

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

На правах рукописи

АЗНАГУЛОВА АНАСТАСИЯ ВИКТОРОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОДУВАНЧИКА
ЛЕКАРСТВЕННОГО (*TARAXACUM OFFICINALE* WIGG.)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

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

Самара - 2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

БАС – биологически активные соединения

ВФС – временная фармакопейная статья

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГСО – государственный стандартный образец

ГФ – Государственная Фармакопея

ДСК – диазобензолсульфокислота

НД – нормативная документация

ЛП – лекарственный препарат

ЛР – лекарственное растение

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

РСО – рабочий стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

ФС – фармакопейная статья

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Оглавление

Введение		7
ГЛАВА 1.	СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ И ПРИМЕНЕНИЯ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	18
1.1.	Одуванчик лекарственный – перспективный источник получения лекарственных препаратов.....	18
1.1.1.	Этимология названия растения и историческая справка...	18
1.1.2.	Ботаническое описание растения.....	19
1.1.3.	Ареал одуванчика лекарственного.....	21
1.1.4.	Лекарственное растительное сырье.....	22
1.1.5.	Заготовка и сушка сырья.....	22
1.1.6.	Внешние признаки сырья.....	23
1.1.7.	Химический состав одуванчика лекарственного и препаратов на его основе.....	24
1.1.8.	Фармакологические свойства препаратов на основе сырья одуванчика лекарственного.....	37
1.2.	Проблемы стандартизации сырья и препаратов одуванчика лекарственного.....	41
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	43
ГЛАВА 2.	ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1.	Объекты исследования.....	44
2.2.	Методы исследования.....	48
2.2.1.	Методики морфолого-анатомического анализа.....	48
2.2.2.	Физические методы анализа.....	49
2.2.3.	Химические методы анализа.....	49
2.2.4.	Хроматографические методы анализа.....	51
2.2.5.	Физико-химические методы анализа.....	52

2.2.6.	Технологические методы.....	54
2.2.7.	Фармакологические методы анализа.....	57
ГЛАВА 3.	МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО И ВОЗМОЖНЫХ ПРИМЕСНЫХ ВИДОВ.....	58
3.1.	Морфолого-анатомические особенности надземной части одуванчика лекарственного.....	59
3.2.	Изучение диагностических признаков измельченного и порошкованного сырья одуванчика лекарственного.....	80
3.3.	Изучение вопросов диагностики примесных видов к одуванчику лекарственному.....	83
3.3.1.	Морфолого-анатомические особенности надземной части одуванчика позднего.....	84
3.3.2.	Морфолого-анатомические особенности надземной части цикория обыкновенного.....	90
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	98
ГЛАВА 4.	ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО.....	100
4.1.	Выделение индивидуальных веществ из надземной части одуванчика лекарственного.....	100
4.2.	Исследование фракций, содержащих важнейшие индивидуальные вещества из надземной части одуванчика лекарственного.....	103
4.2.1.	Физико-химические и спектральные характеристики выделенных индивидуальных веществ.....	104
4.2.2.	Идентификация выделенных веществ.....	106
4.2.3.	Описание структурных особенностей выделенных веществ.....	108
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	112

ГЛАВА 5.	РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО.....	113
5.1.	Разработка методик качественного анализа травы одуванчика лекарственного.....	114
5.1.1.	Тонкослойная хроматография.....	114
5.1.2.	УФ-спектроскопия.....	117
5.2.	Разработка методик количественного определения содержания фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного.....	119
5.3.	Определение динамики накопления фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного.....	125
5.4.	Предварительное фитохимическое исследование одуванчика позднего (<i>Taraxacum serotinum</i>).....	129
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	132
ГЛАВА 6.	ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРАВЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО	133
6.1.	Обоснование состава и способа получения настойки травы одуванчика лекарственного.....	134
6.2.	Стандартизация настойки травы одуванчика лекарственного.....	135
6.2.1.	Качественный анализ настойки травы одуванчика лекарственного.....	135
6.2.2.	Количественное определение содержания фенольных веществ в настойке травы одуванчика лекарственного.....	137
6.2.3.	Числовые показатели настойки травы одуванчика лекарственного.....	139
6.3.	Описание состава и способа получения сиропа одуванчика лекарственного.....	141

6.4.	Стандартизация сиропа одуванчика лекарственного.....	142
6.4.1.	Качественный анализ сиропа одуванчика лекарственного	142
6.4.2.	Количественное определение содержания фенольных веществ в сиропе одуванчика лекарственного.....	144
6.4.3.	Числовые показатели сиропа одуванчика лекарственного	145
6.5.	Изучение влияния разработанных препаратов на выделительную функцию почек.....	147
6.6.	Изучение антимикробных свойств разработанных препаратов.....	149
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.....	154
	ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	155
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	158
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1	
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2	
	ПРИЛОЖЕНИЕ 3	
	ПРИЛОЖЕНИЕ 4	
	ПРИЛОЖЕНИЕ 5	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время в рамках реализации «Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года», а также в рамках реализации «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года» все большую значимость приобретает создание отечественных лекарственных препаратов. Лекарственные препараты на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС) обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими препаратами: более низкий риск развития аллергических реакций, мягкое развитие эффекта, широкое терапевтическое действие, эффективность и безопасность (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2007; Самылина И.А. и др., 2003; 2010).

В этой связи перспективным является использование сырья одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Данное растение широко распространено на территории Российской Федерации, однако в Государственной Фармакопее СССР XI издания в качестве ЛРС описаны лишь корни одуванчика лекарственного. Благодаря наличию в химическом составе горечей корни одуванчика лекарственного используются в качестве средства стимулирующего аппетит, усиливающего секрецию пищеварительных желез. Кроме того, корни одуванчика лекарственного входят в состав желудочных и аппетитных сборов, включены в состав фиточаев.

В тоже время, по нашим оценкам, значительную часть фитомассы растения составляет надземная часть одуванчика лекарственного. Трава одуванчика лекарственного была описана в качестве ЛРС в Российской Фармакопее VII издания, однако в последующие издания данный вид сырья включен не был. Следовательно, в настоящее время большая часть одуванчика лекарственного не находит применения в отечественной медицинской и фармацевтической практике. Использование всей фитомассы одуванчика лекарственного будет способствовать решению проблемы комплексной переработки данного растения в рамках ресурсосберегающих технологий и создаст предпосылки для решения проблемы безотходного использования природных ресурсов. Следовательно, в настоящее

время актуальным является исследование по обоснованию целесообразности применения в медицинской практике наряду с корнями надземной части одуванчика лекарственного.

В зарубежных фармакопеях и в исследованиях зарубежных авторов для надземной части одуванчика лекарственного описаны желчегонный, противовоспалительный, диуретический эффекты.

В зарубежных фармакопеях описаны возможные методики качественного анализа ЛРС и методики количественного определения содержания биологически активных соединений (БАС) в траве одуванчика лекарственного, однако, на наш взгляд, они не лишены недостатков. Так, качественное определение травы одуванчика лекарственного методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) проводится с использованием в качестве стандартов хлорогеновой кислоты и рутина, которые не являются характерными веществами для исследуемого вида сырья. Кроме того, данные стандарты применяются для определения ряда других растений (календулы лекарственной, боярышника, мяты перечной и др.). Количественный анализ БАС в зарубежных фармакопеях предлагается проводить по определению суммы экстрактивных веществ, что не дает представления о содержании конкретных групп действующих веществ.

Таким образом, актуальным является углубленное фармакогностическое изучение надземной части одуванчика лекарственного с целью научного обоснования целесообразности использования в медицинской практике травы данного растения.

Степень разработанности темы. В настоящее время в зарубежных фармакопеях описаны методики стандартизации травы одуванчика лекарственного с использованием метода тонкослойной хроматографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), однако они не лишены ряда недостатков. В западных фармакопеях описаны также морфолого-анатомические признаки цельного и измельченного сырья, однако некоторые диагностические признаки рассмотрены не в полной мере. По вопросам изучения фармакологической активности травы одуванчика лекарственного имеются

исследования советских ученых, подтверждающие наличие желчегонной активности у данного вида ЛРС (Цаль и др., 1991). Зарубежные ученые исследовали также противомикробную, иммуномодулирующую, противоопухолевую активность, влияние извлечений из травы одуванчика лекарственного на работу желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, нервной системы, а также влияние на обмен веществ в организме.

В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют методики стандартизации травы одуванчика лекарственного, а также методики качественного анализа и количественного определения БАС в препаратах на основе данного сырья. Методики, применяемые в зарубежных фармакопеях, не всегда основаны на особенностях химического состава травы одуванчика лекарственного и не являются специфичными. Кроме того, в зарубежных фармакопеях не приведены сравнительные описания сырья одуванчика лекарственного с возможными примесными видами.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование по обоснованию целесообразности использования в медицинской практике различных видов сырья одуванчика лекарственного в качестве источника БАС.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести сравнительное морфолого-анатомическое исследование травы одуванчика лекарственного и возможных примесных видов (одуванчика позднего, цикория обыкновенного).
2. Провести фитохимическое исследование травы одуванчика лекарственного.
3. Изучить динамику накопления БАС фенольной природы в надземной части одуванчика лекарственного.
4. Изучить химический состав надземной части одуванчика лекарственного, произрастающего в различных регионах Российской Федерации.

5. Разработать методики качественного анализа травы одуванчика лекарственного.
6. Разработать методики количественного определения содержания БАС фенольной природы в траве одуванчика лекарственного.
7. Обосновать состав и технологию приготовления лекарственных препаратов на основе травы одуванчика лекарственного («Одуванчика лекарственного травы настойка»; «Одуванчика лекарственного травы сироп»).
8. Разработать методики качественного анализа и количественного определения БАС в лекарственных препаратах на основе травы одуванчика лекарственного («Одуванчика лекарственного травы настойка»; «Одуванчика лекарственного травы сироп»).
9. Определить показатели качества разработанных лекарственных препаратов («Одуванчика лекарственного травы настойка»; «Одуванчика лекарственного травы сироп»).
10. Провести скрининговый анализ специфической фармакологической и антимикробной активности разработанных препаратов.
11. Разработать проект фармакопейной статьи (ФС) на новый вид лекарственного растительного сырья – траву одуванчика лекарственного.

Научная новизна. Выявлены диагностические признаки, характерные для данного вида сырья (очертания поперечных срезов листовой пластинки и цветоноса, количество и особенности строения проводящих пучков, характер залегания млечников, особенности цитологии и локализации арматурных тканей, форма и размеры эпидермальных клеток, характер опушения листовой пластинки и цветоносов) и отличительные особенности травы одуванчика лекарственного, позволяющие отделять целевое сырье от примесных растений.

Впервые выделены из надземной части одуванчика лекарственного в виде индивидуальных соединений фенилпропанойд кафтаровая кислота (2¹-кофеилвинная кислота) и флавоноид трицин (5,7,4¹-тригидрокси-3¹,5¹-диметоксифлавонон). Впервые в Российской Федерации в виде индивидуальных соединений из травы одуванчика лекарственного выделены известные для

одуванчика лекарственного соединения - кофейная кислота, хлорогеновая кислота, лютеолин (5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавоноид), 7-О-рамнозилглюкозид лютеолина, цинарозид (7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавоноид) и тритерпеновый сапонин тараксастерин.

Разработаны и научно обоснованы подходы к стандартизации нового вида ЛРС «Одуванчика лекарственного травы».

Усовершенствованы методики анализа сырья, основанные на определении действующих веществ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и УФ-спектроскопии.

Разработаны методики определения суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Методики анализа адаптированы для лекарственных препаратов травы одуванчика лекарственного, что отвечает принципам унификации, предъявляемым к современному фармацевтическому анализу (Самылина И.А. и др. 1994; 2006).

Обоснована целесообразность применения надземной части наряду с корнями в рамках комплексного использования данного растения.

Разработан состав и способ получения лекарственных препаратов на основе травы одуванчика лекарственного - «Одуванчика лекарственного травы настойки» и «Одуванчика лекарственного травы сиропа», для которых доказано наличие диуретического эффекта.

Получен патент РФ № 2577713 «Сироп одуванчика лекарственного» (заявка 2014133928 от 18.08.2014). Решение о выдаче патента 25.12.2015 г.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработан и направлен в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» с целью включения в дополнения к Государственной Фармакопее Российской Федерации XIII издания проект ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Одуванчика лекарственного трава».

Обосновано применение для стандартизации исследуемого вида сырья усовершенствованных методик качественного анализа методом ТСХ и

спектроскопии, а также методики количественного определения содержания БАС фенольной природы в образцах сырья.

Разработаны состав и способ получения лекарственных препаратов «Одуванчика лекарственного травы настойка» и «Одуванчика лекарственного травы сироп». Определены показатели качества данных препаратов.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования основана на изучении и систематизации литературных данных по фармакогностическому исследованию одуванчика лекарственного, на оценке степени разработанности и актуальности данной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами исследования стали образцы сырья одуванчика лекарственного, собранные на территории Российской Федерации в различные периоды вегетации, образцы сырья возможных примесных растений (одуванчика позднего, цикория обыкновенного), а также препараты, полученные из надземной части одуванчика лекарственного. Исследования проводили с использованием цифровой микроскопии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. Также в работе использовались различные пробирочные и гистохимические реакции на отдельные группы БАС. Математическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ по методике, описанной в ГФ РФ XIII издания.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическом планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России (№ Гос. регистрации 01200900568 до 28.04.2015; с 28.04.2015 № Гос. регистрации 115042810034; наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты морфолого-анатомических исследований различных органов одуванчика лекарственного и возможных примесных видов.
2. Результаты фитохимического исследования травы одуванчика лекарственного.
3. Результаты исследований по разработке методик качественного анализа травы одуванчика лекарственного.
4. Результаты исследований по разработке методик количественного определения содержания фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного.
5. Результаты исследований по разработке способов получения лекарственных препаратов на основе травы одуванчика лекарственного («Одуванчика лекарственного травы настойки», «Одуванчика лекарственного травы сиропа»).
6. Результаты исследований по стандартизации лекарственных препаратов на основе травы одуванчика лекарственного и разработке методик их качественного и количественного анализа.
7. Данные по изучению показателей качества разработанных лекарственных препаратов – «Одуванчика лекарственного травы настойки», «Одуванчика лекарственного травы сиропа».
8. Результаты исследования специфической фармакологической активности разработанных препаратов на основе травы одуванчика лекарственного.

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

Апробация работы. Материалы работы доложены и обсуждены на Межуниверситетских осенних инновационных чтениях У.М.Н.И.К.-2013 (г. Самара, 2013), на III и IV научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения

в медицине» (г. Москва, 2015; 2016); на конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения «Молодые ученые - медицине» (г. Самара, 2013; 2014; 2015); на IX годичной научно-практической конференции молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием (г. Душанбе, 2014); на IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2014); на XIV международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Студенческая медицинская наука XXI века» (г. Витебск, 2014); на VIII Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы использования и охраны природных ресурсов России» (г. Самара, 2014); на научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука: достижения, инновации и перспективы» (г. Пермь, 2015).

Выполнение фрагментов диссертационного исследования осуществлялось по линии программы «Участник Молодежного Научно-Инновационного Конкурса - 2013» («У.М.Н.И.К.»).

Публикации. Основное содержание работы опубликовано в 15 печатных работах, из них 5 статей в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень рецензируемых научных изданий. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Внедрение результатов исследования. Полученные в результате диссертационных исследований данные используются в учебном процессе на кафедрах: фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии; фармацевтической технологии; химии фармацевтического факультета; управления и экономики фармации Самарского государственного медицинского университета; в работе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» и ЗАО «Самаралектравы».

Личный вклад автора. Все приведенные экспериментальные результаты получены самим автором. Автором выполнены исследования по изучению морфологических и анатомо-гистологических особенностей строения различных органов одуванчика лекарственного, выявлены их диагностические признаки.

Изучен химический состав травы одуванчика лекарственного, выявлена химическая структура компонентов, выделенных из сырья в индивидуальном виде. Разработаны методики анализа травы одуванчика лекарственного. Определена динамика накопления БАС фенольной природы в траве одуванчика лекарственного в период вегетации. Разработаны состав и технология получения препаратов – «Одуванчика лекарственного травы настойки» и «Одуванчика лекарственного травы сиропа». Для разработанных препаратов определена фармакологическая и антимикробная активность. Автором предложены методики качественного и количественного анализа препаратов методом ТСХ и УФ-спектроскопии. Автором разработан проект ФС «Одуванчика лекарственного трава».

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

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 174 страницах машинописного текста, полученные данные проиллюстрированы 61 рисунком и изложены в форме 16 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4 глав, в которых

описаны результаты собственных исследований и их обсуждение, общих выводов и списка литературы, состоящего из 163 источников, из которых 46 - на иностранных языках.

Во введении описана актуальность темы исследования, сформулирована цель и задачи, определена научная новизна и практическая значимость проводимого исследования, приведены основные положения, выносимые на защиту, изложены сведения об апробации работы и публикациях.

Глава 1 содержит обзор отечественной и зарубежной литературы по состоянию исследований ЛРС одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). В данной главе приведены имеющиеся сведения по химическому составу различных морфологических органов одуванчика лекарственного, по применению данного сырья в официальной и народной медицине. Описаны подходы к стандартизации сырья одуванчика лекарственного, применяемые в Российской Федерации и за рубежом.

В главе 2 описаны объекты и методы исследования. Представлены методики идентификации и количественного определения содержания БАС в траве одуванчика лекарственного, а также в препаратах на ее основе.

Глава 3 посвящена морфолого-анатомическому анализу надземной части одуванчика лекарственного, а также сравнительному морфологическому и анатомо-гистологическому исследованию травы одуванчика лекарственного и возможных примесных видов (травы одуванчика позднего, травы цикория обыкновенного).

Глава 4 посвящена описанию результатов фитохимических исследований травы одуванчика лекарственного. Приведены результаты выделения индивидуальных БАС из надземной части одуванчика лекарственного, установление их структуры.

В главе 5 приводятся результаты по разработке методик качественного анализа сырья одуванчика лекарственного, по разработке методик количественного определения содержания БАС в сырье одуванчика лекарственного, результаты определения динамики накопления БАС в траве

одуванчика лекарственного, а также предварительный фитохимический анализ возможного примесного вида сырья – травы одуванчика позднего.

Глава 6 посвящена описанию разработки состава и способа стандартизации лекарственных препаратов на основе травы одуванчика лекарственного, а также исследованиям по оценке специфической фармакологической активности разработанных препаратов травы одуванчика лекарственного.

Диссертация завершается общими выводами и списком литературы.

В приложениях представлены фотографии микропрепаратов травы одуванчика позднего и цикория обыкновенного, сравнительные таблицы морфолого-анатомических признаков травы одуванчика лекарственного и возможных примесных видов, акты внедрения, проект фармакопейной статьи «Одуванчика лекарственного трава», патент РФ № 2577713 «Сироп одуванчика лекарственного».

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ И ПРИМЕНЕНИЯ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Одуванчик лекарственный – перспективный источник получения лекарственных препаратов

1.1.1. Этимология названия растения и историческая справка

Об истории происхождения латинского наименования рода Одуванчик – *Taraxacum* – нет единого мнения. Впервые оно встречается в трудах ученых XVI века Фухса и Геснера и, по одной из версий, происходит от арабского «*tarachacum*» - название одного из видов цикория, согласно другой, от греческого «*taraxis*» - болезнь глаз и «*akeomai*» - лечить [52, 77, 88, 156]. В переводе с греческого родовое наименование *Taraxacum* означает «лекарство от болезней» [163]. Также имеется версия о происхождении термина *Taraxacum* от греческого «*tarassein*» - успокаивать [52, 77, 88]. Видовое название происходит от латинского «*officinalis*» - аптечный [52, 57, 77, 88, 156].

Русское название «одуванчик» произошло из-за легкости, с которой созревшие семянки на летучках отрываются от цветоложа и разлетаются при дуновении воздуха [57, 63]. Оставшееся голым цветоложе напоминает плешивую голову – в России с этим связаны такие названия, как пустодуй, плешивец, пушник, а в средние века одуванчик называли *Caput monachi* – монашеская голова [52, 57, 77, 88].

Еще одна группа названий обусловлена млечным соком, содержащимся во всех частях растения (например, молочай, *mlecz* (от польского – «молоко»), *mælkebøtte* (от датского - "молочный горшок"), *kutyatej* (от венгерского - "молоко собаки"), маслчак (от сербского «маслац» - масло) и др.) [52, 57, 77].

Английское название – *dandelion* – может быть дословно переведено, как «зуб льва», что относится к глубоким зубцам по краю листа одуванчика [156,

163]. Сходное название имеет одуванчик и в других языках индо-европейской языковой группы: в немецком языке (*Loewenzahn*), в испанском языке (*diente de lion*) [163]. В современном английском и французском языке есть названия, которые указывают на диуретический эффект данного растения [163]. На македонском языке одуванчик носит название «глуварче», которое происходит от слова «глухой», из-за традиционной веры в то, что если парашютик одуванчика входит в Ваше ухо, Вы могли бы стать глухими [52, 77].

1.1.2. Ботаническое описание растения

Одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.) – многолетнее травянистое растение. В высоту одуванчик может достигать 5-50 см, корень более или менее толстый, обычно вертикальный, от 15 до 30 см в длину (встречаются экземпляры от 60 до 100 см), корневая шейка более или менее шерстистая, реже голая [57, 65, 69, 112, 115, 156].

Листья одуванчика лекарственного от светло-зеленого до темно-зеленого цвета, у основания собраны в прикорневую розетку [65, 69, 112]. В длину листья составляют от 10 до 25 см и от 1,5 до 5 см в ширину. По форме - струговидно-перистораздельные или перистолопастные, с более или менее вниз отклоненными, часто зубчатыми по краю боковыми долями и более крупной конечной долей, реже цельные, по краю выемчато-зубчатые, от рассеянно волосистых до совершенно голых [69, 88, 112, 156].

