168. Сергиенко, В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева – М., 2000. – 263 с.

169. Сернов, Л.М. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.М. Сернов, В.В. Гацура. – М., 2000. – 352 с.

170. Сильверстейн, Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер, Д. Кимл. – М.:БИНОМ, 2012.–557 с.

171. Смирнов, Л.П. Особенности применения стандартного образца рутина в анализе растительного сырья, витаминных и фитопрепаратов / Л.П. Смирнова, С.С. Николаева, В.А. Быков // Хим.–фармац. журн. – 2000. – Т. 34, № 1. – С. 29–31.

172. Современная фитотерапия / под ред. чл.-корр., проф., д-ра В. Петкова. – София: Медицина и физкультура, 1988. – 503 с.

173. Современные методы в биохимии / под ред. акад. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.

174. Сокольская, Т.А. Стандартные образцы в контроле качества лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов / Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева, Я.Ф. Копытько // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы VII Международного съезда «Фитофарм» (3-5 июля 2003 г., г. Санкт-Петербург). – СПб., 2003. – С. 374–377.

175. Сорокин, В.В. Применение направленной экстракции при получении препаратов травы зверобоя / В.В. Сорокин, И.Е. Каухова, В.А. Вайнштейн // Фармация. – 2007. – № 4. – С. 34–35.

176. Сорокина, А.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование стандартизации настоев, отваров и сухих экстрактов из лекарственного растительного сырья: автореф. дис. … д-ра фармац. наук : 15.00.02 / Сорокина Алла Анатольевна. – М., 2002. – 46 с.

177. Сортовой контроль в хмелеводстве: практич. руководство / под ред. А.Р. Рупошева, Г.В. Рупошевой. – М., 2000. – 50 с.

178. Стандартизация и контроль качества ЛС: учеб. пособие / Н.А. Тюкавкина, А.С. Берлянд, Т.Е. Елизарова [и др.] – М.: ООО «МИА», 2008. – 384 с.

179. Стандартизация листьев первоцвета весеннего по показателю «содержание аскорбиновой кислоты» / Г.М. Латыпова, В.Н. Бубенчикова, З.Р. Романова, Д.Ф. Галимова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. – 2012. – № 10 (129), вып. 18/2. – С. 51-56.

180. Стресспротективное действие экстракта соплодий Humus lupulus L. / Я.Г. Разуваева, Н.В. Кабачук, Т.А. Ажунова, О.В. Нагаслаева // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – №2 (72). – С. 210-212.

181. Толстикова, Т.Г. Лекарства из растительных веществ / Т.Г. Толстикова, А.Г. Толстиков, Г.А. Толстиков; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Новосиб. ин-т орган. химии им. Н.Н. Ворожцова. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2010. – 215 с.

182. ТУ 9161-037-46865780-03. БАД таблетки «Виратон», рег. уд. 77.99.02.916.Б.000641.0803.

183. Тутельян, В.А. Содержание в пищевых продуктах, уровень потребления, биодоступность / В.А. Тутельян // Вопр. питания. – 2004. – № 6. – С. 42–48.

184. Тюкавкина, Н.А. Биофлаваноиды. Стандартизация и контроль качества лекарственных средств / Н.А. Тюкавкина, А.С. Берлянд, Т.Е. Елизарова. – М.: ООО «МИА», 2008. – 384 с.

185. Тюкавкина, Н.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки / Н.А. Тюкавкина, И.А. Руленко, Ю.А. Колесник // Вопр. питания. – 1996. – № 2. – С. 33–38.

186. Фадеева, И.А. Новые данные по флоре Смоленской области за 2007 год / И.А. Фадеева, Н.М. Решетникова // Бюлл. МОИП. Отд. биол. – 2008. – Т. 113, вып. 6. – С. 55-57.

187. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения: учеб. пособие / под ред. Г.П. Яковлева. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 863 с.

188. Фармакогнозия. Учебная практика: учеб. пособие / под ред. И.А. Самылиной, А.А. Сорокиной. – М.: ООО «МИА», 2011. – 432 с.

189. Фармакотерапия с основами фитотерапии: в 2-х т. / под ред. Л.В. Пастушенко [и др.]. – СПб., 1995. – Т. 2. – 250 с.

190. Фармацевтическая технология: Технология лекарственных форм: учебник / И.И. Краснюк, Г.В. Михайлова, Т.В. Денисова, В.И. Скляренко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 656 с.

191. Фархутдинов, Р.Р. Клинические аспекты применения метода регистрации хемилюминесценции крови / Р.Р. Фархутдинов // Тер. архив. – 1984. – Т. 56, № 8. – С. 150–153.

192. Фархутдинов, Р.Р. Метод регистрации хемилюминесценции в клинической практике / Р.Р. Фархутдинов, Х.С. Бикмухаметова, Р.Г. Фатихов // Совр. медицина. – 1986. – № 3. – С. 86–89.

193. Фархутдинов, Р.Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине / Р.Р. Фархутдинов, В.А. Лиховских. – Уфа, 1995. – 92 с.

194. Фёдоров, А.А. Первоцвет – Primula L. / А.А. Фёдоров // Флора СССР. – М.-Л.: АН СССР, 1952. – Т. 18. – С. 111-202.

195. Фёдоров, А.А. Сем. Primulaceae Vent. – Первоцветные / А.А. Фёдоров // Флора Европейской части СССР. – Л.: Наука, 1981. – Т. 5. – С. 63-87.

196. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / под ред. В.Г. Кукеса. – М.: Медицина, 1999. – 192 с.

197. Флавоноиды как гепатопротекторы и антиоксиданты / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, В.Б. Браславский [и др.] // Человек и ле-

карство: материалы IX Рос. нац. конгр. (7-11 апреля 2002 г., г. Москва). – М., 2002. – С. 164.

198. Флавоноиды как государственные стандартные образцы и их значение для целей стандартизации сырья и препаратов / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, А.А. Лебедев [и др.] // Человек и лекарство: материалы X Рос. нац. конгр. (7–11 апреля 2003 г., г. Москва). – М., 2003. – С. 728.

199. Флавоны и жирные кислоты надземной части Primula macrocalix Bge / Ю.С. Косенкова, М.П. Половинка, Н.И. Комарова [и др.] // Химия и технология растительных веществ: материалы V всерос. науч. конф. (8-12 июня 2008 г., г. Уфа). – Уфа, 2008. – С. 162.

200. Флора Восточной Европы. – М.; СПб., 2004. – Т. 11. – 536 с.

201. Флора Сибири. – Новосибирск: Наука, 1992. – Т. 5: Salicaceae-Amarantaceae. – 312 с.

202. Флора СССР: в 30-ти т. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1934-1964. – Т. 18. – 742 с.

203. ФС 42-2508-87. Рутин – стандартный образец. – М., 1987.

204. ФСП ЛСР – 001907/08 от 18.03.08. Хмель экстракт сухой / ООО «Хармс». – М.: Россия, 2008. – 6 с.

205. Хелдт, Г.-В. Биохимия растений: пер. с англ. / Г.-В. Хелдт. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

206. Химический анализ лекарственных растений / под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высш. шк., 1984. – 176 с.

207. Хмельницкий, Р.А. Масс–спектрометрия загрязнений окружающей среды / Р.А. Хмельницкий, Е.С. Бродский. – М.: Химия, 1990. – 184 с.

208. Хоед, И. Культура хмеля в Бельгии / И. Хоед // Новое в возделывании за рубежом: сб. переводов. – М., 1970. – С. 16–22.

209. Хроматография в тонких слоях / под ред. Э. Шталя. – М.: Мир, 1968. – 352 с.

210. Хроматография на бумаге / под ред. И.М. Хайца, К. Мацека. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962. – 851 с.

211. Хроматография. Практическое приложение метода: в 2-х ч. / под ред. Э. Хефтмана. – М.: Мир, 1986.

212. Шафикова, С.Ф. Фармакогностическое изучение листьев хмеля обыкновенного (Humulus Lupulus L.): автореф. дис. … канд. фармац. наук : 14.04.02 / Шафикова Светлана Феликсовна. – Самара, 2013. – 20 с.

213. Шматков, Д.А. Определение суммы фенолкарбоновых кислот в корнях лопуха большого (Arctium lappa L.) / Д.А. Шматков, Д.М. Попов // Фармация на современном этапе – проблемы и достижения: сб. науч. тр. – М., 2000. – Т. XXXIX, ч. 2. – С. 174–178.

214. Шмидт, Л.Г. Горькие вещества хмеля и методы их анализа / Л.Г. Шмидт. – М., 1964. – 64 с.

215. Штабский, Б.М. К методике определения среднесмертельных доз и концентраций химических веществ / Б.М. Штабский // Гигиена и санитария. – 1980. – № 10. – С. 49-61.

216. Шумиловских, Е.В. Обеспечение качества продукции, реализуемой аптечными организациями: учеб.-метод. пособие / Е.В. Шумиловских, А.В. Солонинина. – Пермь, 2009. – 134 с.

217. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: учеб. пособие / под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 407 с.

218. A furanocoumarin and polymethoxylated flavonoids from the Yucatec Mayan plant Casimiroa tetrameria / B.H. Heneka, A. Rimpler, O. Ankli [et al.] // Phytochemistry. – 2005. – Vol. 66, № 6. – P. 649-652.

219. A study on exudates and micromorphology of Primula / T.D. Bhutia, W. Adlassnig, L. Brecker, K.V. Vetschera // Planta Med. – 2011. – Vol. 77. – P. 12.

220. Ahmed, S. Epigallocatechim-3-gallate inhibits IL-6 synthesis and suppresses transsignaling by enhancing soluble gp130 production / S. Ahmed, H. Marotte, K. Kwan // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105, № 38. – P. 14692–14697.

221. Allsopp, P. A comparison of the anticancer properties of isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin using in vitro models of colon cancer / P. Allsopp, S. Possemiers, D. Campbel // Biofactors. – 2013. – Jan 30. doi: 10.1002/biof.1084.

222. Anti-inflammatory acylphloroglucinol derivatives from Hops (Humulus lupulus) / G. Bohr, C. Gerhauser, J. Knauft [et al.] // J. Nat. Products. – 2005. – Vol. 68, № 10. – P. 1545-8.

223. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of 5-deprenyllupulonol C and other compounds from Hop (Humulus lupulus L.) / H. Akazawa, H. Kohno, H. Tokuda [et al.] // Chem. Biodiversity. – 2012. – Vol. 9, № 6. – P. 1045-54.

224. Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (Humulus lupulus L.) and beer / B. Vanhoecke, L. Derycke, V. Van Marck [et al.] // Int. J. Cancer. – 2005. – Vol. 117, № 6. – P. 889-95.

225. Antimutagenicity of hops (Humulus lupulus L.): bioassay-directed fractionation and isolation of xanthohumol / J. Kac, J. Plazar, A. Mlinaric [et al.] // Phytomedicine. – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 2016-220.

226. Antioxidant, antihemolytic, and inhibitory activities of endemic Primula heterochroma against Fe(2+)-induced lipid peroxidation and oxidative stress in rat brain in vitro / H. Alinezhad, M. Zare, S.F. Nabavi [et al.] // Pharm. Biol. – 2012. – Vol. 50, № 11. – P. 1391-1396.

227. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus) in human cancer cell lines / C.L. Miranda, J.F. Stevens, A. Helmrich [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 1999. – Vol. 37, № 4. – P. 271-85.

228. Arti, A. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a siries of flavonoids in a liposomal system / A. Arti, G.N. Muraleedharan, M. Gale // Free Radic. Biol. And Med. – 1998. – Vol. 24, № 9. – P. 1355–1363.

229. Assessing the protective effect of Primula heterochroma stapf extracts against sodium fluoride-induced Hemolysis in rat erythrocytes / H. Alinezhad, M. Zare, S.F. Nabavi [et al.] // Fluoride. – 2011. – Vol. 44, № 4. – P. 238-242.

230. Bahorun, T. Phenolic constituents and antioxidant capacities of Crataegus monogyna (Hawthorn) callus extracts / T. Bahorun, E. Aumjaud, H. Ramphul // Nahrung. – 2003. – Vol. 47, № 3. – P. 191–198.

231. Bhutia, T.D. Diversification of exudate flavonoid profiles in further Primula spp / T.D. Bhutia, K.M. Valant-Vetschera // Nat. Product Commun. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. 587-9.

232. Bhutia, T.D. Orphan flavonoids and dihydrochalcones from Primula exudates / T.D. Bhutia, K.M. Valant-Vetschera, L. Brecker // Nat. Product Commun. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. 1081-4.

233. Bioactive Substances of Plant Origin. – Moscow: Nauka, 2001.

234. Biological effects of epicuticular flavonoids from Primula denticulata on human leukemia cells / S.V. Tokalov, B. Kind, E. Wollenweber, H.O. Gutzeit // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, № 2. – P. 239-45.

235. Bors, W. Flavonoids as antioxidants: determinations of ragical-scavenging effeciens / W. Bors, W. Heller // Metods Ensimol. – 1990. – Vol. 186. – P. 343–355.

236. Brant, A. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system / A. Brant, T. Jess, G. Milligan // Biophys. Res. Commun. – 1993. – Vol. 192. – P. 1297–1302.

237. Briant, E.T. A note of the differentiation between flavonoid glicosides and their aglicones / E.T. Briant // J. Amer. Pharm. Assoc. – 1950. – Vol. 39, № 8. – P. 480-488.

238. British Pharmacopoeia. – London: The Stationery Office, 2001. – Vol. 1. – 855 p.

239. Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medical Plants, Lavoisier / J. Bruneton. – N. Y., 1999.

240. Buckwold, V.E. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses / V.E. Buckwold, R.J.H. Wilson, A. Nalca // Antiviral Res. – 2004. – № 1. – S. 57–62.

241. Budzianowski, J. Lipophilic flavones of Primula veris L. from field cultivation and in vitro cultures / J. Budzianowski, M. Morozowska, M. Wesolowska // Phytochemistry. – 2005. – Vol. 66, № 9. – P. 1033-1039.

242. Burda, S. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids / S. Burda, W. Oleszek // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49. – P. 2774–2779.

243. Bureš, J. Cortical spreading depression as a memory disturbing facto / J. Bureš O. Burešová // J. Comp. Physiol. Psychol. – 1963. – Vol. 56. – P. 268–272.

244. Calis, I. Saponin and sapogenol: comparative stady on the sapogenol constituents of three Primula species / I. Calis // Doga: Tip Eczacilic. – 1987. – Vol. 11, № 2. – P. 206–215.

245. Carotenoid content of wild edible young shoots traditionally consumed in Spain (Asparagus acutifolius L., Humulus lupulus L., Bryonia dioica Jacq. and Tamus communis L.) / P. Garcia-Herrera, M.C. Sanchez-Mata, M. Camara [et al.] // J. Sci. Food Agricultur. – 2013. – Vol. 93, № 7. – P. 1692-8.

246. Chadwick, L.R. The pharmacognosy of Humulus lupulus L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties / L.R. Chadwick, G.F. Pauli, N.R. Farnsworth // Phytomedicine. – 2006. – Vol. 13, № 1-2. – P. 119-31.

247. Chevallier, A.M. The Encyclopedia of Medicinal Plants / A.M. Chevallier. – London, 1996. – 336 p.

248. Clark, S.M. Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (Humuluslupulus) / S.M. Clark, V. Vaitheeswaran, S.J. Ambrose // BMC Plant Biol. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 12.

249. Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian Primula species / G. Fico, G. Rodondi, G. Flamini [et al.] // Phytochemistry. – 2007. – Vol. 68, № 12. – P. 1683-91.

250. Comparison of the in vitro estrogenic activities of compounds from hops (Humulus lupulus) and red clover (Trifolium pratense) / C.R. Overk, P. Yao, L.R. Chadwick [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53, № 16. – P. 6246-53.

251. Constitutive expression of a grapevine stilbene synthase gene in transgenic hop (Humulus lupulus L.) yields resveratrol and its derivatives in substantial quantities / A. Schwekendiek, O. Spring, A. Heyerick [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55, № 17. – P. 7002-9.

252. Coran, S.A. Validated determination of primulasaponins in primula root by a high-performance-thin-layer-chromatography densitometric approach / S.A. Coran, S. Mulas // J. Pharm. Biomed. Analysis. – 2012. – Vol. 70. – P. 647-51.

253. Detection and quantification of provitamin D2 and vitamin D2 in hop (Humulus lupulus L.) by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry / P.J. Magalhaes, D.O. Carvalho, L.F. Guido, A.A. Barros // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55, № 20. – P. 7995-8002.

254. Differential regulation of detoxification enzymes in hepatic and mammary tissue by hops (Humulus lupulus) in vitro and in vivo / B.M. Dietz, G.K. Hagos, J.N. Eskra [et al.] // Mol. Nutrit. Food Res. – 2013. – Vol. 57, № 6. – P. 1055-66.

255. ECLA A23L 1/30 B; A23 L2/52; A23 L2/56; C12C11/11; C12F3/ 06; C12H1/ 14. Spent hop products, their content in stilbenes and their use as antioxidant for comestible production / C. Sonia, I. Sa, J. Vesna [et al.]. – WO 2008068344 (A2) – 2008.06.12.

256. Effect of dietary polyphenols from hop (Humulus lupulus L.) pomace on adipose tissue mass, fasting blood glucose, hemoglobin A1c, and plasma monocyte chemotactic protein-1 levels in OLETF rats / K. Yui, H. Uematsu, K. Muroi [et al.] // J. Oleo Sci. – 2013. – Vol. 62, № 5. – P. 283-92.

257. Effects of isometric strength training followed by no exercise and Humulus lupulus L-enriched diet on bone metabolism in old female rats / H. Figard, F. Mougin, M. Nappey [et al.] // Metabol. Clin. Experim. – 2007. – Vol. 56, № 12. – P. 1673-81.

258. Eri, S. Direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (Humulus lupulus L.) essential oils in support of varietal characterization / S. Eri, K. Kroob, J. Lech // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, № 4. – P. 1140–1149.

259. Estrogens and congeners from spent hops (Humulus lupulus) / L.R. Chadwick, D. Nikolic, J.E. Burdette [et al.] // J. Nat. Products. – 2005. – Vol. 67, № 12. – P. 2024-32.

260. European Pharmacopeia. – 5th ed. – Strasburg, 2005. – 2621 p.

261. European Pharmacopeia. – 7th ed. – Strasburg, 2010.

262. European Pharmacopoeia.–3-rd ed. – Paris: Maisonneuve S.A., 2001. – 948 p.

263. Eyres, G.T. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (Humulus lupulus L.) essential oil from four different varieties / G.T. Eyres, P.J. Marriott, J.P. Dufour // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55, № 15. – P. 6252-61.

264. Fatty-acid composition and secondary metabolites from slightly polar extracts of the aerial part of primula macrocalyx / Yu.S. Kosenkova, M.P. Polovinka, N.I. Komarova, [et al.] // Chem. Nat. Compounds. – 2008. – Vol. 44, № 5. – P. 564-568.

265. Flavonoids from Humulus lupulus / W.K. Zhang, S.B. Wang, C.Y. Fu [et al.] // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. – 2013. – Vol. 38, № 10. – P. 1539-42.

266. Flavonoids in selected Primula spp.: bridging micromorphology with chemodiversity / T.D. Bhutia, K.M. Valant-Vetschera, W. Adlassnig, L. Brecker // Nat. Product Commun. – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. 1469-73.

267. Floral heteromorphy in Primula vulgaris: progress towards isolation and characterization of the S locus / J. Li, M.A. Webster, M.C. Smith, P.M. Gilmartin // Ann. Botany. – 2011. – Vol. 108, № 4. – P. 715-26.

268. Fouad, M.A. Chemical and biological studies of the methanolic extarct of Primula elatior L. seeds / M.A. Fouad, A.S. Abdel-Hafeez // Bull. Pharm. Sci. – 2009. – Vol. 32, part 1. – P. 111-123.

269. Gaskett, A.C. Floral odor variation in two heterostylous species of Primula / A.C. Gaskett, E. Conti, F.P. Schiestl // J. Chem. Ecol. – 2005. – Vol. 31, № 5. – P. 1223-1228.

270. Geissman, T.A. Chemistry of flavonoid compounds / T.A. Geissman. – Oxford: Pergamon Press, 1962. – 666 p.

271. Gerhauser, C. Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (Humulus lupulus L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites / C. Gerhauser // Mol. Nutrit. Food Res. – 2005. – Vol. 49, № 9. – P. 827-31.

272. Glasby, J.S. Encyclopedia of the alkaloids / J.S. Glasby. – London, 1975. – Vol. 3. – 519 p.

273. Hagerman, A. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants / A. Hagerman, K. Riedl, G. Jones // J. Agric. Food Chem. – 1998. – Vol. 46. – P. 1887-1892.

274. Halliwell, B.A. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism / B.A. Halliwell // Biochem. Pharmacol. – 1995. – Vol. 49, № 10. – P. 1341–1348.

275. Hann, J.T. Fast LC analyses of the α-acid content of «fresh» and «aged» hops / J.T. Hann // Lab. Pract. – 1989. – Vol. 38. – P. 59-61.

276. Harborn, J.B. Plant polyphenols XXI: Characterisation of flavonoid glycosides by acid and ansimatic hydrolyses / J.B. Harborn // Phytochemistry. – 1965. – Vol. 4, №1. – P. 107-121.

277. Harborn, J.B. The flavonoids / J.B. Harborn, T.J. Mabry, H. Mabry. – N. Y.: Charman and Hall, 1975. – 1200 p.

278. Herdan, J. Antioxidanti / J. Herdan, M. Giurginca, M. Merghea. – Bucuresti: Ed. Tehnica, 1995. – P. 43–59.

279. Heyerick, A. A first prospective, randomized, double-blind, placebo controlled study on the use of standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts / A. Heyerick, S. Vervarcke, H. Depypere // Maturitas. – 2006. – Vol. 53. – P. H164–175.

280. Hill, H.C. Mass – spectra and molecular structure. Part 1. Correlation Studies and metastable transitions / H.C. Hill, R.I. Read, M.T. Robert–Lopes // J. Chem. Sol. – 1968. – № 1. – P. 93–101.

281. Hop (Humulus lupulus L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography / A.W. Taylor, E. Barofsky, J.A. Kennedy, M.L. Deinzer // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51, № 14. – P. 4101-10.

282. Hop (Humulus lupulus)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds / M. Van Cleemput, K. Cattoor, K. De Bosscher [et al.] // J. Nat. Products. – 2009. – Vol. 72, № 6. – P. 1220-30.

283. Hops (Humulus lupulus) inhibits oxidative estrogen metabolism and estrogen-induced malignant transformation in human mammary epithelial cells (MCF-10A) / L.P. Hemachandra, P. Madhubhani, R. Chandrasena [et al.] // Cancer Prevent. Res. – 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 73-81.

284. HPLC separation and wavelength area rations of more than 50 phenolic acids and flavonoids / W.L. Banwart, P.M. Porter, T.C. Granato, I.I. Hassett // J. Chem. Ecol. – 1985. – Vol. 11, № 3. – P. 383–395.

285. Ichikawa, H. Antioxidant activity of antocyanin extract from purple black rice / H. Ichikawa, T. Ichiyanagi, B. Xu // J. Med. Food. – 2001. – Vol. 4, № 4. – P. 211-218.

286. In vitro anti-inflammatory and anti-microbial activity of cowslip flowers (Primula veris L.) / S. Seifert, B. Kopeinig, R. Bauer [et al.] // Planta Med. – 2012. – Vol. 78, № 11. [Date of Publication: July 2012].

287. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, Humulus lupulus / M.C. Henderson, C.L. Miranda, J.F. Stevens [et al.] // Xenobiotica. – 2000. – Vol. 30, № 3. – P. 235-51.

288. Inhibitors of nitric oxide production from hops (Humulus lupulus L.) / F. Zhao, H. Nozawa, A. Daikonnya [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – Vol. 26, № 1. – P. 61-5.

289. Interaction of different extracts of primula heterochroma stapf. with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and

antihemolytic effects / S.M. Nabavi, S.F. Nabavi, W.N. Setzer [et al.] // J. Diet. Suppl. – 2012. – Vol. 9, № 4. – P. 285-292.

290. Investigation of the anxiolytic effects of xanthohumol, a component of humulus lupulus (Hops), in the male Sprague-Dawley rat / T.E. Ceremuga, L.A. Johnson, J.M. Adams-Henderson [et al.] // AANA J. – 2013. – Vol. 81, № 3. – P. 193-8.

291. Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of Primula veris by liquid chromatography and mass spectrometry / C.W. Huck, C.G. Huber, K.H. Ongania, G.K. Bonn // J. Chromatogr. A. – 2000. – Vol. 870, № 1-2. – P. 453-62.

292. Jensen, S.R. Dihydrochalcones from Viburnum davidii and Viburnum Lantanoides / S.R. Jensen, B. J. Nielsen, V. Norn // Phytochemistry. – 1977. – Vol. 16, № 12. – P. 2036-2038.

293. Kac, M. Presentation and determination of hop (Humulus lupulus L.) cultivars by a min-max model on composition of hop essential oil / M. Kac, M. Kovacevic // Mschr. Brauwiss. – 2000. – Bd. 53, № 9/10. – S. 180–184.

294. Lim, D.Y. Comparison of green tea extract and epigallocatechin gallate on blood pressure and contractile responses of vascular smooth muscle of rats / D.Y. Lim, E.S. Lee, H.G. Park // Arch. Pharm. Res. – 2003. – Vol. 26, № 3. – P. 214-223.

295. Mabry, T.J. The systematic identification of flavonoids / T.J. Mabry, M. R. Markham, M.B. Thomas. – N. Y.: Springer, 1970. – 354 p.

296. Medic-Saric, M. Application of numerical methods to the TLC analysis of flavonoids and Phenolic acids of Rosmarini folium / M. Medic-Saric, Z. Males // J. Planar Chromatogr. – 1997. – № 10. – P. 182–186.

297. Merck, E. Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography / E. Merk. – Darmstadt, 1980. – 114 s.

298. Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus L.), by human liver microsomes / D. Nikolic, Y. Li, L.R. Chadwick [et al.] // J. Mass Spectrometry. – 2005. – Vol. 40, № 3. – P. 289-99.

299. Milligan, S.R. Oestrogenic activity of the hop phytoestrogen 8-preniylnaringenin / S.R. Milligan, J.C. Kalita, V. Picock // Reproduction. – 2002. – Vol. 123. – P. 235–242.

300. Milligan, S.R. Oestrogenic activity of the hop phytoestrogen in hops (Humulus lupulus) and beer / S.R. Milligan, J.C. Kalita, V. Picoc // J. Clin. Endorinol. Metabol. – 1999. – Vol. 83. – P. 2249–2252.

301. Miyashita, M. Effect of linalool as a component of Humulus lupulus on doxorubicin-induced antitumor activity / M. Miyashita, Y. Sadzuka // Food Chem. Toxicol. – 2013. – № 53. – P. 174–179.

302. Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (Humulus lupulus L.) flavonoids / R. Monteiro, A. Faria, I. Azevedo, C. Calhau // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2007. – Vol. 105, № 1-5. – P. 124-30.

303. Müller, A. Analysis of phenolic glycosides and saponins in Primula elatior and Primula veris (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry / A. Müller, M. Ganzera, H. Stuppner // J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 1112, № 1–2. – P. 218-23.

304. Najmus-Saqib, Q. Antimicrobial and cytotoxicity activities of the medicinal plant Primula Macrophylla / Q. Najmus-Saqib, F. Alam, M. Ahmad // J. Enzyme Inhibit. Med. Chem. – 2009. – Vol. 24, № 3. – P. 697-701.

305. Narvaez, N. Effects of hop varieties on ruminal fermentation and bacterial community in an artificial rumen (rusitec) / N. Narvaez, Y. Wang, Z. Xu // J. Sci Food Agric. – 2013. – Vol. 93, № 1. – P. 45–52.

306. New insight in the neuropharmacological activity of Humulus lupulus L. / P. Zanoli, M. Rivasi, M. Zavatti [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2005. – Vol. 102, № 1. – P. 102-6.

307. Paris, R. Sur les flavonoides des primeveres indigenes: Presence d'un heteroside du kaempferol dans les fleurs de Primula officinalis Jacq / R. Paris // Ann. Pharm. Franc. – 1957. – Vol. 17, № 5. – P. 331.

308. Phillipson, D. Herbal Drugs and Phytopharmaceutical / D. Phillipson. – Medpharm, 1994. – P. 206–207.

309. Poracova, J. The contents of therapeutically effective compounds of cowslip (Primula veris L.) from various stands of Levocske Mountains in eastern Slovakia / J. Poracova, M. Zahatnanska, M. Blascakova // Planta Med. – 2009. – Vol. 75, № 9. [Date of Publication: July 2009].

310. Positive antibacterial co-action between hop (Humulus lupulus) constituents and selected antibiotics / P. Natarajan, S. Katta, I. Andrei [et al.] // Phytomedicine. – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 194-201.

311. Prenylflavonoid variation in Humulus lupulus: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol / J.F. Stevens, A.W. Taylor, G.B. Nickerson [et al.] // Phytochemistry. – 2000. – Vol. 53, № 7. – P. 759-75.

312. Primula spectabilis Tratt. aerial parts: morphology, volatile compounds and flavonoids / S. Vitalini, G. Flamini, A. Valaguzza [et al.] // Phytochemistry. – 2011. – Vol. 72, № 11-12. – P. 1371-8.

313. Recio, M.C. Structural reguire¬ments for the antiinflamatory activity of natural triterpenoids / M.C. Recio // Planta Med. – 1995. – Vol. 61, № 2. – P. 182-185.

314. Rezac, J. The influence of the main terpen components of hop oil on the beer aroma / J. Rezac, J. Ceptica, I. Viden // Czech J. Food Sci. – 1998. – Vol. 16, № 1. – P. 19–24.

315. Rice-Evans, C. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids / C. Rice-Evans, N.J. Miller // Flavonoids in health and diseases. – 1999. – Ch. 5. – P. 199–219.

316. Richards, J. Primula / J. Richards. – London, 1993. – 299 p.

317. Roberts, J.B. Composition and Biogenesis of essential oils of hop / J.B. Roberts // J. Inst. Brew. – 1962. – № 5. – P. 420–427.