Цветочные стрелки одуванчика лекарственного составляют от 5 до 40 см в длину, их поверхность покрыта более или менее обильным паутинистым войлочком [57, 69, 112]. На верхушке цветоноса развивается соцветие - корзинка, на которой могут располагаться от 140 до 400 желтых цветков [57, 69, 112, 156]. Цветки в 1,5-2,5 раза длиннее обертки, с обильно- и длинноволосистыми в средней части венчиками. На нижней стороне язычков краевых цветков обычно заметны темные полосы. В цветках одуванчика лекарственного обнаруживается 5 тычинок с характерным строением пыльников (при основании они

короткостреловидные, на верхушке с туповатыми треугольными придатками). Цветки одуванчика образуют нижнюю завязь (рис.1) [57, 69, 88, 112, 156].

В нижней части соцветия расположена зеленая обертка 13-20 мм в длину. Наружные листочки ее от широколанцетных до ланцетно-линейных, более или менее отвернутые вниз, почти равные по ширине внутренним листочкам или немного более широкие, по краю без перепончатой каймы или с очень узкой перепончатой каймой, без рожков. Внутренние листочки продолговато-линейные, в 1,5 или меньше чем в 1,5 раза длиннее самых длинных наружных листочков, без рожков, редко с неясными рожками [57, 69, 88, 112, 156].



Рисунок 1 – Одуванчик лекарственный – *Taraxacum officinale* Wigg., сем. Сложноцветные – *Compositae* (фото автора)

Плоды одуванчика лекарственного – семянки, светло-бурого или буроватого цвета; расширенная часть их составляет 3-4 мм в длину, в верхней половине покрытая острыми бугорками; пирамидка 0,4-0,6 мм в длину; носик 7-12 мм в длину; хохолок 6-8 мм в длину, белый [57, 69, 112, 156].

1.1.3. Ареал одуванчика лекарственного

Одуванчик лекарственный – широко распространенный вид, с евро-азиатским ареалом; как заносный известен в Северной и Южной Америке, Австралии и Южной Африке [40, 57, 69, 88, 112, 156]. На территории бывшего СССР встречается повсеместно, исключая тундровые, гольцовые и пустынные районы, а именно, в европейской части, на Кавказе, в Западной и Центральной Сибири, в Средней Азии. На севере ареал достигает берегов Белого моря и по широте Полярного круга доходит до Западной Сибири, восточнее смещается к югу – до Байкала и реки Шилка [3, 129]. На Кавказе встречается повсеместно, кроме полупустынных районов Азербайджана, в Казахстане – в северных районах и горах на востоке республики. Как заносное растение одуванчик известен в некоторых пунктах Дальнего Востока (рис. 2).

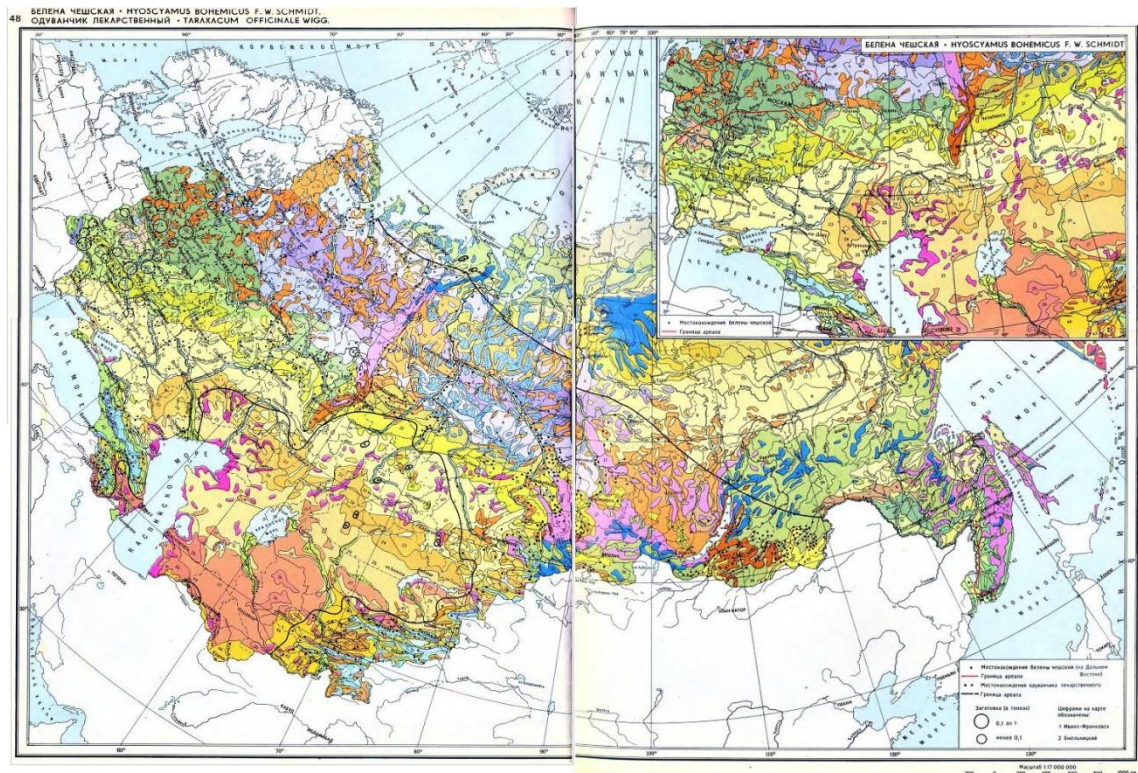


Рисунок 2 – Ареал одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) [3]

Одуванчик лекарственный произрастает в основном около жилья, вдоль дорог, на залежах, а также как сорное в садах, парках, огородах и на полях.

Несколько реже встречается на лесных полянах, вырубках, просеках, обычно на богатых, хорошо увлажненных почвах. Данное растение легко приспосабливается к условиям среды, благополучно выживает, перенося вытаптывание и выпас, а в нарушенных местообитаниях часто образует заросли [40, 57, 63, 65, 69, 88, 112, 156].

1.1.4. Лекарственное растительное сырье

В Российской Федерации в качестве лекарственного сырья используют корни одуванчика лекарственного [26, 28, 29]. Корни одуванчика лекарственного используются в качестве лекарственного средства в Республике Беларусь, Республике Казахстан и других странах [20, 21, 45]. Кроме того, за рубежом официальным сырьем являются трава, листья, трава с корнями одуванчика лекарственного (Американская травяная фармакопея, 2008; Европейская фармакопея 6.6; Немецкая гомеопатическая фармакопея; Французская гомеопатическая фармакопея) [45, 120, 131, 132, 156]. По литературным данным известно, что в мировой практике находят применение различные виды одуванчика. Так, например, в Китайской Фармакопее в качестве лекарственного растительного сырья описана смесь травы одуванчика монгольского (*Taraxacum mongolicum* Hand. –Mazz.), одуванчика китайского (*Taraxacum sinicum* Kitag.) и других видов рода одуванчик [142, 143, 148, 150, 156]. В отечественной медицинской практике используется только один вид – одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.) [26, 29, 70].

Таким образом, перспективным представляется комплексное фармакогностическое исследование травы одуванчика лекарственного с целью создания нормативного документа (ФС), регламентирующего качество данного вида сырья [50, 102].

1.1.5. Заготовка и сушка сырья

В Российской Федерации лекарственным растительным сырьем являются корни одуванчика лекарственного [26, 57, 64, 75, 88, 98]. Сбор проводят весной в

начале роста растения (апрель – начало мая) или осенью (сентябрь - октябрь). Корни одуванчика выкапывают лопатой или подпахивают плугом на глубину 15-25 см. На рыхлых почвах корень значительно толще, чем на плотных. Заготовку на одном и том же месте проводят не чаще, чем 1 раз в 2-3 года. Категорически запрещается заготовка данного ЛРС вблизи железнодорожных путей, шоссейных магистралей и в непосредственной близости от линий электропередач [57, 88, 98].

Выкопанные корни одуванчика отряхивают от земли, обрезают надземные части, корневище («шейку») и тонкие боковые корни и сразу моют под проточной холодной водой. Подвяливают на открытом воздухе в течение нескольких дней (до прекращения выделения млечного сока при надрезании); сушат на чердаках под железной крышей или под навесом с хорошей вентиляцией, разложив тонким слоем (3-5 см) с периодическим перемешиванием. Возможна сушка в печах или сушильных шкафах при 40-50°C [57, 88, 98].

1.1.6. Внешние признаки сырья

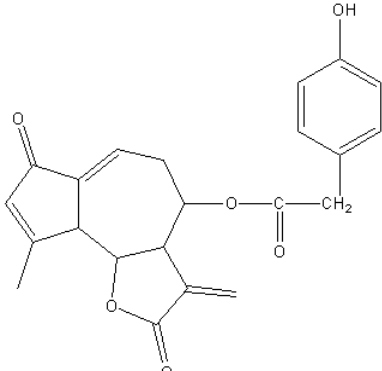
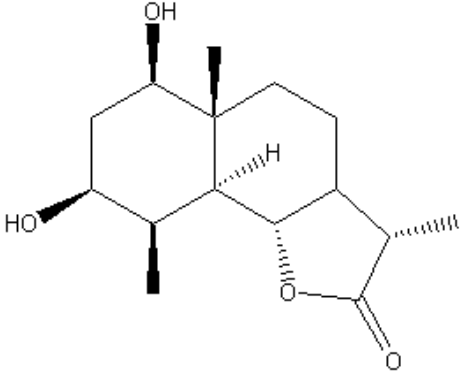
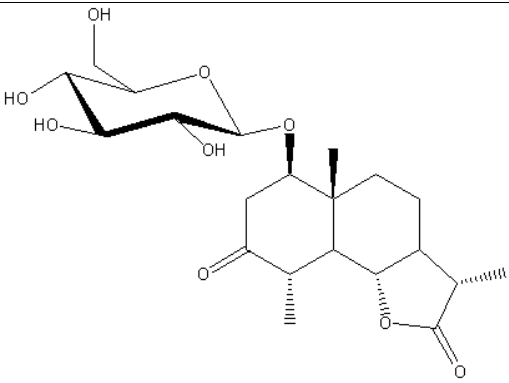
Корни одуванчика лекарственного должны удовлетворять следующим требованиям по внешнему виду: цельные или изломанные, плотные, стержневые или маловетвистые, со срезанной корневой шейкой [17, 20, 26, 27, 53, 57, 64, 98, 120]. Корни одуванчика лекарственного продольно-морщинистые, иногда спирально перекрученные. На изломе заметна небольшая желтая или желтовато-бурая древесина, окруженная серовато-белой внутренней корой, в которой видны буроватые концентрические тонкие кольца [26, 53, 57, 119]. Длина корней в сырье обычно составляет до 12 см, толщина у тонкого конца – от 3 мм. Снаружи корни одуванчика бурые или темно-бурые, внутри на изломе – серовато-белые или чисто-белые с желтой или желтовато-бурой древесиной в центре. Запах отсутствует, вкус – горьковатый со сладковатым привкусом [17, 27, 57]. Корни упаковывают в тюки из ткани или льно-джутно-кенафные мешки. Хранить корни одуванчика необходимо в сухом, хорошо проветриваемом помещении. [17, 26, 27, 151, 156].

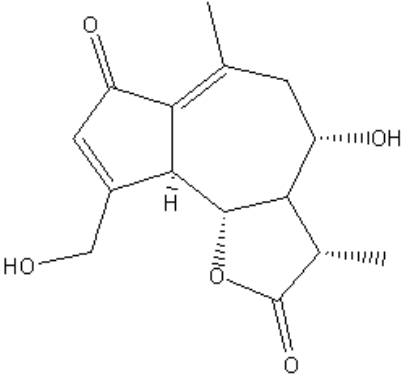
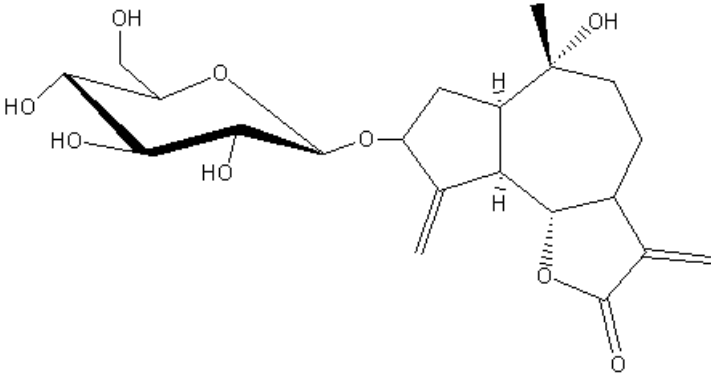
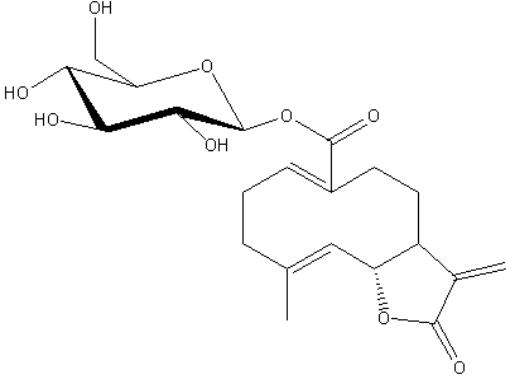
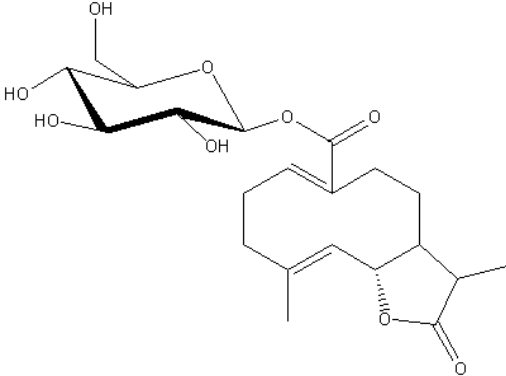
Воздушно-сухие листья одуванчика мятые, изломанные или цельные. Цельные листья обратноланцетовидные. Сырье зеленовато-коричневое или темно-серое. Верхушка листовой пластинки заостренная или тупая, края листовой пластинки лопастные или перисто-надрезанные [120, 131, 150, 151]. Листовая пластинка сужается книзу, центральная жилка сильнее выражена на нижней стороне листа. Один или более цветоносов, каждый из которых оканчивается соцветием – корзинкой. Листочки обертки расположены в несколько слоев, внутренний слой намного длиннее внешнего. Из цветков образуются семянки с белыми летучками [120, 131, 150, 151].

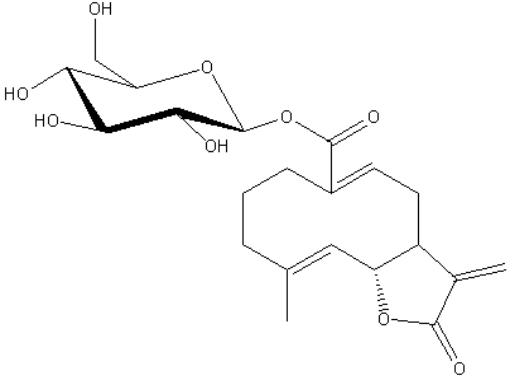
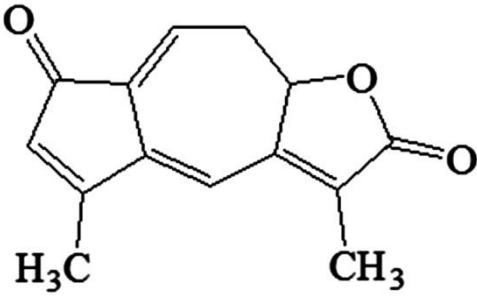
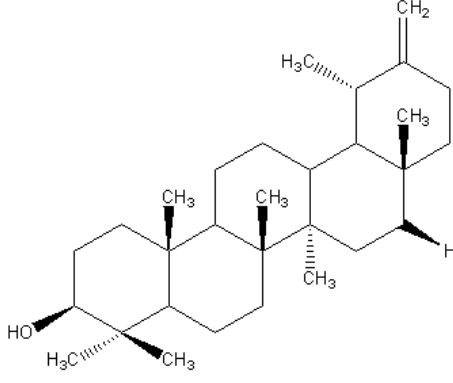
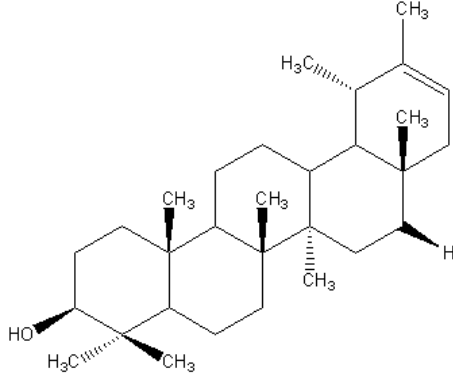
1.1.7. Химический состав и фармакологические свойства одуванчика лекарственного и препаратов на его основе

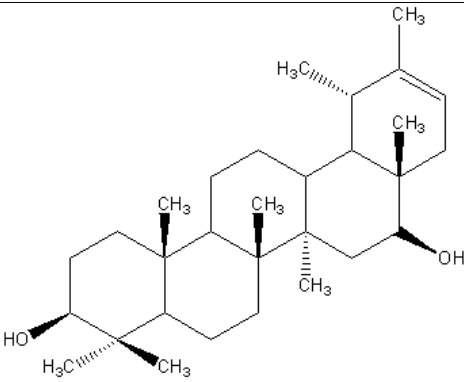
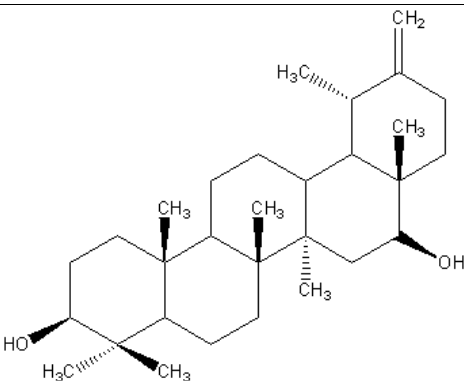
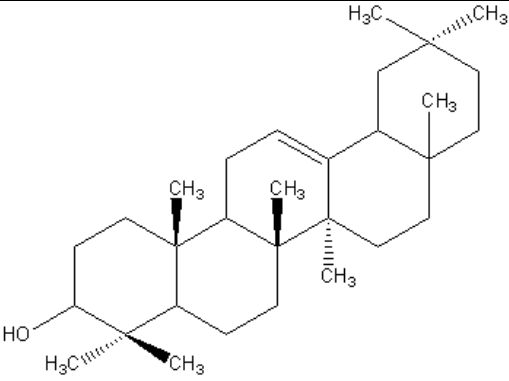
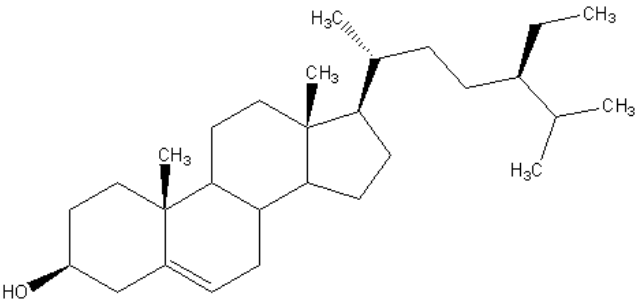
В корнях одуванчика лекарственного содержатся горькие вещества, которые по химической структуре относятся к сесквитерпенам (эудесманолиды тетрагидроридентин В и тараксолид-*O*- β -глюкопиранозид; гвайянолиды 11 β , 13-дигидролактучин, иксерин D, лактукопикрин; гермакранолидовые эфиры β -глюкопиранозид тараксиновой кислоты, глюкозид 11,13-дигидротараксиновой кислоты, аинслиозид), а также горькие гликозиды - тараксацин и тараксацерин [15, 53, 57, 86, 107, 139, 156, 163]. Кроме того, в корнях одуванчика лекарственного содержатся тритерпеновые соединения тараксерол, тараксол, тараксастерол, фарадиол, арнидиол и др. (табл. 1). Корни данного растения богаты инулином, накопление его проходит в течение вегетационного периода: весной содержание составляет около 2%, а осенью может достигать 40% [53, 57, 66, 105, 116, 156, 163]. Из корней одуванчика были выделены стерины (стигмастерол, β -ситостерол). В корнях также содержатся моносахариды (фруктоза, глюкоза и др.), каучук, жирное масло, дубильные вещества, органические кислоты, смолы, слизи, белковые вещества [15, 53, 57, 66, 86, 88, 107, 113, 114, 116, 119, 127, 136]. В подземной части одуванчика также обнаруживается ряд витаминов, таких как ретинол, рибофлавин, аскорбиновая кислота, каротин и др. (табл. 1) [15, 53, 57, 86, 88, 113, 114, 127, 136].