318. Sayanova, O. Delta-6 unsaturated fatty acids in species and tissues of the Primulaceae / O. Sayanova, J.A. Napier, P.R. Shewry // Phytochemistry. – 1999. – Vol. 52. – P. 419-422.

319. Sayanova, O.V. Identification of primula fatty acid delta 6-desaturases with n-3 substrate preferences / O.V. Sayanova, F. Beaudoin, L.V. Michaelson // FEBS Letters. – 2003. – Vol. 542, № 1–3. – P. 100–104.

320. Schaefer, O. 8-preniylnaringenin is apotent Era-selective phytoestrogen present in hops and beer / O. Schaefer, M. Hmpel, K.H. Fritremeier // J. Sleroid Biochem. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 84. – P. 339–360.

321. Selective inhibition of COX-2 by a standardized CO2 extract of Humulus lupulus in vitro and its activity in a mouse model of zymosan-induced arthritis / S. Hougee, J. Faber, A. Sanders [et al.] // Planta Med. – 2006. – Vol. 72, № 3. – P. 228-33.

322. Shimiat, N. New method for location of organic asids on paper chromatogramms / N. Shimiat, C. Pischer, J.N. Mecoven // J. Pharm. Sci. – 1963. – Vol. 52. – P. 468-472.

323. Siems, K. Structures of the two saponins isolated from commercially available root extract of Primula sp. / K. Siems, M. Jaensch, J. Jakupovic // Planta Med. – 1998. – Vol. 64, № 3. – P. 272-4.

324. Skvortsov, A.K. Introduction of Plants of the Natural Flora of the USSR / A.K. Skvortsov, N.V. Trulevich, Z.R. Alferova. – Moscow: Nauka, 1979.

325. Stevens, J.F. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health / J.F. Stevens, J.E. Page // Phytochemistry. – 2004. – Vol. 65, № 10. – P. 1317–1330.

326. Study on chemical constituents of Primula maximowiczii Regel: Part III / G.-L. Qu, H.-M. Zhang, Z.-W. Deng [et al.] // Chin. Pharm. J. – 2011. – Vol. 46, № 2. – P. 93-97.

327. Sumiyoshi, M. Hop (Humulus lupulus L.) extract inhibits obesity in mice fed a high-fat diet over the long term / M. Sumiyoshi, Y. Kimura // Brit. J. Nutr. – 2013. – Vol. 109, № 1. – P. 162–172.

328. Takamura-Enya, T. Analysis of estrogenic activity of foodstuffs and cigarette smoke condensates using a yeast estrogen scrieening method / T. Takamura-Enya, J. Ishihara, S. Tahara // Food Chem. Toxicol. – 2003. – Vol. 41. – P. 543–550.

329. The antimycobacterial components of hops (Humulus lupulus) and their dereplication / M. Stavri, R. Schneider, G. O'Donnell [et al.] // Phytother. Res. – 2004. – Vol. 18, № 9. – P. 774-6.

330. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (Humulus lupulus L.) flavonoids / S.R. Milligan, J.C. Kalita, V. Pocock [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metabol. – 2000. – Vol. 85, № 12. – P. 4912-5.

331. The extract from hop cones (Humulus lupulus) as a modulator of oxidative stress in blood platelets / B. Olas, J. Kolodziejczyk, B. Wachowicz [et al.] // Platelets. – 2011. – Vol. 22, № 5. – P. 345-52.

332. The flavonoids as the bioantioxidants / V.A. Kurkin [et al.] // Polyphenols Communications 2002: 21 International conference on polyphenols. – Marrakech-Morocco, 2002. – P. 285–286.

333. Trease, G.E. Pharmacognosy / G.E. Trease. – London: WB Saunders, 1996. – 812 p.

334. Triterpene saponins from Primula veris subsp. Macrocalyx and Primula elatior subsp. Meyeri / Çaliş Ihsan, Yürüker Ayşen, Rue"gger Henz [et al.] // J. Natur. Prod. – 1992. – Vol. 55, № 9. – P. 1299–1306.

335. Use of hop (Humulus lupulus) agricultural by-products for the reduction of aqueous lead(II) environmental health hazards / J. Gardea-Torresdey, M. Hejazi, K. Tiemann [et al.] // J. Hazardous Mater. – 2002. – Vol. 91, № 1-3. – P. 95-112.

336. Valant-Vetschera, K.M. Exudate flavonoids of Primula spp: structural and biogenetic chemodiversity / K.M. Valant-Vetschera, T.D. Bhutia, E. Wollenweber // Nat. Product Commun. – 2009. – Vol. 4, № 3. – P. 365-70.

337. Volak, J. Plants Medicinalis / J. Volak, J. Stodola. – Paris: Grund, 1983. – 320 s.

338. Wagner, H. Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas / H. Wagner, S. Blads. – Berlin; Heidelberg; N. Y.: Springer Verlang, 1996. – 348 p.

339. Wang, G. Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (Humulus lupulus) and the evolution of monoterpene biosynthesis / G. Wang, R.A. Dixon // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, № 24. – P. 9914-9.

340. Wang, W.S. New prenylchalcones from the hops of Humulus lupulus / W.S. Wang, Y.H. Ye, Y.W. Zhou // J. Asian Nat. Prod. Res. – 2008. – Vol. 10, № 5-6. – P. 485-90.

341. Wu, X. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity / X. Wu, L.Gu, R.L. Prior // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52. – P. 7846-7856.

342. Wulf, L.W. Analisis of phenolic acids and flavonoids by high pressure liquid chromatography / L.W. Wulf, C.W. Nagel // J. Chromatogr. – 1976. – Vol. 116, № 2. – P. 36–40.

343. Xanthohumol isolated from Humulus lupulus Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase / B.M. Dietz, Y.H. Kang, G. Liu [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 2005. – Vol. 18, № 8. – P. 1296-305.

344. Yamaguchi, N. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (Humulus lupulus) addressing acne vulgaris / N. Yamaguchi, K. Satoh-Yamaguchi, M. Ono // Phytomedicine. – 2009. – Vol. 16, № 4. – P. 369-76.

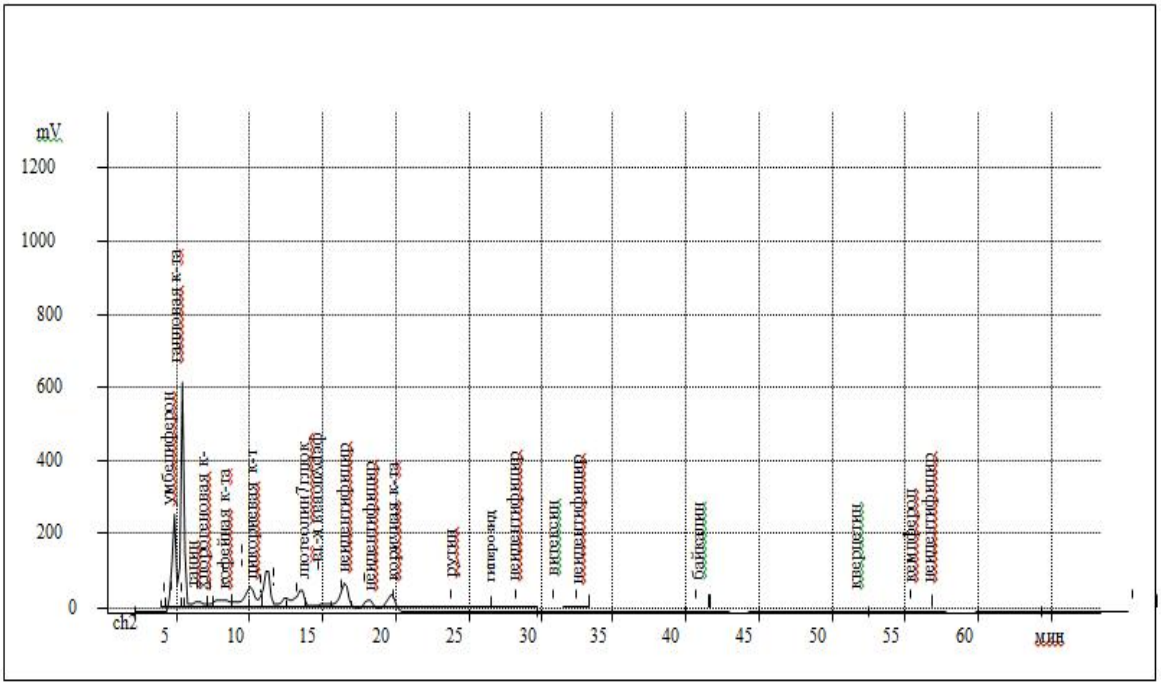
345. Zanoli, P. Experimental evidence of the anafrodisiac activity of Humulus lupulus in naive male rats / P. Zanoli, M. Zavatti, M. Rivaci // J. Ethnopharmacol. – 2009. – Vol. 125. – P. 36–40.

346. Zanoli, P. Pharmacognosic and pharmacological profile of Humulus lupulus / P. Zanoli, M. Zavatti // J. Ethnopharmacol. – 2008. – Vol. 116. – P. 383–396.

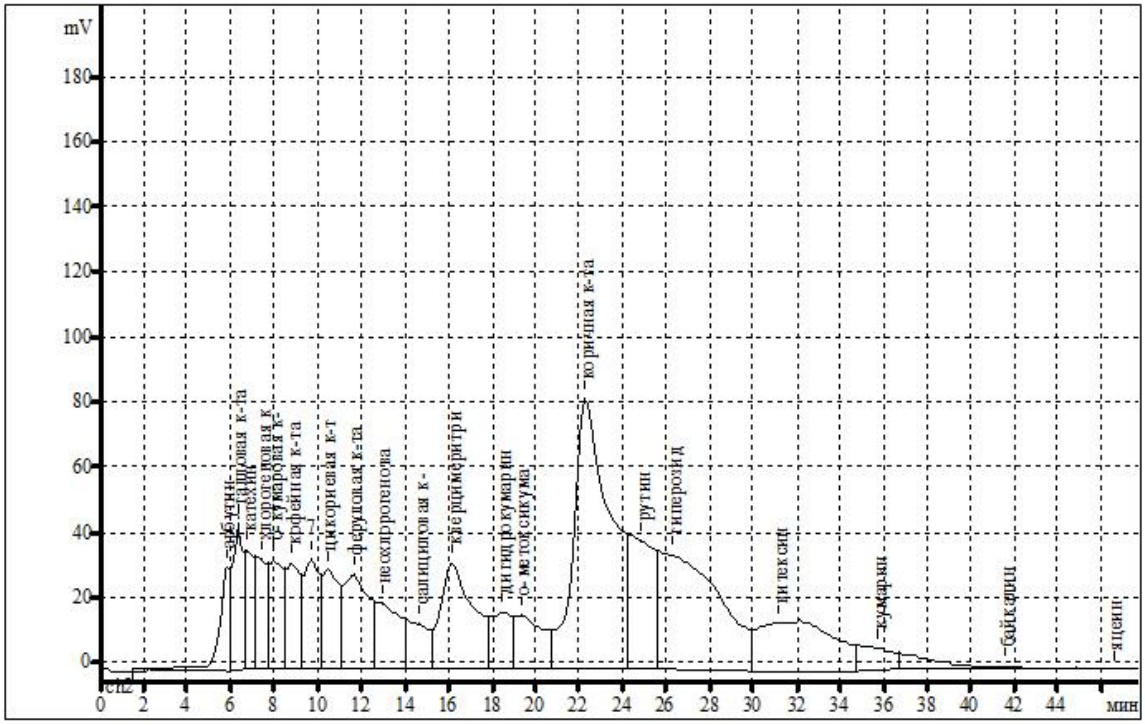
347. Zhand, W. Study of automated mass spectral deconvollution and identification system in pesticide reside analysis / W. Zhand, P. Wu, C. Li // Rapid Commun. Mass. Spectrom. – 2006. – Vol. 20. – P. 1563–1568.

348. Zierau, O. Antiandrogenic activity of the phytoestrogen naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl) naringenin and 8-preniylnaringeni / O. Zierau, C. Morrisey, R.V. Watson // Planta Med. – 2003. – Vol. 69. – P. 856–8.

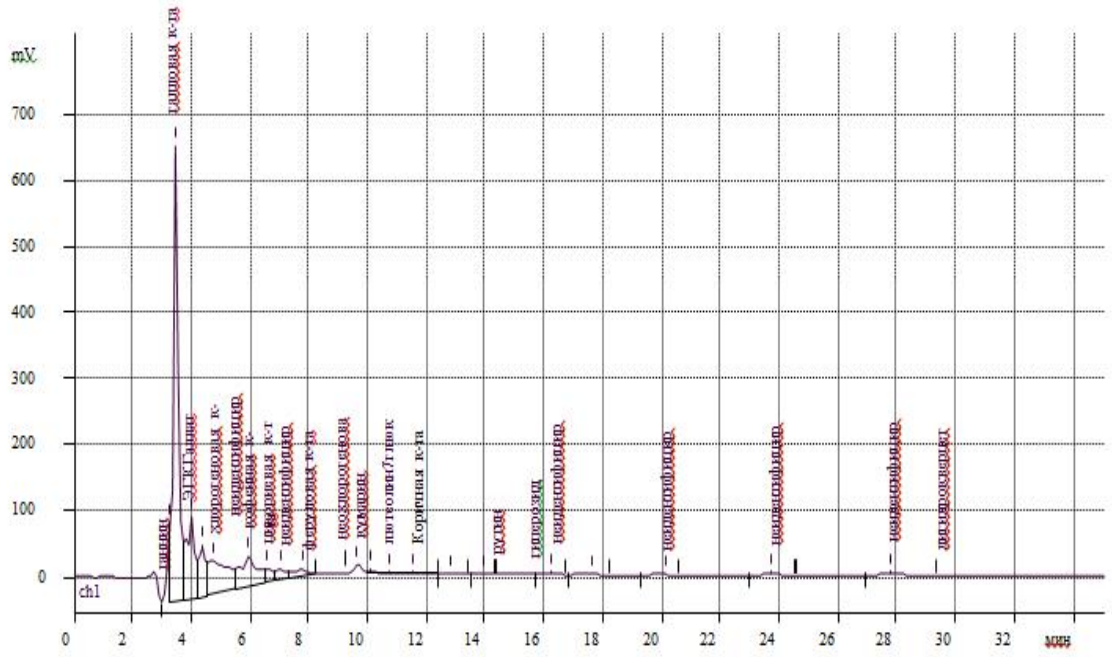
ПРИЛОЖЕНИЯ



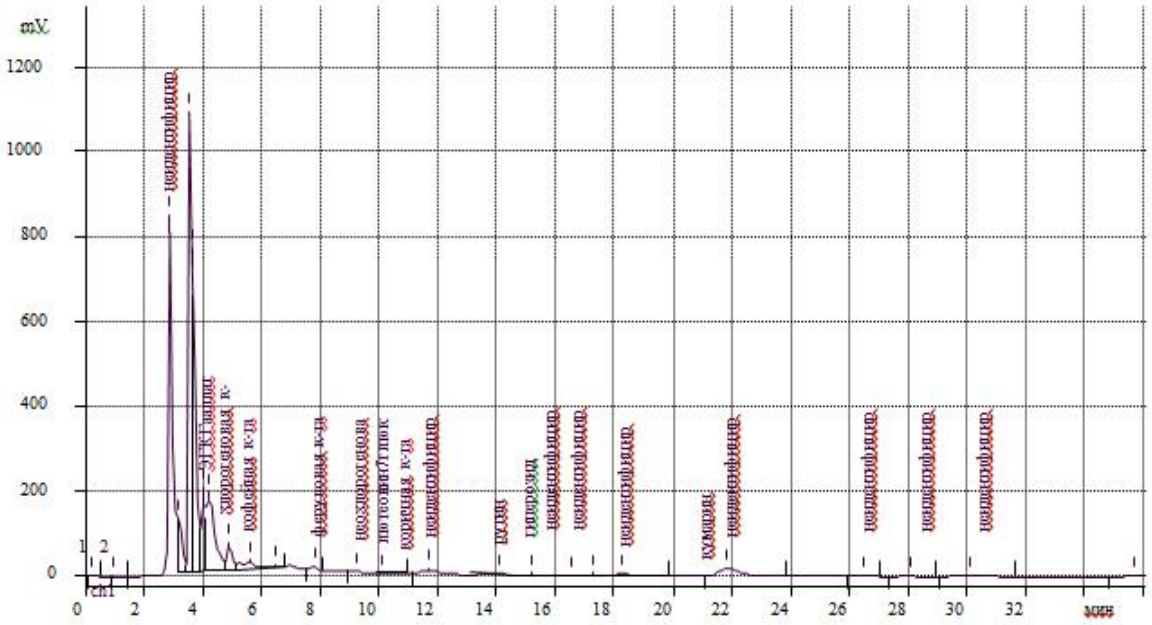
Приложение 1 – Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения сырья первоцвета весеннего



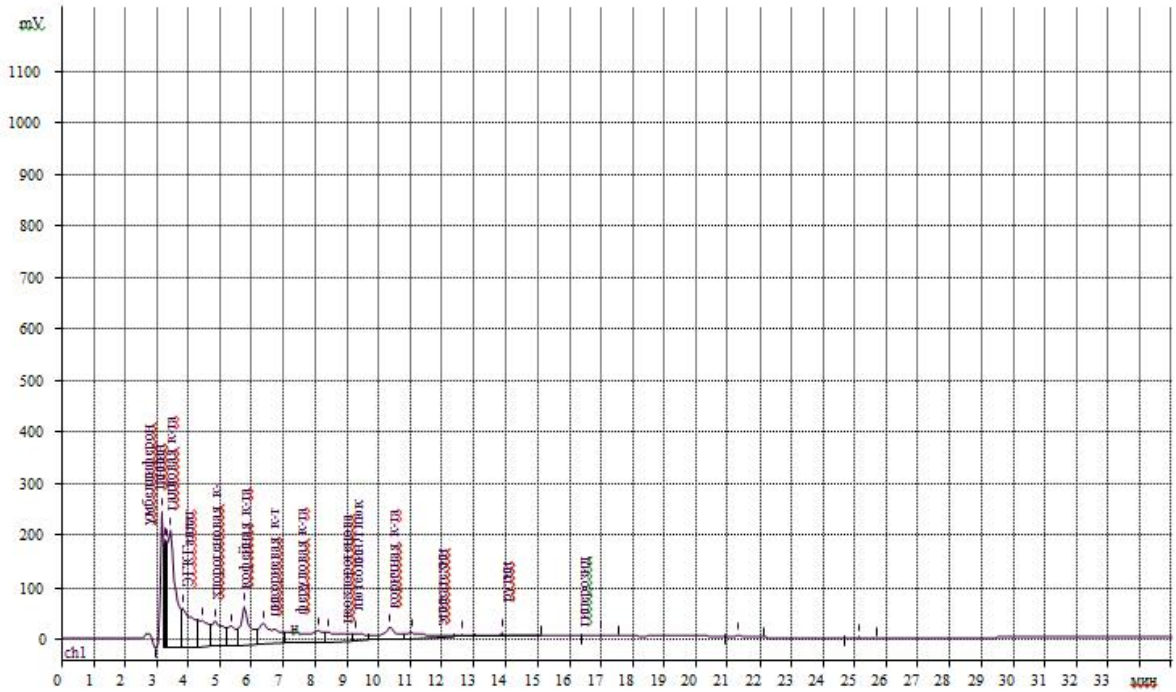
Приложение 2- Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения сырья первоцвета крупночашечного



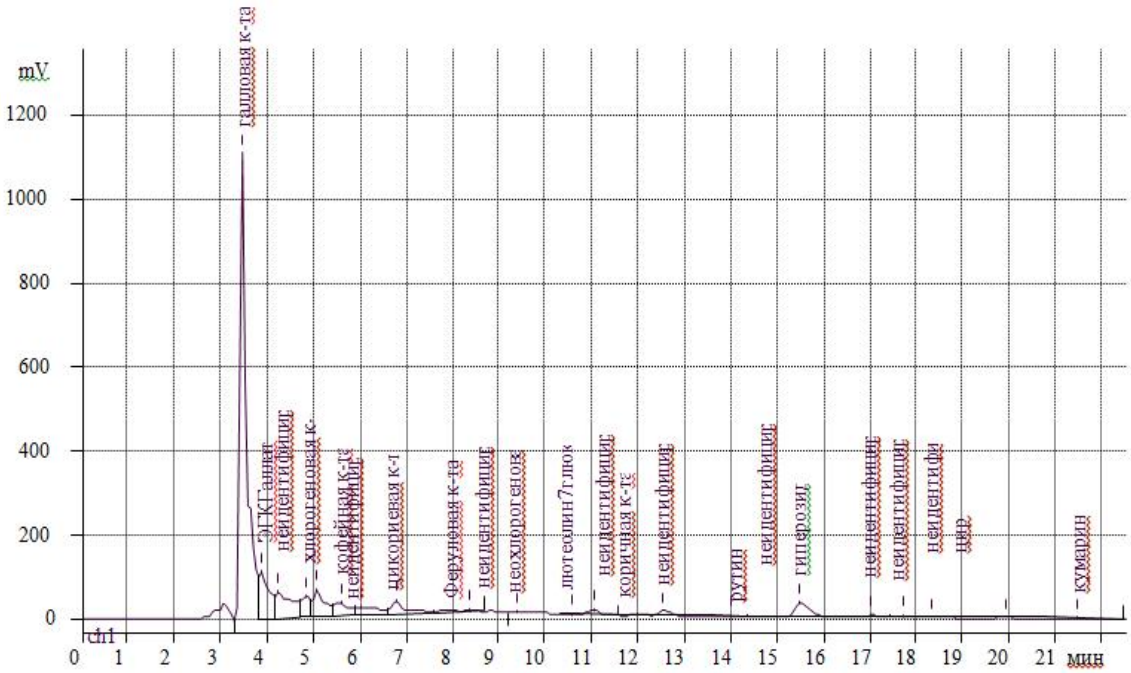
Приложение 3. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения листьев хмеля обыкновенного, собранного в Давлекановском районе РБ



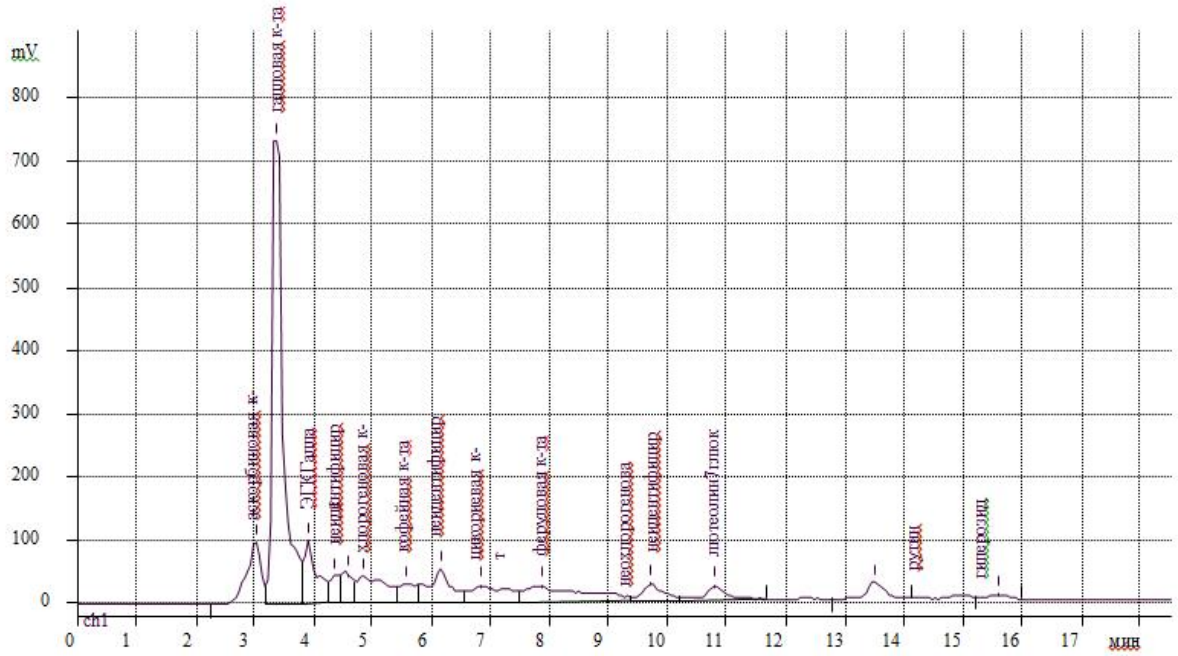
Приложение 4. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения листьев хмеля обыкновенного, собранного в Уфимском районе РБ



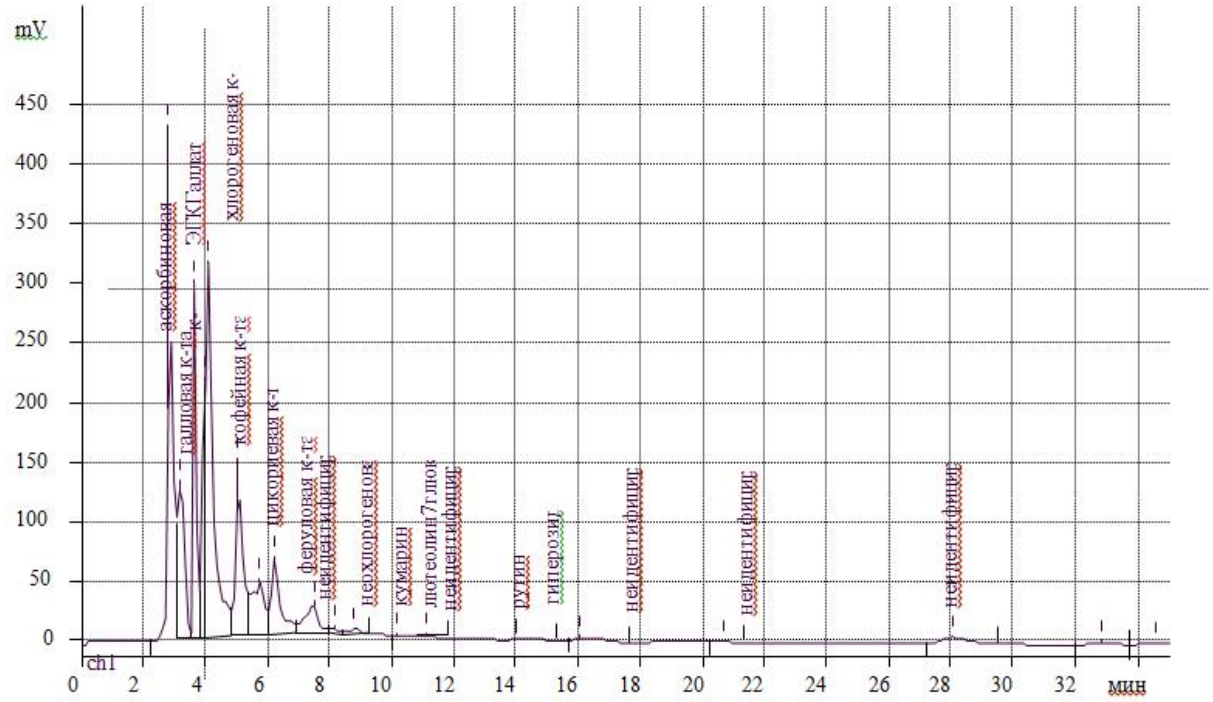
Приложение 5. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения соплодий хмеля обыкновенного, собранного в Уфимском районе РБ



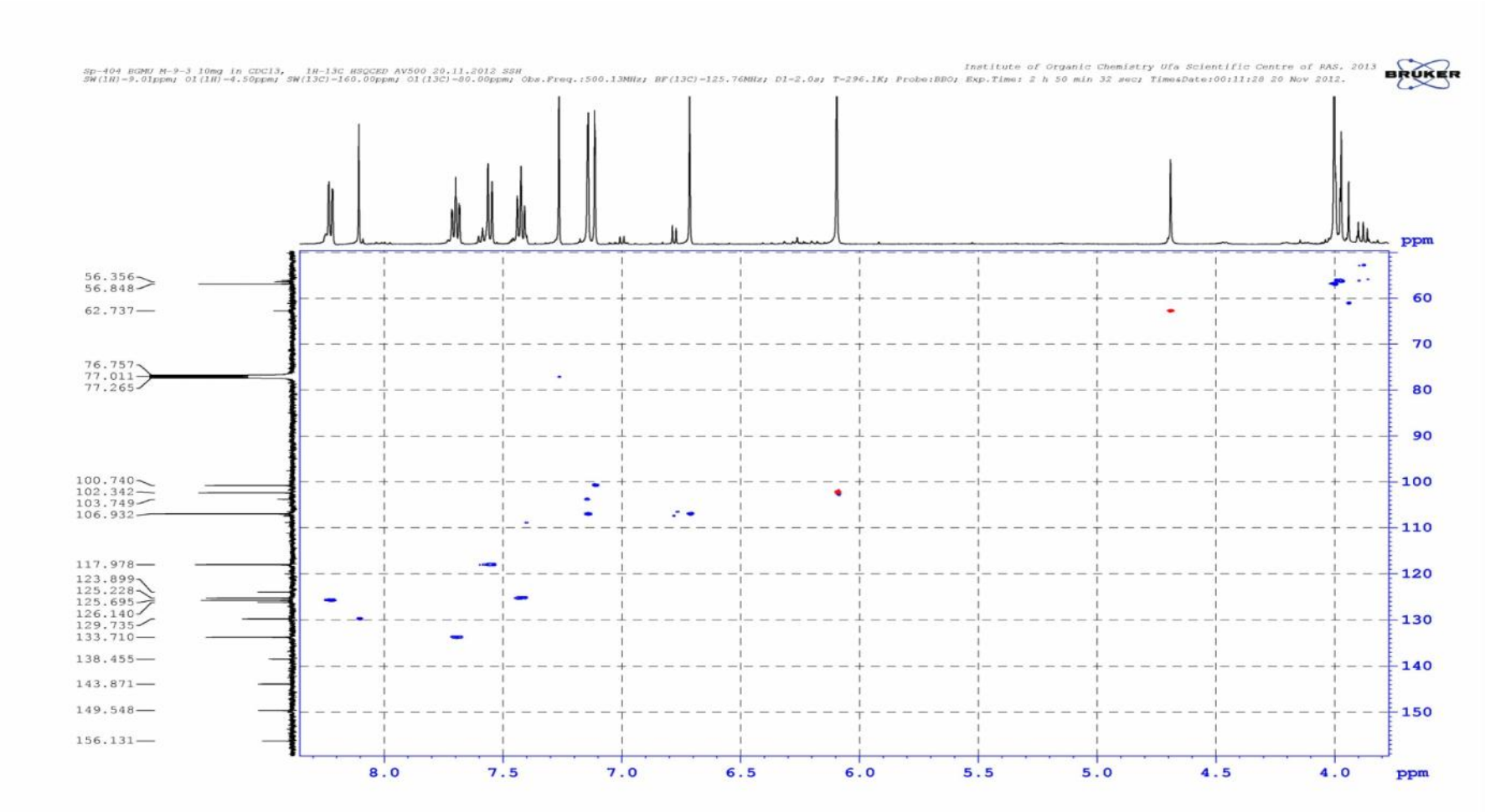
Приложение 6. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения листьев хмеля обыкновенного сорт «Ранний»



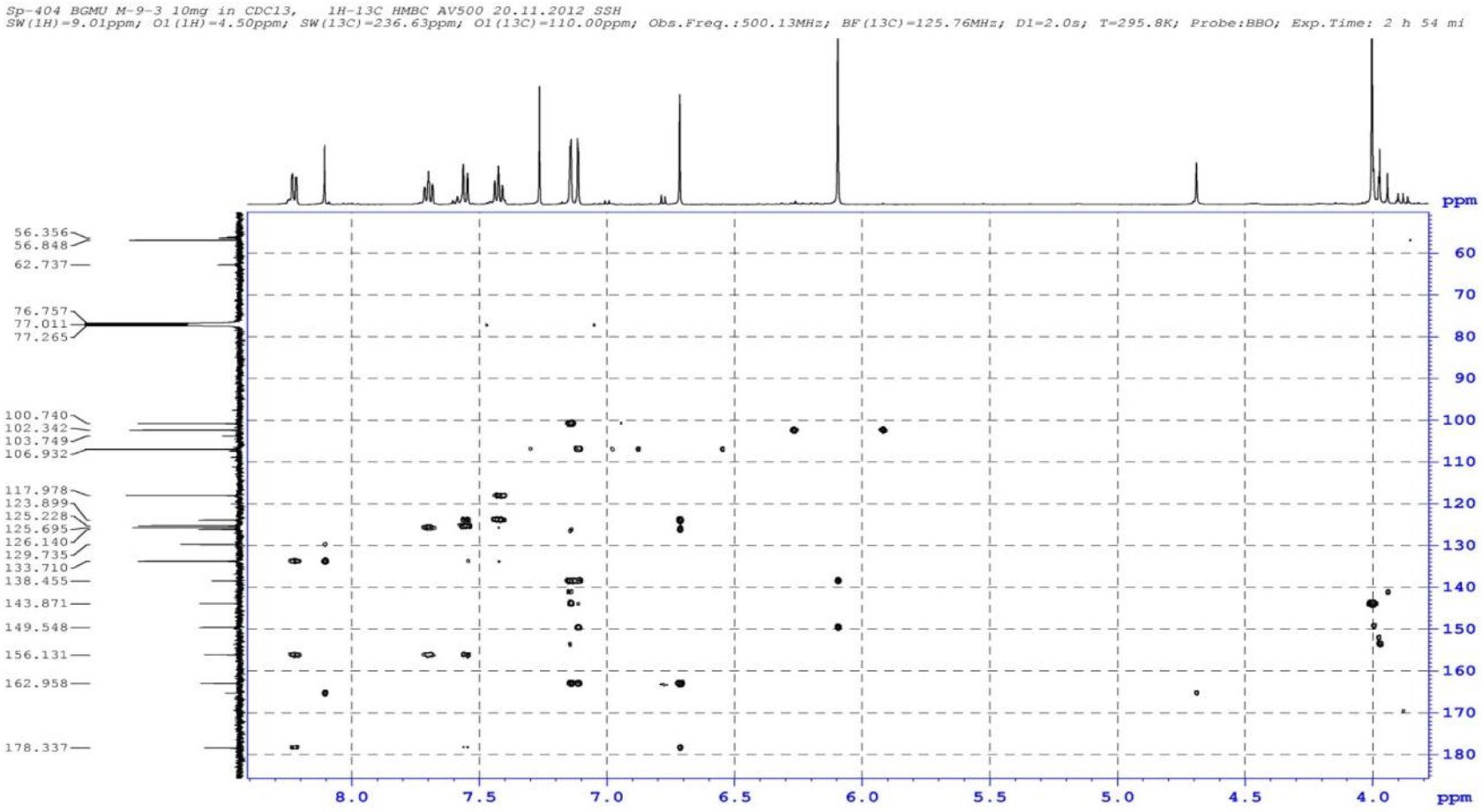
Приложение 7. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения листьев хмеля обыкновенного сорт «Крылатский»



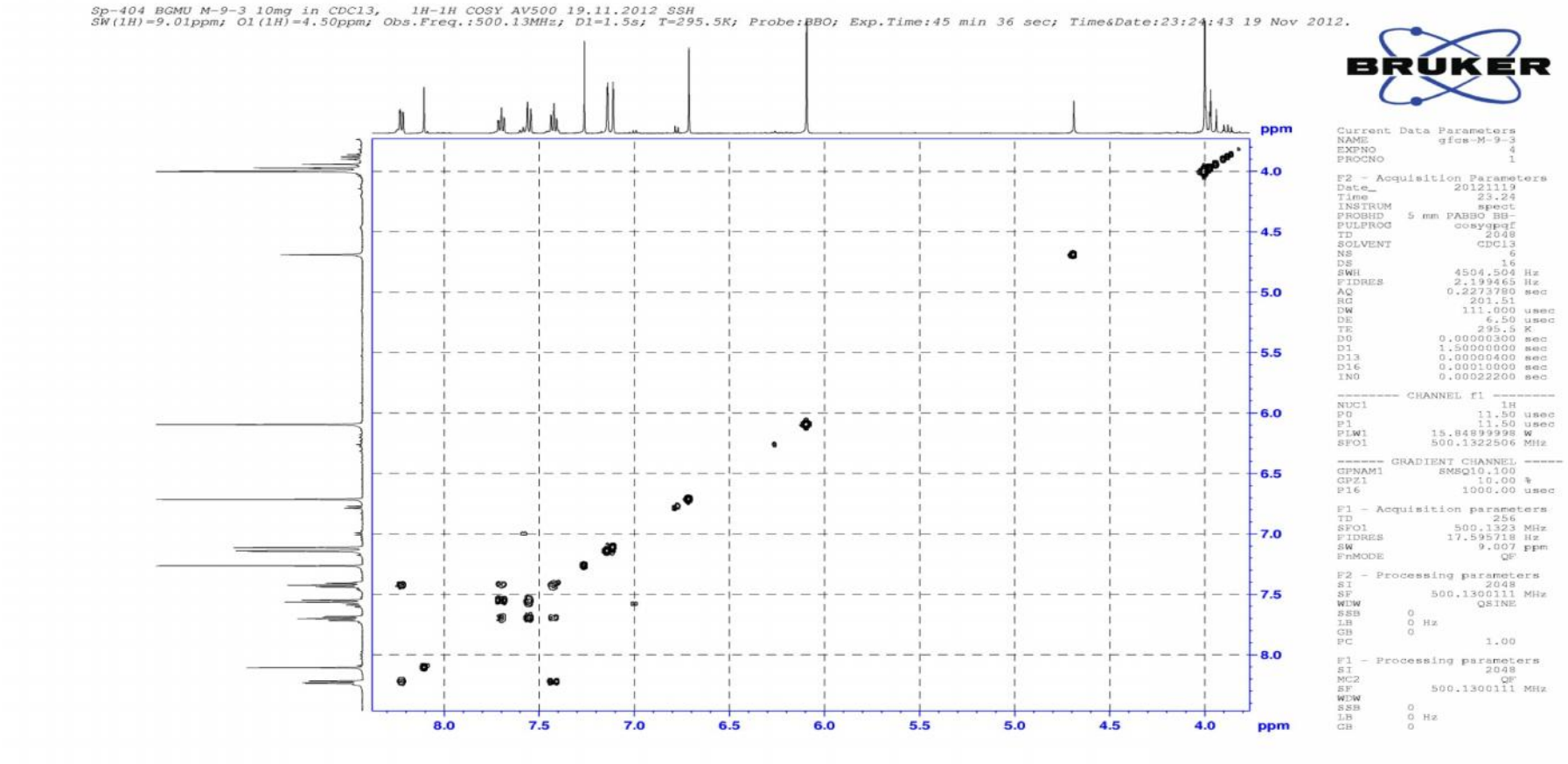
Приложение 8. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения листьев хмеля обыкновенного сорт «Подвязный»



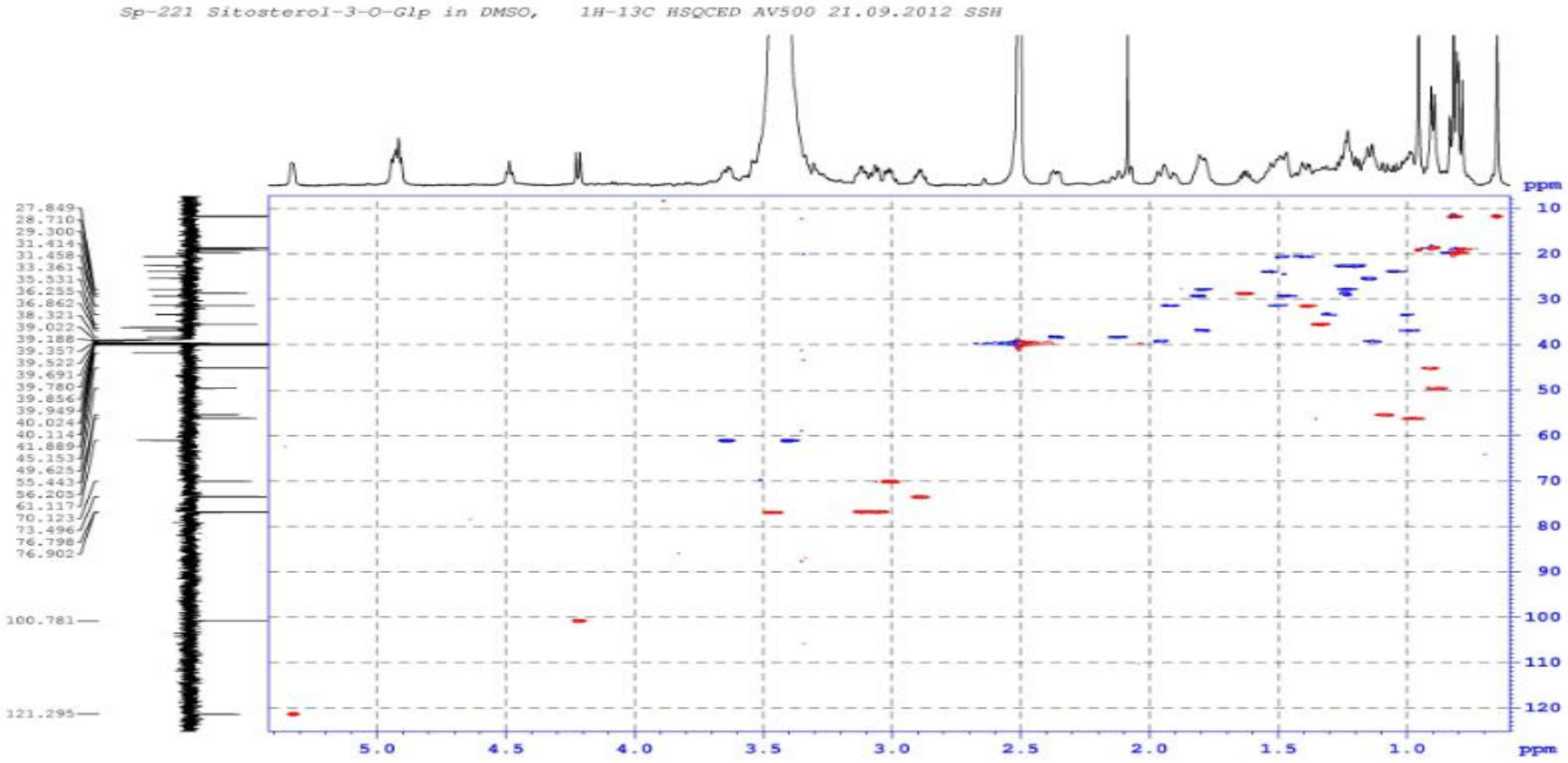
Приложение 9. Корреляционный спектр ^{1}H - ^{13}C HSQCED вещества 3.01 (3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона) в $CDCl_3$



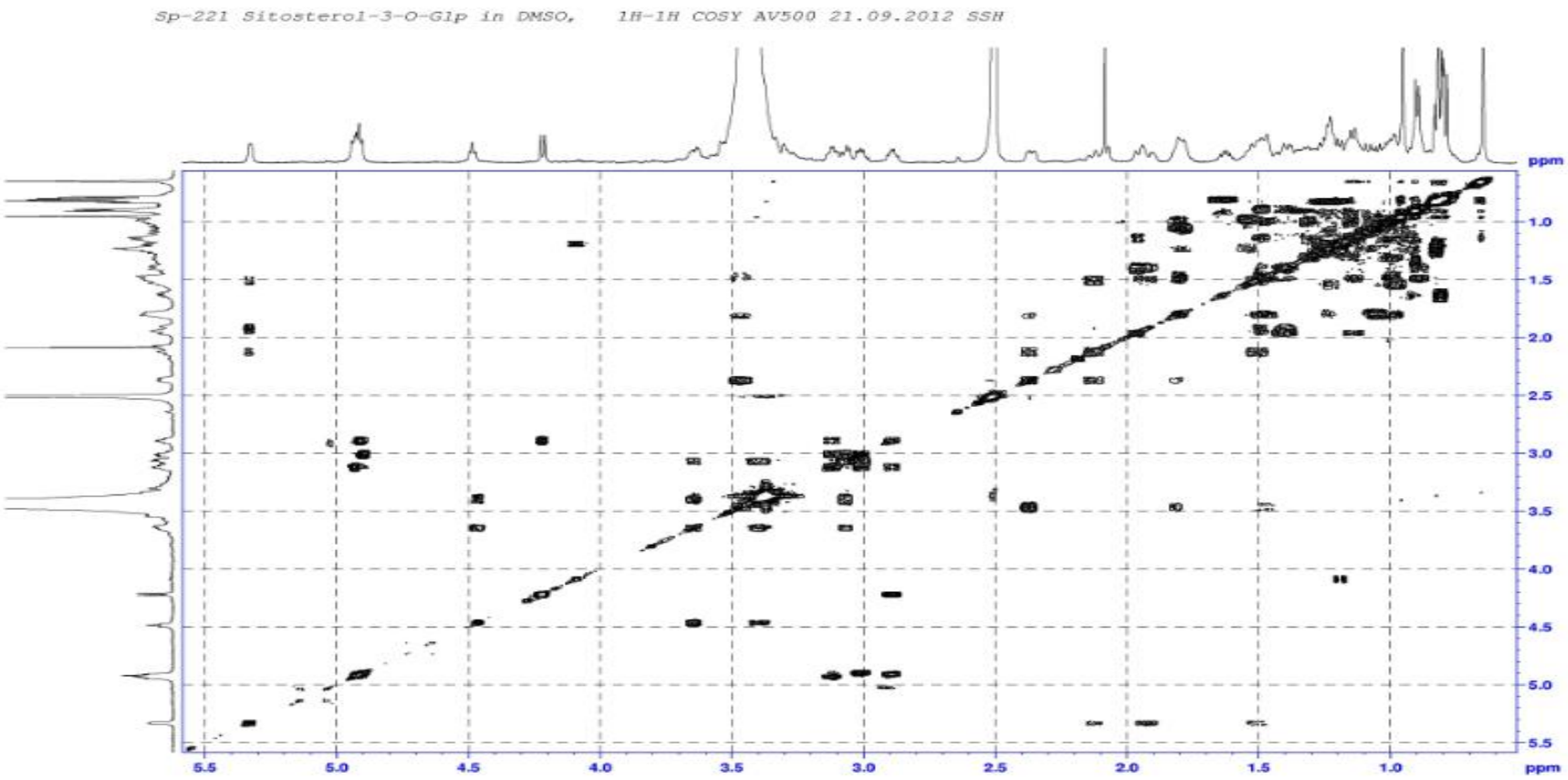
Приложение 10. Корреляционный спектр ^{1}H - ^{13}C HMBC вещества 3.01 (3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона) в $CDCl_3$



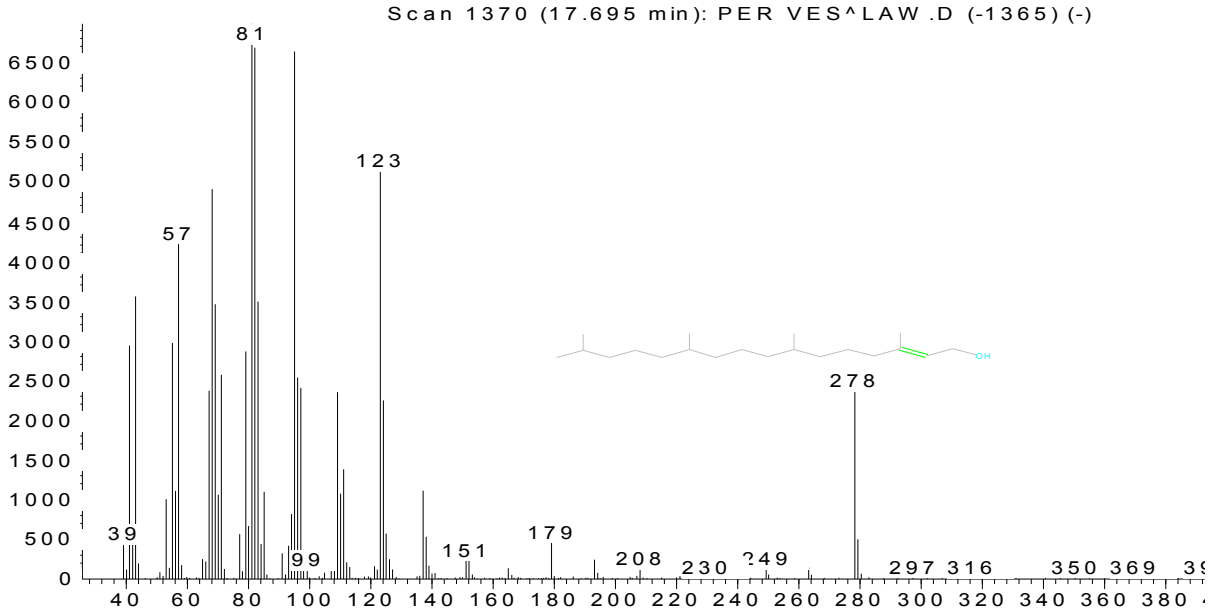
Приложение 11. Корреляционный спектр ^{1}H - ^{1}H COSY вещества 3.01 (3’,4’-метилендиокси-5’-метоксифлавона) в $CDCl_3$



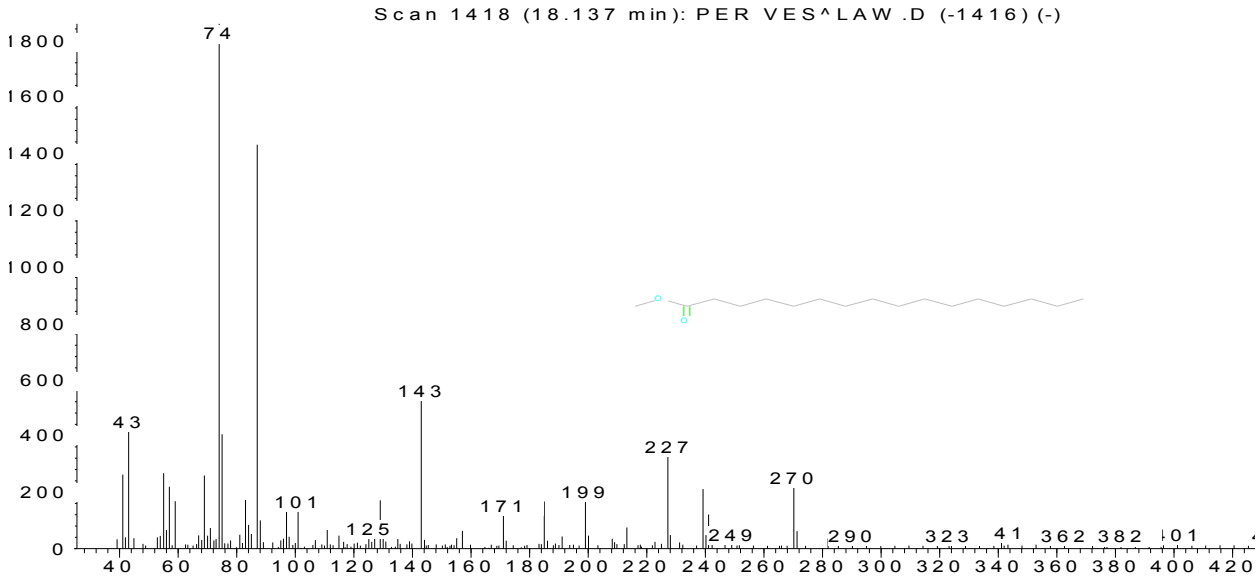
Приложение 12. Корреляционный спектр ^{1}H – ^{13}C HSQCED вещества β-ситостерола-3-O- β-D-глюкопиранозида в DMSO



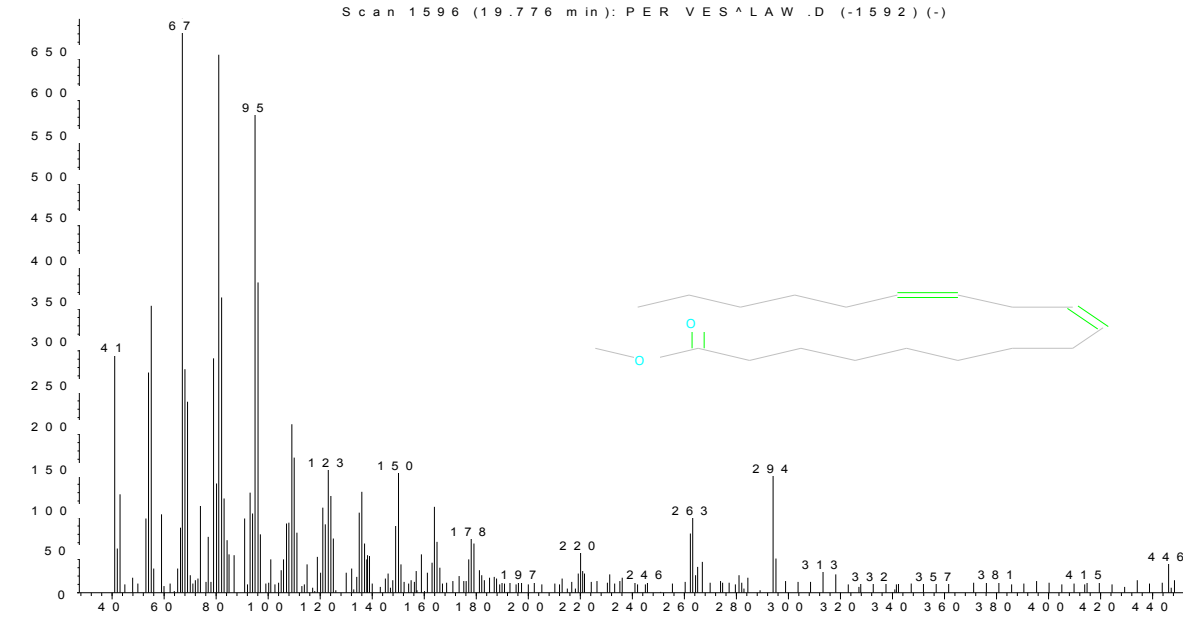
Приложение 13. Корреляционный спектр ^{1}H – ^{1}H COSY вещества β-ситостерола-3-O- β-D-глюкопиранозида в DMSO



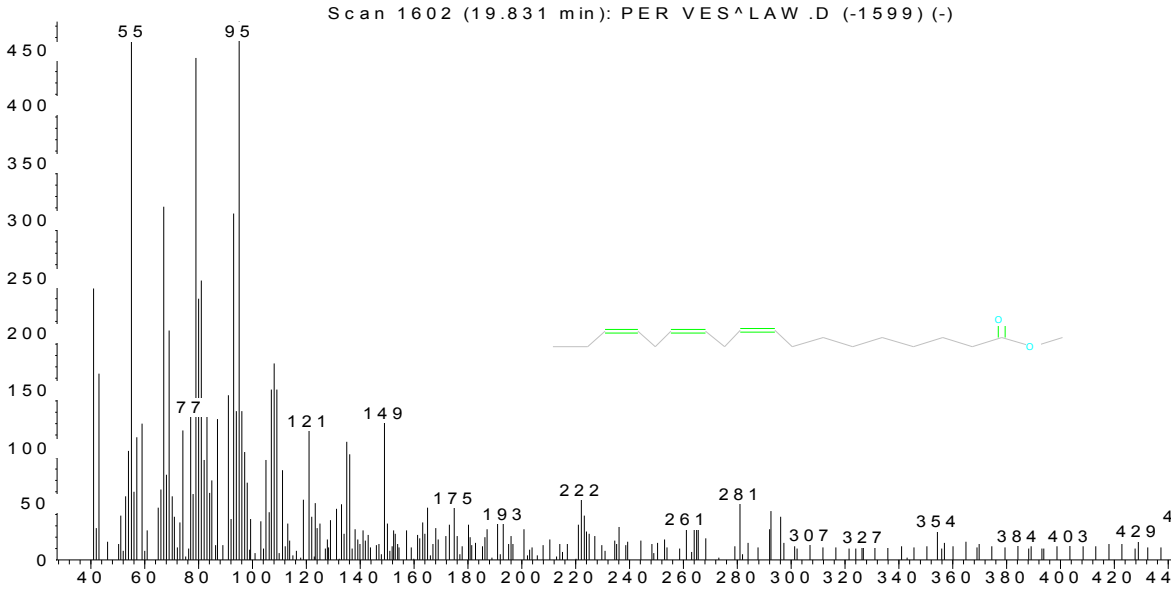
Приложение 14. Масс-спектр и структура фитола



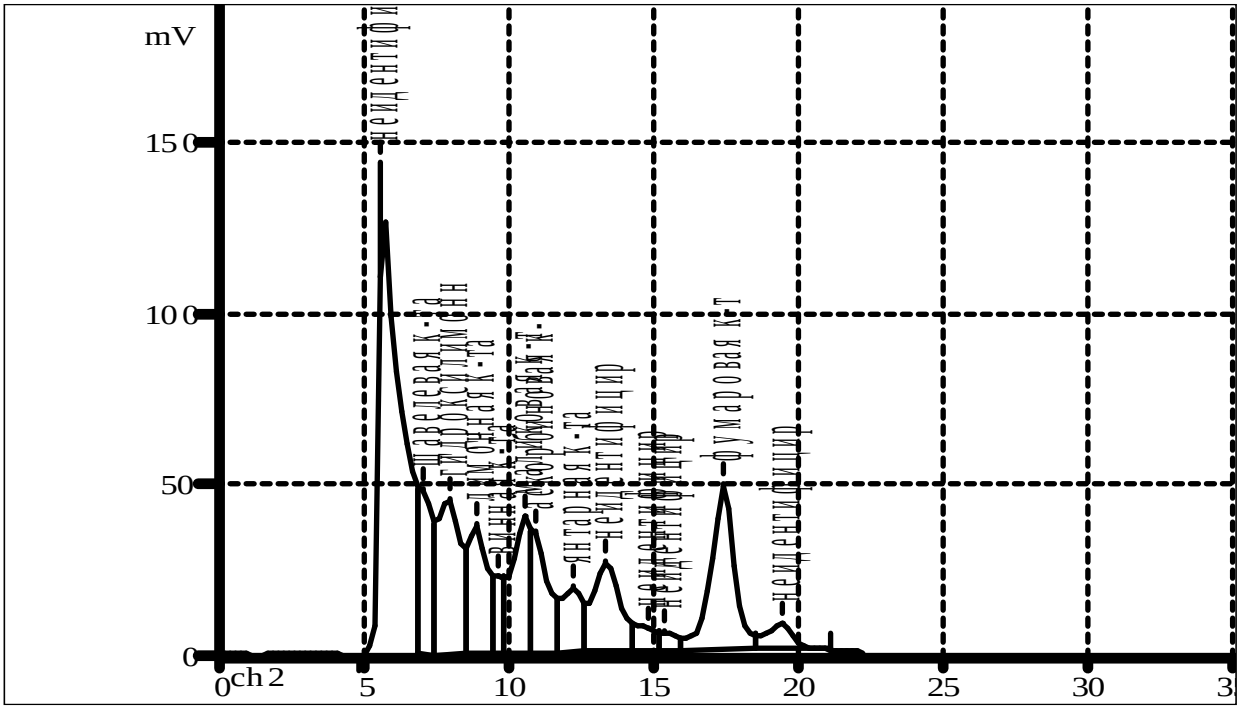
Приложение 15. Масс-спектр и структура метилового эфира пальмитиновой кислоты