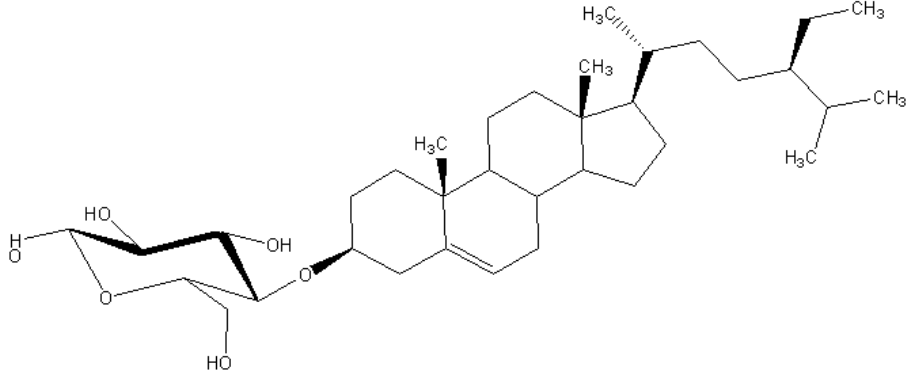
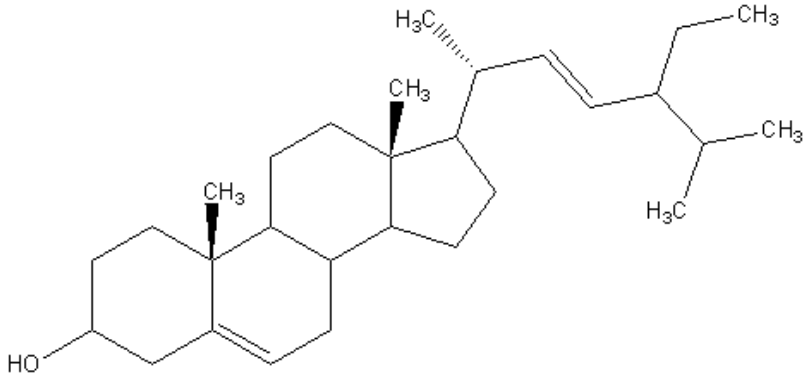
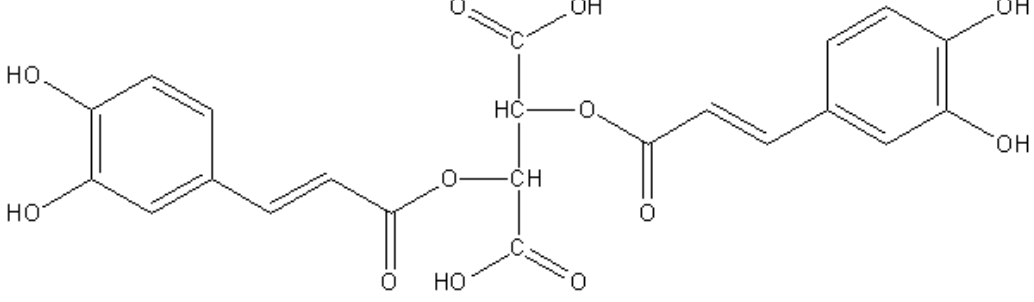
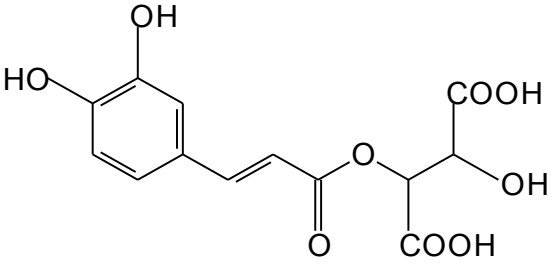
Химический состав корней одуванчика лекарственного

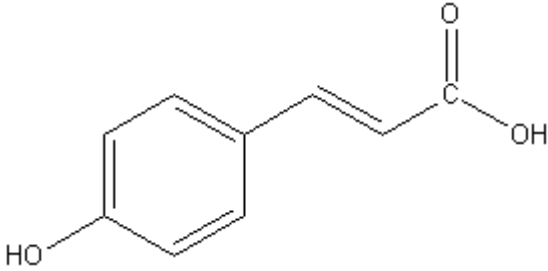
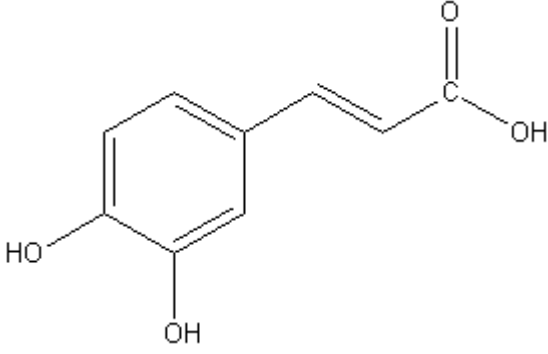
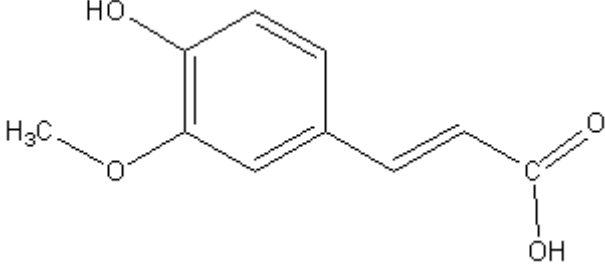
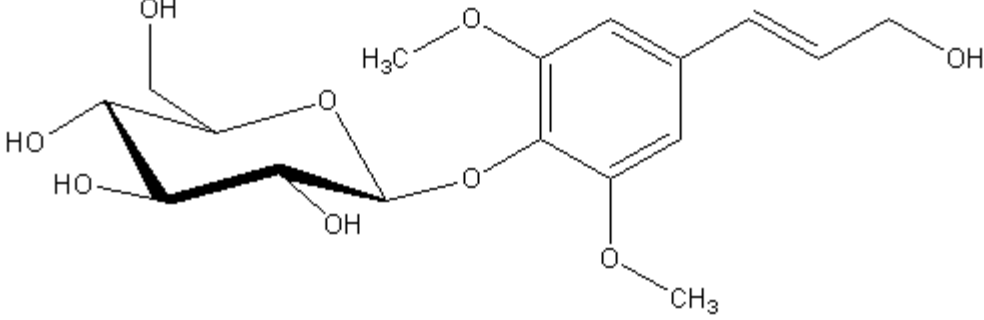
Биологически активные соединения	Литературный источник
Горькие вещества сесквитерпеновой природы	
 <p data-bbox="678 963 933 996">Лактукопикрин</p>	53, 57, 163
 <p data-bbox="614 1422 989 1456">Тетрагидроридентин В</p>	53, 139, 156
 <p data-bbox="534 1892 1077 1926">Тараксолид-<i>O</i>-β-глюкопиранозид</p>	53, 139, 156, 163

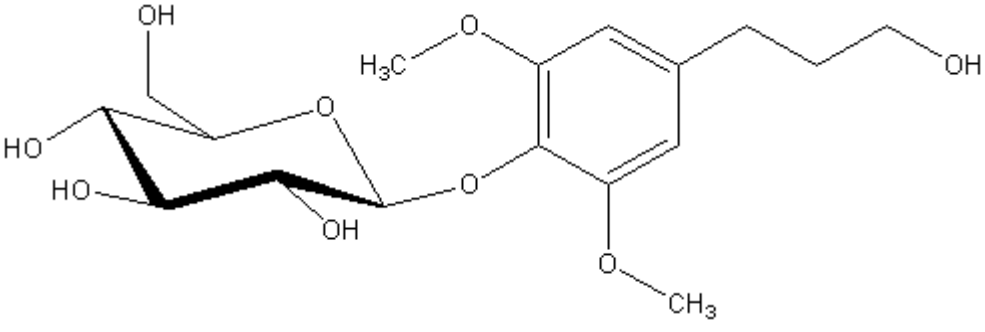
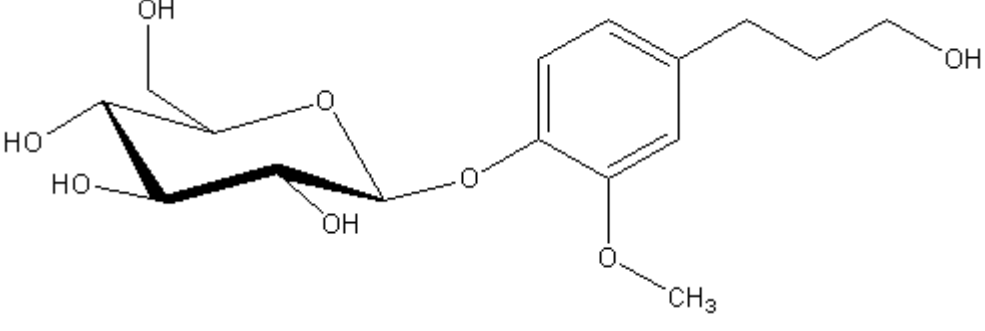
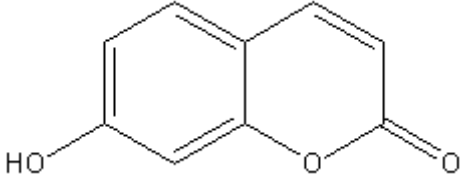
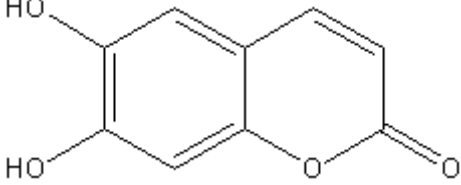
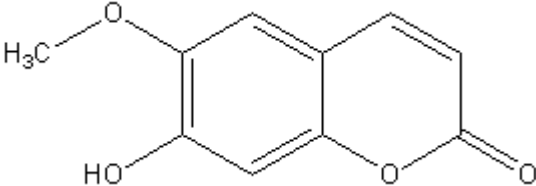
 <p>11β, 13-дигидролактучин</p>	139, 156
 <p>Иксерин D</p>	139, 156, 163
 <p>β-глюкопиранозид тараксиновой кислоты</p>	139, 156
 <p>Глюкозид 11,13-дигидротараксиновой кислоты</p>	53, 139, 156

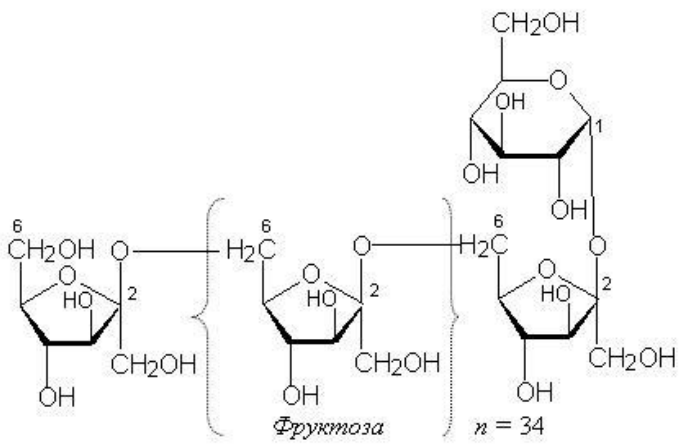
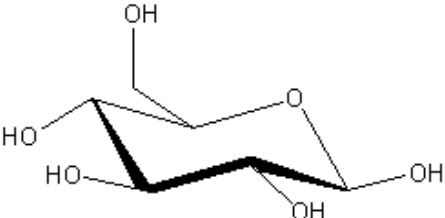
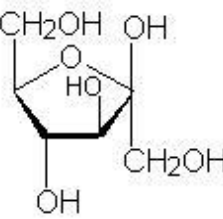
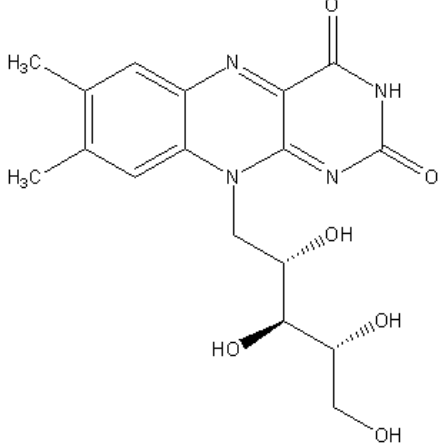
 <p style="text-align: center;">Аинслиозид</p>	139, 156
 <p style="text-align: center;">Тараксацин</p>	53, 163
Тритерпеновые соединения	
 <p style="text-align: center;">Тараксастерол</p>	156, 163
 <p style="text-align: center;">Ψ-тараксастерол</p>	156

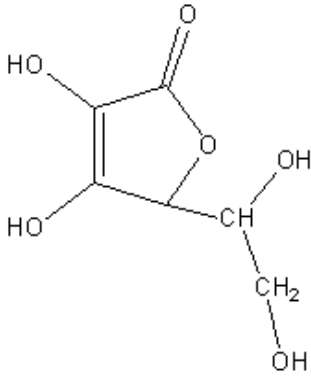
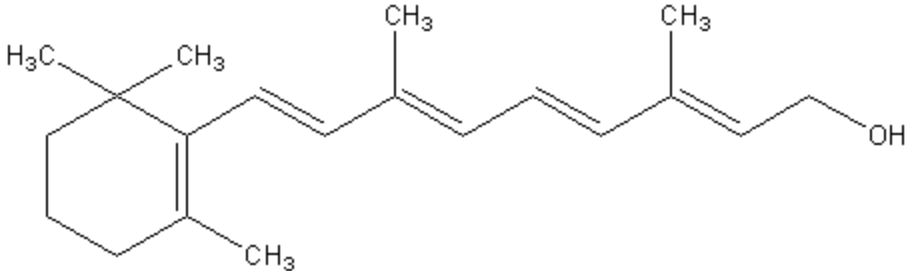
 <p style="text-align: center;">Фарадиол</p>	53, 156
 <p style="text-align: center;">Арнидиол</p>	53, 156
 <p style="text-align: center;">β – амирин</p>	53, 156
Стерины	
 <p style="text-align: center;">β-ситостерол</p>	156

 <p style="text-align: center;">β-ситостерол-β-D-глюкопиранозид (даукостерин)</p>	156
 <p style="text-align: center;">Стигмастерол</p>	156
Фенилпропаноиды	
 <p style="text-align: center;">Цикориевая кислота</p>	127, 156
 <p style="text-align: center;">Монокатеоилвинная кислота</p>	149, 156, 163

 <p><i>p</i>-Кумаровая кислота</p>	156
 <p>Кофейная кислота</p>	127, 156, 163
 <p>Феруловая кислота</p>	156
 <p>Сирингин</p>	139

 <p style="text-align: center;">Дигидросирингин</p>	139
 <p style="text-align: center;">Дигидрокониферин</p>	139
Кумарины	
 <p style="text-align: center;">Умбеллиферон</p>	53, 156
 <p style="text-align: center;">Эскулетин</p>	53, 156
 <p style="text-align: center;">Скополетин</p>	156

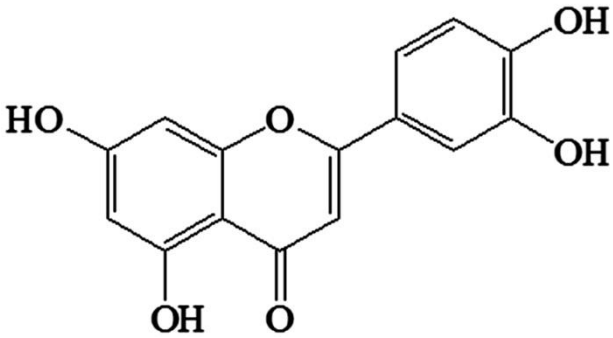
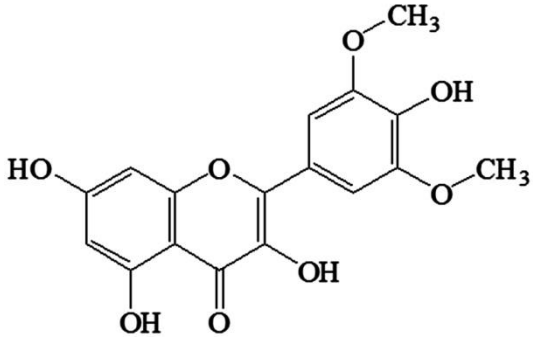
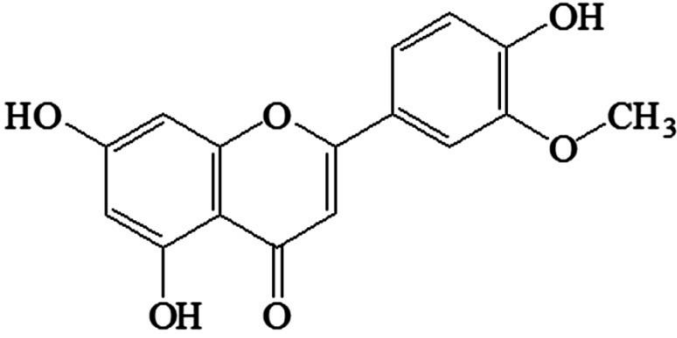
Углеводы	
 <p style="text-align: center;">Инулин</p>	53, 66, 155, 105, 156, 163
 <p style="text-align: center;">Глюкоза</p>	53, 66, 156
 <p style="text-align: center;">Фруктоза</p>	53, 66, 156
Витамины	
 <p style="text-align: center;">Рибофлавин</p>	156

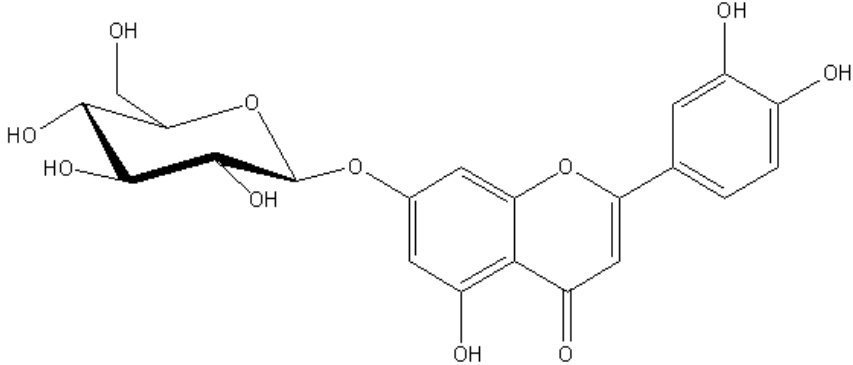
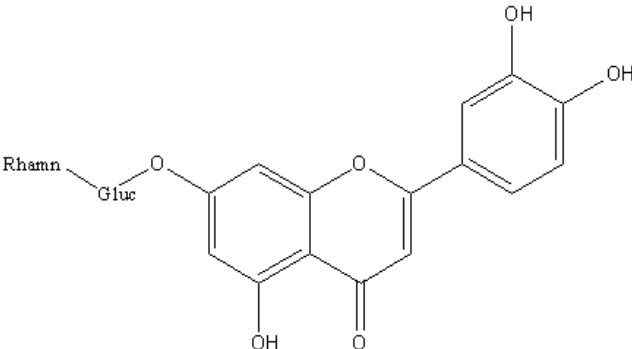
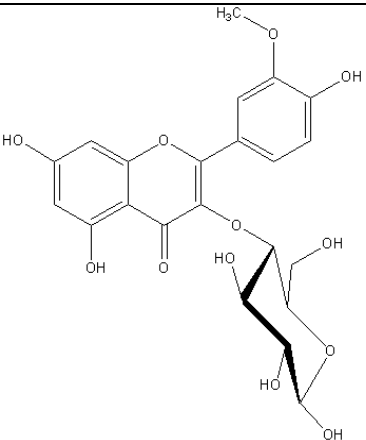
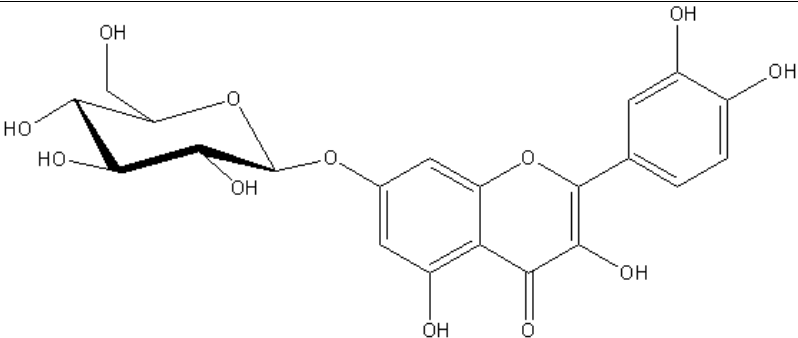
 <p style="text-align: center;">Аскорбиновая кислота</p>	156
 <p style="text-align: center;">Ретинол</p>	156

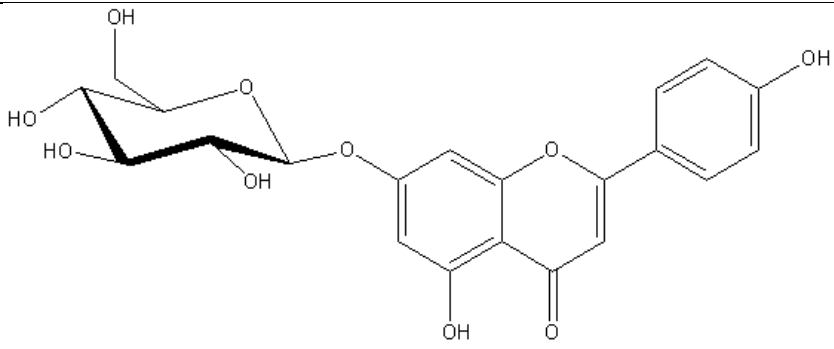
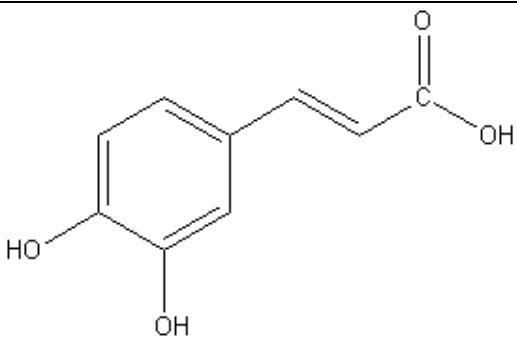
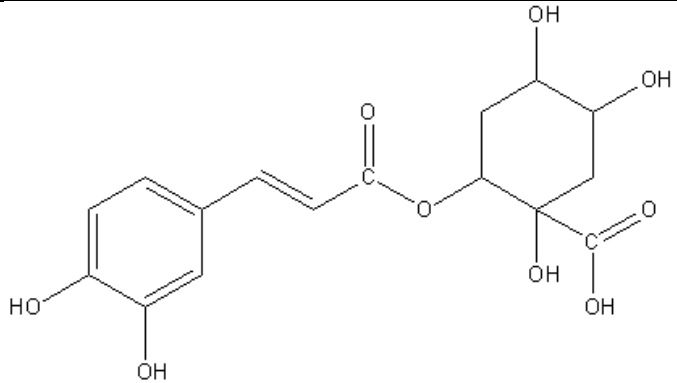
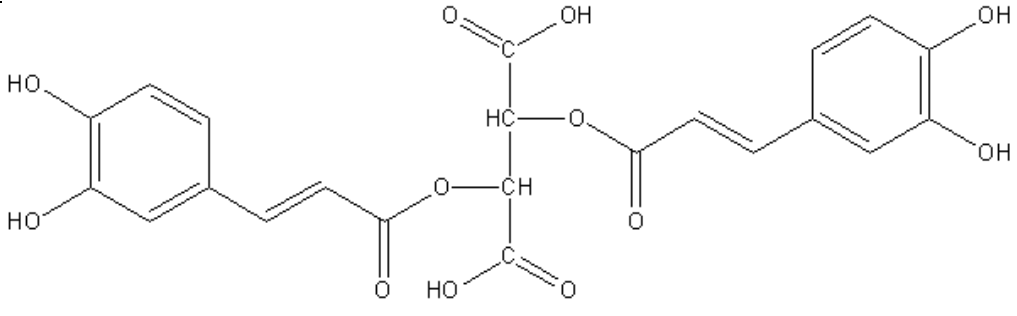
В корнях одуванчика лекарственного накапливаются эссенциальные и токсичные элементы [6, 30, 84, 110]. Вероятно, их соотношение зависит от минерального состава почв, а также от уровня антропогенного загрязнения в конкретном районе произрастания. В наибольшем количестве корни одуванчика накапливают фосфор и алюминий, в наименьшем – серебро и кадмий [6, 30, 84].