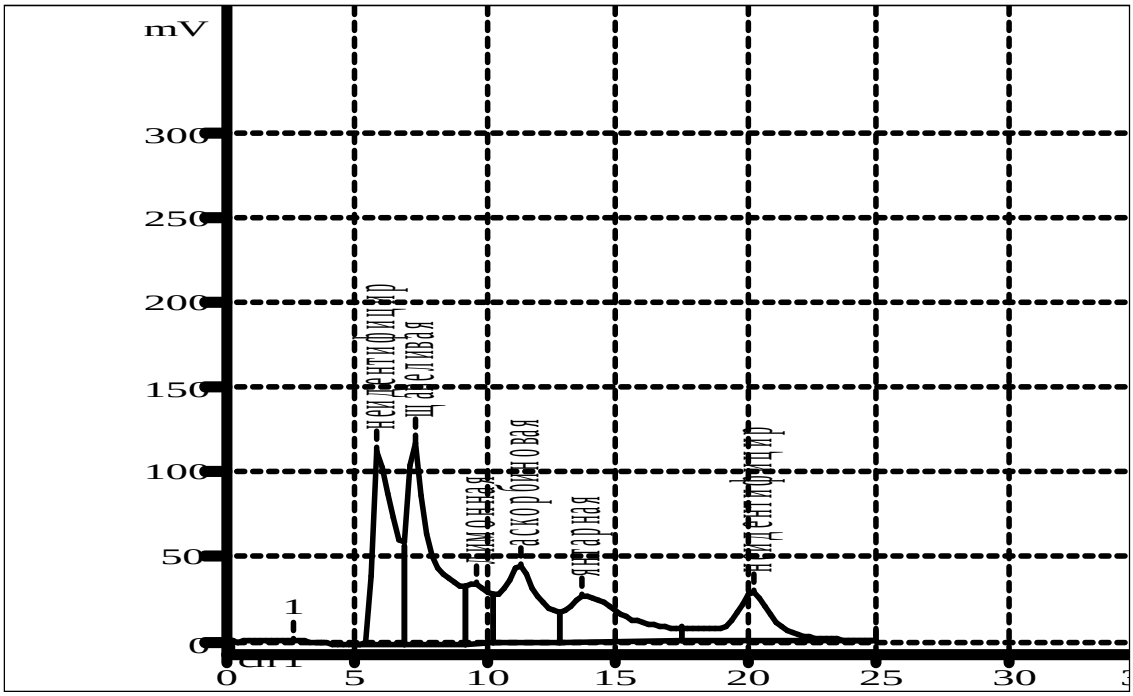
Приложение 16. Масс-спектр и структура метилового эфира 9,12-Октадекадиеновой кислоты



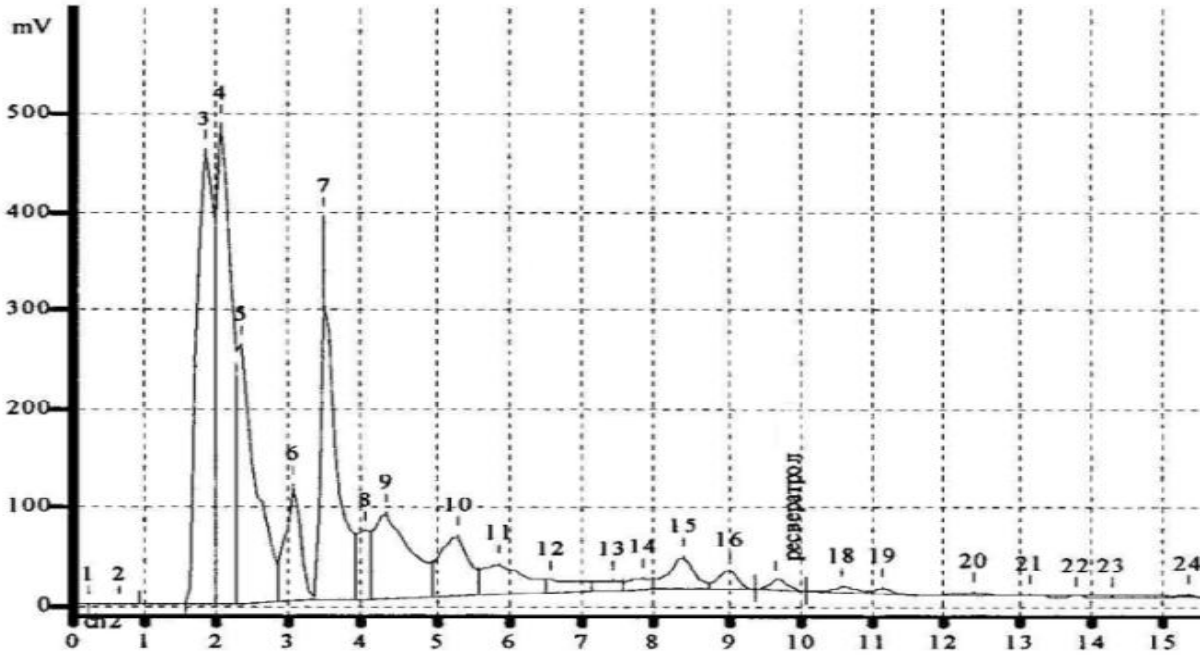
Приложение 17. Масс-спектр и структура метилового эфира 9,12,15-Октадекатриеновой кислоты



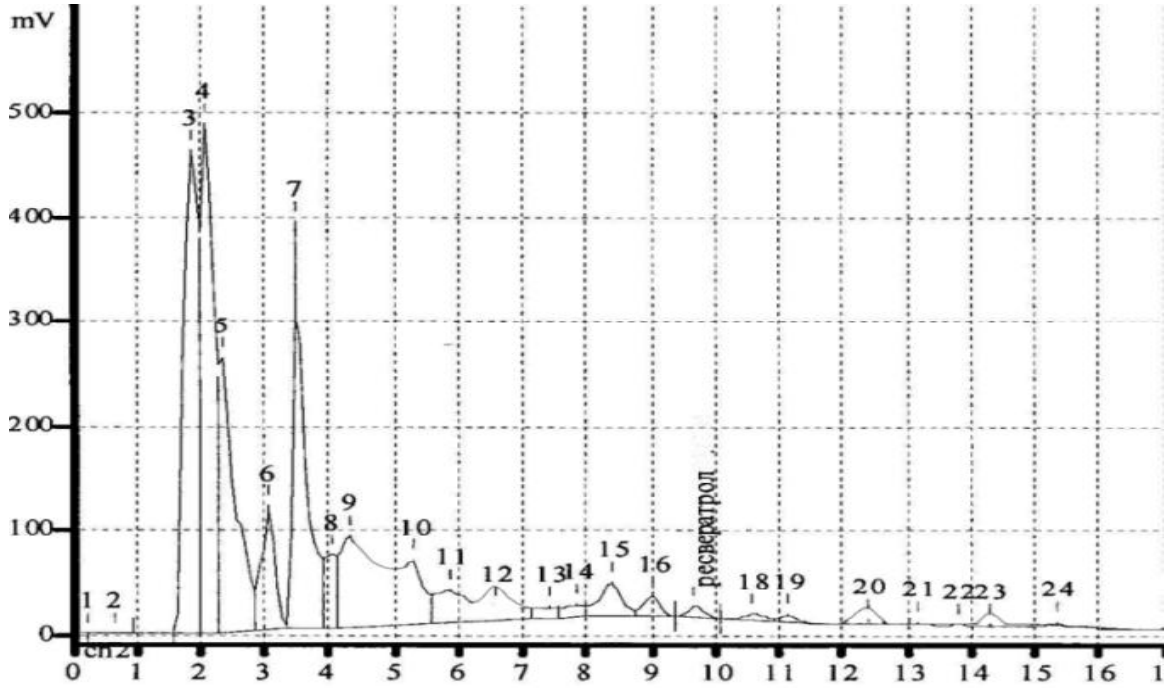
Приложение 18. Хроматограмма ВЭЖХ травы первоцвета весеннего (органические кислоты)



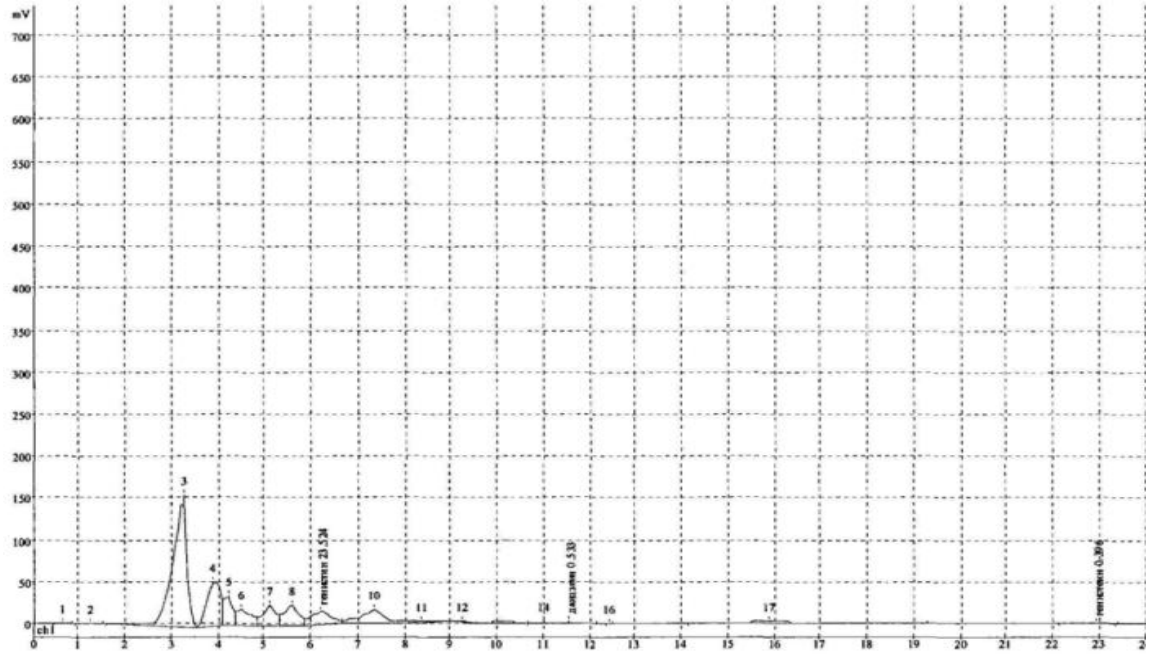
Приложение 19. Хроматограмма ВЭЖХ травы первоцвета крупночашечного (органические кислоты)



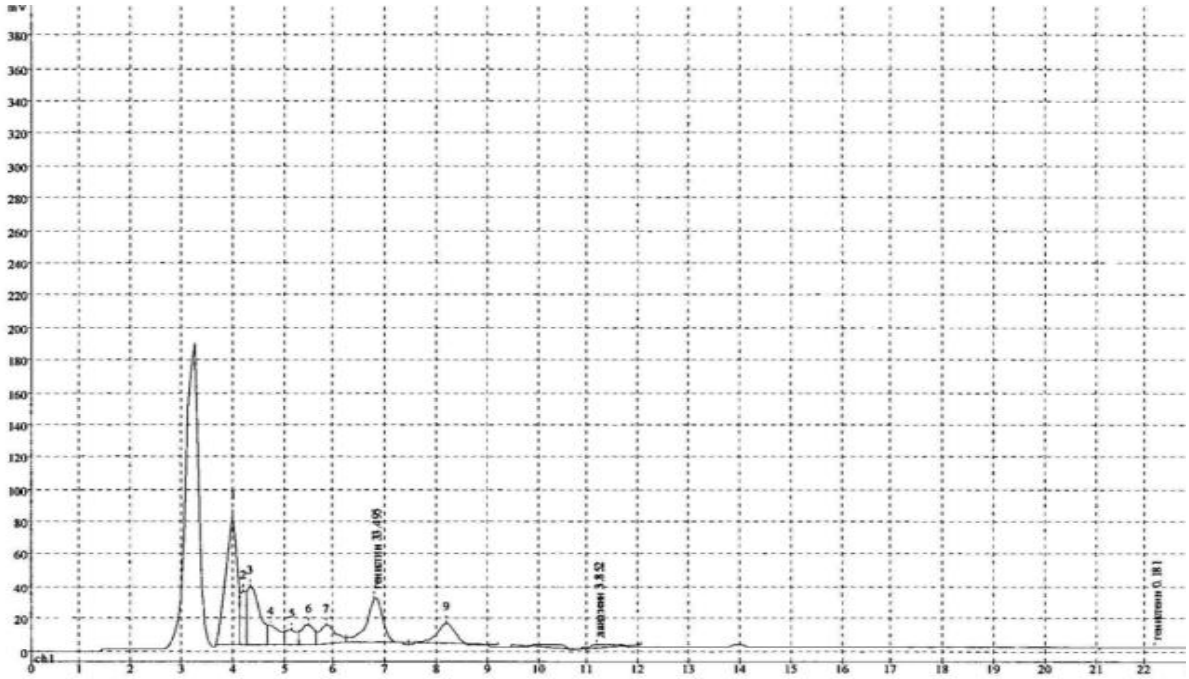
Приложение 20. Хроматограмма ВЭЖХ метанольного извлечения из соплодий хмеля (ресвератрол)



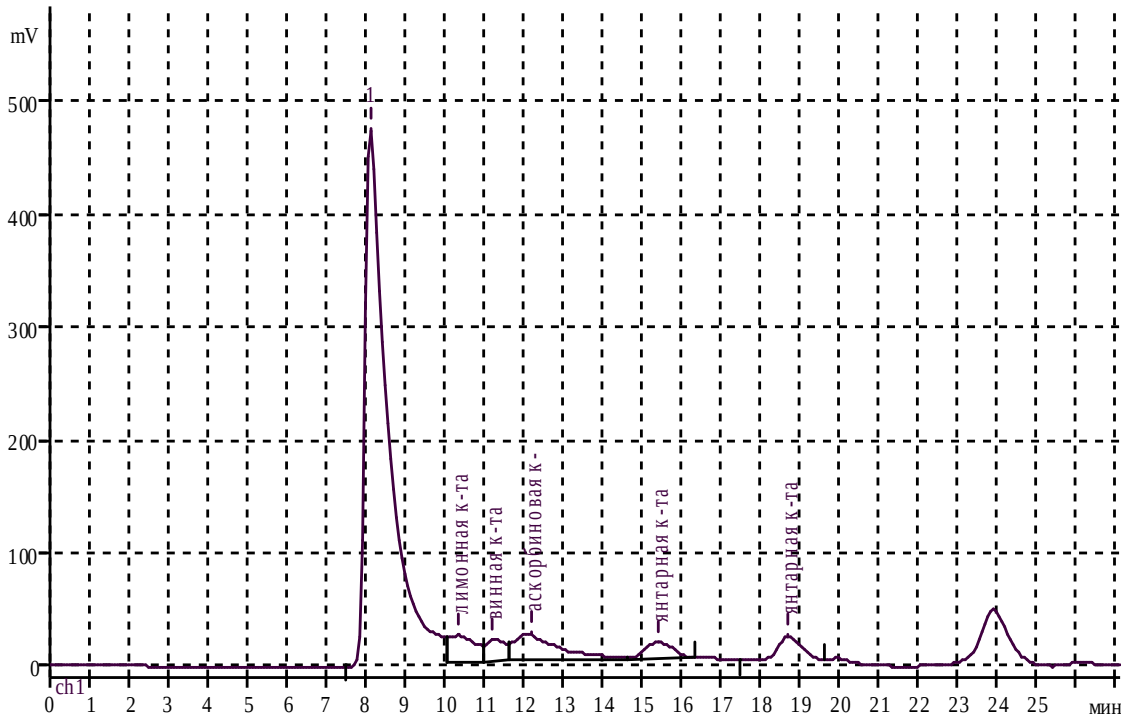
Приложение 21. Хроматограмма ВЭЖХ метанольного извлечения из листьев хмеля (ресвератрол)



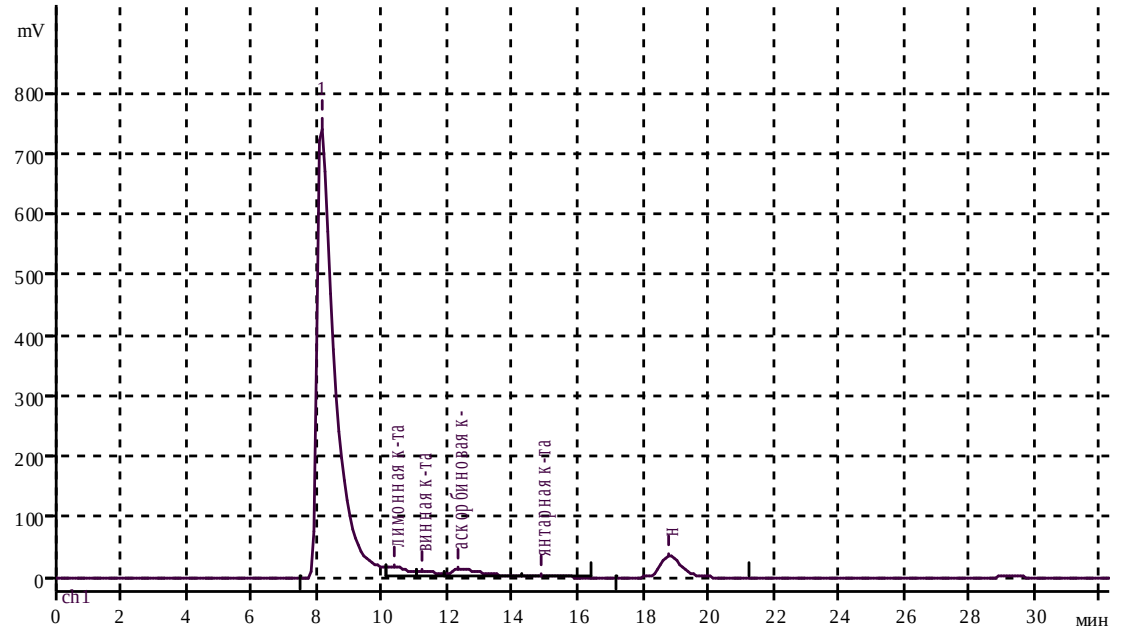
Приложение 22. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения из соплодий хмеля (изофлавоноиды)



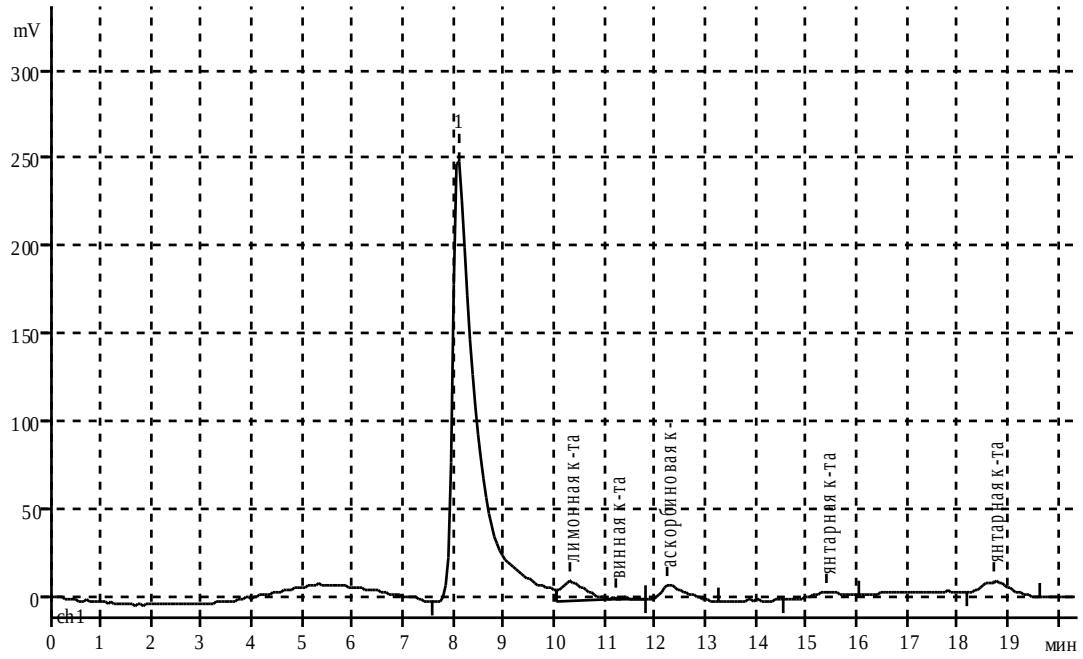
Приложение 23. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения из листьев хмеля (изофлавоноиды)



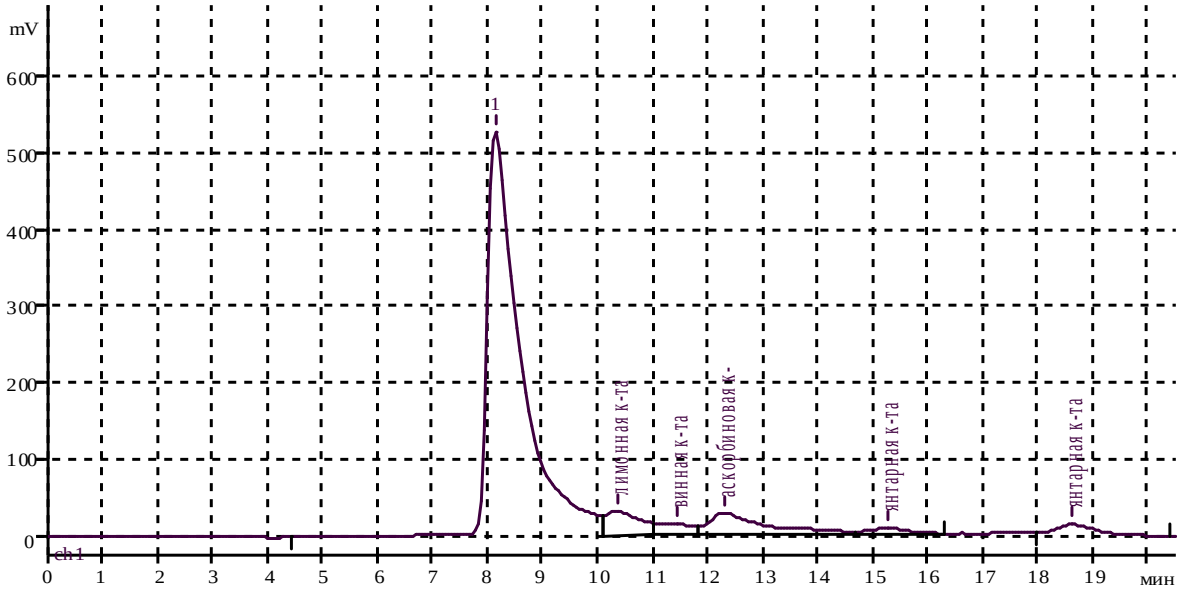
Приложение 24. Хроматограмма ВЭЖХ водного извлечения из листьев хмеля, собранного в Давлекановском районе РБ (органические кислоты)



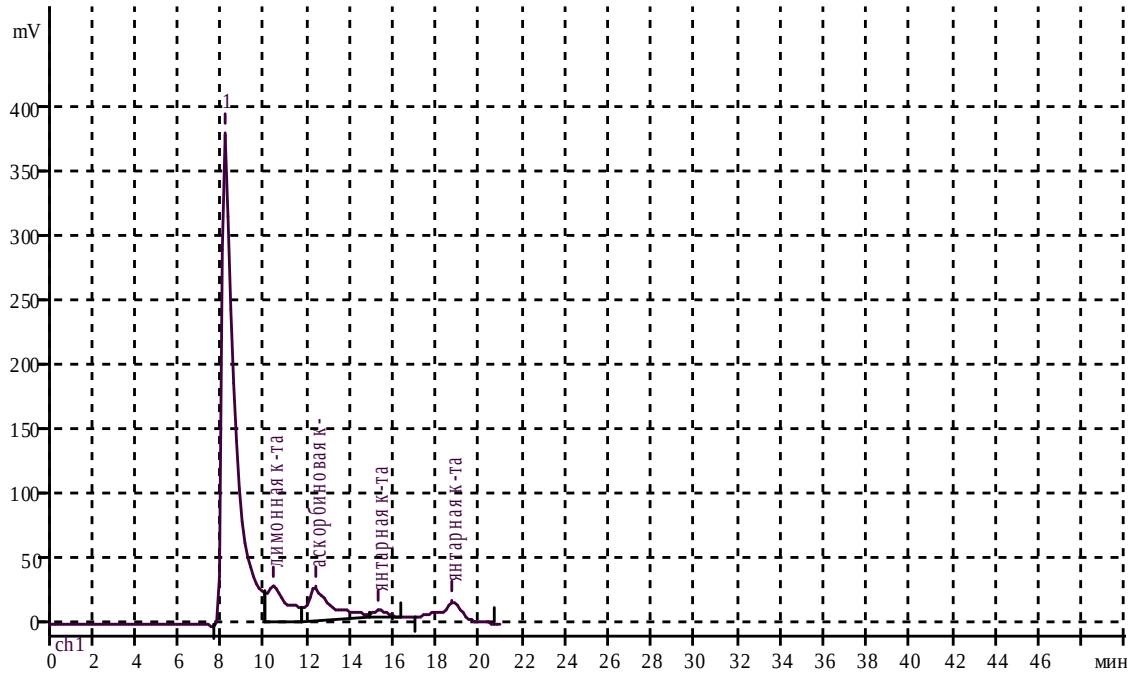
Приложение 25. Хроматограмма ВЭЖХ водного извлечения из листьев хмеля, собранного в Уфимском районе РБ (органические кислоты)



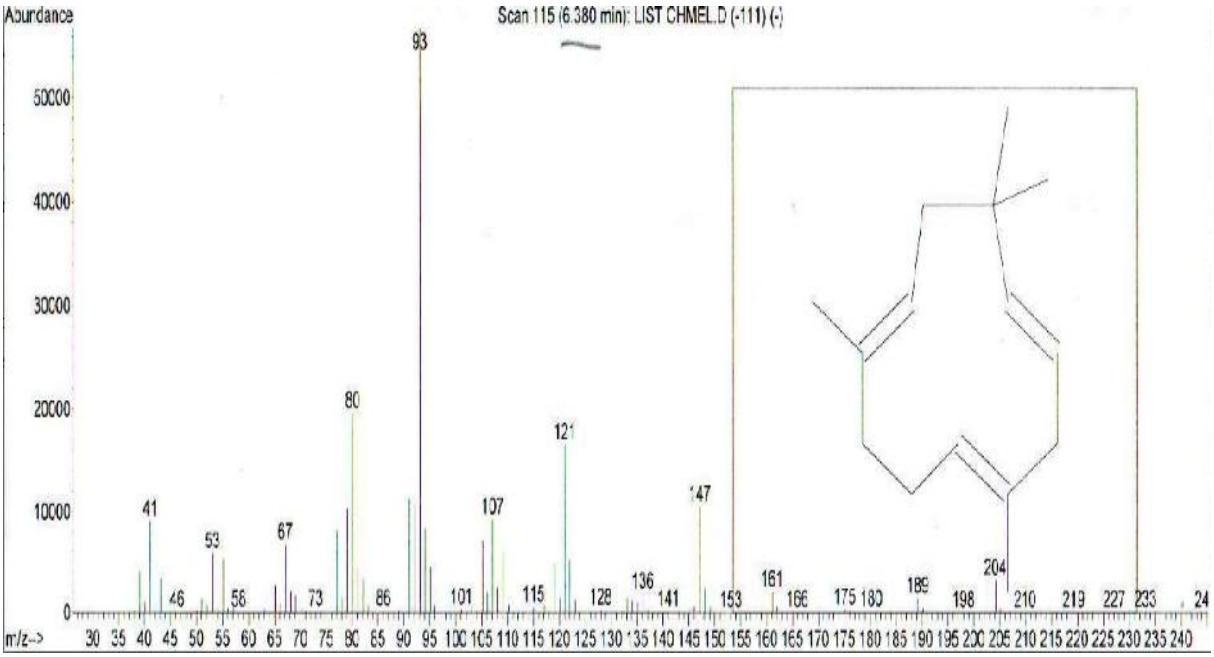
Приложение 26. Хроматограмма ВЭЖХ водного извлечения из листьев хмеля обыкновенного сорт «Ранний» (органические кислоты)



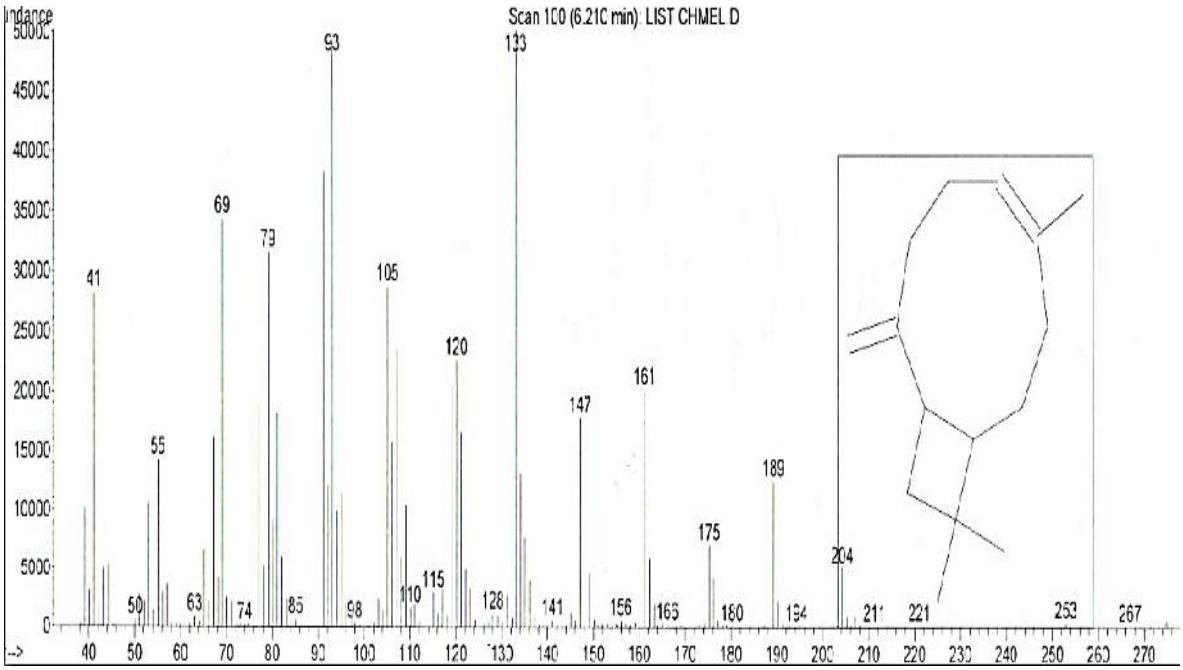
Приложение 27. Хроматограмма ВЭЖХ водного извлечения из листьев хмеля обыкновенного сорт «Крылатский» (органические кислоты)



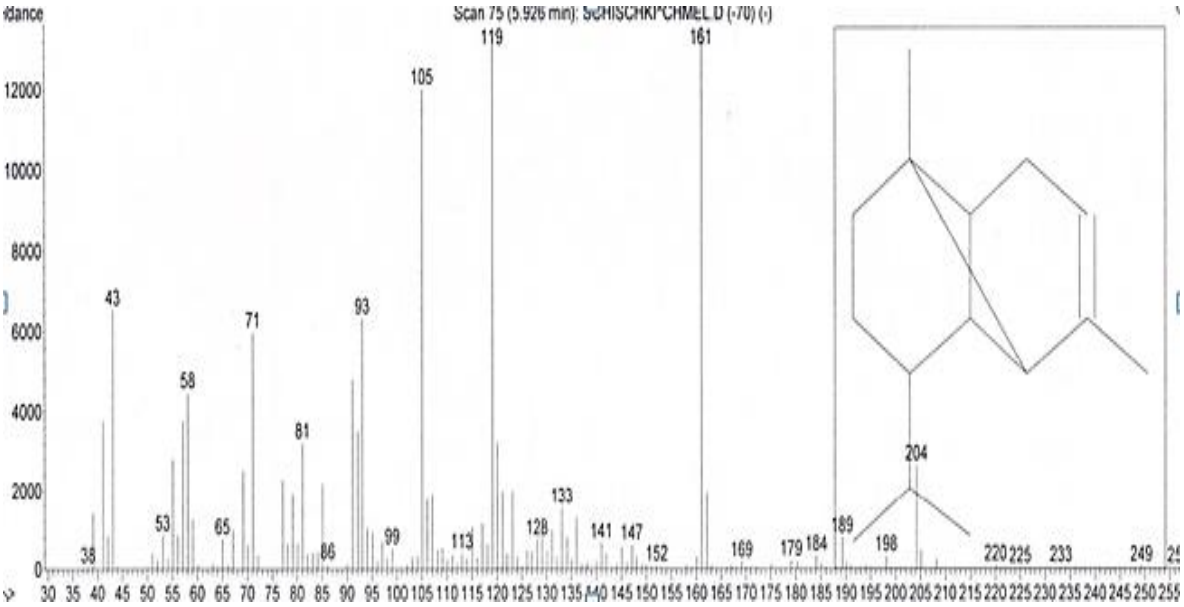
Приложение 28. Хроматограмма ВЭЖХ водного извлечения из листьев хмеля обыкновенного сорт «Подвязный» (органические кислоты)



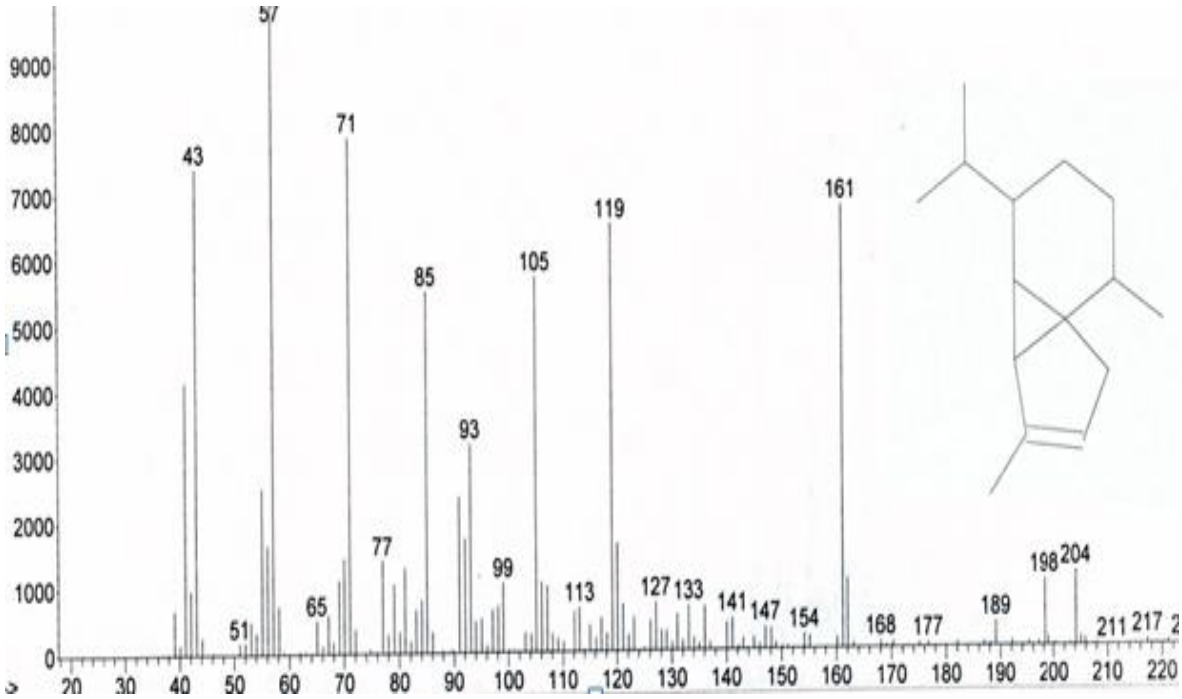
Приложение 29. Масс-спектр и структура α-кариофиллена



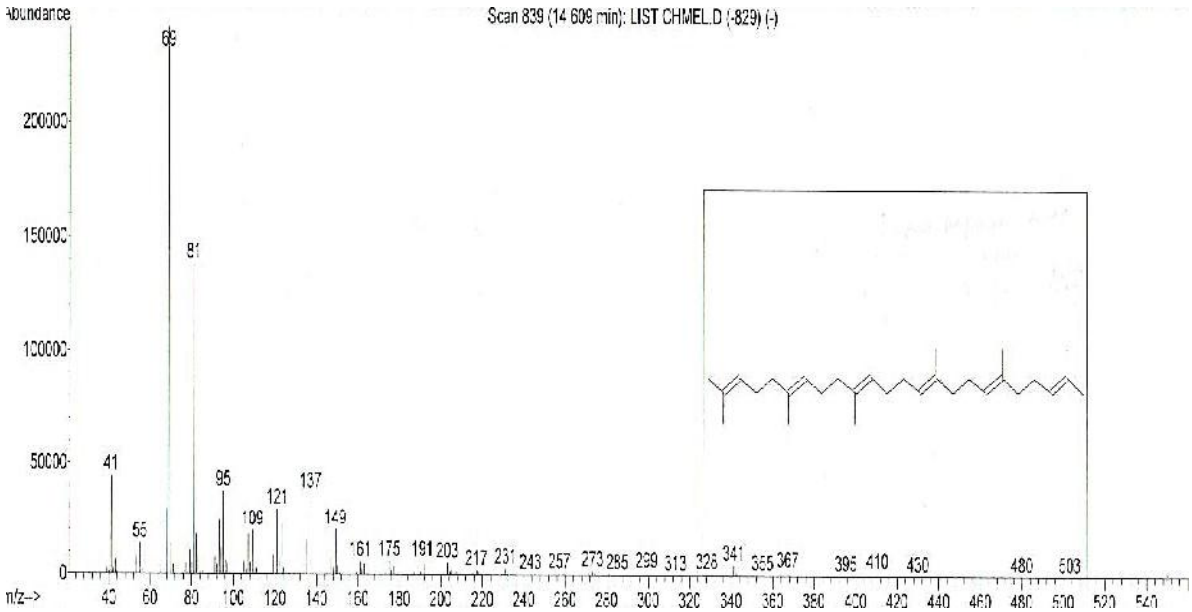
Приложение 30. Масс-спектр и структура кариофиллена



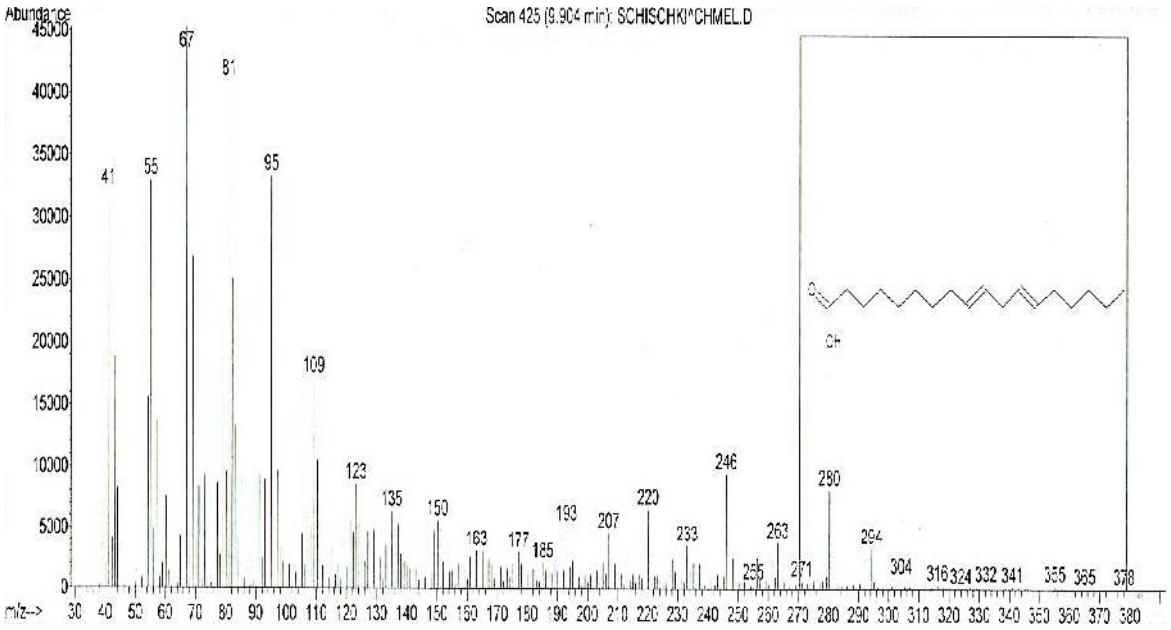
Приложение 31. Масс-спектр и структура копаена



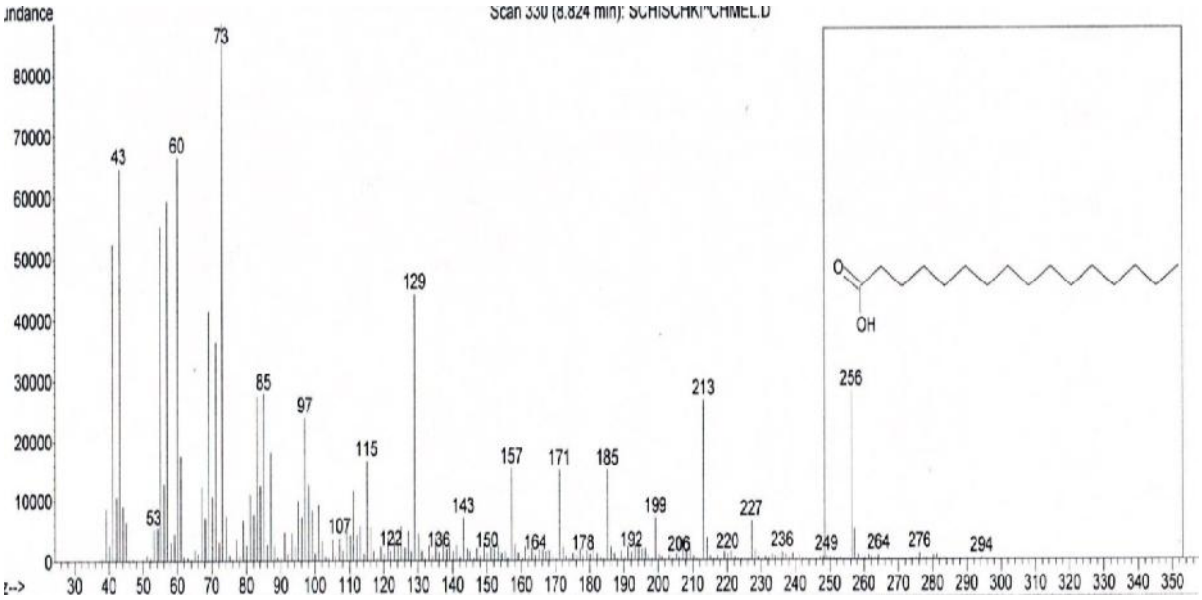
Приложение 32. Масс-спектр и структура α-кубебена



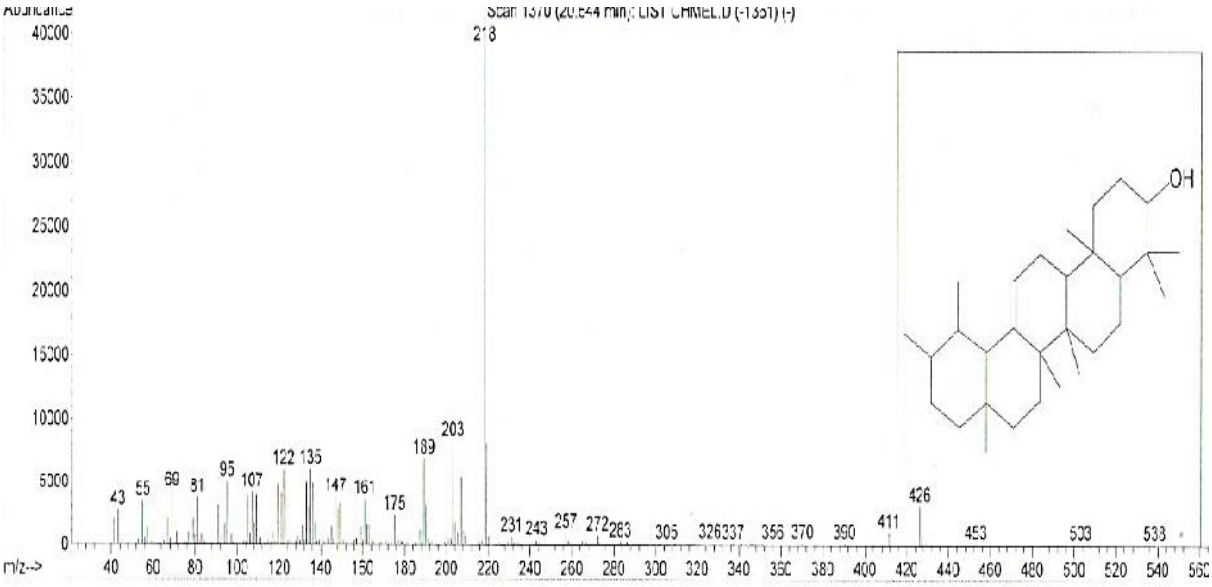
Приложение 33. Масс-спектр и структура сквалена



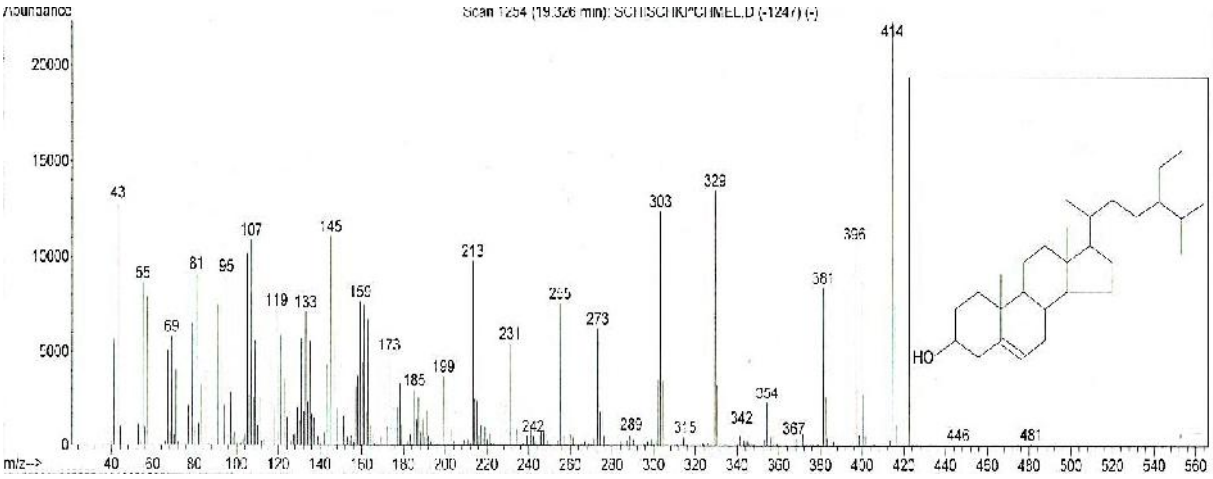
Приложение 34. Масс-спектр и структура линолевой кислоты



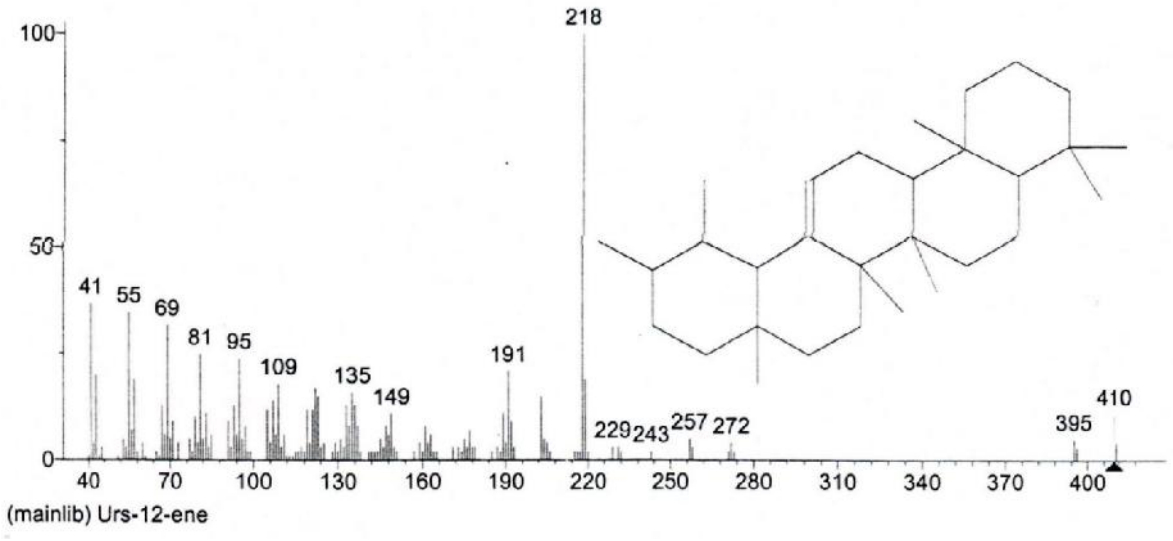
Приложение 35. Масс-спектр и структура пальмитиновой кислоты



Приложение 36. Масс-спектр и структура β-амирина



Приложение 37. Масс-спектр и структура стигмаситостерола



Приложение 38. Масс-спектр и структура урс-12-ен

Приложение 39. Ресурсные исследования травы первоцвета крупночашечного на территории РБ(в пересчете на воздушно-сухую массу)

Район исследо-вания	S за-рос-лей, га	Урожай-ность, г/ м^2	Эксплуата-ционный запас, т	Биоло-ги-ческий запас, т	Объем возмож-ных ежегодных заготовок, т
1	2	3	4	5	6
Иглинский рай-он (окрестности пос. Иглино)	1,1	42,2±3,7	0,346	0,494	0,068
Пос. Шакша	0,6	81,7 ± 7,7	0,325	0,484	0,066
Пос. Авдон	1,2	57,5 ± 5,4	0,478	0,718	0,095
Уфимский район (окрестности пос.Уптино)	1,4	29,5 ± 2,6	0,312	0,453	0,063
г. Салават (окре-стности)	1,9	22,2 ± 2,0	0,358	0,524	0,071
г. Мелеуз (окре-стности)	1,6	40,7±4,1	0,489	0,737	0,097
Абзелиловский район (окрестно-сти д. Муракаево)	2,2	11,3±1,0	0,188	0,282	0,039
Абзелиловс-кий район (окрестно-сти с. Салаватово)	0,9	34,4±3,4	0,217	0,328	0,042
Абзелиловс-кий район (окрестно-сти т с. Шарипово)	1,3	25,2±2,2	0,206	0,298	0,043
Аургазинский район (окрестно-сти с. Наумкино)	1,7	18,4±1,6	0,239	0,351	0,047
Белорецкий рай-он (окрестности с. Исламбаево)	0,9	44,2±4,3	0,319	0,477	0,065
Белорецкий рай-он (окрестности с. Серменево)	0,8	91,3±8,2	0,524	0,755	0,106

Продолжение Приложения 39

1	2	3	4	5	6
Белорецкий район (окрестности р. Кухтур)	1,1	65,4±6,7	0,521	0,793	0,103
Бурзянский район (окрестности с. Яумбаево)	1,8	12,2±1,1	0,192	0,275	0,039
Гафурийский район (окрестности пос. Краусно-усольский)	1,2	48,0±5,1	0,416	0,644	0,084
Дуванский район (окрестности с. Дуван)	2,1	28,4±2,4	0,467	0,671	0,093
Ишимбайский район (окрестности с. Сайраново)	0,8	39,7±3,6	0,293	0,426	0,059
Учалинский район (окрестности д. Мулдашево)	2,2	68,5±2,8	1,314	1,558	0,264
Учалинский район (окрестности д. Козакку-лово)	1,6	71,5±6,3	0,880	1,266	0,175

Приложение 40

Протоколы
валидации аналитических методов
«Количественное определение суммы флавоноидов
в пересчете на рутин»,
«Количественное определение кислоты аскорбиновой»
в траве первоцвета весеннего

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве первоцвета весеннего

1. Правильность методики.

1.1. Опыты на модельных смесях с ГСО рутина.

Модельные смеси готовили трех концентраций с содержанием рутина в % к исходной концентрации 75, 100, 125. Определение проводилось в трех повторностях для каждой концентрации.

Таблица результатов модельной смеси

№	Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси (ГСО рутин), мг	Экспериментально найденное значение (ГСО рутин)	
		Абсолютная величина, мг	Процент восстановления, %
1	7,50	7,45	99,30
2	7,50	7,55	100,67
3	7,50	7,38	98,40
4	10,00	9,82	98,20
5	10,00	10,15	101,50
6	10,00	9,92	99,20
7	12,50	12,42	99,36
8	12,50	12,55	100,40
9	12,50	12,45	99,60
Средний % восстановления для трех концентраций в трех повторностях			99,63

1.2. Опыты с добавками ГСО рутина.

Испытание проводилось на одном образце листьев первоцвета весеннего в 3-х концентрациях с добавками ГСО рутина в трех повторностях.

Таблица результатов

Содержание суммы флавоноидов в аликвоте, мкг	Добавлено ГСО рутина, мкг	Ожидаемое содержание, мкг	Полученное содержание, мкг	Ошибка, %	
				абс., мкг	отн., %
786,34	60	846,34	853,71	+7,37	0,87
786,34	60	846,34	842,95	-3,39	0,40
786,34	60	846,34	855,51	+9,17	1,08
786,34	90	876,34	885,80	+9,46	1,08
786,34	90	876,34	868,67	-7,67	0,86
786,34	90	876,34	902,13	+ 25,79	2,94
786,34	120	906,34	911,67	+ 5,33	0,59
786,34	120	906,34	920,05	+13,71	1,51
786,34	120	906,34	885,20	-21,14	2,33

2. Прецизионность методики.

Для определения сходимости испытания проводились на спектрофотометре СФ-46 в разные дни на одном образце сырья одним и тем же специалистом в шести повторностях.

Определение воспроизводимости проводили в двух лабораториях на приборах «СФ-46» и «СФ-26» на одном образце сырья в шести повторностях: («Центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО БГМУ (условно, лаборатория № 1), ассистент кафедры послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования (ПДПФО)

ИПО БГМУ Иванова Д.Ф.; кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии БГМУ (условно, лаборатория № 2), старший преподаватель кафедры ПДПФО ИПО БГМУ Федотова А.А.).

Таблица результатов содержания

суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %

Образец №	Первый день	Второй день	Лаборатория № 1	Лаборатория № 2
1	5,05	5,01	4,82	4,78
2	5,07	4,98	4,75	4,85
3	5,03	5,03	4,86	4,82
4	5,09	4,89	4,81	4,73
5	5,05	4,87	4,72	4,70
6	5,06	4,83	4,83	4,86
Стандартное отклонение S	0,02041	0,08240	0,05269	0,06511
Относительное стандартное отклонение RSD, %	0,40	1,67	1,09	1,36

3. Специфичность методики.

Спектрофотометрия. Специфичность методики основана на совпадении спектров поглощения извлечения из исследуемого сырья листьев первоцвета весеннего и ГСО рутина с 2% раствором алюминия хлорида. Спектры поглощения полученных комплексов снимали на спектрофотометре «СФ-46» в интервале 350–500 нм.

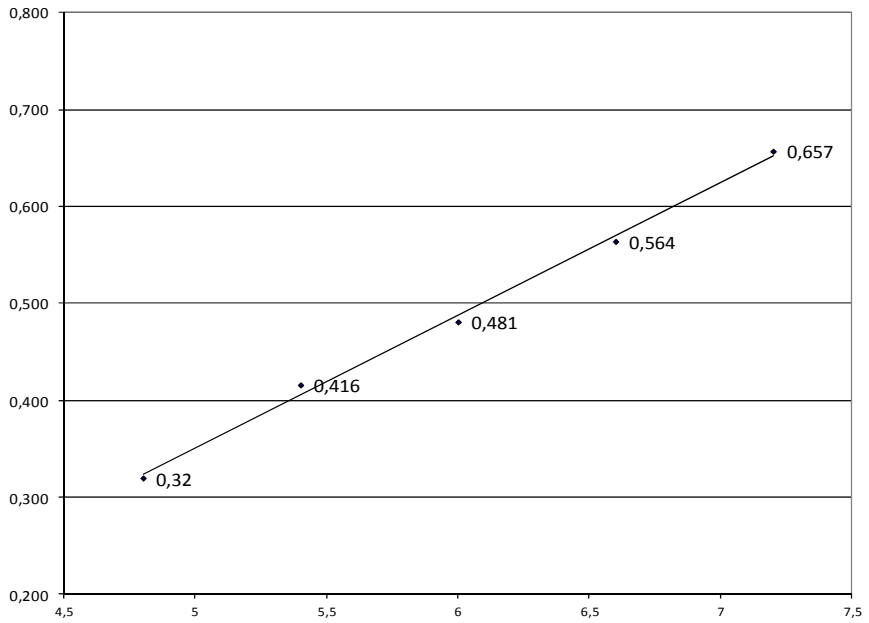
4. Линейность и диапазон методики.

Для определения линейности проводили определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемых образцах в пяти концентрациях ГСО рутина - 80, 90, 100, 110, 120% от теоретического уровня. Линейность метода сохраняется в интервале концентраций от 4,8 до 7,2 мкг/мл и охватывает нижний предел содержания суммы флавоноидов в исследуемом сырье.

Таблица результатов

Оптическая плотность, D	Концентрация рутина, мкг/мл	Коэффициент корреляции	y = b·x + a	
			b	a
0,320	4,8	0,998341	0,1370	- 0,3344
0,416	5,4			
0,481	6,0			
0,564	6,6			
0,657	7,2			

D



Концентрация рутина, мкг/мл

Таблица результатов

№	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	Правильность	% от ожидаемого значения 100,0±5,0%	Относительная ошибка: 0,40 – 2,94% (<5%)
2	Сходимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 10%	1-ый день RSD=0,40% 2-ой день RSD=1,67%
3	Воспроизводимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 15%	Лаборатория № 1 RSD=1,09%, лаборатория № 2 RSD=1,36%
4	Специфичность	Совпадение спектров поглощения	Доказана совпадением спектров поглощения окрашенных комплексов извлечения и ГСО рутина
5	Линейность и диапазон применения	Коэффициент корреляции r≥0,99	Коэффициент корреляции r=0,998341 в интервале 4,8-7,2 мкг/мл рутина

Количественное определение кислоты аскорбиновой в траве первоцвета весеннего

1. Правильность методики.

1.1. Опыты на модельных смесях с РСО кислоты аскорбиновой.

Модельные смеси готовили трех концентраций с содержанием кислоты аскорбиновой в % к исходной концентрации 75, 100, 125. Определение проводилось в трех повторностях для каждой концентрации.

Таблица результатов

№	Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси (кислота аскорбиновая), мг	Экспериментально найденное значение (кислота аскорбиновая)	
		абсолютная величина, мг	процент восстановления, %
1	9,00	9,11	101,22
2	9,00	9,08	100,89
3	9,00	8,89	98,78
4	12,00	12,11	100,91
5	12,00	12,09	100,75
6	12,00	11,90	99,17
7	15,00	14,92	99,47
8	15,00	14,89	99,27
9	15,00	15,12	100,80
Средний % восстановления для трех концентраций в трех повторностях			100,14

1.2. Опыты с добавками РСО кислоты аскорбиновой.

Испытание проводилось на одном образце листьев первоцвета весеннего в 3 концентрациях с добавками РСО кислоты аскорбиновой в трех повторностях.

Таблица результатов

Содержание кислоты аскорбиновой в аликвоте, мкг	Добавлено РСО кислоты аскорбиновой, мкг	Ожидаемое содержание, мкг	Полученное содержание, мкг	Ошибка, %	
				абс., мкг	отн., %
1	2	3	4	5	6
408,25	50	458,25	461,22	+ 2,97	0,65
408,25	50	458,25	452,44	–5,81	1,27
408,25	50	458,25	464,32	+6,07	1,32
408,25	100	508,25	516,46	+8,21	1,61
408,25	100	508,25	512,92	+4,67	0,99
408,25	100	508,25	505,13	–3,12	0,61
408,25	150	558,25	550,22	–8,03	1,44
408,25	150	558,25	564,09	+5,84	1,05
408,25	150	558,25	554,16	–4,09	0,73

2. Прецизионность методики.

Для определения сходимости испытания проводились на спектрофотометре СФ-46 в разные дни на одном образце сырья одним и тем же специалистом в шести повторностях.

Определение воспроизводимости проводили в двух лабораториях на приборах «СФ-46» и «СФ-26» на одном образце сырья в шести повторностях: («Центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО БГМУ (условно, лаборатория № 1), ассистент кафедры послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования (ПДПФО) ИПО БГМУ Иванова Д.Ф.; кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии БГМУ (условно, лаборатория № 2), старший преподаватель кафедры ПДПФО ИПО БГМУ Федотова А.А

Таблица результатов содержания аскорбиновой кислоты, %

Образец №	Первый день	Второй день	Лаборатория № 1	Лаборатория № 2
1	2,38	2,35	2,39	2,37
2	2,41	2,32	2,41	2,41
3	2,36	2,38	2,43	2,42
4	2,40	2,31	2,45	2,34
5	2,39	2,37	2,38	2,33
6	2,42	2,33	2,39	2,35
Стандартное отклонение S	0,02160	0,02805	0,02714	0,03742
Относительное стандартное отклонение RSD, %	0,90	1,20	1,13	1,58

3. Специфичность методики.