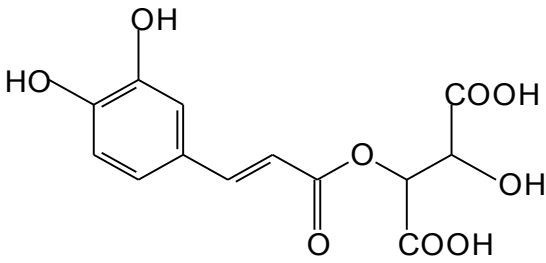
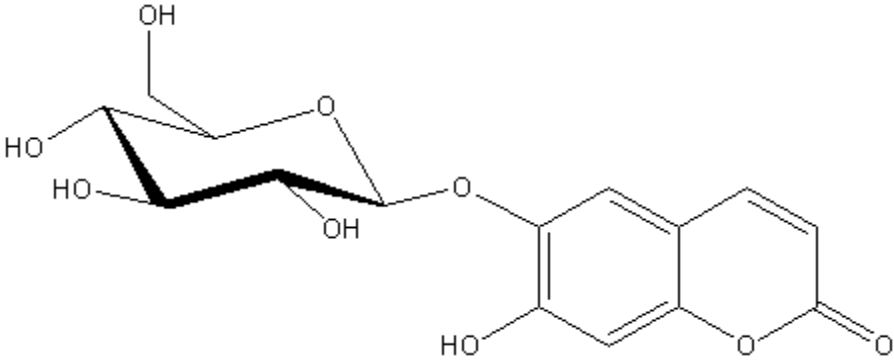
В надземной части (в соцветиях и листьях) содержатся каротиноиды (тараксантин, флавоксантин), флавоноиды (лютеин), тритерпеновые сапонины (арнидиол, фарадиол), рибофлавин, никотиновая кислота, флавоновые гликозиды (космосиин, лютеолин-7-О-гликозид), флавоновые агликоны (лютеолин, трицин, хризоэриол), аскорбиновая кислота (табл. 2) [15, 53, 57, 86, 91, 127, 128, 139, 156].

Химический состав травы одуванчика лекарственного

Биологически активные соединения	Литературный источник
Флавоновые агликоны	
 <p style="text-align: center;">Лютеолин</p>	62, 127
 <p style="text-align: center;">Трицин</p>	62, 91
 <p style="text-align: center;">Хризоэриол</p>	62, 91

Флавоноидные гликозиды	
 <p style="text-align: center;">Лутеолин-7-О-глюкозид</p>	32, 62, 91, 127, 156
 <p style="text-align: center;">Лутеолин-7-О-рутинозид</p>	62, 139, 156, 160
 <p style="text-align: center;">Изорамнетин-3-О-глюкозид</p>	62, 156, 160
 <p style="text-align: center;">Кверцетин-7-О-глюкозид</p>	156, 160

 <p style="text-align: center;">Апигенин-7-О-глюкозид (космосиин)</p>	91, 156
Фенилпропаноиды	
 <p style="text-align: center;">Кофейная кислота</p>	127, 155, 156, 163
 <p style="text-align: center;">Хлорогеновая кислота</p>	32, 123, 156, 163
 <p style="text-align: center;">Цикориевая кислота</p>	123, 127, 155, 156

 <p style="text-align: center;">Монокофеoilвинная кислота</p>	149, 155, 156, 163
Кумарины	
 <p style="text-align: center;">Эскулин</p>	156

Во всех частях растения содержится млечный сок, богатый холином, сапонидами, органическими кислотами [86].

Листья одуванчика содержат 25 макро- и микроэлементов (бор, магний, фосфор, медь, железо и др.), многие из которых относятся к незаменимым факторам питания, выполняя роль регуляторов метаболизма [6, 83]. Кроме того, надземная часть одуванчика лекарственного является богатым источником калия [163].

1.1.8. Фармакологические свойства препаратов на основе сырья одуванчика лекарственного

В российской и зарубежной научной медицине применяются корни одуванчика лекарственного в виде измельченного сырья, в составе сборов, в виде густого экстракта [26, 28, 29, 95, 163]. Препараты на основе одуванчика применяются как желчегонное средство при заболеваниях печени и желчного пузыря [108, 126, 134, 135], как средство, возбуждающее аппетит, при гастритах,

колитах, применяются в качестве легкого слабительного средства при лечении геморроя [88, 103, 113, 114, 121, 126, 151, 156, 163]. Наличие желчегонного эффекта некоторые ученые объясняют присутствием β -ситостерола в сырье [121]. Кроме того, у данных препаратов отмечены мочегонный, кровоостанавливающий, болеутоляющий, противовоспалительный, отхаркивающий эффекты [5, 88, 118, 145, 156]. Препараты на основе одуванчика лекарственного снижают уровень глюкозы в крови [14, 46, 49, 68], а густой экстракт одуванчика используется для приготовления пилульной массы [114].

Группой ученых из г. Львова в 1991 г. проводилось исследование влияния лиофилизатов из корней, листьев и цветков одуванчика на желчевыделительную функцию печени в сравнении с отваром из корней данного растения и фламиноном. В эксперименте определяли желчевыделение, концентрацию желчных кислот, холестерина и билирубина в желчи. Лиофилизаты корней и листьев обладают более выраженным желчегонным действием по сравнению с отваром корней [113, 114]. Кроме того, желчегонная активность определялась рядом зарубежных ученых для листьев и корней одуванчика лекарственного [134, 135, 156]. Как гепатопротекторное и желчегонное средство трава одуванчика лекарственного используется во многих народных медицинах [118, 121, 127, 134, 135, 151, 163].

Для отвара корней одуванчика лекарственного было определено противогипоксическое и стресс-протективное свойство [76, 137].

В народной медицине одуванчик и препараты на его основе используются в качестве отхаркивающего (трава одуванчика назначается для курения как средство от кашля), успокаивающего при бессоннице, а также кровоочищающего при сыпи, прыщах, экземе и других кожных заболеваниях [48, 88, 114]. В средние века масляное извлечение из одуванчика лекарственного использовалось для лечения ран и ожогов [88]. Сок одуванчика с давних времен рекомендуется применять как средство от веснушек, пигментных пятен на коже, а также для удаления бородавок и мозолей [9, 114]. Примочки на основе одуванчика лекарственного использовались в народной медицине при болезнях глаз. Авиценна рекомендовал сводить бельмо на роговице глаза соком свежего

растения, а на место укуса скорпиона накладывать повязку из свежей травы и корня одуванчика. Кроме того, Абу Али ибн-Сина назначал препараты одуванчика при застое в воротной вене, водянке [88, 89, 129, 156]. Имеется предположение, что трава одуванчика лекарственного упоминалась в качестве лекарственного средства в известном трактате Диоскорида *De Materia Medica* [163].

Зарубежными учеными проводились исследования по определению противовоспалительной активности извлечений корней и надземной части одуванчика лекарственного. Предположительно данный фармакологический эффект связан с наличием в сырье БАС фенилпропаноидной природы [54, 58, 147, 158, 163]. Извлечения показали свою эффективность в уменьшении синтеза фактора некроза опухоли, подавляя выработку интерлейкина-1. В различных исследованиях показали активность отдельных фракций извлечений из травы и корней одуванчика лекарственного для подавления синтеза лейкотриена В₄, интерлейкина-6 и других факторов воспаления [156]. Рядом отечественных и зарубежных ученых доказана противоопухолевая активность препаратов на основе травы и корней одуванчика лекарственного [33, 67, 90, 111, 133]

В Западной Европе одуванчик лекарственный используется как пищевое растение [39, 40, 113, 114, 130, 144]. Во Франции выведена огородная культура с более нежными и крупными листьями. Употребляются листья одуванчика весной в виде салатов в качестве источника витаминов, а также для улучшения состава крови [114, 156, 163]. В Болгарии применяются свежие листья и сок в комплексном лечении анемии, атеросклероза, С-авитаминоза и кожных заболеваний [113, 163]. Корни одуванчика лекарственного используются в качестве заменителя кофе [156, 163].

В корейской медицине корни и трава одуванчика лекарственного применяются для лечения гастрита, диспепсии, болей в желудке, а также в качестве противовоспалительного средства при воспалениях молочной железы, лимфатических узлов [114]. В качестве наружного средства используется для лечения гнойничков [114, 127, 156].

В китайской медицине используются все части растения в качестве жаропонижающего, потогонного средства [114, 148, 150]. Кроме того, средства на основе одуванчика применяются при укусах змей, при недостатке молока у кормящих женщин, а также при воспалении лимфатических узлов, при гастритах, болях в желудке и при общем недомогании. Наружно применяется сок свежего растения [127, 148, 150, 156].

Существуют исследования, доказывающие возможность применения препаратов на основе одуванчика лекарственного для лечения сахарного диабета [14, 46, 49, 68, 163]. На наш взгляд это может быть объяснено тем обстоятельством, что в корнях одуванчика лекарственного содержится большое количества полисахарида инулина, обладающего сахароснижающим действием [47]. Порошок корней незначительно снижает уровень холестерина у здоровых лабораторных животных. Кроме того, жидкий экстракт из корней и листьев одуванчика лекарственного снижает массу тела лабораторных животных, а также проявляет диуретический и салуретический эффект [88, 114, 118, 127, 156].

Антибактериальное действие проявляет препарат на основе экстракта из цветочной пыльцы одуванчика [114].

Кроме того, трава одуванчика лекарственного используется при изготовлении гомеопатических лекарственных средств [42, 132].

1.2. Проблемы стандартизации сырья и препаратов одуванчика лекарственного

В Российской Федерации фармакопейным видом сырья являются корни одуванчика лекарственного. Качество сырья и вопросы его стандартизации регламентируются ст. 69 ГФ СССР XI «Корни одуванчика» [26]. В разделе «Качественные реакции» описана реакция на отсутствие крахмала, а также реакция на инулин. На наш взгляд, описанные реакция не являются специфичными для данного вида сырья, так как положительную реакцию на наличие инулина могут давать различные виды лекарственного растительного сырья (корни цикория, корни алтея, корни топинамбура и др.) [34, 47, 57, 64, 75].

Качество сырья - корней одуванчика лекарственного – в Российской Федерации оценивается по показателю экстрактивных веществ [26, 66]. В состав экстрактивных веществ входят различные БАС: горечи, дубильные вещества, аминокислоты и гидроксикоричные кислоты, минеральные элементы, витамины, углеводы [57, 66, 75]. Корни одуванчика лекарственного особенно богаты углеводами (свободными и связанными: моно-, ди-, олиго- и полисахаридами – глюкозой, фруктозой, сахарозой, инулином и др.) [66]. До 40% от массы экстрактивных веществ составляют полисахариды. Следовательно, данный вид анализа не может в полной мере охарактеризовать качество заготовленного сырья, так как содержание отдельных компонентов в смеси экстрактивных веществ весовым методом определить невозможно.

Качественный анализ травы одуванчика, согласно Фармакопее Китайской Народной Республики [150], рекомендуется проводить методом ТСХ в системе этилацетат - муравьиная кислота – вода (7:2,5:2,5) с использованием в качестве вещества-стандарта кофейной кислоты. Хроматограмму рекомендуется просматривать в ультрафиолетовом свете при $\lambda = 365$ нм. Флуоресцирующая зона вещества-стандарта должна совпадать по подвижности и характеру свечения с зоной вещества в исследуемом образце [150]. Количественное определение БАС рекомендуется проводить методом ВЭЖХ в пересчете на кофейную кислоту [71, 150]. Однако, как известно, кофейная кислота не является доминирующим

веществом травы одуванчика лекарственного. Следовательно, использование вещества, содержащегося в сырье в минорных количествах, в качестве стандарта может привести к высокой степени погрешности при количественном определении содержания БАС, а также к ошибке при идентификации сырья и качественном анализе.

В Европейской Фармакопее как метод качественного анализа травы с корнями одуванчика лекарственного предлагается ТСХ с использованием в качестве веществ-свидетелей хлорогеновой кислоты и рутина [131]. С нашей точки зрения, это не достаточно оправдано. Рутин и хлорогеновая кислота не являются для данного ЛРС специфичными и доминирующими веществами. Кроме того, эти вещества-стандарты используются для анализа таких объектов, как, например, листья алтея, кора ивы, цветки коровяка, листья мелиссы, цветки ноготков и др. [131]. Таким образом, отсутствует селективность ТСХ, так как в анализе не используются вещества-стандарты, характерные для конкретного вида сырья. Количественный анализ в Европейской Фармакопее рекомендуется проводить по сумме экстрактивных БАС. В данном подходе так же не учитываются уникальные особенности состава БАС, отвечающих за фармакологическую активность сырья и препаратов на его основе.

В корнях одуванчика лекарственного содержится большое количество полисахаридов, доминирующим из которых является инулин [7, 8, 66]. Российскими учеными разработаны методики определения количественного содержания инулина в корнях одуванчика лекарственного [7, 8, 105]. Данная методика основана на взаимодействии инулина с резорцином в кислой среде. Однако в ней имеется ряд отрицательных моментов, как то: методика многостадийная, подразумевает многоэтапную подготовку; объемы используемых реактивов не всегда соответствуют номиналу лабораторной посуды, что может сказаться на точности анализа; в анализе используются высокотоксичные соединения (например, ацетат свинца). К положительным сторонам методики, можно отнести возможность расчета не только суммарного содержания углеводов в исследуемом сырье, но и отдельное содержание полисахаридов и моносахаров.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.

1. В результате анализа литературных данных была выявлена широкая ресурсная база одуванчика лекарственного, а также богатый химический состав различных морфологических органов одуванчика лекарственного (корней, травы).

2. Богатый химический состав БАС обуславливает широкий спектр фармакологической активности. Отдельные эффекты (иммуномодулирующий, противовоспалительный, желчегонный, диуретический и др.), были выявлены в работах отечественных и зарубежных ученых.

3. В Российской Федерации отсутствует нормативная документация на траву одуванчика лекарственного, что препятствует применению данного вида сырья в официальной медицинской практике.

4. Имеющиеся зарубежные методики анализа и стандартизации не лишены ряда недостатков, что обуславливает актуальность проведения исследований с целью повышения селективности и точности анализа травы одуванчика лекарственного и препаратов на ее основе.

5. Разработка нормативной документации на траву одуванчика лекарственного позволит применять всю доступную фитомассу растения с целью комплексного использования природных ресурсов и создания отечественных импортозамещающих лекарственных препаратов с широким спектром фармакологической активности.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили образцы сырья – травы и корней одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.), травы и корней одуванчика позднего (*Taraxacum serotinum*), а также травы и корней цикория обыкновенного (*Cichorium tuberosum*), собранные в период с 2012 по 2015 гг. Сырье заготавливали на территории Самарской, Пензенской, Ульяновской, Архангельской областей. Образцы сырья были собраны в различные фазы вегетации растений в период с мая по сентябрь.

Образцы лекарственного растительного сырья:

- трава одуванчика лекарственного, заготовленная в п. Алексеевка Кинельского района Самарской области в период с мая по сентябрь 2013 и 2014 гг.;
- трава одуванчика лекарственного, заготовленная в с. Челно-Вершины Челно-Вершинского района Самарской области в мае 2015 г.;
- трава одуванчика лекарственного, заготовленная в Архангельской области в мае 2015 г.;
- трава одуванчика лекарственного, заготовленная в п. Бессоновка Бессоновского района Пензенской области в мае 2014 г.;
- трава одуванчика лекарственного, заготовленная в Ульяновской области в мае 2014 г.;
- трава одуванчика позднего, заготовленная в п. Богдановка Кинельского района Самарской области в августе 2015 г.;
- трава одуванчика позднего, заготовленная в п. Калиновка Сергиевского района Самарской области в сентябре 2015 г.;
- трава цикория обыкновенного, выращенного на фармакопейном участке СамГМУ (сырье заготовлено в августе 2015 г.);

- корни одуванчика лекарственного, заготовленные в п. Алексеевка Кинельского района Самарской области в период с мая по сентябрь 2013 и 2014 гг.;
- корни одуванчика лекарственного, заготовленные в с. Челно-Вершины Челно-Вершинского района Самарской области в мае 2015 г.;
- корни одуванчика лекарственного, заготовленные в п. Бессоновка Бессоновского района Пензенской области в мае 2014 г.;
- корни одуванчика лекарственного, заготовленные в Архангельской области в мае 2015 г.;
- корни одуванчика позднего, заготовленные в п. Богдановка Кинельского района Самарской области в августе 2015 г.;
- корни одуванчика позднего, заготовленные в п. Калиновка Сергиевского района Самарской области в сентябре 2015 г.;
- корни цикория обыкновенного, выращенного на фармакопейном участке СамГМУ (сырье заготовлено в августе 2015 г.).

Изучены лекарственные препараты и субстанции, перечисленные ниже.

1. Настойка травы одуванчика лекарственного

Состав: Травы одуванчика лекарственного 200,0 г

Спирта этилового 70% до получения 1 л настойки

2. Настойка травы одуванчика лекарственного

Состав: Травы одуванчика лекарственного 200,0 г

Спирта этилового 40% до получения 1 л настойки

3. Настой травы одуванчика лекарственного

Состав: Травы одуванчика лекарственного 100,0 г

Воды очищенной до получения 1 л настоя

4. Сироп травы одуванчика лекарственного на основе сахарозы

Состав: Сиропа сахарного 64% 90,0 г или 95,0 г

Настойки травы одуванчика

на 70% спирте этиловом 10,0 г или 5,0 г соответственно

5. Сахар высшей степени очистки – рафинад, содержащий сахарозы не менее 99,9% в пересчете на сухое вещество, воды – не более 0,4%. [16, 18, 19, 43, 44]

6. Сироп травы одуванчика лекарственного на основе фруктозы

Состав: Сиропа фруктозного 64% 90,0 г или 95,0 г

Настойки травы одуванчика

на 70% спирте этиловом 10,0 г или 5,0 г соответственно

7. Фруктоза – белый кристаллический рассыпающийся порошок. Применяется в фармацевтической и пищевой промышленности, когда использование сахарозы невозможно (для пациентов, страдающих ожирением, сахарным диабетом) [43, 44].

8. Сироп травы одуванчика лекарственного на основе сорбита

Состав: Сиропа сорбитного 64% 90,0 г или 95,0 г

Настойки травы одуванчика

на 70% спирте этиловом 10,0 г или 5,0 г соответственно

9. Сорбит пищевой – белый гигроскопичный порошок без запаха. Заменитель сахара, получаемый каталитическим гидрированием *D*-глюкозы и содержащий не менее 91% *D*-сорбита в пересчете на безводный продукт. Хорошо растворим в воде.[19, 43, 44].

10. Индивидуальные вещества: рутин, лютеолин, хлорогеновая кислота, цинарозид.

Экспериментальные данные были получены с использованием следующей приборной базы.

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

2. Спектрофотометр «Specord 40» (Analytik Jena).

3. Спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ Спектр).

4. Термостат суховоздушный «ТС-1/80».

5. Набор ареометров общего назначения ИСП.АІ.

6. Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ».
7. Хроматографические системы (хлороформ-этанол, хлороформ-этанол-вода, бутанол-уксусная кислота-вода в различных соотношениях).
8. Набор ареометров общего назначения ИСП.АІ.
9. Цифровые микроскопы марки Motic: DM-111 и DM-39C-N9GO-A.
10. Цифровой люминесцентный микроскоп «Альтами ЛЮМ-2»
11. Набор сит с размером отверстий 0,2 мм; 0,5 мм; 1 мм; 2 мм; 3 мм, 7 мм.
12. Спектрометр «Bruker AM-300» (проведение ЯМР-спектроскопии).
13. Масс-спектрометр «Kratos MS-30» (проведение масс-спектрометрии).
14. рН-метр «MP-25»

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа

В данной работе исследовали свежую и высушенную надземную часть одуванчика лекарственного, одуванчика позднего и цикория обыкновенного. Сушка сырья проводилась естественным путём под навесами без дополнительного нагрева. Свежее сырьё для микроскопического анализа фиксировались в смеси спирта этилового 96%, глицерина ректифицированного и воды в соотношении 1:1:1. Высушенное сырьё подвергалось классической пробоподготовке по требованиям ГФ СССР XI издания и ГФ РФ XIII издания на траву, листья и цветки [24, 25, 26, 85, 87, 96].

Макро- и микроскопический анализ ЛРС проводили визуально по общей фармакопейной методике на листья, траву и цветки ГФ СССР XI издания и ГФ РФ XIII издания [24, 25, 26, 85, 87]. Объекты исследовали, рассматривая невооруженным глазом и с помощью лупы (x10). При этом изучали и оценивали такие диагностические признаки, как форму листовой пластинки, характер жилкования листа, его край и размеры (длина, ширина), характер поверхности, цвет, запах и вкус [24, 25, 26].