Специфичность методики доказана отсутствием отклика при отсутствии анализируемого вещества. При замещении раствора аскорбиновой кислоты водой очищенной в реакции с раствором натрия фосфорномолибдата (при нагревании на кипящей водяной бане в течение 10 мин) синего окрашивания не наблюдалось.

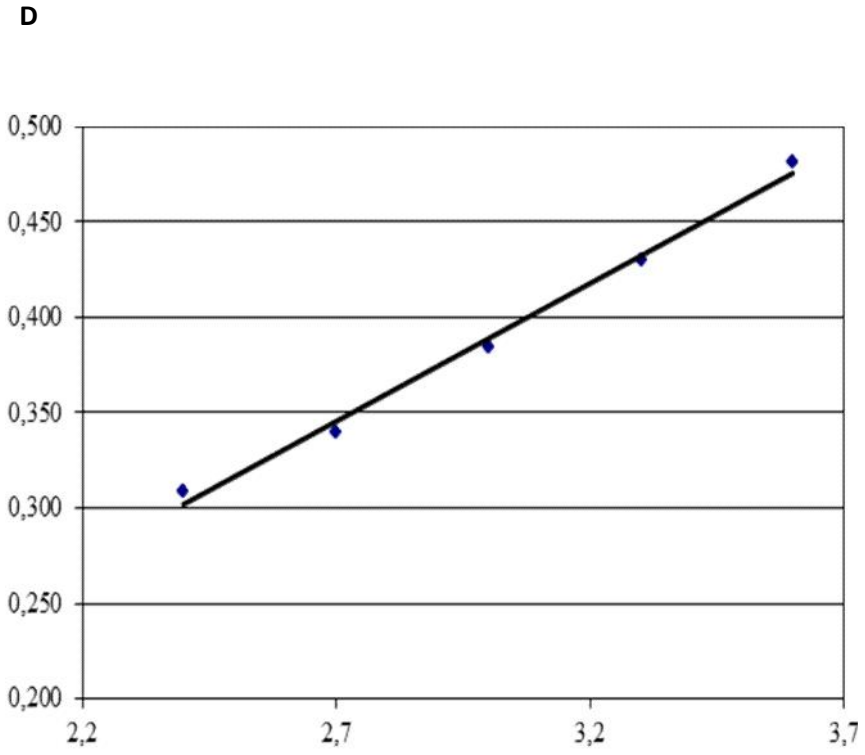
4. Линейность и диапазон методики.

Для определения линейности проводили определение содержания аскорбиновой кислоты в исследуемых образцах в пяти концентрациях ГСО аскорбиновой кислоты - 80, 90, 100, 110, 120% от теоретического уровня. Линейность метода сохраняется в интервале концентраций от 2,4 до 3,6 мкг/мл и

охватывает нижний предел содержания аскорбиновой кислоты в исследуемом сырье.

Таблица результатов

Оптическая плотность, D	Концентрация кислоты аскорбиновой, мкг/мл	Коэффициент корреляции	y = b·x + a	
			b	a
0,309	2,4	0,99643	0,1447	– 0,0452
0,340	2,7			
0,384	3,0			
0,430	3,3			
0,481	3,6			



Концентрация кислоты аскорбиновой, мкг/мл

Таблица результатов

№	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	Правильность	% от ожидаемого значения 100,0±5,0%	Относительная ошибка: 0,65 – 1,61% (<5%)
2	Сходимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 10%	1-ый день RSD=0,90% 2-ой день RSD=1,20%
3	Воспроизводимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 15%	Лаборатория № 1 RSD=1,13%, лаборатория № 2 RSD=1,58%
4	Специфичность	Отсутствие отклика при отсутствии анализируемого вещества	Отсутствие синего окрашивания с раствором натрия фосфорномолибдата в отсутствии кислоты аскорбиновой
5	Линейность и диапазон применения	Коэффициент корреляции r≥0,99	Коэффициент корреляции r=0,99643 в интервале 2,4-3,6 мкг/мл аскорбиновой кислоты

Приложение 41

Числовые показатели

травы первоцветов

РЕЗУЛЬТАТЫ ТОВАРОВЕДЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА
(цельное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание аскорбиновой кислоты, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Минеральная примесь, %	Органическая примесь, %	Пожелтевшие листья и черешки, %	Иные части растений (цветки), %	Радионуклиды (Sr-90), Бк/кг	Частицы, проходящие сквозь сито с d=0,5мм, %
					Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %								
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006	4,78	3,61	9,04	10,61	1,85	40,21	48,35	0,39	0,47	1,61	4,79	34,60	3,19
2	Курская область, окрестности г. Курска, VI-2006	5,48	2,01	8,65	8,19	1,49	39,55	51,48	0,42	0,39	1,78	5,10	33,75	1,55
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006	5,05	2,53	10,81	11,12	2,76	43,18	46,80	0,21	0,25	1,25	6,09	40,28	4,46
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006	3,58	2,14	8,10	7,93	0,95	38,21	46,23	0,41	0,37	0,92	7,15	35,52	1,83
5	Нуримановский р-н РБ, VI-2006	3,13	2,15	12,43	11,19	2,53	41,73	46,95	0,45	0,41	0,51	3,49	45,12	2,24

РЕЗУЛЬТАТЫ ТОВАРОВЕДЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА
(измельченное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание аскорбиновой кислоты, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Минеральная примесь, %	Органическая примесь, %	Пожелтевшие листья и черешки, %	Иные части растений (цветки), %	Радионуклиды (Sr-90), Бк/кг	Частицы, не проходящие сквозь сито с d =7 мм, %	Частицы, проходящие сквозь сито с d=0,5мм, %
					Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %									
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006	4,75	3,55	9,06	10,58	1,87	40,20	48,33	0,38	0,45	1,60	4,79	34,61	8,73	5,57
2	Курская область, окрестности г. Курска, VI-2006	5,43	1,98	8,64	8,20	1,48	39,59	51,45	0,40	0,36	1,79	4,98	33,73	6,54	6,71
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006	4,99	2,41	10,80	11,10	2,75	43,13	46,78	0,19	0,21	1,44	6,01	40,30	9,25	7,92
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006	3,48	2,10	8,08	7,91	0,94	38,23	46,20	0,44	0,39	0,87	6,90	35,50	8,08	9,20
5	Нуримановский р-н РБ, VI-2006	3,09	2,12	12,40	11,09	2,51	41,69	46,87	0,40	0,37	0,45	3,47	45,07	9,12	8,05

РЕЗУЛЬТАТЫ ТОВАРОВЕДЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА
(порошкованное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание аскор-биновой кислоты, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Радионуклиды (Sr-90), Бк/кг	Частицы, не проходящие сквозь сито с d =2 мм, %	Частицы, проходящие сквозь сито с d=0,25мм, %
					Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %					
1	Белгородская обл., окрестности г. Бел-город, VI-2006	4,75	3,52	9,08	10,58	1,87	40,19	48,37	34,58	8,18	7,31
2	Курская область, окрестности г. Курска, VI-2006	5,42	1,95	8,63	8,20	1,48	39,60	51,44	33,72	7,29	6,95
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006	4,96	2,40	10,81	11,09	2,74	43,11	46,75	40,31	9,41	7,63
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006	3,45	2,09	8,06	7,90	0,95	38,25	46,21	35,50	7,74	8,05
5	Нуримановский р-н РБ, VI-2006	3,07	2,14	12,41	11,11	2,50	41,67	46,85	45,05	8,93	8,50

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСИ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ПРИ ХРАНЕНИИ
(цельное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первого и последующих анализов	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание аскорбиновой кислоты, %	Товароведческий анализ				Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Продолжительность хранения, годы
					Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Пожелтевшие листья и черешки, %			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006 (собственный сбор)	08.06.06 18.12.06 20.06.07 20.12.07 09.06.08 15.12.08	4,78 4,77 4,79 4,72 4,70 4,65	3,61 3,55 3,45 3,42 3,32 3,20	9,04 9,05 9,08 9,12 9,20 9,25	10,61 10,63 10,65 10,62 10,60 10,64	1,85 1,84 1,85 1,87 1,86 1,85	1,61 1,62 1,60 1,59 1,60 1,63	40,21 40,23 40,27 40,25 40,31 40,24	48,35 48,34 48,33 48,38 48,45 48,50	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
2	Курская область, окрестности г. Курск, VI-2006 (собственный сбор)	08.06.06 18.12.06 20.06.07 20.12.07 09.06.08 15.12.08	5,48 5,45 5,41 5,38 5,33 5,29	2,01 1,85 1,67 1,62 1,57 1,49	8,65 8,66 8,69 8,71 8,88 8,94	8,19 8,20 8,17 8,22 8,21 8,18	1,49 1,48 1,45 1,50 1,49 1,51	1,78 1,77 1,79 1,80 1,82 1,85	39,55 39,59 39,62 39,61 39,65 39,59	51,48 51,44 51,43 51,42 51,47 51,46	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	5,05 5,04 5,01 4,95 4,97 4,94	2,53 2,49 2,39 2,25 2,00 1,75	10,81 10,89 10,85 10,91 10,93 10,96	11,12 11,10 11,13 10,95 10,98 10,97	2,76 2,74 2,72 2,73 2,75 2,74	1,25 1,26 1,29 1,32 1,35 1,37	43,18 43,22 43,24 43,28 43,32 43,35	46,80 46,82 46,78 46,84 46,82 46,85	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	3,58 3,55 3,51 3,49 3,53 3,47	2,14 2,08 2,02 1,98 1,85 1,78	8,10 8,12 8,16 8,18 8,19 8,18	7,93 7,94 7,92 7,91 7,89 7,88	0,95 0,93 0,90 0,91 0,91 0,91	0,92 0,89 0,88 0,87 0,88 0,86	38,21 38,25 38,24 38,31 38,28 38,29	46,23 46,25 46,27 46,31 46,32 46,33	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
5	Нуримановский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	3,13 3,10 3,09 3,08 3,06 3,07	2,15 2,09 2,06 2,04 1,89 1,78	12,43 12,45 12,48 12,50 12,51 12,53	11,19 11,20 11,18 11,15 11,16 11,17	2,53 2,53 2,52 2,50 2,53 2,48	0,52 0,54 0,56 0,59 0,63 0,64	41,73 41,75 41,78 41,81 41,80 41,79	46,95 46,98 46,92 46,91 46,94 46,93	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ПРИ ХРАНЕНИИ
(измельченное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первого и последующих анализов	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание аскорбиновой кислоты, %	Товароведческий анализ				Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Продолжительность хранения, годы
					Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Пожелтевшие листья и черешки, %			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006 (собственный сбор)	08.06.06 18.12.06 20.06.07 20.12.07 09.06.08 15.12.08	4,77 4,73 4,74 4,70 4,69 4,68	3,60 3,52 3,49 3,40 3,39 3,21	9,06 9,08 9,08 9,07 9,11 9,23	10,59 10,61 10,64 10,60 10,62 10,61	1,83 1,84 1,85 1,86 1,84 1,85	1,58 1,61 1,62 1,62 1,64 1,65	40,19 40,22 40,25 40,26 40,28 40,24	48,32 48,34 48,33 48,37 48,45 48,47	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
2	Курская область, окрестности г. Курск, VI-2006 (собственный сбор)	08.06.06 18.12.06 20.06.07 20.12.07 09.06.08 15.12.08	5,45 5,44 5,43 5,38 5,33 5,26	2,03 1,89 1,74 1,62 1,57 1,43	8,64 8,65 8,65 8,71 8,78 8,84	8,22 8,20 8,19 8,22 8,21 8,20	1,46 1,48 1,45 1,49 1,49 1,51	1,80 1,79 1,83 1,85 1,84 1,86	39,59 39,62 39,67 39,65 39,66 39,64	51,52 51,50 51,49 51,47 51,48 51,50	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	5,07 5,05 5,01 4,95 4,92 4,89	2,50 2,49 2,39 2,25 2,15 1,82	10,76 10,83 10,85 10,91 10,93 10,99	11,15 11,13 11,11 11,05 10,99 11,05	2,75 2,77 2,73 2,74 2,76 2,75	1,28 1,26 1,28 1,30 1,33 1,35	43,19 43,21 43,24 43,25 43,31 43,34	46,82 46,80 46,78 46,83 46,80 46,84	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	3,57 3,55 3,52 3,49 3,51 3,43	2,15 2,09 2,02 1,96 1,75 1,71	8,12 8,14 8,16 8,18 8,22 8,21	7,95 7,94 7,92 7,91 7,89 7,90	0,93 0,93 0,90 0,91 0,94 0,90	0,96 0,98 1,02 1,05 1,03 1,06	38,28 38,25 38,27 38,31 38,29 38,29	46,24 46,25 46,27 46,29 46,32 46,33	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
5	Нуримановский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	3,12 3,08 3,09 3,08 3,02 3,01	2,15 2,11 2,06 2,04 1,91 1,72	12,51 12,50 12,55 12,56 12,56 12,59	11,21 11,20 11,18 11,17 11,18 11,17	2,55 2,53 2,52 2,54 2,53 2,49	0,53 0,57 0,56 0,59 0,62 0,66	41,82 41,80 41,84 41,81 41,80 41,82	46,96 46,98 46,92 46,95 46,94 46,93	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ПРИ ХРАНЕНИИ
(порошкованное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первого и последующих анализов	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание аскорбиновой кислоты, %	Товароведческий анализ			Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Продолжительность хранения, годы
					Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006 (собственный сбор)	08.06.06 18.12.06 20.06.07 20.12.07 09.06.08 15.12.08	4,78 4,75 4,74 4,72 4,69 4,67	3,59 3,54 3,49 3,42 3,39 3,34	9,06 9,07 9,08 9,10 9,15 9,19	10,58 10,61 10,60 10,59 10,57 10,61	1,85 1,84 1,85 1,83 1,84 1,83	40,20 40,22 40,25 40,24 40,26 40,24	48,35 48,34 48,33 48,37 48,38 48,42	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
2	Курская область, окрестности г. Курск, VI-2006 (собственный сбор)	08.06.06 18.12.06 20.06.07 20.12.07 09.06.08 15.12.08	5,44 5,42 5,41 5,35 5,33 5,28	2,04 1,89 1,75 1,62 1,53 1,42	8,68 8,69 8,73 8,75 8,78 8,83	8,21 8,20 8,19 8,23 8,21 8,22	1,47 1,48 1,47 1,49 1,48 1,47	39,58 39,62 39,61 39,65 39,63 39,67	51,53 51,50 51,46 51,47 51,48 51,49	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	5,08 5,05 5,05 4,95 4,88 4,85	2,51 2,49 2,39 2,27 2,19 1,81	10,78 10,83 10,84 10,89 10,90 10,95	11,16 11,13 11,15 11,09 11,08 11,07	2,76 2,77 2,75 2,74 2,76 2,74	43,21 43,23 43,24 43,25 43,29 43,32	46,85 46,80 46,83 46,84 46,83 46,86	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	3,56 3,55 3,52 3,47 3,46 3,43	2,14 2,09 2,02 1,95 1,76 1,72	8,13 8,15 8,16 8,18 8,21 8,23	7,96 7,94 7,92 7,94 7,91 7,90	0,95 0,93 0,92 0,91 0,94 0,93	38,27 38,25 38,31 38,27 38,29 38,28	46,26 46,25 46,26 46,28 46,29 46,30	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5
5	Нуримановский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Баш-кирии»)	28.06.06 16.01.07 29.06.07 17.01.08 02.07.08 21.01.09	3,11 3,08 3,09 3,05 3,01 3,00	2,13 2,11 2,06 2,04 1,90 1,79	12,50 12,49 12,52 12,54 12,56 12,57	11,20 11,20 11,18 11,19 11,18 11,19	2,54 2,53 2,52 2,54 2,53 2,52	41,84 41,80 41,84 41,81 41,84 41,82	46,97 46,98 46,92 46,95 46,97 46,93	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА (цельное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первичного анализа и перекоторля	Содержание микроорганизмов в 1 мл настоя (1:10)					
			Дрожжевые и плесневые грибы (не более 10^5)	Аэробные бактерии (не более 10^7)	Staphylococcus aureus	Семейства Enterobacteriaceae	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006 (собственный сбор)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,4 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,2 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
2	Курская область, окрестности г. Курск, VI-2006 (собственный сбор)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,7 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,5 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
5	Нуриманов-ский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,2 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА
(измельченное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первичного анализа и переконтроля	Содержание микроорганизмов в 1 мл настоя (1:10)					
			Дрожжевые и плесневые грибы (не более 10^5)	Аэробные бактерии (не более 10^7)	Staphylococcus aureus	Семейства Enterobacteriaceae	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006 (собственный сбор)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,4 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,2 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
2	Курская область, окрестности г. Курск, VI-2006 (собственный сбор)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,7 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,5 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
5	Нуриманов-ский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,2 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА
(порошкованное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первичного анализа и переконтроля	Содержание микроорганизмов в 1 мл настоя (1:10)					
			Дрожжевые и плесневые грибы (не более 10^5)	Аэробные бактерии (не более 10^7)	Staphylococcus aureus	Семейства Enterobacteriaceae	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Белгородская обл., окрестности г. Белгород, VI-2006 (собственный сбор)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,4 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,2 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
2	Курская область, окрестности г. Курск, VI-2006 (собственный сбор)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,7 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
3	Уфимский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	Иглинский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,5 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
5	Нуриманов-ский р-н РБ, VI-2006 (ООО «Травы Башкирии»)	15.07.06 21.12.06 15.07.07 20.01.08 06.07.08 28.01.09	$1,2 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

РЕЗУЛЬТАТЫ СИТОВОГО АНАЛИЗА ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА
(измельченное сырье)

Показатель	Белгород-ская обл., окрестности г. Белгород	Курская область, окрестности г. Курска	Уфимский р-н РБ	Иглинский р-н РБ	Нури-мановский р-н РБ
1	2	3	4	5	6
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=7 мм	8,73%	6,54%	9,25%	8,08%	9,12%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=5 мм	9,24%	8,13%	7,98%	9,29%	10,14%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=3 мм	32,42%	29,44%	31,61%	34,53%	35,65%
Частиц, не проходящих сквозь сито с о d=2 мм	20,76%	18,78%	15,19%	15,05%	12,54%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=1 мм	10,20%	18,13%	12,16%	11,57%	17,21%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=0,5 мм	13,08%	12,27%	15,89%	12,28%	7,29%
Частиц, проходящих сквозь сито с d=0,5 мм	5,57%	6,71%	7,92%	9,20%	8,05%

РЕЗУЛЬТАТЫ СИТОВОГО АНАЛИЗА ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА

(порошкованное сырье)

Показатель	Белгород-ская обл., окрестности г. Белгород	Курская область, окрестности г. Курска	Уфимский р-н РБ	Иглинский р-н РБ	Нури-мановский р-н РБ
1	2	3	4	5	6
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=2 мм	8,18%	7,29%	9,41%	7,74%	8,93%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=1 мм	35,61%	32,90%	36,85%	40,12%	38,22%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=0,5 мм	39,80%	40,24%	33,83%	31,27%	32,53%
Частиц, не проходящих сквозь сито с о d=0,3 мм	4,10%	5,26%	6,46%	7,51%	5,51%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=0,25 мм	5,00%	7,36%	5,82%	5,31%	6,31%
Частиц, проходящих сквозь сито с d=0,25 мм	7,31%	6,95%	7,63%	8,05%	8,50%

Приложение 42

Протоколы

валидации аналитических методов

«Количественное определение суммы флавоноидов

в пересчете на рутин»

в листьях хмеля обыкновенного

1. Правильность методики.

1.1. Опыты на модельных смесях с ГСО рутина.

Модельные смеси готовили трех концентраций с содержанием рутина в % к исходной концентрации 75, 100, 125. Определение проводилось в трех повторностях для каждой концентрации.

Таблица результатов модельной смеси

№	Реальное значение измеряемой величины в модельной смеси (ГСО рутин), мг	Экспериментально найденное значение (ГСО рутин)	
		Абсолютная величина, мг	Процент восстановления, %
1	7,50	7,47	99,60
2	7,50	7,52	100,27
3	7,50	7,54	100,53
4	10,00	9,97	99,70
5	10,00	10,10	101,00
6	10,00	9,96	99,60
7	12,50	12,42	99,36
8	12,50	12,53	100,24
9	12,50	12,52	100,16
Средний % восстановления для трех концентраций в трех повторностях			100,05

1.2. Опыты с добавками ГСО рутина.

Испытание проводилось на одном образце листьев хмеля обыкновенного в 3-х концентрациях с добавками ГСО рутина в трех повторностях.

Таблица результатов

Содержание суммы флавоноидов в аликвоте, мкг	Добав-ле-но ГСО рутина, мкг	Ожидаемое содержание, мкг	Полученное содержание, мкг	Ошибка, %	
				абс., мкг	отн., %
546,28 546,28 546,28	60 60 60	606,28 606,28 606,28	601,71 611,65 614,02	–4,57 +5,37 +7,74	0,75 0,89 1,27
546,28 546,28 546,28	90 90 90	636,28 636,28 636,28	631,85 629,55 639,76	–4,43 –6,73 +3,48	0,70 1,06 0,55
546,28 546,28 546,28	120 120 120	666,28 666,28 666,28	658,61 675,12 670,20	–7,67 +8,84 +3,92	1,15 1,33 0,59

2. Прецизионность методики.

Для определения сходимости испытания проводились на спектрофотометре СФ-46 в разные дни на одном образце сырья одним и тем же специалистом в шести повторностях.

Определение воспроизводимости проводили в двух лабораториях на приборах «СФ-46» и «СФ-26» на одном образце сырья в шести повторностях: («Центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО БГМУ (условно, лаборатория № 1), ассистент кафедры послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования (ПДПФО) ИПО БГМУ Иванова Д.Ф.; кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фи-

тотерапии БГМУ (условно, лаборатория № 2), старший преподаватель кафедры ПДПФО ИПО БГМУ Федотова А.А.).

Таблица результатов содержания
суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %

Образец №	Первый день	Второй день	Лаборатория № 1	Лаборатория № 2
1	3,21	3,20	3,05	3,01
2	3,22	3,24	3,09	3,03
3	3,25	3,27	3,01	2,98
4	3,24	3,26	3,12	3,05
5	3,19	3,25	3,15	3,06
6	3,20	3,24	3,06	2,97
Стандартное отклонение S	0,02317	0,03061	0,05059	0,03669
Относительное стандартное отклонение RSD, %	0,72	0,94	1,64	1,22

3. Специфичность методики.

Спектрофотометрия. Специфичность методики основана на совпадении спектров поглощения извлечения из исследуемого сырья листьев хмеля обыкновенного и ГСО рутина с 2% раствором алюминия хлорида. Спектры поглощения полученных комплексов снимали на спектрофотометре «СФ-46» в интервале 350- 500 нм.

4. Линейность и диапазон методики.

Для определения линейности проводили определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемых образцах в пяти концентрациях ГСО рутина - 80, 90, 100, 110, 120% от теоретического уровня. Линейность метода сохраняется в интервале концентраций от 4,8 до 7,2 мкг/мл и охватывает нижний предел содержания суммы флавоноидов в исследуемом сырье.

Таблица результатов

Оптическая плотность, D	Концентрация рутина, мкг/мл	Коэффициент корреляции	y = b·x + a	
			b	a
0,295	4,8	0,997737	0,1388	- 0,3650
0,398	5,4			
0,465	6,0			
0,543	6,6			
0,639	7,2			

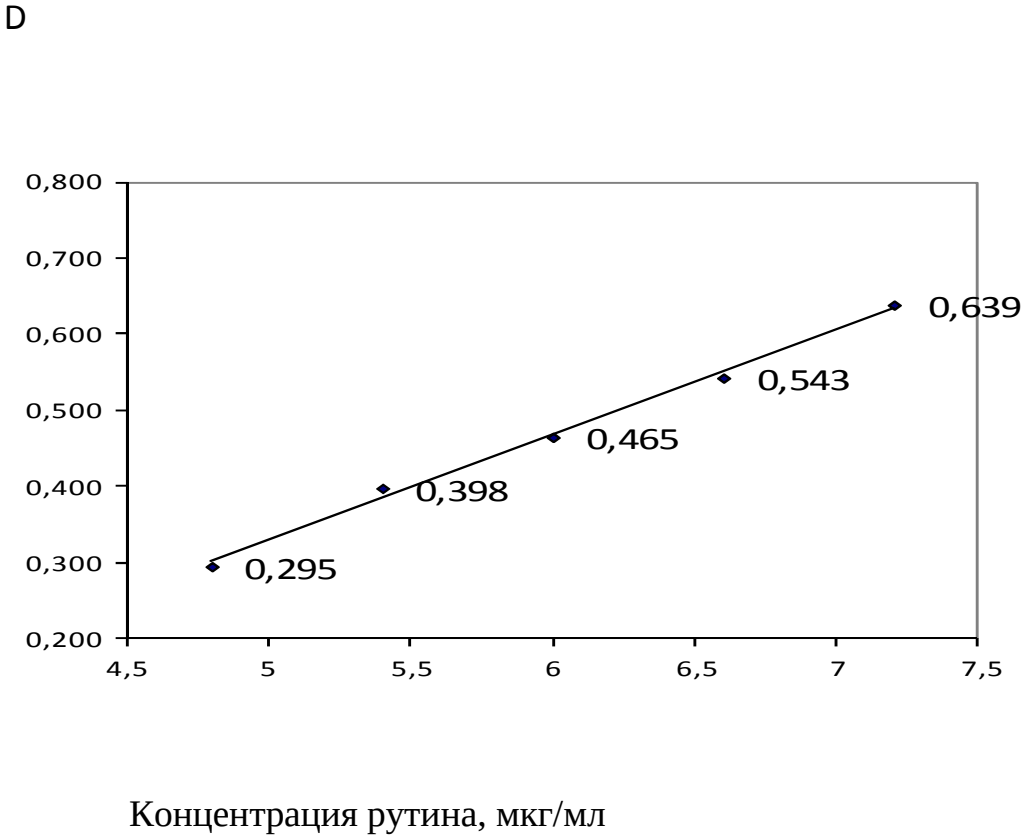


Таблица результатов

№	Параметры валидации	Критерий приемлемости	Экспериментальные данные
1	Правильность	% от ожидаемого значения 100,0±5,0%	Относительная ошибка: 0,55 – 1,33% (<5%)
2	Сходимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 10%	1-ый день RSD=0,72% 2-ой день RSD=0,94%
3	Воспроизводимость	Относительное стандартное отклонение RSD не более 15%	Лаборатория № 1 RSD=1,64%, лаборатория № 2 RSD=1,22%
4	Специфичность	Совпадение спектров поглощения	Доказана совпадением спектров поглощения окрашенных комплексов извлечения и ГСО рутина
5	Линейность и диапазон применения	Коэффициент корреляции r≥0,99	Коэффициент корреляции r=0,997737 в интервале 4,8-7,2 мкг/мл рутина

Приложение 43

Числовые показатели

листьев хмеля обыкновенного

РЕЗУЛЬТАТЫ ТОВАРОВЕДЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО
(цельное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание ацилфлоро-глюцидов, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Минеральная примесь, %	Органическая примесь, %	Иные части растений (соплодия), %	Радионуклиды (Sr-90), Бк/кг	Частицы, проходящие сквозь сито с d=0,5мм, %
					Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %							
1	Дикорастущее, Давлеканв-ский р-н РБ, IX–2009	2,96	12,7	11,36	11,61	1,65	40,21	48,35	0,31	0,39	6,07	36,41	1,89
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	3,25	12,5	12,05	11,12	1,52	39,55	51,48	0,25	0,29	6,17	41,19	2,23
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	2,69	12,9	9,80	9,34	0,93	43,18	46,80	0,34	0,38	7,58	44,88	3,28
4	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ре-сурсы», г.Чебоксары, IX–2009	2,37	12,4	11,13	9,83	1,08	38,21	46,23	0,41	0,34	7,23	33,31	3,49
5	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	3,12	11,7	10,64	10,75	1,28	41,73	46,95	0,38	0,35	6,79	32,49	1,77

РЕЗУЛЬТАТЫ ТОВАРОВЕДЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО
(измельченное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание ацилфлоро-глюцидов, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Минеральная примесь, %	Органическая примесь, %	Иные части растений (соплодия), %	Радионуклиды (Sr-90), Бк/кг	Частицы, не проходящие сквозь сито с d =7 мм, %	Частицы, проходящие сквозь сито с d=0,5мм, %
					Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %								
1	Дикорастущее, Давле-канвский р-н РБ, IX–2009	2,93	12,6	11,37	11,60	1,66	40,21	48,35	0,30	0,37	6,05	36,40	7,43	7,45
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	3,21	12,4	12,07	11,09	1,52	39,55	51,48	0,23	0,28	6,16	41,18	9,11	8,92
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ре-сурсы», г.Чебоксары, IX–2009	2,65	12,7	9,81	9,32	0,91	43,18	46,80	0,32	0,36	7,56	44,86	8,24	8,15
4	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ре-сурсы», г.Чебоксары, IX–2009	2,35	12,3	11,12	9,81	1,09	38,21	46,23	0,40	0,32	7,22	33,32	7,17	5,95
5	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресур-сы», г.Чебоксары, IX–2009	3,13	11,5	10,63	10,73	1,27	41,73	46,95	0,37	0,33	6,78	32,47	6,67	6,88

РЕЗУЛЬТАТЫ ТОВАРОВЕДЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗОВ ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО
(порошкованное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание ацилфлоро-глюцидов, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Радионуклиды (Sr-90), Бк/кг	Частицы, не проходящие сквозь сито с d =2 мм, %	Частицы, проходящие сквозь сито с d=0,25мм, %
					Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %					
1	Дикорастущее, Давле-канвский р-н РБ, IX–2009	2,93	12,5	11,38	11,59	1,65	40,21	48,35	36,40	5,97	7,25
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	3,20	12,3	12,06	11,08	1,53	39,55	51,48	41,17	8,23	7,92
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ре-сурсы», г.Чебоксары, IX–2009	2,66	12,5	9,83	9,33	0,92	43,18	46,80	44,86	7,41	8,27
4	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ре-сурсы», г.Чебоксары, IX–2009	2,35	12,4	11,11	9,81	1,08	38,21	46,23	33,31	6,97	5,83
5	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресур-сы», г.Чебоксары, IX–2009	3,11	11,3	10,65	10,72	1,26	41,73	46,95	32,47	6,83	6,73