Размеры анализируемых объектов определяли при помощи линейки, а также программного оборудования цифрового стереоскопического микроскопа Motic DM-39C-N9GO-A. Цвет определяли при дневном освещении, запах – при разламывании, вкус оценивали, пробуя измельченное сырьё.

Исследование микропрепаратов в проходящем и отраженном свете проводили с помощью цифровых микроскопов марки “Motic”: DM-111 и DM-39C-N9GO-A.

Одревесневшие оболочки клеток выявляли обработкой препаратов раствором сернокислого анилина; кутинизированную поверхность эпидермы окрашивали раствором Судана III [24, 25, 34, 85, 87, 98] по описанным ниже методикам.

1. Окрашивание одревесневших и лигнифицированных оболочек клеток.

На предметное стекло, на котором расположен исследуемый срез, наносили каплю раствора сернокислого анилина, после чего накрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом. Наблюдали окрашивание лигнифицированных оболочек клеток в желтый цвет [25, 34, 57].

Приготовление раствора сернокислого анилина. 2,0 г сернокислого анилина растворяли в смеси 4 мл ледяной уксусной кислоты и 194 мл спирта этилового 50% [57].

2. Окрашивание кутинизированных оболочек клеток эпидермиса.

На предметное стекло, на котором расположен исследуемый срез, наносили каплю раствора Судана III, после чего накрывали предметным стеклом и просматривали под микроскопом. Наблюдали окрашивание кутинизированных оболочек клеток эпидермиса в розовый цвет [24, 25, 34, 57].

Приготовление раствора Судана III. 0,01 г Судана III растворяли в 5 мл спирта этилового 95% и прибавляли 5 мл глицерина ректифицированного [24, 25].

2.2.2. Физические методы анализа

Плотность образцов настоек и сиропов определяли с помощью набора ареометров общего назначения ИСП.АІ по методике, описанной в Государственной Фармакопее Российской Федерации XII и XIII издания [22, 24].

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

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

2.2.3. Химические методы анализа

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

Цианидиновая реакция (проба Shinoda) использовалась для определения присутствия флавоноидов в извлечении из травы одуванчика лекарственного. К 1-2 мл исследуемого извлечения добавляли 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и 5-10 мг цинка. Наблюдалось красно-малиновое окрашивание, которое обусловлено образованием флавилиевых пигментов [57].

Цианидиновая реакция с модификацией по Брианту является продолжением пробы Shinoda. Полученный в первой реакции раствор разбавляли водой очищенной в соотношении 1:1 и добавляли *n*-бутанол. При наличии агликонов флавоноидов красно-малиновое окрашивание переходит в верхнюю органическую фазу. В случае присутствия гликозидов – окрашивание распределяется в нижнем неорганическом слое [57].

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

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

При взаимодействии с *раствором аммиака* флавоны, флаваноны, флавонолы и флаванололы образуют комплекс, окрашенный в желтый цвет. При нагревании окрашивание переходило в оранжево-красное. При реакции с парами аммиака наблюдалась желто-зеленая флуоресценция при $\lambda=366$ нм.

Реакция со щелочным раствором диазобензолсульфокислоты (ДСК) является специфичной реакцией на свободные ароматические ОН-группы в исследуемых соединениях. К 1-2 мл извлечения травы одуванчика лекарственного добавляли 1-2 капли раствора ДСК. Наблюдалось желтое окрашивание раствора.

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

Реакция Сальковского является реакцией, характерной для тритерпеновых сапонинов. Сухой остаток растирают с небольшим количеством хлороформа и добавляют концентрированную серную кислоту. При этом развивается окраска от желтой до красной [57].

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

2.2.4. Хроматографические методы анализа

1. Тонкослойная хроматография (ТСХ) [24, 34, 57, 98].

Методом ТСХ нами были исследованы водные и водно-спиртовые извлечения из травы и корней одуванчика лекарственного и одуванчика позднего.

В анализе использовались хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». В ходе исследований были апробированы системы растворителей *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2), хлороформ – спирт этиловый 96% - вода (26:16:3), хлороформ – спирт этиловый 96% (9:1).

Перед проведением хроматографического исследования хроматографические пластинки помещали в термостат при температуре 100-105°C

для удаления влаги из сорбента. Хроматографическую камеру насыщали парами системы в течение 24 ч. Исследование проводили при комнатной температуре.

Исследуемые образцы наносили на линию старта стандартным капилляром, после чего погружали в камеру и хроматографировали восходящим способом. Окончание хроматографического анализа определяли по фронту растворителя, который должен был составить около 7-8 см.

Полученные хроматограммы высушивали и просматривали при дневном свете, а также в УФ-свете при $\lambda=366$ нм и $\lambda=254$ нм. Отмечали особенности свечения зон веществ. После чего хроматограммы обрабатывали щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты, раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты, 16% раствором серной кислотой.

2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография [57, 98].

Методом адсорбционной жидкостной хроматографии нами был исследован химический состав водно-спиртового извлечения из надземной части одуванчика лекарственного. В качестве сорбента нами использовался силикагель КСКГ измельченный (фракция 0,04-0,10 мм, ГОСТ 3956-76, производитель: Sorbis Group). В качестве элюентов использовали хлороформ, спирт этиловый 96%, спирто-хлороформные смеси в различных соотношениях, воду очищенную.

В результате проведения исследований были получены фракции, содержащие отдельные БАС надземной части одуванчика лекарственного. Для их очистки использовался полиамид для колоночной хроматографии (производитель Woelm Pharma, Германия), а также силикагель марки, описанной выше.

2.2.5. Физико-химические методы анализа

1. Спектрофотометрия [24, 57, 61, 62, 98,].

Метод спектрофотометрии использовали для определения содержания суммы веществ фенольной природы в извлечениях из травы одуванчика лекарственного, а также в препаратах на ее основе. Кроме того, спектрофотометрическое определение применялось для анализа индивидуальных

веществ, выделенных из надземной части одуванчика лекарственного. Эксперимент проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 500 нм. Раствором сравнения служил спирт этиловый 96%. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «WinAspect Excel».

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве одуванчика лекарственного в пересчете на ГСО лютеолина [117]

Около 1 г сырья (точная навеска), проходящего через сито с диаметром отверстий 2 мм помещали в термостойкую коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, добавляли 40 мл спирта этилового 70%, закрывали колбу и взвешивали (погрешностью $\pm 0,01$ г). Затем колбу подсоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов с момента закипания экстрагента. После чего содержимое колбы охлаждали, взвешивали и доводили до первоначальной массы 70% спиртом этиловым. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

1 мл раствора А помещали в мерную колбу на 50 мл, добавляли 2 мл 1% спиртового раствора алюминия (III) хлорида и доводили объем раствора до метки 96% спиртом этиловым. Оптическую плотность измеряли через 30 минут на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) при длине волны 365 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А, доведенного до метки 96% спиртом этиловым в мерной колбе на 50 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times 40 \times 50 \times 100}{464 \times m \times l \times (100 - W)};$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; m – навеска сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 464 – удельный показатель

поглощения комплекса лютеолина со спиртовым раствором алюминия (III) хлорида при $\lambda=365$ нм [117].

2. ^1H -ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия.

Метод масс-спектрометрии применяется для анализа твердых, жидких или газообразных проб. Качественный масс-спектрометрический анализ основан на измерении массы ионов. Идентификация масс проводится по положению линии на фотопластинке, которое фиксируют, измеряя расстояние между линиями с известной массой и анализируемой линией [12, 24].

Масс-спектрометрия характеризуется высокой универсальностью. К достоинствам метода можно отнести возможность одновременного определения нескольких элементов, а также использование в работе небольших навесок [12].

Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) отражает взаимодействие с магнитным полем магнитного момента ядра [12, 24]. Данное явление основано на эффекте Зеемана, заключающемся в расщеплении спектральных линий или уровней в магнитном поле на отдельные компоненты. По табличным значениям резонансных сдвигов или по данным предварительной калибровки устанавливают наличие определенных атомных группировок в исследуемой молекуле (информация о структуре), а по площади пиков определяют число ядер. Метод ЯМР-спектроскопии применяется для определения структуры сложных соединений [12, 24].

2.2.6. Технологические методы

Настойку травы одуванчика лекарственного получали двумя методами: методом перколяции и методом модифицированной дробной мацерации. Настойки получались на 40% и 70% спирте этиловом в массо-объемном соотношении 1:5 [24, 81, 99, 109].

Получение настойки травы одуванчика лекарственного методом модифицированной дробной мацерации [81, 99].

День 1. В три термостойкие широкогорлые колбы помещали по 1 части травы одуванчика лекарственного. В первую колбу добавляли 8 объемов спирта этилового 40% или 70%, во вторую колбу – 3 объема спирта этилового 40% или 70% на смачивание. Плотно укупоривали колбы, оставляли на сутки.

День 2. Из первой колбы переливали полученное извлечение во вторую колбу. В первую колбу добавляли 5 объемов чистого экстрагента – спирта этилового 40% или 70%. В третью колбу добавляли 3 объема спирта этилового 40% или 70% на смачивание. Плотно укупоривали колбы, оставляли на сутки.

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

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

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

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

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

Получение настойки травы одуванчика лекарственного методом перколяции [24, 72, 109].

Из 210,0 г травы одуванчика лекарственного было получено 1050 мл настойки. Настойка была получена за 2 дня, процесс проводился по описанной ниже схеме.

День 1. 210,0 г травы одуванчика лекарственного заливали 630 мл спирта этилового 40% или 70% и оставляли на сутки для смачивания и набухания сырья.

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

Суммарное извлечение (1050 мл настойки травы одуванчика лекарственного) выдерживали при температуре 8°C в течение двух суток, фильтровали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку [24, 41, 72, 109].

Вкусовые сиропы - сахарный, фруктозный и сорбитный - получали по классической методике [24, 41, 44, 72].

Приготовление базового сиропа [44, 72, 109].

Сахар загружали в термостойкую колбу и добавляли небольшое количество воды. Когда сахар начинал распадаться на мелкие крупинки, добавляли остальную воду до соотношения сахар-вода 64:36, нагревали до 60-70°C и перемешивали до полного растворения сахара. После этого полученный сироп доводили до кипения, образующуюся пену убирали и доводили сироп до кипения еще раз. Если пены больше не образовывалось, полученный горячий сироп фильтровали и фасовали в чистые сухие флаконы темного стекла, оформляли этикетку. По аналогичной схеме приготавливали сорбитный и фруктозный сироп.

Полученные вкусовые сиропы использовали для производства лекарственного препарата – сиропа травы одуванчика лекарственного [24, 41, 72, 109].

2.2.7. Фармакологические методы анализа

В рамках данной работы проводили исследование влияния извлечений из надземной части одуванчика лекарственного на выделительную функцию почек в хроническом эксперименте [36, 37]. Исследования проводились на 120 белых беспородных крысах обоего пола массой 200-250 г. Всего было поставлено 6 серий экспериментов на кафедре фармакологии Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ). Животные содержались в виварии при свободном доступе к воде на обычном рационе. За день до опыта крысы получали водную нагрузку в объеме 3% от массы тела животного при помощи внутрижелудочного зонда. В день эксперимента животным контрольной группы повторно вводилась водная нагрузка для водных извлечений и водно-спиртовая нагрузка для спиртовых извлечений, а животным опытной группы – внутрижелудочно лекарственный препарат в идентичном объеме [36, 82]. Исследовали образцы настоек травы одуванчика лекарственного на 70% и 40% спирте этиловом и настой травы одуванчика лекарственного (в дозе 50 мкл/кг за 4 и 24 ч эксперимента), приготовленные на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ. Животных помещали в обменные клетки на сутки, собирали 4-х и 24-х часовые порции мочи [36]. В каждой порции определяли экскрецию воды, регистрировали концентрацию натрия и калия методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости ПАЖ-1, креатинина – колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3. Статистическую обработку полученных данных проводили по критерию Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 и Microsoft Excel 2010 «Пакет анализа» [24, 36, 37].

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО И ВОЗМОЖНЫХ ПРИМЕСНЫХ ВИДОВ

В Российской Федерации отсутствует нормативная документация на траву одуванчика лекарственного, что препятствует разработке отечественных препаратов на основе данного вида ЛРС. Оценка подлинности и качества ЛРС посредством морфолого-анатомического анализа является одним из обязательных критериев стандартизации любого вида сырья [24, 45, 98, 102]. В фармацевтическом анализе данный вид диагностики особенно важен в виду необходимости выявления случайной подмеси или намеренной фальсификации ЛРС.

Род Одуванчик (*Taraxacum*) включает в себя более 1000 видов, которые широко распространены на территории Евразии [31, 38, 68, 112]. В Российской Федерации в качестве источника официального сырья применяется только один вид – одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.) [26, 28, 29]. Однако для представителей данного рода характерен высокий уровень морфологической изменчивости вегетативных органов в зависимости от экологических условий произрастания (средняя температура, освещенность, характер почв и др.) [4, 38]. Данный факт снижает ценность макроскопического анализа в диагностике лекарственных и примесных видов. Следовательно, особенное значение придается анализу анатомо-гистологических признаков вегетативных органов растения, которые могут встречаться в сырье.

3.1. Морфолого-анатомические особенности надземной части одуванчика лекарственного

Надземная часть одуванчика лекарственного, по нашим оценкам, представляет собой значительную часть фитомассы растения. В данном сырье встречаются фрагменты листовой пластинки, цветоносов, соцветий (цветки, цветоложе, листочки обертки), а также фрагменты плодов (летучки, семянки).

Морфолого-анатомическому анализу подвергались свежие и высушенные листья, цветоносы и соцветия одуванчика лекарственного, а также плоды одуванчика лекарственного, собранные в период с июня по июль 2013-2015 годов в п. Смышляевка Самарской области. Свежие листья для микроскопического анализа фиксировались в смеси спирта этилового, глицерина и воды в соотношении 1:1:1. Сухие листья подвергали классической пробоподготовке по требованиям ГФ СССР XI и ГФ РФ XIII на траву, листья и цветки [24, 25]. Видовая специфичность собранных объектов подтверждалась с помощью определителей флоры [31, 68, 112], а также с помощью гербарных образцов кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ [106].

Макро- и микроскопический анализ ЛРС проводили визуально по общей фармакопейной методике на листья траву и цветки ГФ СССР XI и ГФ РФ XIII [23, 24, 25]. Объекты исследовали, рассматривая невооруженным глазом и с помощью лупы (x10). При этом изучали и оценивали такие диагностические признаки, как форму листовой пластинки, характер жилкования листа, его край и размеры (длина, ширина), характер поверхности, цвет, запах и вкус.

Размеры анализируемых объектов определяли при помощи линейки, а также программного оборудования цифрового стереоскопического микроскопа Motic DM-39C-N9GO-A. Цвет определяли при дневном освещении, запах – при разламывании, вкус оценивали, пробуя измельченное сырьё.

Исследование микропрепаратов в проходящем и отраженном свете проводили с помощью цифровых микроскопов марки “Motic”: DM-111 и DM-39C-N9GO-A.

Одревесневшие оболочки клеток выявляли обработкой препаратов раствором сернокислого анилина; кутинизированную поверхность эпидермы окрашивали раствором Судана III [24, 25, 57, 98].

Морфолого-анатомический анализ показал, что лист одуванчика по типу анатомического строения изолатеральный. Морфологически простой, неравномерно-перисто-раздельный, или рассеченный (рис. 3). Особая струговидная форма листовой пластинки описана в определителях флоры и имеет высокое диагностическое значение при анализе цельного ЛРС [31, 69, 112]. Однако форма листовой пластинки в анализе подлинности измельченного сырья не актуальна.

Проведен анатомо-гистологический анализ листовой пластинки одуванчика лекарственного (поперечных сечений и ее поверхности). Выявлено, что поперечное сечение листа одуванчика неоднородно по длине, особенно в области его центральной жилки (рис. 3Б, 3В, 3Г).

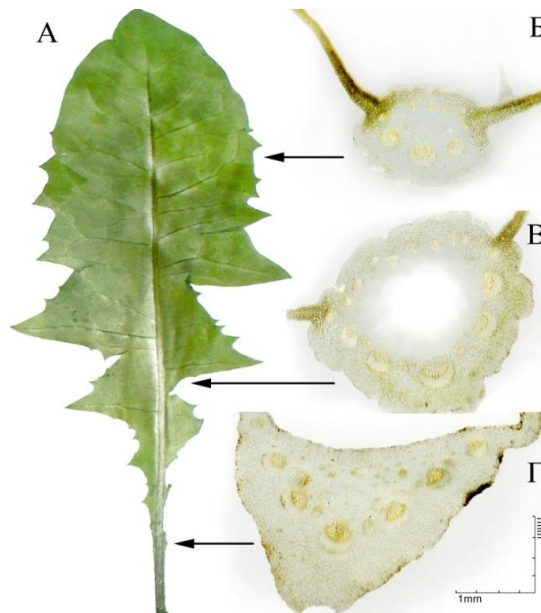


Рисунок 3 - Струговидный лист одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Анатомия поперечных срезов.

А – общий вид листа (верхняя сторона); Б – поперечное сечение **верхушки** листовой пластинки (x 40); В – поперечное сечение **средней части** листа (x40); Г – поперечное сечение **базальной части** листа (x40).

В *базальной части* листовой пластинки (ближе к основанию листа) поперечное сечение имеет треугольную форму с округлым углублением с адаксиальной стороны. По ребрам базального среза сохраняются фрагменты низбегающей листовой пластинки (рис. 3Г). Лист в базальной части выполнен основной паренхимой с малым количеством хлоропластов и имеет светло-зеленую окраску.

Очертание поперечного среза центральной жилки в *средней части* листовой пластинки ребристое и имеет более-менее округлую форму, слегка сдавленную с адаксиальной стороны (рис. 3В).

На поперечном сечении в *средней части* листа отчетливо видна центральная полость. Её размеры могут варьировать, постепенно уменьшаясь и к верхушке листовой пластинки, и в направлении к её базальной части (рис. 3В). Поперечное сечение центральной жилки в *верхней части* листовой пластинки сохраняет очертания *средней части*. При этом полость здесь отсутствует (рис. 3Б).

Анализ элементов проводящей системы листа на поперечных срезах показал, что в *базальной части* листовой пластинки насчитывается, как правило, семь основных, крупных пучков коллатерального типа. Они расположены почти параллельно поверхности абаксиальной стороны листа, имеющей очертание треугольника (рис. 3Г). В основной паренхиме листовой пластинки наблюдается многочисленное скопление мелких пучков - жилок второго порядка. Они локализованы, как правило, между крупными (основными) пучками и хаотично в паренхиме адаксиальной стороны. Далее, на протяжении всего листа, на поперечном сечении средние жилки более упорядочены и расположены по окружности.

Размеры основных (крупных) пучков уменьшаются и по направлению к верхушке листа, и от центра черешка к периферии листовой пластинки (рис. 3Б, 3В, 3Г). Количество их также постепенно уменьшается, и в верхней части листовой пластинки чаще диагностируется 2-3 основных пучка (рис. 3Б).

Из гистологических особенностей проводящих пучков необходимо отметить довольно сильно выраженную флоэмную часть. Она имеет неоднородную структуру и по периферии представлена плотно сомкнутыми клетками с заметно утолщенными оболочками, напоминающими склеренхиму (рис. 4). Их клеточные стенки не лигнифицируются. В тканях вокруг пучков со стороны флоэмы расположены млечники, содержащие млечный сок (латекс) (рис. 4). Млечники также диагностируются в мезофилле листовой пластинки, ближе к эпидермису листа (рис. 5).

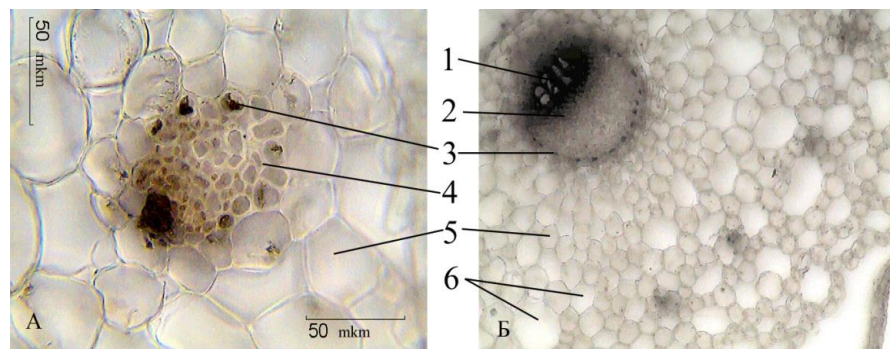


Рисунок 4 - Лист одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Поперечный срез.

А – проводящий пучок (x400); Б – фрагмент мезофилла листа (x100).

Обозначения: 1 – ксилема; 2 – флоэма; 3 – млечники; 4 – склеренхима; 5 – клетка мезофилла; 6 – воздушная полость.

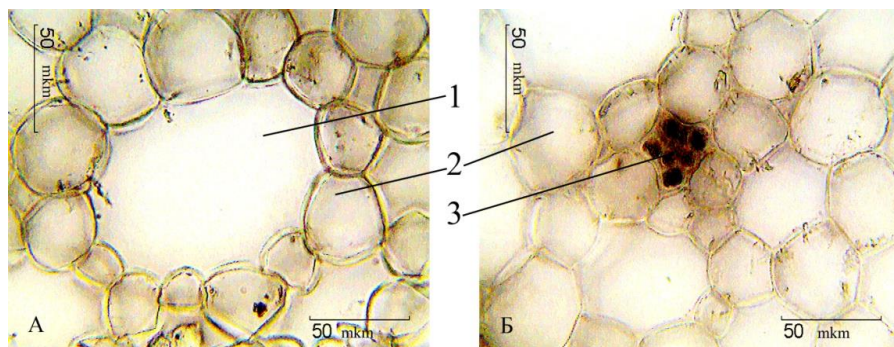


Рисунок 5 - Лист одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Поперечный срез (x400).