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО ПРИ ХРАНЕНИИ (цельное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первого и последующих анализов	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание ацилфлороглюцидов, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Продолжительность хранения, годы
						Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	26.08.09	2,96	12,7	11,36	11,61	1,65	40,21	48,35	--
		18.12.09	2,93	12,6	11,37	11,62	1,66			0,5
		02.09.10	2,91	12,5	11,38	11,64	1,67			1,0
		20.12.10	2,89	12,4	11,39	11,66	1,63			1,5
		05.09.11	2,87	12,4	11,38	11,63	1,62			2,0
		15.12.11	2,88	12, 3	11,39	11,64	1,64			2,5
		12.05.12	2,84	12,3	11,41	11,65	1,66			3,0
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	26.08.09	3,25	12,5	12,05	11,12	1,52	39,55	51,48	--
		18.12.09	3,23	12,2	12,07	11,10	1,50			0,5
		02.09.10	3,24	12,1	12,09	11,11	1,49			1,0
		20.12.10	3,22	12,0	12,12	11,13	1,46			1,5
		05.09.11	3,20	11,9	12,15	11,10	1,43			2,0
		15.12.11	3,21	11,8	12,18	11,14	1,45			2,5
		12.05.12	3,21	11,7	12,17	11,15	1,44			3,0
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09	2,69	12,9	9,80	9,34	0,93	43,18	46,80	--
		18.12.09	2,66	12,5	9,85	9,33	0,91			0,5
		02.09.10	2,62	12,3	9,98	9,38	0,94			1,0
		20.12.10	2,59	12,1	10,05	9,41	0,92			1,5
		05.09.11	2,57	11,8	10,11	9,40	0,90			2,0
		15.12.11	2,53	11,3	10,15	9,38	0,91			2,5
		12.05.12	2,49	11,2	10,17	9,39	0,92			3,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	Сорт «Крылат-ский», ОАО «Агро-фирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	2,37 2,35 2,32 2,30 2,29 2,27 2,26	12,4 12,1 12,0 11,8 11,7 11,6 11,5	11,13 11,15 11,17 11,19 11,22 11,26 11,34	9,83 9,84 9,86 9,85 9,87 9,85 9,85	1,08 1,05 1,04 1,03 0,98 0,97 0,96	38,21	46,23	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0
4	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	3,12 3,09 3,08 3,07 3,05 3,03 3,04	11,7 11,5 11,6 11,4 11,2 10,9 10,7	10,64 10,66 10,65 10,67 10,68 10,67 10,67	10,75 10,73 10,76 10,74 10,76 10,75 10,74	1,28 1,27 1,26 1,25 1,27 1,26 1,25	41,73	46,95	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО ПРИ ХРАНЕНИИ
(измельченное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первого и последующих анализов	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание ацилфлороглюцидов, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Продолжительность хранения, годы
						Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	26.08.09	2,93	12,6	11,37	11,60	1,66	40,21	48,35	--
		18.12.09	2,92	12,5	11,38	11,61	1,67			0,5
		02.09.10	2,90	12,4	11,39	11,63	1,64			1,0
		20.12.10	2,89	12,3	11,40	11,64	1,65			1,5
		05.09.11	2,86	12,2	11,42	11,62	1,63			2,0
		15.12.11	2,87	12,1	11,41	11,63	1,64			2,5
		12.05.12	2,85	12,1	11,42	11,64	1,65			3,0
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	26.08.09	3,21	12,4	12,07	11,09	1,52	39,55	51,48	--
		18.12.09	3,20	12,1	12,09	11,11	1,53			0,5
		02.09.10	3,19	12,0	12,10	11,13	1,55			1,0
		20.12.10	3,18	11,9	12,15	11,14	1,53			1,5
		05.09.11	3,16	11,7	12,16	11,15	1,54			2,0
		15.12.11	3,15	11,5	12,17	11,16	1,56			2,5
		12.05.12	3,13	11,4	12,18	11,17	1,55			3,0
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09	2,65	12,7	9,81	9,32	0,91	43,18	46,80	--
		18.12.09	2,63	12,5	9,85	9,30	0,90			0,5
		02.09.10	2,59	12,2	9,97	9,29	0,89			1,0
		20.12.10	2,55	12,1	10,04	9,28	0,90			1,5
		05.09.11	2,54	11,8	10,07	9,29	0,91			2,0
		15.12.11	2,53	11,5	10,13	9,30	0,91			2,5
		12.05.12	2,51	11,3	10,14	9,31	0,91			3,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	Сорт «Крылат-ский», ОАО «Агро-фирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	2,35 2,32 2,30 2,27 2,26 2,25 2,26	12,3 12,0 11,9 11,8 11,7 11,6 11,5	11,12 11,13 11,14 11,16 11,19 11,21 11,22	9,81 9,83 9,85 9,84 9,83 9,84 9,82	1,09 1,07 1,05 1,06 1,03 0,98 0,98	38,21	46,23	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0
4	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	3,13 3,11 3,08 3,06 3,05 3,04 3,03	11,5 11,4 11,3 11,2 11,1 10,9 10,8	10,63 10,65 10,66 10,67 10,69 10,68 10,68	10,73 10,74 10,73 10,72 10,73 10,73 10,74	1,27 1,26 1,25 1,28 1,29 1,27 1,26	41,73	46,95	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО ПРИ ХРАНЕНИИ (порошкованное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первого и последующих анализов	Содержание суммы флавоноидов, %	Содержание ацилфлороглюцидов, %	Влажность, %	Зола		Экстрактивные в-ва, извлекаемые водой, %	Экстрактивные в-ва, извлекаемые 70% спиртом этиловым, %	Продолжительность хранения, годы
						Общая, %	Нерастворимая в 10% растворе HCl, %			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	26.08.09	2,93	12,5	11,38	11,59	1,65	40,21	48,35	--
		18.12.09	2,91	12,3	11,40	11,61	1,66			0,5
		02.09.10	2,90	12,1	11,45	11,62	1,63			1,0
		20.12.10	2,88	12,0	11,46	11,58	1,64			1,5
		05.09.11	2,85	11,9	11,47	11,60	1,64			2,0
		15.12.11	2,83	11,7	11,48	11,61	1,63			2,5
		12.05.12	2,84	11,6	11,49	11,60	1,64			3,0
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	26.08.09	3,20	12,3	12,06	11,08	1,53	39,55	51,48	--
		18.12.09	3,18	12,1	12,08	11,09	1,52			0,5
		02.09.10	3,17	11,9	12,11	11,10	1,49			1,0
		20.12.10	3,16	11,7	12,13	11,12	1,50			1,5
		05.09.11	3,15	11,5	12,14	11,13	1,52			2,0
		15.12.11	3,13	11,4	12,15	11,12	1,48			2,5
		12.05.12	3,12	11,3	12,14	11,11	1,47			3,0
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09	2,66	12,5	9,83	9,33	0,92	43,18	46,80	--
		18.12.09	2,63	12,4	9,87	9,31	0,91			0,5
		02.09.10	2,62	12,3	9,91	9,32	0,90			1,0
		20.12.10	2,61	12,2	9,98	9,29	0,91			1,5
		05.09.11	2,62	11,9	10,06	9,29	0,93			2,0
		15.12.11	2,60	11,6	10,11	9,30	0,92			2,5
		12.05.12	2,59	11,4	10,12	9,32	0,91			3,0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	Сорт «Крылат-ский», ОАО «Агро-фирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	2,35 2,34 2,31 2,32 2,29 2,28 2,27	12,4 12,1 11,8 11,7 11,6 11,5 11,4	11,11 11,13 11,15 11,17 11,20 11,22 11,23	9,81 9,82 9,84 9,83 9,82 9,83 9,81	1,08 1,07 1,06 1,05 1,02 0,99 0,98	38,21	46,23	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0
4	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	3,11 3,09 3,07 3,07 3,06 3,04 3,03	11,3 11,2 11,0 10,9 10,8 10,6 10,5	10,65 10,66 10,68 10,69 10,70 10,71 10,72	10,72 10,71 10,73 10,73 10,72 10,71 10,71	1,26 1,25 1,24 1,23 1,22 1,23 1,22	41,73	46,95	-- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (цельное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первичного анализа и перекоторля	Содержание микроорганизмов в 1 мл настоя (1:10)					
			Аэробные бактерии (не более 10^7)	Дрожжевые и плесневые грибы (не более 10^5)	Staphylococcus aureus	Семейства Enterobacteriaceae	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,7 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,7 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
5	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,0 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,2 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (измельченное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первичного анализа и переконтроля	Содержание микроорганизмов в 1 мл настоя (1:10)					
			Аэробные бактерии (не более 10^7)	Дрожжевые и плесневые грибы (не более 10^5)	Staphylococcus aureus	Семейства Enterobacteriaceae	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,7 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,7 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
5	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,0 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,2 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО (порошкованное сырье)

№ п/п	Место и дата сбора сырья	Дата первичного анализа и перекоторля	Содержание микроорганизмов в 1 мл настоя (1:10)					
			Аэробные бактерии (не более 10^7)	Дрожжевые и плесневые грибы (не более 10^5)	Staphylococcus aureus	Семейства Enterobacteriaceae	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
2	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,7 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,7 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
4	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,5 \cdot 10^5$ $1,6 \cdot 10^5$ $1,7 \cdot 10^5$ $1,4 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,9 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$ $1,8 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --
5	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	26.08.09 18.12.09 02.09.10 20.12.10 05.09.11 15.12.11 12.05.12	$1,0 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$ $1,1 \cdot 10^5$ $1,3 \cdot 10^5$ $1,2 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^2$ $1,3 \cdot 10^2$ $1,2 \cdot 10^2$ $1,4 \cdot 10^2$ $1,5 \cdot 10^2$ $1,6 \cdot 10^2$	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --	-- -- -- -- -- --

РЕЗУЛЬТАТЫ СИТОВОГО АНАЛИЗА ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО
(измельченное сырье)

Показатель	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009
1	2	3	4	5	6
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=7 мм	7,43%	9,11%	8,24%	7,17%	6,67%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=5 мм	10,20%	7,85%	10,02%	8,49%	9,31%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=3 мм	34,53%	30,85%	33,68%	30,84%	31,12%
Частиц, не проходящих сквозь сито с о d=2 мм	17,29%	16,19%	15,73%	21,37%	19,19%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=1 мм	11,68%	17,18%	13,09%	20,08%	16,89%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=0,5 мм	11,42%	9,90%	11,09%	6,10%	9,94%
Частиц, проходящих сквозь сито с d=0,5 мм	7,45%	8,92%	8,15%	5,95%	6,88%

РЕЗУЛЬТАТЫ СИТОВОГО АНАЛИЗА ЛИСТЬЕВ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО
(порошкованное сырье)

Показатель	Дикорастущее, Давлеканвский р-н РБ, IX–2009	Дикорастущее, Уфимский р-н РБ, IX–2009	Сорт «Подвязный», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	Сорт «Крылатский», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009	Сорт «Ранний», ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г.Чебоксары, IX–2009
1	2	3	4	5	6
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=2 мм	5,97%	8,23%	7,41%	6,97%	6,83%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=1 мм	42,05%	37,11%	37,92%	34,28%	33,16%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=0,5 мм	31,09%	32,79%	33,75%	40,42%	41,05%
Частиц, не проходящих сквозь сито с о d=0,3 мм	7,88%	7,17%	5,93%	4,83%	5,78%
Частиц, не проходящих сквозь сито с d=0,25 мм	5,76%	6,78%	6,72%	7,67%	6,45%
Частиц, проходящих сквозь сито с d=0,25 мм	7,25%	7,92%	8,27%	5,83%	6,73%

Приложение 44

Спецификация

Лекарственное растительное сырье «Хмеля обыкновенного листья»

ОАО «Агрофирма «Ресурсы», г. Чебоксары

Показатели качества	Методы	Норма
1	2	3
Внешние признаки	ГФ XI	Соответствуют ФСП
Микроскопия	ГФ XI	Соответствуют описанию и рисункам
Качественные реакции	С 2% спиртовым раствором алюминия хлорида	Зеленовато-желтое окрашивание (флавоноиды).
	С 1% раствором ацетата свинца	Белый хлопьевидный осадок (производные ацилфлороглюцидов (горькие кислоты).
	ТСХ	На хроматограмме в системе растворителей: этилацетат – кислота ледяная уксусная – вода (5:1:1) после высушивания при просмотре в УФ- свете при длине волны 254 нм должно появляться три пятна, одно из которых желто-коричневого цвета на уровне зоны РСО рутина с Rf 0,33, второе темно-коричневого цвета с Rs (по рутину) около 0,68, третье – светло-бурого цвета с Rs (по рутину) около 0,56.
Числовые показатели		
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	Спектрофотометрия	Не менее 1,5%
Сумма производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот)	Неводное титрование	Не менее 10%
Числовые показатели		
1	**2**	**3**
Влажность	ГФ XI	Не более 13%
Зола общая	ГФ XII	Не более 12%
Зола нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ XI	Не более 3,5%
Содержание других частей растений (соплодия, стебли)	ГФ XI	Не более 10%
Содержание частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм	ГФ XI	Не более 5%
Органическая примесь	ГФ XI	Не более 0,5%
Минеральная примесь	ГФ XI	Не более 0,5%

Микробиологическая чистота	ГФ XII	Категория 4 А
Количественное определение	Спектрофотометрия	См. раздел «Количественное определение флавоноидов»
	Неводное титрование	См. раздел «Количественное определение суммы производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот)»
Упаковка		По 1 кг, 2кг, 3 кг, 5 кг в пакеты бумажные или полипропиленовые; по 10 кг, 20 кг, 25 кг, 30 кг в мешки бумажные или тканевые, или пропиленовые.
Маркировка		В соответствии с ФСП
Хранение		В сухом, защищенном от света месте
Срок годности		3

Результаты определения основных показателей качества гранул густого экстракта из травы первоцвета весеннего

№ серии	Высвобождение суммы флавоноидов за 45мин, %	Высвобождение кислоты аскорбиновой за 45мин, %	Фракционный состав гранул (размер гранул),%			Остаточная влажность,%	Сыпучесть, г/сек	Время распадаемости, мин.	Механическая прочность,%
			менее 0,2мм	0,2 - 3,0 мм	свыше 3,0 мм				
1	99,1±0,14	99,3±0,16	1,5±0,05	98,3±0,83	11,8±0,07	8,05±0,02	11,8±0,05	11±0,03	99,3±0,55
2	99,4±0,24	99,4±0,19	1,4±0,03	98,2±0,89	12,1±0,03	8,11±0,04	12,2±0,04	9±0,02	99,2±0,64
3	99,5±0,18	99,2±0,17	1,1±0,01	98,4±0,83	12,2±0,08	8,52±0,05	12,4±0,07	10±0,04	98,3±0,57
4	99,3±0,29	99,1±0,27	1,6±0,05	97,5±0,71	12,3±0,11	8,85±0,07	12,3±0,11	9±0,03	99,4±0,56
5	99,2±0,31	99,2±0,21	1,3±0,02	98,3±0,79	12,1±0,04	8,12±0,08	12,1±0,03	10±0,02	98, 6±0,58

Приложение 46

Результаты анализа стабильности основных показателей качества гранул густого экстракта из травы первоцвета весеннего

№ серии	Продолжи-тельность хранения (в годах)	Содержание влаги,%	Время распадае-мости, мин	Механическая прочность на истирание,%	Количественное содержание суммы флавоноидов,%
1	2	3	4	5	6
1	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	8,05 8,09 8,13 8,17 8,21 8,01	11 11 10 11 10 10	99,3 99,3 99,4 99,3 99,3 99,0	7,89 7,88 7,87 7,86 7,87 7,85
2	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	8,11 8,15 8,17 8,19 8,20 8,25	9 9 10 10 10 9	99,2 99,2 99,3 99,2 99,3 98,9	7,95 7,94 7,93 7,92 7,93 7,90
3	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	8,52 8,53 8,54 8,54 8,55 8,61	10 10 11 11 11 10	98,3 99,4 99,5 98,4 99,2 98,8	8,13 8,12 8,11 8,10 8,12 7,95

1	2	3	4	5	6
4	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	8,85 8,86 8,87 8,87 8,88 8,90	9 9 10 10 10 10	99,4 99,5 99,6 99,4 99,5 98,9	8,25 8,23 8,22 8,21 8,20 8,10
5	- 0,5 1,0 1,5 2,0 2,5	8,12 8,13 8,15 8,15 8,18 8,20	10 10 11 11 11 10	98,6 98,7 98,8 98,8 98,9 98,5	8,44 8,41 8,42 8,41 8,40 8,30

Приложение 47

Результаты определения основных показателей качества гранул густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного

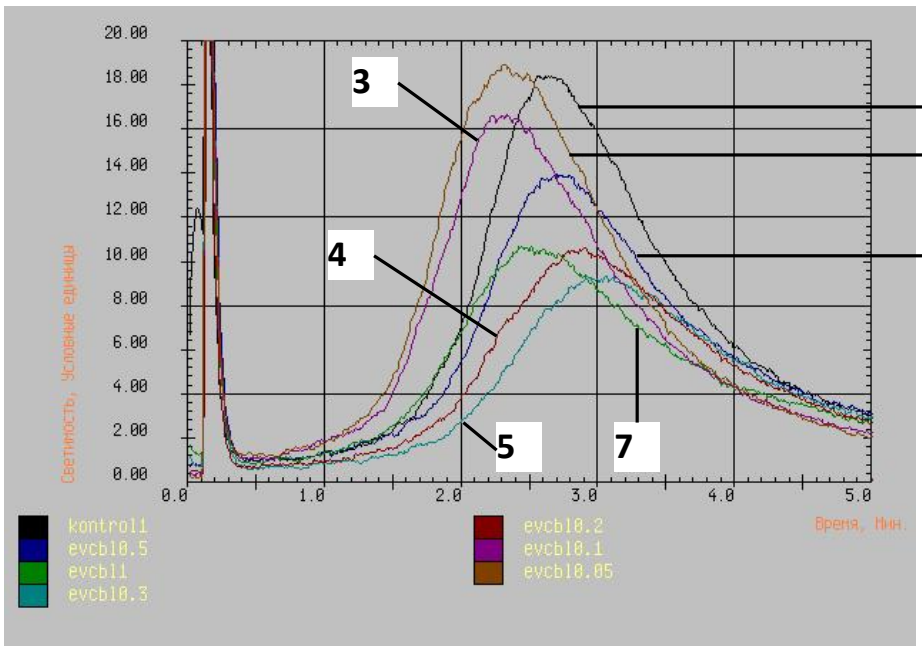
№ се-рии	Высвобожде-ние суммы флавоноидов за 45мин, %	Высвобожде-ние суммы АФГ за 45мин, %	Фракционный состав гранул (размер гранул),%			Остаточная влажность,%	Сыпучесть, г/сек	Время распада-емости, мин.	Механиче-ская прочность,%
			менее 0,2мм	0,2 - 3,0 мм	свыше 3,0 мм				
1	99,2±0,14	99,4±0,16	1,3±0,05	98,4±0,83	11,8±0,07	8,05±0,02	11,8±0,05	11±0,03	98,9±0,55
2	99,1±0,24	99,5±0,19	1,4±0,03	98,2±0,89	12,1±0,03	8,11±0,04	12,2±0,04	12±0,02	99,1±0,64
3	99,4±0,18	99,0±0,17	1,2±0,01	98,4±0,83	12,2±0,08	8,52±0,05	12,4±0,07	10±0,04	98,5±0,57
4	99,3±0,29	99,1±0,27	1,5±0,05	97,5±0,71	12,3±0,11	8,85±0,07	12,3±0,11	11±0,03	98,8±0,56
5	99,2±0,31	99,2±0,21	1,3±0,02	98,3±0,79	12,1±0,04	8,12±0,08	12,1±0,03	10±0,02	98, 4±0,58

Приложение 48

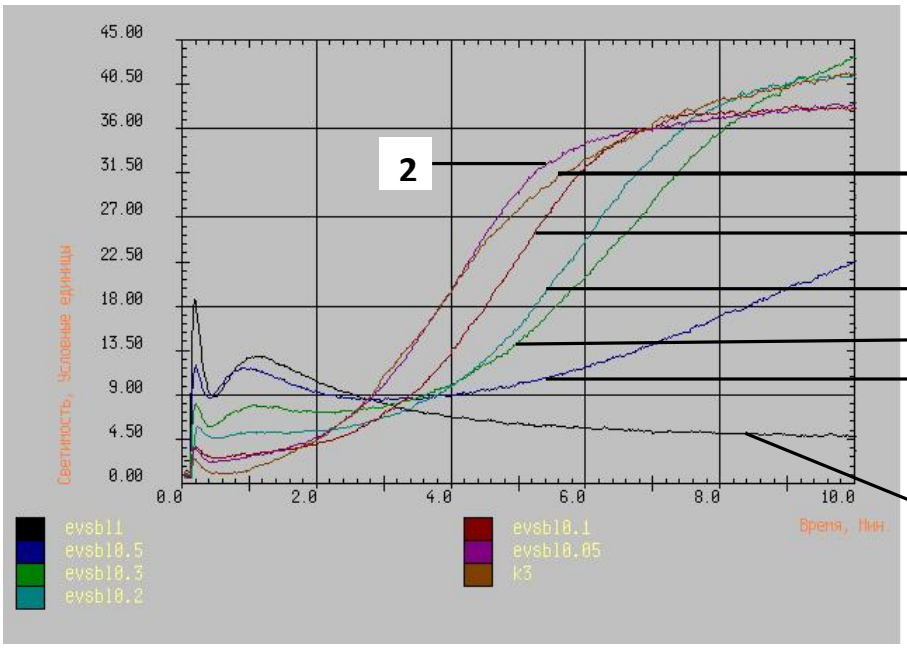
Результаты анализа стабильности основных показателей качества гранул густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного

№ серии	Продолжительность хранения (в годах)	Содержание влаги,%	Время распадаемости, мин	Механическая прочность на истирание,%	Количественное содержание суммы флавоноидов,%	Количественное содержание суммы АФГ,%
1	2	3	4	5	6	7
1	-	8,05	11	99,3	7,89	21,29
	0,5	8,09	11	99,3	7,88	21,38
	1,0	8,13	10	99,4	7,87	21,67
	1,5	8,17	11	99,3	7,86	21,56
	2,0	8,21	10	99,3	7,87	21,87
	2,5	8,25	12	99,1	7,85	21,85
	3,0	8,22	11	98,5	7,85	20,85
	3,5	8,28	12	98,1	7,80	20,80
2	-	8,11	9	99,2	7,95	21,89
	0,5	8,15	9	99,2	7,94	21,48
	1,0	8,17	10	99,3	7,93	21,87
	1,5	8,19	10	99,2	7,92	21,46
	2,0	8,20	10	99,3	7,93	21,27
	2,5	8,23	10	98,5	7,90	21,25
	3,0	8,31	11	98,6	7,88	20,95
	3,5	8,35	11	98,3	7,85	20,82

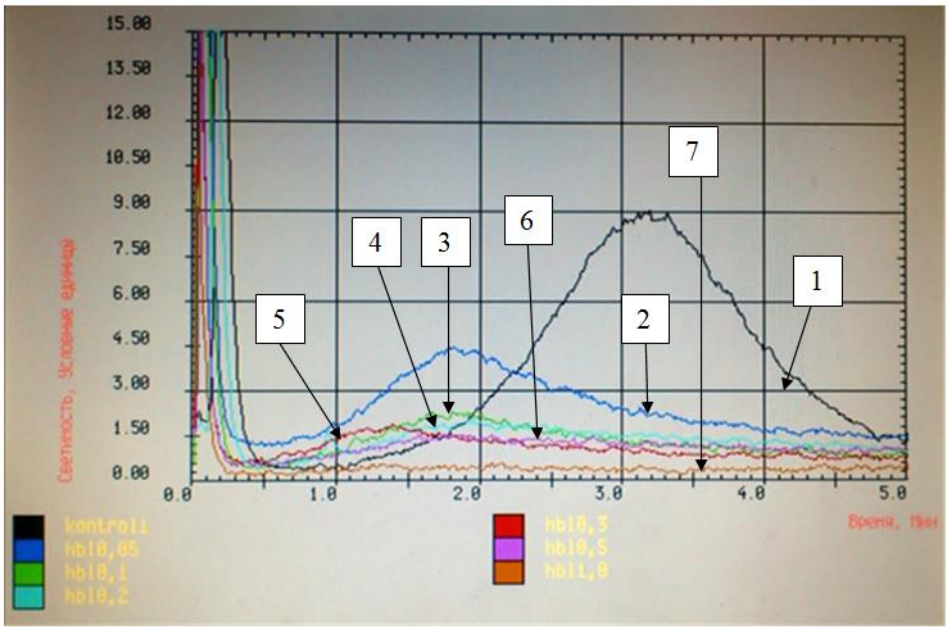
1	2	3	4	5	6	7
3	-	8,52	10	98,3	8,13	21,89
	0,5	8,53	10	99,4	8,12	21,68
	1,0	8,54	11	99,5	8,11	21,57
	1,5	8,54	11	98,4	8,10	21,66
	2,0	8,55	11	99,2	8,12	21,47
	2,5	8,50	11	98,7	8,10	21,25
	3,0	8,56	12	98,4	7,90	21,15
	3,5	8,61	12	98,5	7,88	20,90
4	-	8,85	9	99,4	8,25	22,19
	0,5	8,86	9	99,5	8,23	22,10
	1,0	8,87	10	99,6	8,22	21,97
	1,5	8,87	10	99,4	8,21	21,86
	2,0	8,88	10	99,5	8,20	21,87
	2,5	8,89	10	99,0	8,15	21,69
	3,0	8,88	11	98,9	8,16	21,55
	3,5	8.89	11	98,5	8,12	21,30
5	-	8,12	10	98,6	8,44	22,15
	0,5	8,13	10	98,7	8,41	21,98
	1,0	8,15	11	98,8	8,42	21,87
	1,5	8,15	11	98,8	8,41	21,56
	2,0	8,18	11	98,9	8,40	21,77
	2,5	8,22	11	98,5	8,39	21,45
	3,0	8,24	12	98,1	8,34	21,25
	3,5	8,24	12	98,0	8,33	21,00



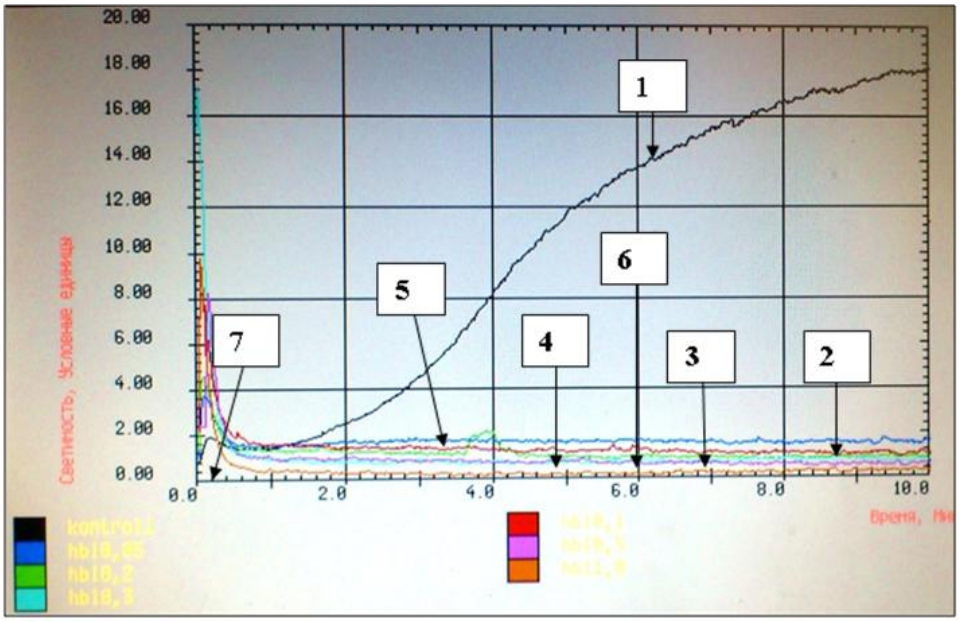
Приложение 49. Хемилюминограмма в тест-системе, генерирующей активные формы кислорода. Кривая 1 – контроль, кривые – после добавления ГЭТПВ в дозах 0.05 мл (2); 0.1 мл (3); 0.2 мл (4); 0.3 мл (5); 0.5 мл (6); 1 мл (7)



Приложение 50. Хемилюминограмма в тест-системе с липосомами. Кривая 1 – контроль, кривые– после добавления ГЭТПВ в дозах 0.05 мл (2), 0.1 мл (3), 0.2 мл (4), 0.3 мл (5), 0.5 мл (6), 1 мл (7)



Приложение 51. Хемилюминограмма в тест-системе, генерирующей активные формы кислорода. Кривая 1 – контроль, кривые – после добавления ГЭЛХО в дозах 0.05 мл (2); 0.1 мл (3); 0.2 мл (4); 0.3 мл (5); 0.5 мл (6); 1 мл (7)



Приложение 52. Хемилюминограмма в тест-системе с липосомами. Кривая 1 – контроль, кривые– после добавления ГЭЛХО в дозах 0.05 мл (2), 0.1 мл (3), 0.2 мл (4), 0.3 мл (5), 0.5 мл (6), 1 мл (7)

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ
(ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВА)
450000, г.Уфа, ул.Ленина, 3. тел.(347) 272-41-73, факс 272-37-51
Адрес в интернете: WWW. bsmu.anrb.ru
E-mail: rectorat @ anrb.ru
E-mail: admin @ bsmu.anrb.ru
ОКПО01963597 ОГРН 1020202561136
ИНН/КПП 0274023088/027401001

03.12.09 № 3580-01

на №_____ от_____

И.о. Генерального директора
ФГУ "НЦЭСМП"
Буданову С. В.

Направляем Вам на рассмотрение проект фармакопейной статьи «Первоцвета листья», разработанный на кафедре фармации Института последипломного образования Башкирского государственного медицинского университета для последующего включение в Фармакопею XII издания.

Ректор ГОУ ВПО БГМУ,
чл.-корр. РАМН, профессор В.М. Тимербулатов

КАНЦЕЛЯРИЯ
НЦЭСМП
Вх.№ 21105
от 08.12.09

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Первоцвета листья	**ФС 42-**
Primulae folia	Вводится впервые

Собранные в фазу начала цветения высушенные листья многолетнего дикорастущего травянистого растения первоцвета весеннего – *Primula veris* L., семейства первоцветных - *Primulaceae* Vent.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Директор ЦФМС ФГБУ
«Научного центра экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России
_____ Е.И. Саканян
«_____»_____20____ г.

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

Производитель: ООО «АгроРесурсы», п.г.т. Урмары

Заявитель: ООО «АгроРесурсы», п.г.т. Урмары

Разработчик: ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Хмеля листья | **ФСП 42-**

Humulus lupulus L. | Вводится впервые

Срок введения установлен
с «___» _____ г.
до «____» _____ г.

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на собранные в период созревания соплодий и высушенные листья культивируемого и дикорастущего растения хмеля обыкновенного – Humulus lupulus L., семейства коноплевые (Cannabaceae), измельченные, расфасованный в упаковки «ангро» и используемые для производства лекарственных средств.

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Лекарственное растительное сырье «Хмеля обыкновенного листья»

ООО «АгроРесурсы», п.г.т. Урмары

Показатели	Методы	Норма
Внешние признаки	ГФ XI	Соответствует ФСП
Микроскопия	ГФ XI	Соответствует описанию и рисункам
Качественные реакции	С 2% спиртовым раствором алюминия хлорида	Зеленовато-желтое окрашивание (флавоноиды).
	С 1% раствором ацетата свинца	Белый хлопьевидный осадок (производные ацилфлороглюцидов (горькие кислоты).
	ТСХ	На хроматограмме в системе растворителей: этилацетат – кислота ледяная уксусная – вода (5:1:1) после высушивания при просматре в УФ-свете при длине волны 254 нм должно появляться три пятна, одно из которых желто-коричневого цвета на уровне зоны РСО рутина с Rf 0,33, второе темно-коричневого цвета с Rs (по рутину) около 0,68, третье – светло-бурого цвета с Rs (по рутину) около 0,56.
Числовые показатели		
Сумма флавоноидов в пересчете на рутин	Спектрофотометрия	Не менее 1,5%
Сумма производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот)	Неводное титрование	Не менее 10%

Числовые показатели		
1	2	3
Влажность	ГФ XI	Не более 13%
Зола общая	ГФ XII	Не более 12%
Зола нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ XI	Не более 3,5%
Других частей растений (соплодия, стебли)	ГФ XI	Не более 10%
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм	ГФ XI	Не более 5%
Органическая примесь	ГФ XI	Не более 0,5%
Минеральная примесь	ГФ XI	Не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ XII	Категория 4 А
Количественное определение	Спектрофотометрия	См. раздел «Количественное определение флавоноидов»
	Неводное титрование	См. раздел «Количественное определение суммы производных ацилфлороглюцидов (горьких кислот)»
Упаковка		По 1 кг, 2кг, 3 кг, 5 кг в пакеты бумажные или полипропиленовые; по 10 кг, 20 кг, 25 кг, 30 кг в мешки бумажные или тканевые, или пропиленовые.
Маркировка		В соответствии с ФСП
Хранение		В сухом, защищенном от света месте
Срок годности		3

Примечание. Методы анализа, методики определения числовых показателей и реактивы, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах ГФ XI, вып. 1,2; ГФ XII, ч.I.

Проректор по научной и инновационной работе
ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России
д.фарм.н., профессор В.А. Катаев

Генеральный директор
ООО «АгроРесурсы» С.Л. Дмитриев

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ
В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Территориальное управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Башкортостан

(наименование территориального органа)

САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

№ 02.ТУ.03.970.Т.000327.08.05 от 03 августа 2005г.

Настоящим санитарно-эпидемиологическим заключением удостоверяется, что требования, установленные в проектной документации (перечислить рассмотренные документы, указать наименование и адрес организации-разработчика):

ТУ 9700-014-26795008-2005 «Сырье растительное. Технические условия».

ООО «Травы Башкирии», 450020, Республика Башкортостан, г.Уфа, ул. Глазовская, 1/3 (Российская Федерация)

СООТВЕТСТВУЮТ (~~НЕ СООТВЕТСТВУЮТ~~) государственным санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам (ненужное зачеркнуть, указать полное наименование санитарных правил)

СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов», МУК 2.3.2.971-00 «Порядок санитарно-эпидемиологической экспертизы технических документов на пищевые продукты», ГОСТ Р 51740-2001 «Технические условия на пищевые продукты. Общие требования к разработке и оформлению».

Основанием для признания представленных документов соответствующими (~~не соответствующими~~) государственным санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам являются (перечислить рассмотренные документы):

Экспертное заключение № С-1355 от 13.07.2005г. ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан».

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
Иванов А.А.

Главный государственный санитарный врач
(заместитель главного государственного санитарного врача)
по Республике Башкортостан

Р.М.Такаев
Ф.И.О. подпись, печать

Формат А4. Бланк. Срок хранения 5 лет.

№066958

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«ТРАВЫ БАШКИРИИ»

ОКП 970000
937000

Группа Р60
(ОКС 65.020.20)

СОГЛАСОВАНО
Санитарно-эпидимиологическое заключение
№ 02.ТУ.03.970.Т.000327.08.05
от 03.08.2005 г.
выданное Территориальным управлением
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека по РБ

УТВЕРЖДАЮ
Директор ООО «Травы Башкирии»
_____ А.А.Иванов
«___» _____ 2005 г.

СЫРЬЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ

Технические условия
ТУ 9700-014-26795008-2005

Дата введения в действие 08. 12 2005 г.

РАЗРАБОТАНО
ООО «Травы Башкирии»
Гл.технолог
_____ Н.Е. Елемина

Руководитель ОКК
_____ Э.Э.Бегишев

Федеральное агентство
по техническому регулированию и метрологии
ФГУ "ЦСМ Республики Башкортостан"
Внесен в реестр 08. 12 2005 г.
№ 0561009900
Директор _____ А.М. Муратшин

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
Иванов А.А.

УФА
2005

1 Область применения

Настоящие технические условия распространяются на сырье растительное высушенное цельное или измельченное, предназначенное для приготовления настоев и отваров, чайных напитков и реализации через фитоцентры.

Примечание: в настоящих технических условиях используются термины, определения к которым установлены:

ГОСТ 14192-96	Маркировка грузов.
ГОСТ 16299-78	Упаковывание. Термины и определения.
ГОСТ 17527-86	Упаковка. Термины и определения.
ГОСТ Р 51074-2003	Продукты пищевые. Информация для потребителя. Общие требования.
ГОСТ Р 51474-99	Упаковка, маркировка, указание на способ обращения с грузом.
ГОСТ Р 51740-2001	Технические условия на пищевые продукты. Общие требования к разработке и оформлению.

Сырье растительное высушенное цельное или измельченное выпускается в следующем ассортименте:

Наименование продукции	Код ОКП
трава:	
- алтея;	937262
- аистника цикутного	974400
- амаранта;	974400
- бедренца;	974500
- белокопытника;	974400
- боровой матки;	974500
- бораго (бурачника);	973287
- борщевика;	974500
- бутеня;	974500
- ветреницы;	974500
- водяного перца;	937612
- гвоздики травянки;	974400
- герани лесной;	972623
- горечавки;	974500
- горца альпийского;	974500
- горца птичьего;	937717
- горца почечуйного;	937612
- гравилата;	974400
- грудницы;	974500
- грушанки;	974500
- грыжника круглолистного;	974500
- дербенника;	974500
- дымянки;	974400
- живокости;	937217
- земляники;	974500
- зимолюбки;	974500
- золотарника обыкновенного (золотой розги);	974500

Наименование продукции	Код ОКП
Трава:	937332
- золототысячника;	974500
- зюзника;	974500
- икотника;	974500
- кирказона;	974500
- кипрея болотного;	974500
- конского щавеля;	974500
- котовника;	974500
- короставника;	974500
- купены;	974400
- крапивы жгучей;	974500
- кровохлебки;	974500
- курильского чая;	974500
- лабазника шестилепестного;	974500
- латука;	974500
- мальвы;	974400
- марьянника;	974400
- мелиссы;	937918
- мокрицы;	974500
- мяты перечной;	972621
- недотроги;	974400
- одуванчика;	937912
- очанки;	974400
- очитка большого	974500
- пастушьей сумки;	937223
- панцерии шерстистой;	974500
- первоцвета;	974500
- подмаренника душистого;	974500
- подмаренника цепкого;	974500
- посконника;	974500
- прострела лугового;	974500
- пустырника;	972537
- фиалки;	937711
- ромашки;	937317
- ряски;	974500
- синюхи;	974500
- синяка;	974500
- стальника;	937910
- сурепки;	937910
- смолевки;	974500
- тархуна (эстрагона);	974500
- топинамбура;	974500
- тысячелистника;	937616
- череды голубой;	974400

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2342942

СРЕДСТВО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩЕЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Патентообладатель(ли): ***Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ" (ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВА) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2007144096**

Приоритет изобретения **16 ноября 2007 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***10 января 2009 г.***

Срок действия патента истекает **16 ноября 2027 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ (19) **RU** (11) **2 342 942** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007144096/15, 16.11.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 16.11.2007

(45) Опубликовано: 10.01.2009 Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Рабинович А.М. и др. Лекарственные растения России. - М.: АРНЕБИЯ, 2005, с.296-297. Варлих В.К. Полный иллюстрированный регистр лекарственных растений России. - М.: Рипол классик, 2005, с.295-298. RU 2302252 C1, 10.07.2007.

Адрес для переписки:
450000, г.Уфа-центр, Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, патентный отдел

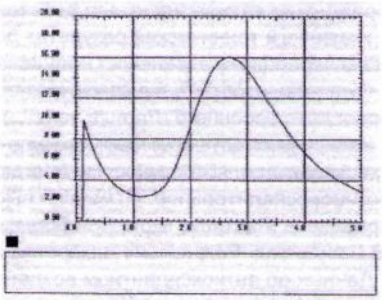
(72) Автор(ы):
Латыпова Гузель Минулловна (RU),
Романова Земфира Рашитовна (RU),
Соколов Геннадий Васильевич (RU),
Иксанова Галина Розлевна (RU),
Галимов Шамиль Нуриманович (RU),
Гильмутдинова Лира Талгатовна (RU),
Катаев Валерий Алексеевич (RU),
Бубенчикова Валентина Николаевна (RU),
Исхаков Ильдар Ренатович (RU),
Сафаргалиева Розалия Талгатовна (RU),
Камалетдинов Салават Ханифович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ" (ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВА) (RU)

(54) СРЕДСТВО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩЕЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармакологии и может быть использовано для лечения и профилактики заболеваний, где основным патогенетическим фактором является нарушение процессов перекисного и свободнорадикального окисления, особенно липидов. В качестве антиоксидантного средства предложен густой экстракт травы первоцвета весеннего (Primula veris L.). Средство расширяет арсенал лекарственных средств для профилактики и лечения свободнорадикальных патологий. 14 ил., 1 табл.



Фиг.1

RU 2342942 C1

RU 2342942 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2372931

АНТИОКСИДАНТНОЕ СРЕДСТВО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Патентообладатель(ли): ***Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ" (ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВА) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2008125593**

Приоритет изобретения **23 июня 2008 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***20 ноября 2009 г.***

Срок действия патента истекает **23 июня 2028 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 372 931** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2008125593/15, 23.06.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 23.06.2008

(45) Опубликовано: 20.11.2009 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2008068344 A2, 12.06.2008. RU 2155062 C1, 27.08.2000. RU 2180232 C1, 10.03.2002. Далали В.А. Процессы перекисного окисления в организме и природные антиоксиданты. - Новосибирск, 1999, т.3, с.241.

Адрес для переписки:
450000, г.Уфа-Центр, Ленина, 3, БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, патентный отдел

(72) Автор(ы):
Латыпова Гузель Минупловна (RU),
Гильмутдинова Лира Талгатовна (RU),
Закиева Светлана Владимировна (RU),
Галеева Амина Хамитовна (RU),
Круглова Наталья Николаевна (RU),
Камалетдинов Салават Ханифович (RU),
Янтурина Неля Хатмуловна (RU),
Сыртланова Эльза Раифовна (RU),
Галимов Шамиль Нуриманович (RU),
Искандарова Зульфира Миннуловна (RU),
Бубенчикова Валентина Николаевна (RU),
Давлетшина Разида Ягшафаровна (RU),
Шафикова Светлана Феликсовна (RU),
Лукманова Гюзель Флюровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ" (ГОУ ВПО БГМУ РОСЗДРАВА) (RU)

RU 2372931 C1

(54) АНТИОКСИДАНТНОЕ СРЕДСТВО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

(57) Формула изобретения

Применение густого экстракта из листьев хмеля обыкновенного (Humulus Lupulus) в качестве антиоксидантного средства.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2353378

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТА ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО

Патентообладатель(ли): ***Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" (ГОУ ВПО БГМУ Росздрава) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2008102824**

Приоритет изобретения **16 января 2008 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***27 апреля 2009 г.***

Срок действия патента истекает **16 января 2028 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 353 378** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 36/185 (2006.01)
A61K 31/21 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/401 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2008102824/14, 16.01.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: **16.01.2008**

(45) Опубликовано: **27.04.2009 Бюл. № 12**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ЛАТЫПОВА Г.М. и др. Применение экстракта травы первоцвета весеннего в восстановительном лечении больных ишемической болезнью сердца. Вестник восстановительной медицины, 2007, №2(20), с.58-60. RU 2163132 C1, 20.02.2001. UA 76464 C2, 15.08.2006. ДЕРИМЕДВЕДЬ Л.В. Антиоксидантные препараты в профилактике и лечении гиперлипидемий. Провизор, 1999,** (см. прод.)

Адрес для переписки:
450000, г.Уфа-Центр, Ленина, 3, БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, патентный отдел

(72) Автор(ы):
Латыпова Гузель Минулловна (RU), Соколов Геннадий Васильевич (RU), Романова Земфира Рашитовна (RU), Галимов Шамиль Нуриманович (RU), Гильмутдинова Лира Талгатовна (RU), Иксанова Галина Роэлевна (RU), Камалетдинов Салават Ханифович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" (ГОУ ВПО БГМУ Росздрава) (RU)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТА ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к кардиологии, и может быть использовано для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Для этого вводят нитраты, и/или антиагреганты, и/или антигипертензивные, и/или липидкорригирующие препараты. Дополнительно в качестве антиоксиданта вводят густой экстракт травы первоцвета весеннего по 0,1 г 1 раз в сутки в течение 21 дня. Включение в терапевтический комплекс указанного экстракта в специально подобранной дозе и режиме введения повышает эффективность профилактики и лечения данной категории больных. 1 табл.

(56) (продолжение):
вып.3, [найдено на сайте http://www.provisor.com.ua/archive/1999/N3/derimedved.htm]. CYSARZ D. et al. Evaluation of modulations in heart rate variability caused by a composition of herbal extracts. Arzneimittelforschung, 2000 May; 50 (5), p.420-424, abstract.

RU 2353378 C1

RU 2353378 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2539299

НОВОЕ ПРИРОДНОЕ ВЕЩЕСТВО ИЗ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО

Патентообладатель(ли): ***Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2013144706**

Приоритет изобретения **04 октября 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***01 декабря 2014 г.***

Срок действия патента истекает **04 октября 2033 г.**

Врио руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 539 299 (13) C1

(51) МПК
C07D 405/04 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013144706/04, 04.10.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.10.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 04.10.2013

(45) Опубликовано: 20.01.2015 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Budzianowski Jaromir el al,Phytochemistry,2005,66(9),p.1033-1039 (см. прод.)

Адрес для переписки:
450077, г.Уфа-Центр, Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ,
ПАТЕНТНЫЙ ОТДЕЛ

(72) Автор(ы):
ЛАТЫПОВА ГУЗЕЛЬ МИНУЛЛОВНА (RU),
БУБЕНЧИКОВА ВАЛЕНТИНА НИКОЛАЕВНА (RU),
КУРКИН ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ (RU),
КАТАЕВ ВАЛЕРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ (RU),
ИВАНОВА ДИНА ФИРУСОВНА (RU),
САЛИХОВ ШАМИЛЬ МУБАРАКОВИЧ (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(54) НОВОЕ ПРИРОДНОЕ ВЕЩЕСТВО ИЗ ТРАВЫ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО

(57) Реферат:

Изобретение относится к применению 3',4'-метилендиокси-5'-метоксифлавона в качестве специфического маркера для стандартизации надземной части первоцвета весеннего (лекарственного) (Primula veris L., или Primula officinalis (L.) Hill.), что позволяет расширить перечень специфических веществ-маркеров для стандартизации лекарственного растительного сырья. 7 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):
Valant-Vetschera Karin M.,Natural Product Communication,2012,7(11),p.1469-1473 Kosenkova Yu.s. et al,Chemistry of Natural Compounds,2008,44(5),p.564-568 Г.М.Латыпова и др. Известия Самарского научного центра РАН, 2013,т.15,1653-1656 Г.М.Латыпова и др.,Известия Самарского научного центра РАН,2011,т.13,Т5(3) с.64-67 EP 0001261603 B1 16.08.2006

RU 2539299 C1

RU 2539299 C1

Форма № 01 ИЗ-2011

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(РОСПАТЕНТ)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993. Телефон (8-499) 240- 60- 15. Факс (8-495) 531- 63- 18

На № - от -

Наш № 2014114957/15(023446)

При переписке просим ссылаться на номер заявки и сообщить дату получения настоящей корреспонденции
от 12.01.2015

БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ,
Патентный отдел
Ленина, 3
г.Уфа-Центр
450077

РЕШЕНИЕ
о выдаче патента на изобретение

(21) Заявка № 2014114957/15(023446) (22) Дата подачи заявки 15.04.2014

В результате экспертизы заявки на изобретение по существу установлено, что

[X] заявленное изобретение

[ ] заявленная группа изобретений

относится к объектам патентных прав и соответствует условиям патентоспособности, предусмотренным Гражданским кодексом Российской Федерации, в связи с чем принято решение о выдаче патента на изобретение.

Заключение по результатам экспертизы прилагается.

Приложение: на 3 л. в 1 экз.

Врио руководителя Кирий Л.Л.

Форма № 01а

(21) 2014114957/15

(51) МПК
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(57)

Применение густого экстракта травы первоцвета весеннего (Primula veris L.) в качестве гепатозащитного средства.

(56)

Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России, 2006, изд-е 12, Москва, АстраФармСервис, стр.Б-573

RU 2342942, 10.01.2009

JP 2000229870 A, 22.08.2000

При публикации сведений о выдаче патента будут использованы описание в редакции заявителя и реферат, скорректированный экспертизой.

Приложение:

1. Реферат на 1 л. в 1 экз.
2. Сведения об уплате пошлины за регистрацию изобретения, выдачу и поддержание патента на изобретение на 1 л. в 1 экз.

Главный государственный эксперт по интеллектуальной собственности отдела фармацевтики ФИПС

Е. М. Курильченко
8(499)240-55-47

БАШҠОРТОСТАН РЕСПУБЛИКАҺЫ
ҺАУЛЫҠ ҺАҠЛАУ МИНИСТРЛЫҒЫ

«ДАРЫУҘАРҘЫ СЕРТИФИКАТЛАУ ҺӘМ СИФАТЫН ТИКШЕРЕҮ РЕСПУБЛИКА ҮҘӘГЕ» ҺАУЛЫҠ ҺАҠЛАУ ДӘҮЛӘТ БЮДЖЕТ УЧРЕЖДЕНИЕҺЫ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СЕРТИФИКАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

УФК по Респ. Башкортостан (Минфин РБ (ГБУЗ «Лекконтроль» л/с 020112040020)
Отделение НБ Республика Башкортостан г.Уфа р\с 40601810400003000001
БИК 048073001, ИНН 0274064091, КПП 027401001

Батырҙар урамы, 39в, Өфө ҡ-һы, 450106
тел.: (347) 255-45-57
тел./факс: (347) 255-45-03
E-mail: guzlk@ufanet.ru
www.lekkontrol.bashmed.ru

Батырская ул., 39в, г. Уфа, 450106
тел.: (347) 255-45-57
тел./факс: (347) 255-45-03
E-mail: guzlk@ufanet.ru
www.lekkontrol.bashmed.ru

№ 01-60 от « 15 » января 2015 г.

На № ____ от « ___ » _____ 2015 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Латыповой Гузель Минулловны «Экспериментально-теоретическое обоснование рационального использования растений рода *Primula* L. и рода *Humulus* L.» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России в ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» директора Мулюковой Т.Ф., провизора-аналитика Дианова И.С., провизора-аналитика Ерховой Е.И., подтверждает использование материалов диссертационного исследования Латыповой Г.М., посвященного фармакогностическому изучению растений родов первоцвет и хмель при проведении анализа лекарственного растительного сырья первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного. Разработанные методики контроля качественного и количественного состава апробированы в процессе работы предприятия. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ, УФ-спектроскопии в присутствии ГСО рутина и кислоты аскорбиновой. Методики определения подлинности сырья первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного, а также методики количественного определения суммы флавоноидов воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Г.М. Латыповой будут способствовать повышению объективности стандартизации сырья первоцвета весеннего и хмеля обыкновенного.

Члены комиссии:

Директор ГБУЗ «Лекконтроль» Мулюкова Татьяна Фатиховна
Провизор-аналитик ГБУЗ «Лекконтроль» Дианова Ирина Стефановна
Провизор-аналитик ГБУЗ «Лекконтроль» Ерхова Екатерина Игоревна

УТВЕРЖДАЮ
Директор ООО
«Травы Башкирии»
Иванов А.А.
_____
«____»_____2015 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Латыповой Гузель Минулловны «Экспериментально-теоретическое обоснование рационального использования растений рода *Primula* L. и рода *Humulus* L.» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» в работу предприятия ООО «Травы Башкирии»

Комиссия в составе сотрудников ООО «Травы Башкирии» в составе зав. производством ООО «Травы Башкирии» Муратовой Эльвиры Ахатовны, начальника ОКК ООО «Травы Башкирии» Макеевой Натальи Сергеевны, подтверждает использование материалов диссертационного исследования Латыповой Г.М., посвященного фармакогностическому изучению растений рода первоцвет и рода хмель, определению морфолого-анатомических диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного, содержащих флавоноиды, кислоту аскорбиновую. Разработанные методики анализа апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья травы первоцветов и хмеля обыкновенного.

Члены комиссии:

Зав. производством
ООО «Травы Башкирии» Муратова Эльвира Ахатовна

Начальник ОКК
ООО «Травы Башкирии» Макеева Наталья Сергеевна

450095, г. Уфа, ул. Глазовская, д.1/3

У Т В Е Р Ж Д А Ю
Директор
ООО «АгроРесурсы»
_____ С.Л.Дмитриев
« 12 » августа 2013г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Авторы: доцент кафедры послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования ИПО ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, к. фарм. н., Латыпова Г.М.

Объект апробации: Проект ФСП «Хмеля листья».

Источник информации: результаты исследования докторской диссертации

Где и кем проведена апробация: ОКК ООО «АгроРесурсы»

Цель апробации: оптимизация переработки сырья хмеля

Результат апробации: ФСП «Хмеля листья» составлена по требованиям предъявляемой НД. Данный вид сырья будет включен в план развития ООО «АгроРесурсы».

Начальник ОКК
ООО «АгроРесурсы» Т.М.Николаева.

429400, Чувашская Республика, Урмаркский район,
п.г.т. Урмары, ул. Промышленная, д.2

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной работе ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор

_____ В.А. Катаев

«_____» 12.01. 2015 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Латыповой Гузель Минулловны «Экспериментально-теоретическое обоснование рационального использования растений рода *Primula* L. и рода *Humulus* L.» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии: зав. кафедрой, д. фармац. н., профессора Н. В. Кудашкиной, профессора, д. фармац. н. К. А. Пупыкиной, доцента, д. фармац.н. Ю.Г. Афанасьвой, подтверждает использование материалов диссертационного исследования Латыповой Г.М., посвященного расширению отечественной номенклатуры лекарственного растительного сырья с позиции ресурсосберегающих технологий, комплексного использования растений, использования отходов производства, внедрения в медицинскую практику малоизученных видов растений на примере растений родов первоцвет и хмель, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, интернами, аспирантами, а также в научно-исследовательской работе. Результаты фитохимических, морфолого-анатомических исследований способствуют повышению объективности стандартизации лекарственного и пищевого растительного сырья травы первоцветов и листьев хмеля обыкновенного.

Члены комиссии:

Заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д. фармац. н., профессор — Кудашкина Наталья Владимировна

Профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д. фармац.н. — Пупыкина Кира Александровна

Доцента кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д. фармац.н. — Афанасьева Юлия Геннадьевна

Н.В. Кудашкиной

Секретарь ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

подпись

450000, г. Уфа, ул. Ленина, д.3

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе и инновационному развитию ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, доцент

_____ П.В. Ткаченко

«____» _____ 2015 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Латыповой Гузель Минулловны «Экспериментально-теоретическое обоснование рационального использования растений рода *Primula* L. и рода *Humulus* L.» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии и ботаники: зав. кафедрой, д. фармац. н., профессора В.Н. Бубенчикова, доцента, к. фармац. н. Ю.А. Сухомлинов, доцента, к. фармац.н. Н.Ф. Гончаров, подтверждает использование материалов диссертационного исследования Латыповой Г.М., посвященного комплексному фармакогностическому и фармакологическому изучению растений родов первоцвет и хмель как перспективных источников биологически активных веществ, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, интернами, аспирантами, а также в научно-исследовательской работе. Полученные результаты исследования химического состава, фармакологических свойств представителей родов первоцвет и хмель доказывают перспективность введения в отечественную номенклатуру официнального растительного сырья травы первоцветов весеннего и крупночашечного, листьев хмеля обыкновенного, что расширяет отечественную сырьевую базу.

Члены комиссии:

Заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники, д. фармац. н., профессор — Бубенчикова Валентина Николаевна

Доцент кафедры фармакогнозии и ботаники, к. фармац. н., профессор — Сухомлинов Юрий Анатольевич

Доцент кафедры фармакогнозии и ботаники, к. фармац. н., профессор — Гончаров Николай Федорович

305041,г. Курск, ул. К. Маркса, д.3

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной и инновационной работе ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

_____ И.Л. Давыдкин

«_14_» _01_ 2015 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Латыповой Гузель Минулловны «Экспериментально-теоретическое обоснование рационального использования растений рода *Primula* L. и рода *Humulus* L.» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д. фармац. н., профессора В.А. Куркина, профессора, д. фармац. н. Е.В. Авдеевой, доцента, д. фармац.н. О.Е. Правдивцевой, подтверждает использование материалов диссертационного исследования Латыповой Г.М., посвященного расширению номенклатуры лекарственного растительного сырья (ЛРС) для отечественной фармацевтической практики, за счет рационального природопользования на примере представителей родов первоцвет и хмель, а также совершенствованию имеющейся и разработке нормативной документации на новые виды ЛРС, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и интернами в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют расширению сведений о химическом составе, фармакологических свойствах растений родов первоцвет и хмель.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д. фармац. н., профессор Куркин Владимир Александрович

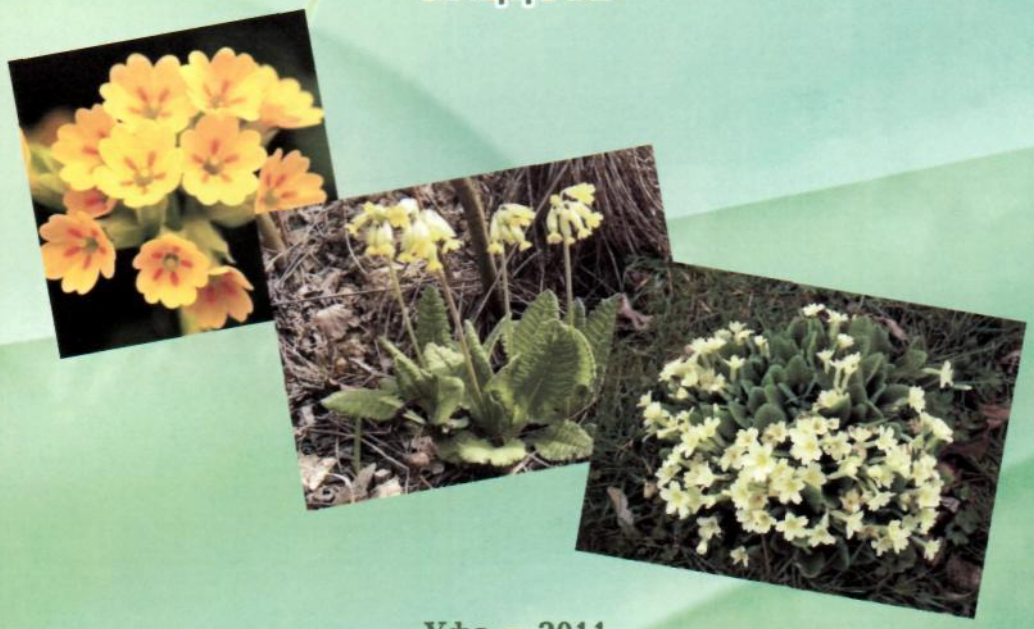
Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д. фармац. н. Авдеева Елена Владимировна

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д. фармац. н. Правдивцева Ольга Евгеньевна

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

Г.М. Латыпова, В.Н. Бубенчикова,
В.А. Катаев, З.Р. Романова

РАСТЕНИЯ РОДА «ПЕРВОЦВЕТ» КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



Уфа – 2011

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ: СОСТАВ И ПРИМЕНЕНИЕ

Уфа – 2008

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РФ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ: СОСТАВ И ПРИМЕНЕНИЕ

Учебное пособие

Рекомендовано УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России

ЗДРАВООХРАНЕНИЕ БАШКОРТОСТАНА
ИЗДАТЕЛЬСТВО
Уфа –2008