А – воздушная полость; Б – млечник.

Обозначения: 1 – полость; 2 – клетка мезофилла; 3 - млечник.

Крупные пучки средней жилки армированы со стороны ксилемы склеренхимой, её клетки по форме угловатые, как бы смятые (рис. 6). Клеточные стенки целлюлозные (не дают положительной реакции на лигнин) (рис. 6А, 6В).

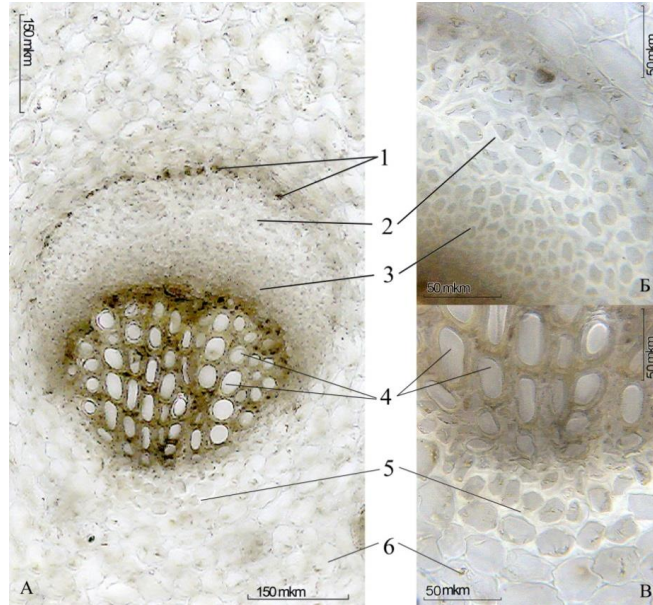


Рисунок 6 - Пучок центральной жилки листовой пластинки одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Поперечный срез базальной части. А – пучок, общий вид (x100); Б – фрагмент флоэмной части пучка (x400); В – фрагмент ксилемной части пучка (x400).

Обозначения: 1- млечники; 2 – лубяная склеренхима; 3 – проводящие элементы флоэмы; 4 – ксилема; 5 – склеренхима; 6 – основная паренхима.

Мезофилл листовой пластинки вокруг центральной жилки представлен паренхимой с ослизняющимися воздушными полостями. Воздушные полости расположены равномерно и достигают 100 мкм в поперечном сечении, выделений или секрета не содержат. Они окружены клетками мезофилла изодиаметрической формы (рис. 5).

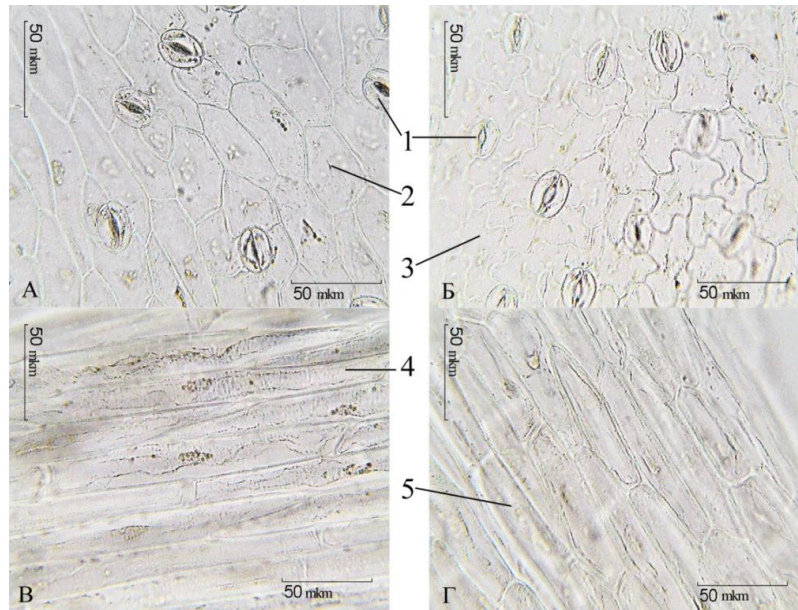


Рисунок 7 - Особенности строения эпидермальных клеток листовой пластинки одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) (x400):

А – верхний эпидермис; Б – нижний эпидермис; В – эпидермис над жилкой, верхняя сторона листа; Г – эпидермис над жилкой, нижняя сторона листа.

Обозначения: 1 – устьичные аппараты; 2, 3 – клетки основной эпидермы; 4, 5 – эпидермис над жилкой.

Эпидермис листовой пластинки с нижней стороны листа представлен паренхимными клетками неправильной формы с сильноизвилистыми стенками (рис. 7Б). Клетки верхнего эпидермиса угловатые, слабо вытянутые (рис. 7А).

Эпидермис над жилкой листовой пластинки с верхней и нижней стороны представлен вытянутыми, угловатыми, острыми на концах клетками. Стенки клеток слабо и равномерно утолщены (рис. 7В, 7Г).

Лист одуванчика амфистоматический. На его поверхности, как с верхней, так и с нижней стороны, изредка встречаются устьичные аппараты анамоцитного типа (рис. 7). Устьица разных размеров (от 5 до 10 мкм) окружены 3-5 клетками, на листовой пластинке они встречаются значительно чаще, чем на жилке (рис. 7).

На поперечном сечении эпидермальные клетки по форме прямоугольные. Их радиальные стенки тонкие, напротив, стенки поверхности значительно утолщены (рис. 8А). Эпидермис покрыт тонким слоем кутикулы,

окрашивающимся в розовый цвет при обработке препарата раствором Судана III (рис. 8Б).

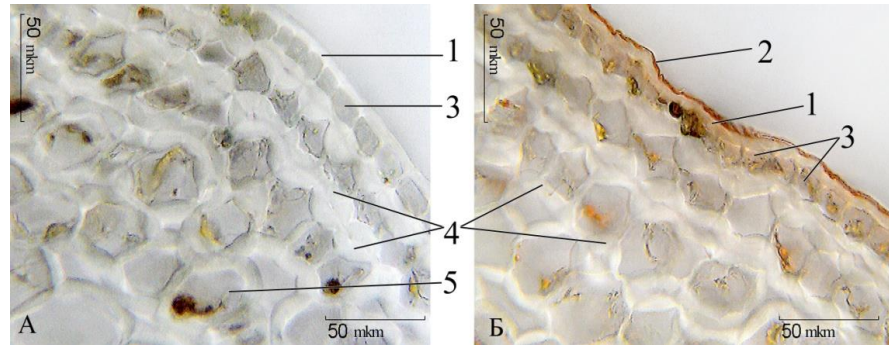


Рисунок 8 - Колленхима абаксиальной стороны базальной части листа одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Поперечный срез (x400).

А – общий вид уголковой колленхимы; Б – окраска раствором Судана III.

Обозначения: 1- эпидермис; 2 – кутикула; 3 – протопласт клеток; 4 – клетки колленхимы; 5 – клетки паренхимы.

Непосредственно под эпидермой по всему диаметру центральной жилки листа располагается слой уголковой колленхимы, насчитывающей до трех рядов клеток. Межклетники, как правило, наблюдаются во втором ряду клеток колленхимы (рис. 8).

Эпидермис жилок покрыт длинными неразветвленными многоклеточными многорядными волосками, обламывающимися на конце. Клетки волосков округлые изодиаметричные с живым протопластом. Основания волосков двух типов: одни 3-х рядные (рис. 10Б), у других волосков количество клеточных рядов в основании заметно больше (рис. 10А, 10В).

Если основания волосков имеют вид конуса, широкого у основания и зауживающегося к верху волоска, такой волосок оканчивается крупными, вытянутыми клетками, лишенными протопласта в количестве 2-х – 3-х, причем конечная клетка самая большая (рис. 9А).

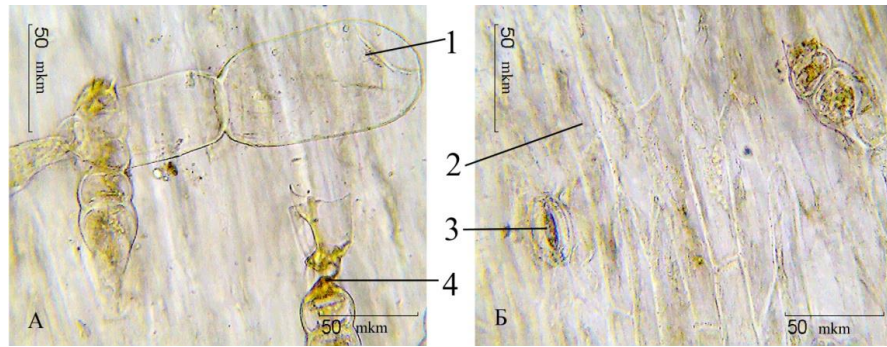


Рисунок 9 - Нижний эпидермис листа одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) над жилкой (x400).

А – трихомы; Б – фрагмент эпидермиса.

Обозначения: 1 – конечная клетка волоска; 2 – клетка эпидермы; 3 – устьице; 4 – основания обломанных волосков.

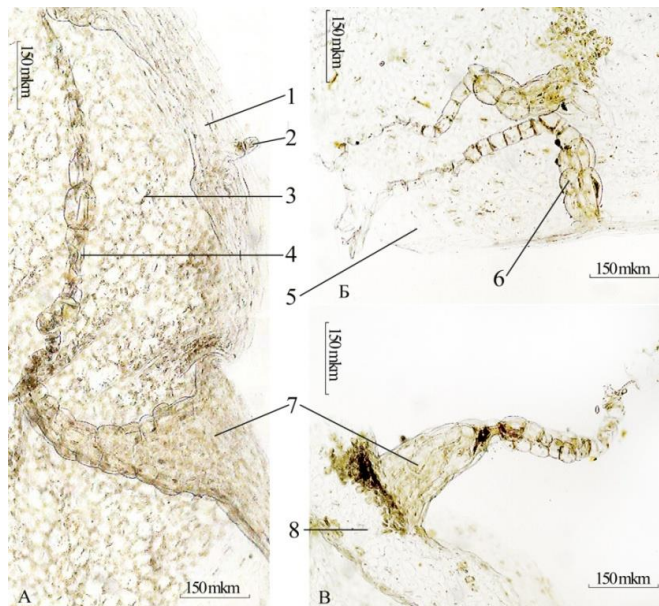


Рисунок 10 - Характер опушения листа одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) (x100).

А – трихомы по центральной жилке, нижний эпидермис; Б, В – трихомы основной эпидермы верхней стороны листа.

Обозначения: 1 – эпидермис над жилкой; 2 – остатки трихом; 3 – основной эпидермис нижней стороны листовой пластинки; 4 – многоклеточный многорядный бичевидный волосок; 5, 8 – верхний эпидермис; 6 – многоклеточный двурядный волосок; 7 – основание многоклеточного многорядного волоска.

Известно, что из листовой розетки одуванчика в процессе вегетации развиваются многочисленные цветоносные стрелки, лишенные листьев, полые внутри, достигающие в высоту от 10 до 35 см [31, 57, 68]. Цветоносные стрелки значительно уступают в фитомассе листьям одуванчика, однако их наличие и анатомо-гистологические особенности могут являться ключевым фактором в диагностике сырья.

Морфолого-анатомический анализ показал, что на поперечном срезе цветонос имеет характерный для травянистых стеблей представителей семейства Сложноцветные переходный тип строения (рис. 11А). Очертания их поперечных срезов округлые, поверхность срезов слаборебристая, в центре имеется крупная полость в диаметре до 1,5 мм (рис. 11).

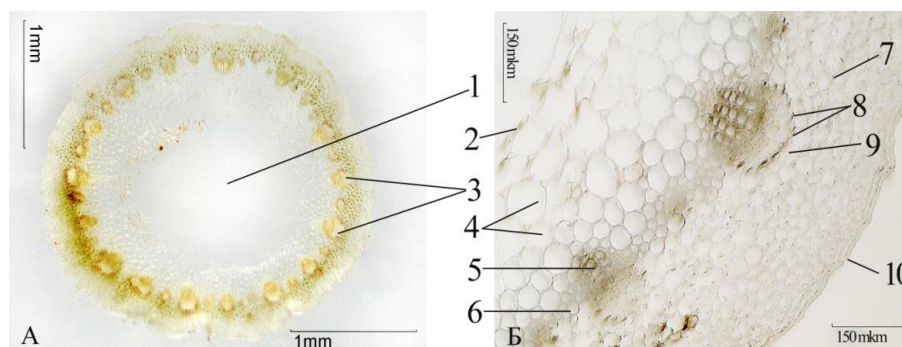


Рисунок 11 – Цветонос одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Поперечный срез.

А – общий вид цветоноса (x40); Б – фрагмент цветоноса (x100).

Обозначения: 1 – центральная полость; 2 – клетки эпителия; 3 – проводящие пучки; 4 – паренхима сердцевины; 5 – ксилема; 6 – кольцо склерифицированных клеток; 7 – паренхима коры первичной; 8 – млечники; 9 – эпидермис.

Поверхность цветоноса при рассмотрении на поперечном сечении покрыта эпидермой, сложенной мелкими клетками прямоугольной формы, несильно сдавленными с поверхности. Характер утолщенности клеточных стенок аналогичен таковому у эпидермальных клеток листа (рис. 11Б).

При рассмотрении с поверхности клетки эпидермиса цветоносов вытянутые прямоугольные, иногда имеющие заостренные скошенные концы (рис. 12А).

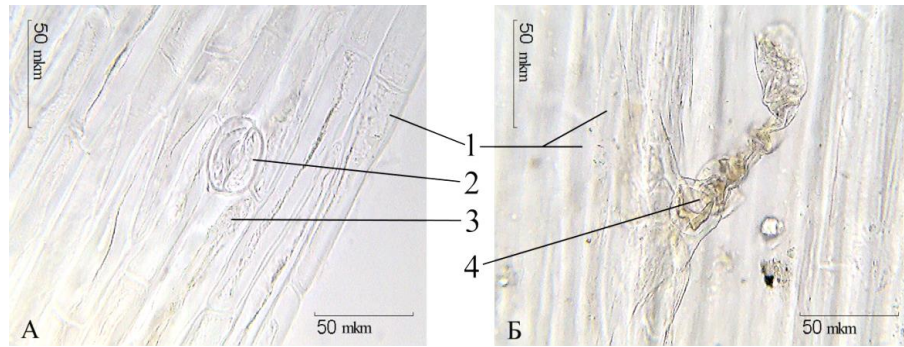


Рисунок 12 - Особенности гистологии покровных тканей цветоноса одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Вид с поверхности (x400).

А – фрагмент эпидермы с устьичным аппаратом; Б – фрагмент эпидермы с остатками трихомы.

Обозначения: 1 – клетки эпидермы; 2 – устьичный аппарат; 3 – протопласт; 4 – трихома.

Цветонос слабо опушен, причем при микроскопировании сухого сырья в эпидерме чаще встречаются фрагменты конусовидных оснований волосков. В отличие от волосков листовых пластинок, трихомы цветоносов имеют основания, как правило, в один ряд клеток (рис. 12Б).

Рыхлая колленхима, расположенная под эпидермой, содержит большое количество мелких межклетников (рис. 11). На поперечном сечении клетки колленхимы неправильной формы, их стенки извилисты. Межклетники трех- либо четырехугольной формы.

Клетки коровой паренхимы крупные округлые с незначительно утолщенными стенками и большим количеством межклетников (рис. 11). Протопласт паренхимных клеток коры содержит хлоропласты, количество которых в клетках заметно увеличивается от периферии среза к эндодерме (рис. 11А). Эндодерма слабо выражена.

Проводящие пучки открытые, коллатерального типа, расположены по кругу и имеют характерное строение для пучков, описанных выше в жилке листа. Между крупными основными пучками располагаются мелкие пучки (рис. 13Б).

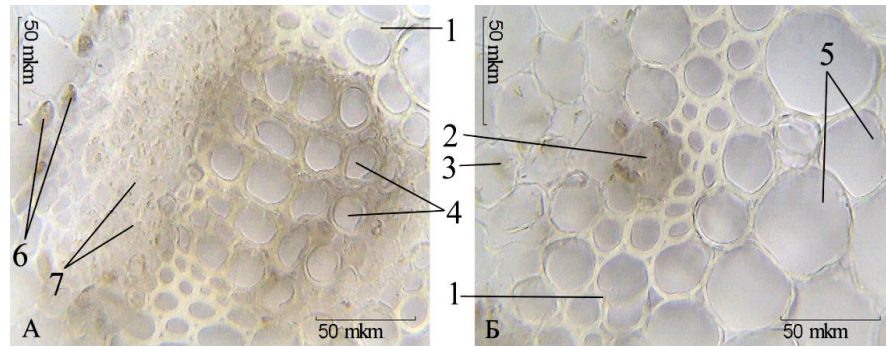


Рисунок 13 - Проводящие ткани цветоноса одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Поперечный срез (x 400).

А – открытый коллатеральный пучок; Б – вторичный пучок.

Обозначения: 1 – склеренхима; 2 – флоэма вторичного пучка; 3 – паренхима первичной коры; 4 – сосуды ксилемы; 5 – паренхима сердцевинки; 6 – млечники; 7 - флоэма.

Кольцо проводящих пучков окружает склеренхима, представленная округлыми на поперечном сечении клетками. Их диаметр относительно клеток паренхимы коры заметно меньше. Клеточные стенки сильно утолщены и нативно окрашены в слабо-желтый цвет (рис. 13Б).

Клетки сердцевинки цветоноса округлой формы и значительно крупнее склеренхимных. Размер клеток сердцевинки постепенно увеличивается к центру (рис. 11Б). Полость цветоноса выстлана крупными (140-160 мкм) уплощенными, смятыми клетками, лишенными протопласта. Их клеточные стенки целлюлозные, слабоутолщенные (рис. 11Б).

Кроме фрагментов листовой пластинки и цветоноса в сырье «Одуванчика лекарственного трава» могут также встречаться фрагменты цветка, цветоложа и плода, которые имеют высокое диагностическое значение при качественном анализе ЛРС.

По имеющимся литературным данным и результатам собственных исследований известно, что соцветие одуванчика лекарственного - одиночная корзинка диаметром до 2,5 см размещается на безлистном цветоносе высотой 20—40 см [31, 57, 68]. У растения может развиваться 10 и более цветоносов.

Цветки располагаются на укороченной разросшейся оси соцветия - общем цветоложе. Соцветие одуванчика лекарственного – гомогенное (все цветки в соцветии одинаковые по строению – язычковые) [31, 57, 68]. Соцветие окружено конусовидной оберткой, представляющей собой верхушечные листья.

Соцветие одуванчика – корзинка - морфологически сложно организованный объект [31, 57, 68] (рис. 14). Диагностические признаки могут иметь как цветки, так и другие части соцветия, в частности листочки обертки, цветоложе и цветоножка [31, 57, 68] (рис. 14).

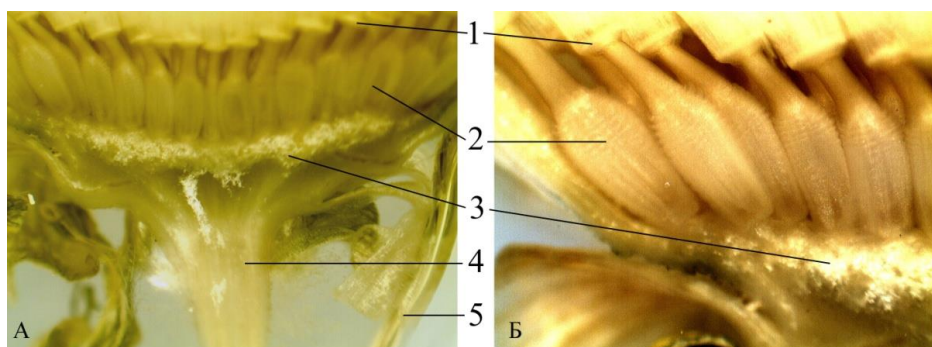


Рисунок 14 – Соцветие корзинка одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Поперечный срез.

А – общий вид соцветия (x20); Б – фрагмент соцветия (x40)

Обозначения: 1 – летучка семянки; 2 – семянка; 3 – цветоложе; 4 – цветоножка; 5 – обертка корзинки.

Обертки цветочной корзинки 13-20 мм в длину, зеленые. Наружные листочки их по форме от широколанцетных до ланцетно-линейных, более или менее вниз отвороченные, почти равные по ширине внутренним листочкам или немного более широкие, по краю без перепончатой каймы или с очень узкой перепончатой каймой, без рожков. Внутренние листочки продолговато-линейные, в 1,5 раза длиннее наружных листочков, без рожков [31, 57, 68].

Обзор научной литературы выявил не достаточно данных по описательной анатомии и гистологии соцветия одуванчика лекарственного и его частей [31, 57, 68]. При этом очевидна важность анатомо-гистологических признаков в диагностике ЛРС.

При рассмотрении поперечного сечения листочков обертки можно отметить наличие колленхимы, расположенной в концевых частях листочка обертки (рис. 15). Мезофилл листочка представлен пигментированными паренхимными клетками неодинаковой формы. В паренхиме листочка образуются воздушные полости, которые не содержат секрета или иных выделений (рис. 15).

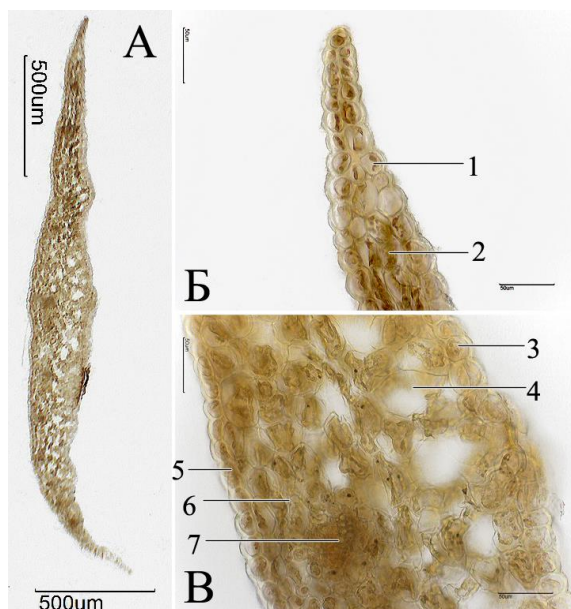


Рисунок 15 – Поперечное сечение листочка обертки соцветия одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.).

А – общий вид поперечного сечения (x40); Б – край листочка обертка (x400); В – средняя часть листочка обертки (x400).

Обозначения: 1 – колленхима края листочка обертки; 2 – клетки паренхимы края листочка обертки; 3 – клетки эпидермиса нижней стороны листочка обертки; 4 – воздушная полость; 5 – клетки эпидермиса верхней стороны листочка обертки; 6 – клетки паренхимы листочка обертки; 7 – проводящий сосуд.

Цветки одуванчика лекарственного желтые, с обильно- и длинноволосистыми в средней части венчиками. Краевые цветки на нижней стороне язычков обычно имеют темные полосы [31, 57, 68] (рис. 16А).



Рисунок 16 – Общий вид цветка и семянки одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.).

А – общий вид язычкового цветка одуванчика лекарственного с завязью;
Б – общий вид зрелой семянки одуванчика лекарственного.

Обозначения: 1 – рыльце пестика; 2 – отгиб венчика; 3 – тычиночные нити;
4 – фрагмент околоцветника; 5 – анемохора; 6 – место прикрепления летучки;
7 – столбик пестика; 8 – семянка; 9 – шиповидные выросты.

Кроме того, характерной особенностью всех представителей семейства Сложноцветные является наличие нижней завязи образующей характерный плод – семянку [31, 57, 68]. Семянка одуванчика лекарственного продолговато-яйцевидной формы, по цвету светло-бурая или буроватая. Расширенная часть семянки одуванчика лекарственного составляет 3-4 мм в длину, также имеется пирамидка (в длину составляет 0,4-0,6 мм) и носик – 7-12 мм. Семянка с поверхности голая, однако, на верхней половине её имеются острые выросты, повёрнутые к верхушке цветка (рис. 16Б). При микроскопировании семянки указанные выросты хорошо заметны. Они постепенно увеличиваются в размерах от середины семянки к её верхушке (рис. 16Б, 24Б).

Выше семянки расположен столбик пестика, к краю которого прикреплена летучка (анемохора) – белый хохолок, который может составлять 6-8 мм в длину

(рис. 16Б, 17, 24) [31, 57, 68]. Летучка сложена из длинных многоклеточных волоскообразных элементов - ресничек с острыми выступами отдельных клеток (рис. 17).

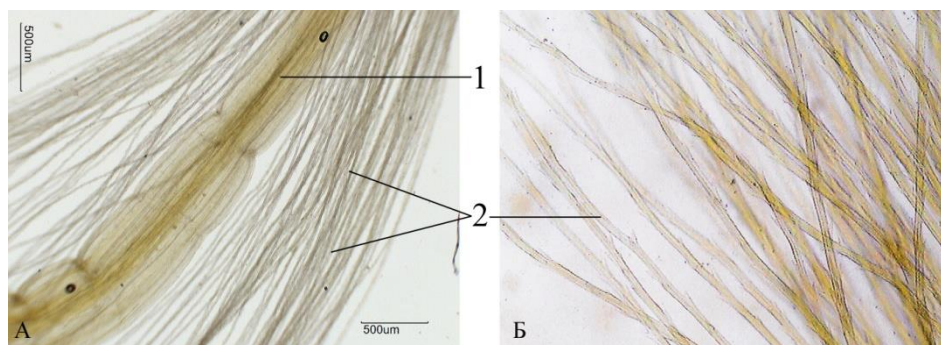


Рисунок 17 – Анемохора язычкового цветка одуванчика лекарственного (x100).

А – фрагмент хохолка со столбиком пестика; Б – фрагмент летучки.

Обозначения: 1 – столбик пестика; 2 – клетки летучки.

Фрагмент столбика от семянки до места прикрепления анемохоры может варьировать по длине в зависимости от стадии созревания семян (рис. 16). Данная часть столбика неопушена, в просветах его тканей хорошо заметны проводящие элементы ксилемы (рис. 24А).

Венчик язычкового цветка у основания слабо опушён. Опушение неоднородное и представлено двумя типами трихом. Чаще встречаются простые одноклеточные остроконечные волоски, хаотично расположенные по трубке венчика (рис. 19А). Длинные многоклеточные кроющие волоски расположены ближе к основанию венчика. Они имеют ярко выраженную клетку основания, как правило, небольшого размера с пигментированным основанием. Основные клетки волоска расположены вдоль эпидермы, полости клеток прозрачные, неокрашенные (рис. 18Б, 19Б). Конечная клетка, как правило, самая длинная (рис. 18Б).

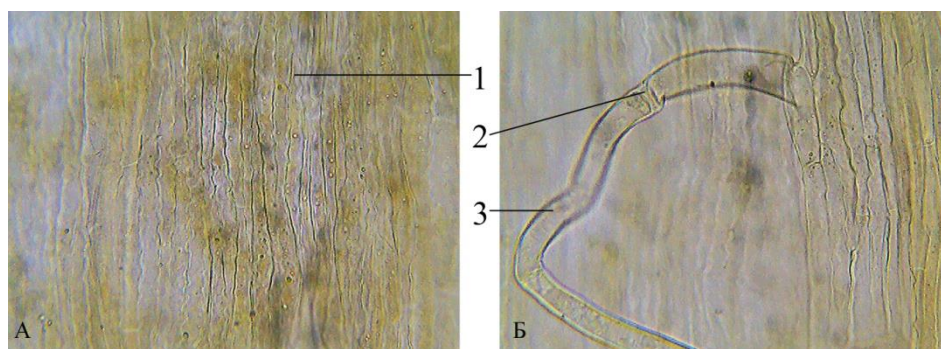


Рисунок 18 – Околоцветник язычкового цветка одуванчика лекарственного (x400).

А – прозенхимные клетки эпидермы околоцветника; Б – простой многоклеточный волосок.

Обозначения: 1 – клетки эпидермы; 2 – сочленение клеток волоска; 3 – простой волосок.

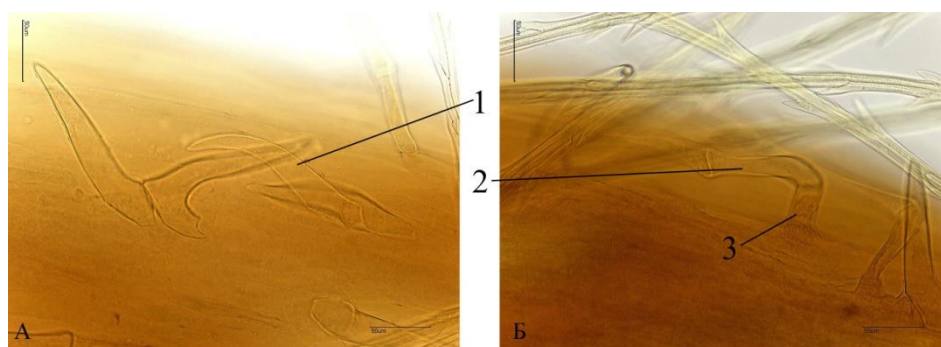


Рисунок 19 – Трихомы околоцветника язычкового цветка одуванчика лекарственного (x400).

А – фрагмент с одноклеточными остроконечными волосками; Б – фрагмент с простыми многоклеточными волосками.

Обозначения: 1 – простой одноклеточный волосок; 2 – простой многоклеточный волосок; 3 – основание волоска.

Клетки эпидермиса венчика вытянутые, с волнообразно извилистыми стенками. В протопласте клеток хорошо заметны капли пигментов ярко-желтого цвета (рис. 20). На отгибе венчика эпидермальные клетки паренхимные неправильной угловатой формы, бугристые с поверхности. Хорошо заметна

морщинистая кутикула. На отгибе встречаются выделительные элементы (гидатоды), представленные скоплением устьиц (рис. 20).

В паренхиме венчика, как в трубке, так и на отгибе, хорошо заметны тяжи спиральных сосудов ксилемы (рис. 21)

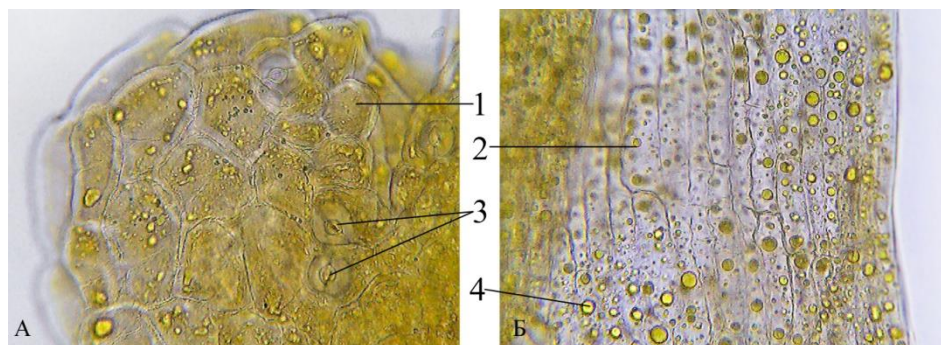


Рисунок 20 – Венчик язычкового цветка одуванчика лекарственного (x400)

А – фрагмент отгиба венчика; Б – фрагмент края венчика.

Обозначения: 1 – клетка эпидермиса отгиба венчика; 2 – клетка эпидермиса; 3 – устьице гидатоды; 4 – пигмент протопласта.

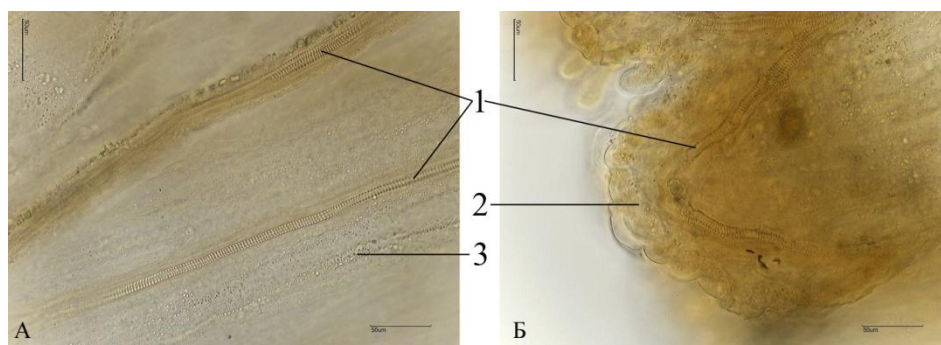


Рисунок 21 – Ксилема околоцветника одуванчика лекарственного (x400).

А – фрагмент трубки венчика; Б – фрагмент отгиба венчика.

Обозначения: 1 – спиральные сосуды; 2 – эпидермис отгиба венчика; 3 – эпидермис трубки венчика.

Столбик пестика на конце имеет раздвоенное рыльце, густо опушенное волосками (рис. 22). Непосредственно на рыльце с внутренней стороны локализованы мелкие сосочковидные выросты, образующие сплошной покров

(рис. 23А). Остальная часть пестика (столбик и внешняя сторона рыльца) покрыта крупными остроконечными одноклеточными волосками (рис. 23Б).

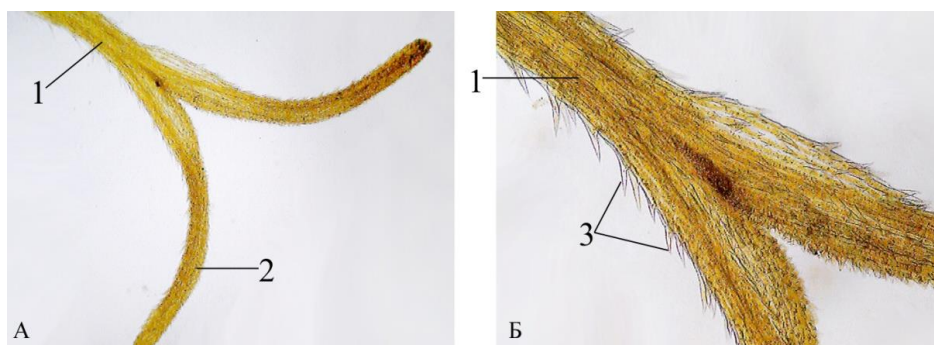


Рисунок 22 – Гинецей язычкового цветка одуванчика лекарственного.

А – общий вид рыльца пестика (x100); Б – фрагмент рыльца (x400).

Обозначения: 1 – столбик пестика; 2 – рыльце пестика; 3 – опушение гинецея.

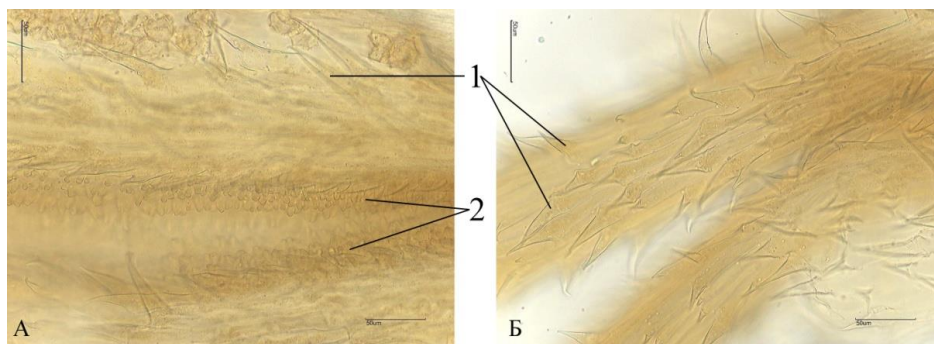


Рисунок 23 – Гинецей язычкового цветка одуванчика лекарственного (x400).

А – фрагмент внутренней стороны рыльца; Б – фрагмент внешней стороны рыльца.

Обозначения: 1 – простые одноклеточные волоски ; 2 – сосочковидные выросты.

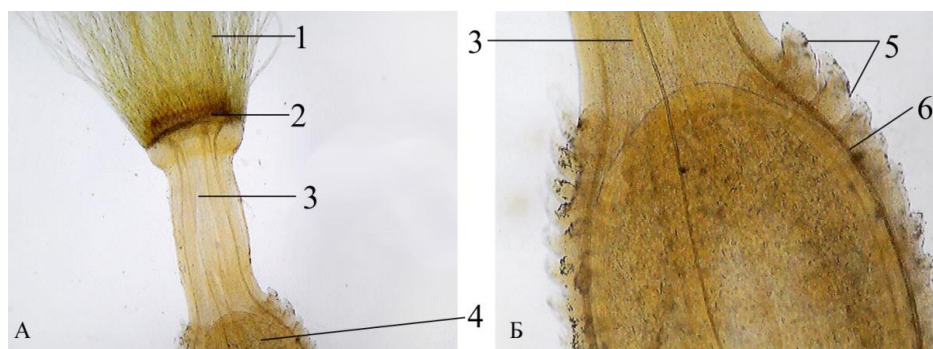


Рисунок 24 – Гинецей язычкового цветка одуванчика лекарственного.

А – фрагмент с основанием летучки (x100); Б – фрагмент завязи (x400).

Обозначения: 1 – анемохора; 2 – место прикрепления летучки; 3 – столбик пестика; 4 – завязь; 5 – выросты семянки; 6 – сосуд ксилемы.

Андроцей цветка одуванчика лекарственного представлен четырьмя тычинками. Пыльники тычинок крупные удлиненные окрашенные в желто-оранжевый цвет. Теки пыльников к верхушке остроконечные стреловидные (рис. 25А). Эпидермис пыльников неоднороден. Основная поверхность пыльника покрыта мелкоклеточным эпидермисом с пигментированным протопластом. В зоне связника клетки крупнее, их протопласт не окрашен (рис. 25).

Пыльники содержат в себе большое количество округлой шиповатой пыльцы, неоднородно пигментированной с поверхности в желто-оранжевый цвет (рис. 26)

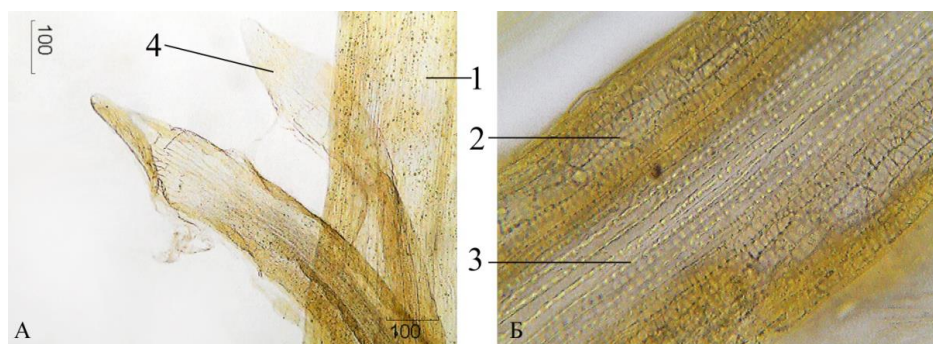


Рисунок 25 – Андроцей язычкового цветка одуванчика лекарственного.

А – фрагмент пыльников (x100); Б – фрагмент теки пыльника (x400).

Обозначения: 1 – эпидермис венчика; 2 – эпидермис теки пыльника; 3 – связник; 4 – стреловидная верхушка пыльника.

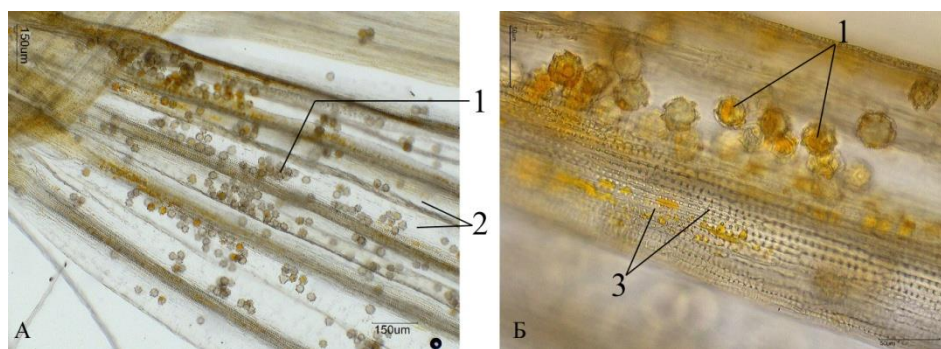


Рисунок 26 – Пыльники язычковых цветков одуванчика лекарственного.

А – фрагмент пыльников (x100); Б – фрагмент пыльников (x400).

Обозначения: 1 – пыльца; 2 – теки пыльников; 3 – эпидермис пыльника.

Как известно, строение пыльцы является селективным признаком и часто используется в биологии для определения вида растения [10, 11, 101, 163].

Структура пыльцы одуванчика лекарственного достаточно хорошо изучена (рис. 27, 28)[10, 11, 101].

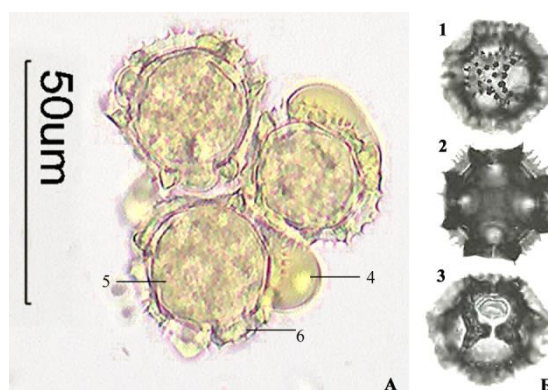


Рисунок 27 – Пыльца одуванчика лекарственного.

А – микрофотоснимок пыльцы, СамГМУ (x400); Б – электронные микрофотоснимки пыльцы, Бурмистров А.Н., 1990 г. [10, 11]

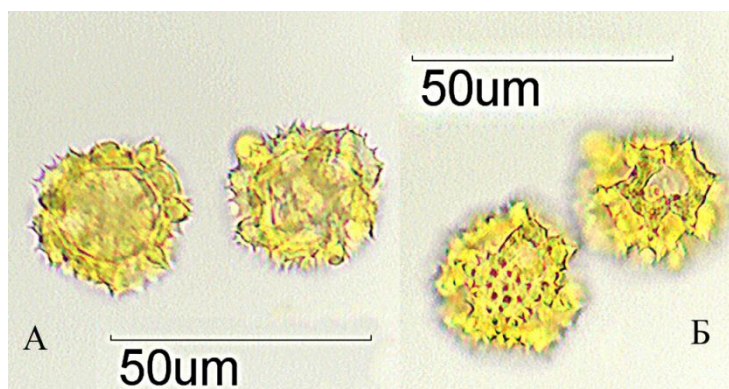


Рисунок 28 – Пыльца одуванчика лекарственного (x400).

А – фокус на внутреннюю часть пыльцы; Б – фокус на поверхность пыльцевой оболочки.

Пыльцевые зерна одуванчика лекарственного трех-, четырех-поровые, угловато-сплюсненной, почти округлой формы. Длина полярной оси 30,6—37,4 мкм, экваториальный диаметр 34—40,8 мкм (рис. 27). В очертании с полюса шести-, восьмиугольные, с экватора - угловато-эллиптические. Поры округлые, часто с неровными краями, 7—8 мкм в диаметре; мембрана гладкая. Поровые лакуны округлые, с канавками. Диаметр лакун не превышает диаметра пор. Гребни, окружающие лакуны, имеют высоту 5,5 мкм, шипы на всех гребнях оттянуты и заострены. Полярное утолщение трех- или четырехугольное. Текстура на полярном утолщении мелкопятнистая (рис. 28). Экваториальные гребни отчетливо выражены. Пыльца ярко-желтого цвета [10, 11].

3.2. Изучение диагностических признаков измельченного и порошкованного сырья одуванчика лекарственного

Как было отмечено ранее, в фармацевтическом анализе зачастую встают задачи проверки доброкачественности порошкованного или измельченного сырья. Сложность данного вида анализа состоит в том, что характерные морфологические признаки исследуемого вида сырья такие, как форма листовой пластинки, характер жилкования листовой пластинки и другие, утрачивают свою ценность.

При исследовании травы одуванчика лекарственного, измельченной до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 7 мм, нами были обнаружены следующие характерные фрагменты, описанные ранее: фрагменты анемохоры (летучки), фрагменты околоцветника (рис. 29А). В большом количестве в измельченном сырье встречаются фрагменты листовых пластинок (рис. 29Б, 30А).

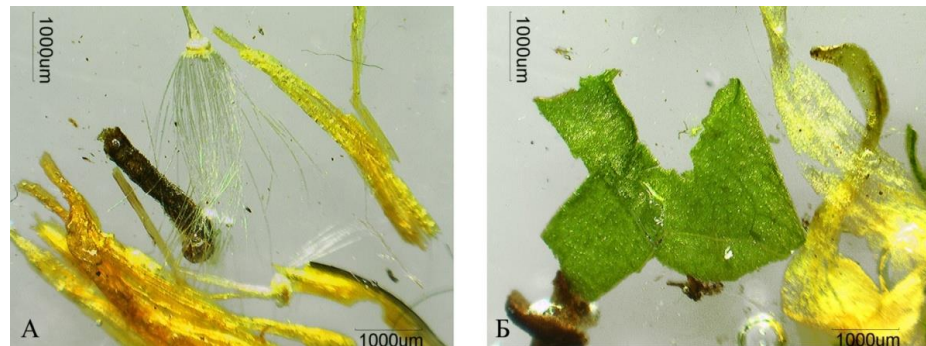


Рисунок 29 – Измельченное сырьё «Одуванчика лекарственного трава», 7 мм (x40).

А – фрагменты анемохоры и околоцветника, Б – фрагмент листовой пластинки.

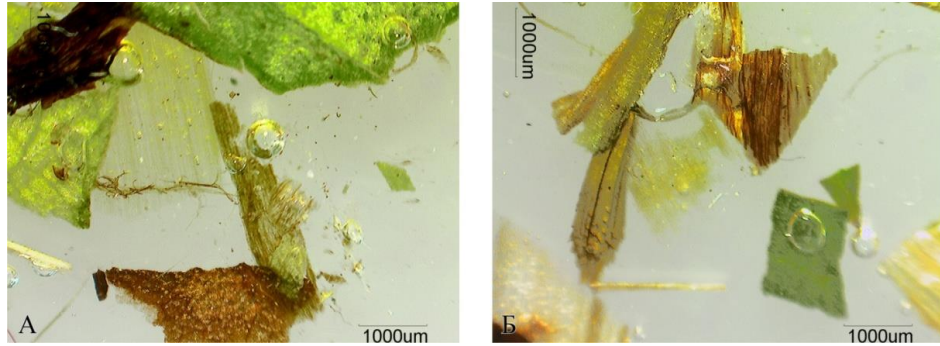


Рисунок 30 – Измельченное сырьё «Одуванчика лекарственного трава», 7 мм (x40).

А – фрагменты цветоложа и околоцветника; Б – фрагмент семянки.

При исследовании порошок сырьё «Одуванчика лекарственного трава», измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм, нами были обнаружены следующие характерные фрагменты, позволяющие идентифицировать исследуемое сырьё: фрагменты цветка - фрагменты рыльца пестика, пыльца, цветоложа, околоцветника с трихомами (рис. 31), фрагменты летучки (рис. 32).



Рисунок 31 – Порошок сырьё «Одуванчика лекарственного трава», 0,5 мм (x100).

А – фрагмент околоцветника с трихомами; Б – фрагмент рыльца пестика и цветоложа.

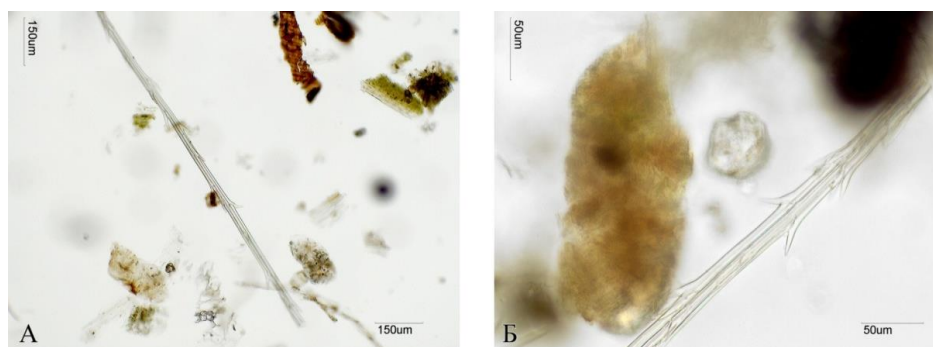


Рисунок 32 – Порошок сырья «Одуванчика лекарственного трава», 0,5 мм.
А – фрагмент анемохоры (x100), Б – фрагмент анемохоры (x400).

Кроме того, характерной особенностью порошка травы одуванчика лекарственного являются фрагменты трихом, представленных крупными бесцветными и спавшимися клетками, а также фрагменты паренхимы листовой пластинки (рис. 33).

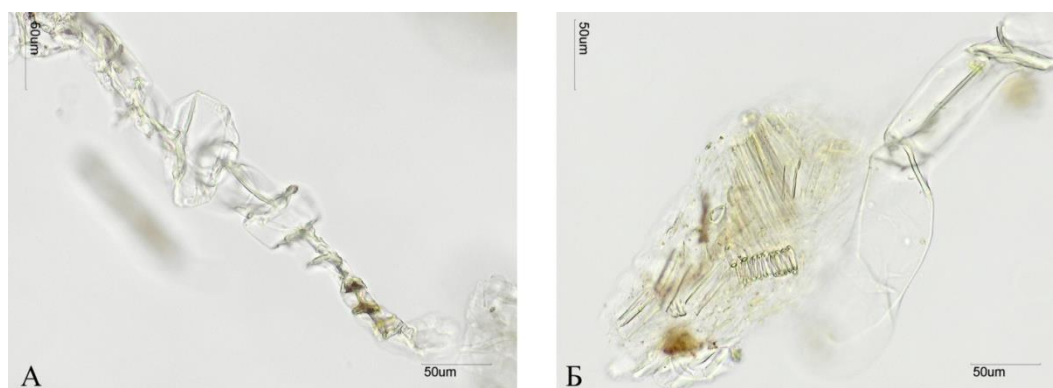


Рисунок 33 – Порошок сырья «Одуванчика лекарственного трава», 0,5 мм (x400).

А – фрагмент трихомы; Б – фрагмент трихомы и паренхимы листа.

Полученные данные морфологического и анатомо-гистологического строения надземной части одуванчика лекарственного позволили разработать раздел «Микроскопия» проекта ФС «Одуванчика лекарственного трава».

3.3. Изучение вопросов диагностики примесных видов к одуванчику лекарственному

Одним из вопросов современной фармакогнозии является проблема диагностики лекарственного растительного сырья, как в цельном, так и в измельченном виде. При этом основным методом подтверждения подлинности является метод морфолого-анатомического анализа. Указанный метод позволяет отличать целевой вид растения от примесного, тем самым выявляя фальсификат [45, 98, 125, 140].

Для одуванчика лекарственного в качестве примесных видов можно рассматривать другие виды одуванчика, произрастающие в приблизительно схожих ареалах и экологических условиях среды (см. главу 1 настоящих исследований). Кроме того, в качестве примесного вида можно рассматривать цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.), листья которого имеют высокую степень сходства морфологических признаков с одуванчиком [98]. Указанное сходство повышает вероятность случайного или намеренного подмешивания примесного вида в целевое сырье [31, 45, 69, 98, 112, 125].

В настоящей главе нами приводятся результаты собственных исследований по изучению морфологических и анатомо-гистологических признаков травы одуванчика позднего и цикория обыкновенного как примесных видов к одуванчику лекарственному, произрастающих на территории Российской Федерации.

3.3.1. Морфолого-анатомические особенности надземной части одуванчика позднего

Морфологически одуванчик поздний *Taraxacum serotinum* (Waldst. & Kit.) Poir. весьма схож с одуванчиком лекарственным (рис. 34) и имеет близкие с ним ареалы обитания [31, 69, 112].

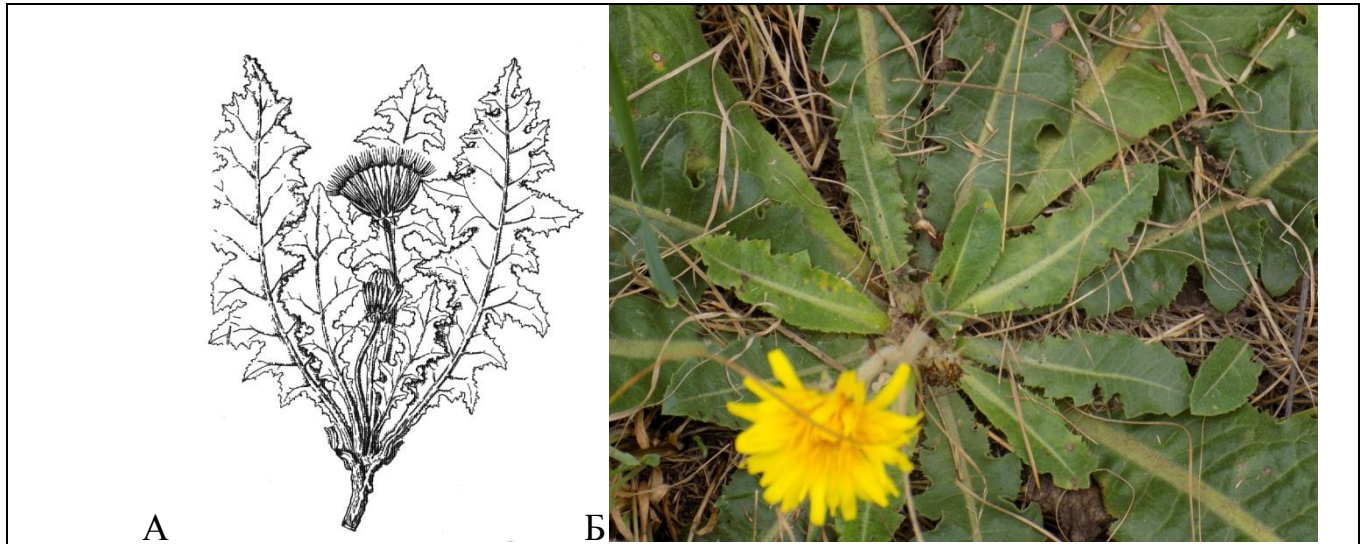


Рисунок 34 – Одуванчик поздний (*Taraxacum serotinum*).

А – схема-рисунок одуванчика позднего (Губанов, 2007 г.) [31]; Б – одуванчик поздний в природе, Самарская область 2015 г.

Форма листовой пластинки одуванчика позднего незначительно отличается от таковой у одуванчика лекарственного [31, 69, 112]. В качестве отличительной особенности необходимо отметить заметное жесткое опушение поверхности листа и его плотную, кожистую консистенцию, хорошо заметную при макроскопическом анализе (рис. 34Б).

Анатомически лист одуванчика позднего также не однороден по своей длине, как и лист одуванчика лекарственного (рис. 35).

Очертание поперечного сечения в месте прикрепления листа уплощенное широко-треугольное, с адаксиальной стороны ровное с оттянутыми краями (рис. 35). Необходимо отметить, что очертание указанного места среза листа одуванчика позднего по форме отличается от выраженной треугольной формы одуванчика лекарственного (рис. 3Г).

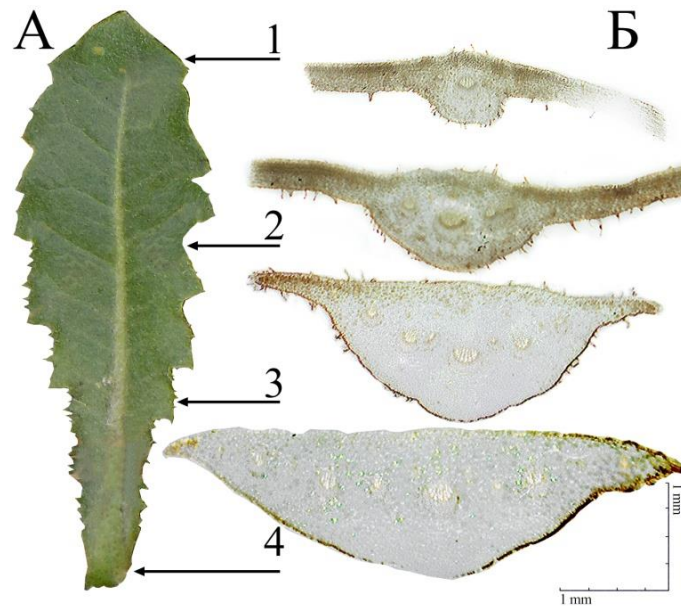


Рисунок 35 – Анатомия поперечных срезов листа одуванчика позднего (*Taraxacum serotinum*).

А – общий вид листа одуванчика позднего; Б – поперечные сечения листа одуванчика позднего.

Обозначения: 1 – сечение листа в апикальной части; 2 - сечение листа в медиальной части; 3 - сечение листа в базальной части; 4 - сечение листа в месте прикрепления.

Проводящая система представлена совокупностью разноразмерных пучков коллатерального типа. Самый крупный пучок расположен в центре среза. Пучки округлой формы с сильно развитой флоэмной частью (Приложение 1, рис. 9). На периферии флоэмы локализован мощный слой крупных клеток с утолщенными стенками, по краю которого хорошо заметны млечники с темным латексом окрашиваемым в розовый цвет при обработке раствором Судана III (Приложение 1, рис. 12). Структура проводящих пучков одуванчика позднего гистологически не отличается от таковой у пучков одуванчика лекарственного и может являться общим диагностическим признаком для представителей рода *Taraxacum*.

Лист в месте прикрепления сильно паренхимизирован. Паренхима крупноклеточная, на поперечном сечении клетки округлые с мелкими межклетниками. Хлоренхима локализована по углам среза (Приложение 1, рис.

8А). Колленхима слабо выражена (Приложение 1, рис. 8Б). Эпидермис в месте прикрепления листа голый. Протопласты клеток эпидермиса сильно пигментированы в бурый цвет (Приложение 1, рис. 8А), что значительно отличает одуванчик позднего от одуванчика лекарственного.

В базальной части форма среза имеет вид полукруга с оттянутыми краями листовых пластинок (рис. 36). Проводящие пучки расположены в два ряда. Нижний ряд составлен из крупных коллатеральных пучков, описанных выше для места прикрепления листа. Верхний ряд, ближе к адаксиальной стороне листа, представлен мелкими пучками с крупными млечниками (Приложение 1, рис. 10). Мелкие пучки хорошо диагностируются при люминесцентной микроскопии по ярко-желтому свечению сосудистых элементов ксилемы (Приложение 1, рис. 11 Б).

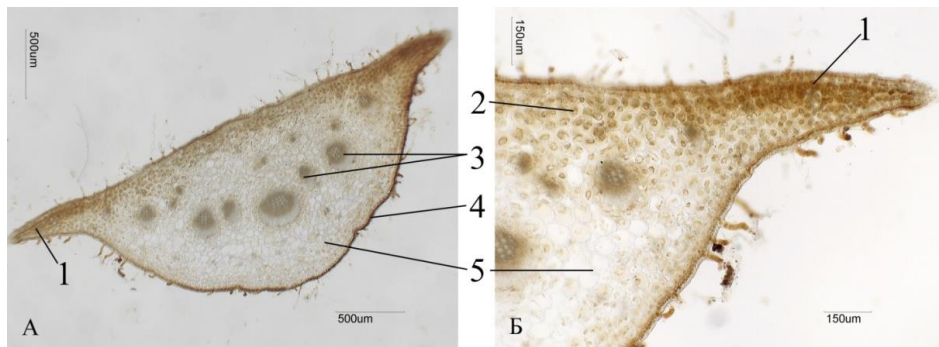


Рисунок 36 – Базальная часть листа одуванчика позднего. Поперечный срез. А – Общий вид (x40); Б – Фрагмент края пластинки (x100).

Обозначения: 1 - эпидермис; 2 - мезофилл; 3 - пучки; 4 – абаксиальная сторона листа; 5 – паренхима жилки.

Необходимо отметить отсутствие крупных ослизняющихся полостей в паренхиме места прикрепления, базальной и медиальной части листа одуванчика позднего, что на наш взгляд является значительным гистологическим признаком в диагностике сравниваемых видов. В медиальной части листа одуванчика позднего отсутствует также полость в центральной жилке, характерная для одуванчика лекарственного (рис. 3В).

Кроме того, заметны отличия в характере армированности листьев сравниваемых видов. Так у листьев одуванчика позднего слабо представлена

колленхима, в то время как у листьев одуванчика лекарственного уголково-пластинчатая колленхима значительно представлена, особенно с абаксиальной стороны базальной части (рис. 8).

Базальная часть также сильно паренхимизирована. Хлоренхима расположена по верхней стороне жилки и во фрагментах листовой пластинки (Приложение 1, рис. 14А). Протопласты хлоренхимных клеток окрашиваются в розовый цвет при обработке раствором Судана III (Приложение 1, рис. 14Б) и люминесцируют розовым цветом за счет хлорофилла (Приложение 1, рис. 11Б).

Эпидермальные клетки аналогично месту прикрепления сильно пигментированы (Приложение 1, рис. 10, 13А). Поверхность листа в медиальной части заметно опушена однорядными, реже двурядными кроющими трихомами с сильно пигментированными протопластами (Приложение 1, рис. 13А). Колленхима уголкового, расположена с абаксиальной стороны центральной жилки и насчитывает два ряда клеток (Приложение 1, рис. 13Б).

В апексе листа центральная жилка значительно уступает в размерах медиальной части. Проводящая система сложена из одного крупного коллатерального пучка и нескольких мелких в количестве от 2-х до 4-х (рис. 37 Б).

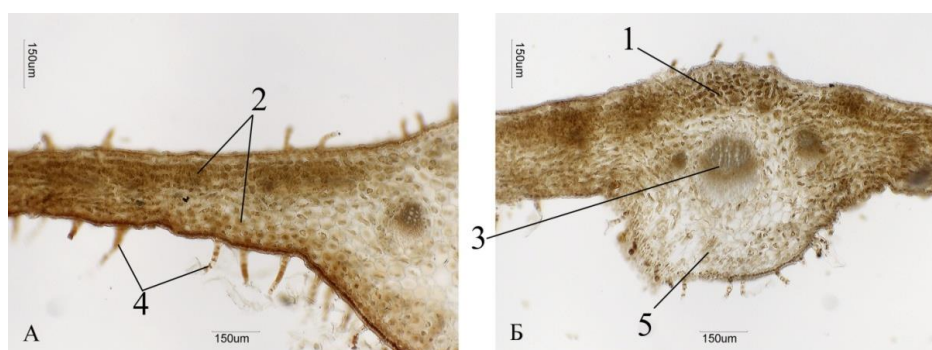


Рисунок 37 – Поперечный срез листовой пластинки одуванчика позднего.

А – фрагмент листовой пластинки в медиальной части; Б – фрагмент листовой пластинки в апикальной части.

Обозначения: 1 – колленхима над жилкой; 2 - мезофилл; 3 – центральный пучок жилки; 4 - трихомы; 5 – паренхима жилки.

Опушение апикальной части листа аналогично описанному выше для медиальной части, при этом волоски меньше и расположены главным образом по центральной жилке (рис. 37).

Цветонос одуванчика позднего морфологически сходен с таковым у одуванчика лекарственного. Основным отличием при макроскопическом анализе является выраженное опушение поверхности по всей его длине.

При анализе поперечных срезов цветоноса выявлен аналогичный цветоносу одуванчика лекарственного переходный тип строения (рис. 38). Центральный цилиндр представлен разноразмерными чередующимися коллатеральными пучками. Очертание цветоноса ребристое, при этом, как и у одуванчика лекарственного, крупные пучки соответствуют ребрам цветоноса (рис. 38).

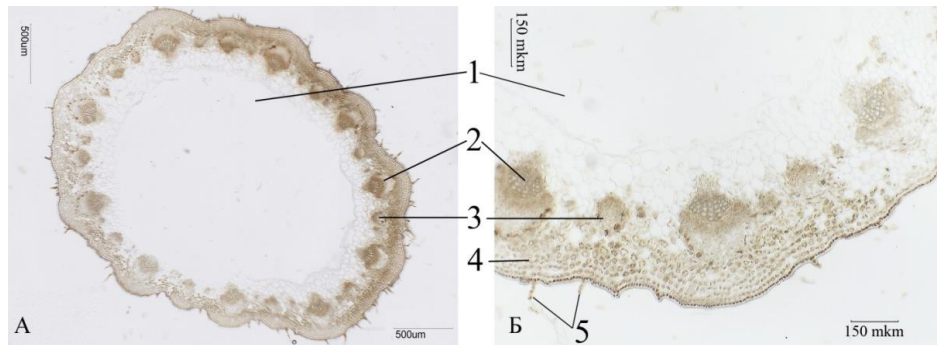


Рисунок 38 – Цветонос одуванчика позднего (*Taraxacum serotinum*). Поперечный срез.

А – общий вид (x40); Б – фрагмент цветоноса(x100).

Обозначения: 1 – полость; 2 – первичные коллатеральные пучки; 3 – вторичные коллатеральные пучки; 4 – хлоренхима; 5 - трихомы.

Проводящие пучки аналогичны по строению пучкам цветоносов одуванчика лекарственного. На периферии пучков локализованы млечники с пигментированным млечным соком, окрашиваемым в розовый цвет при обработке раствором Судана III (Приложение 1, рис. 3). При микроскопировании в УФ-свете наблюдается флуоресценция у ксилемы пучков - желтый цвет, у латекса млечников – оранжево-розовый (Приложение 1, рис. 4).

Эпидермальные клетки цветоноса одуванчика позднего при рассмотрении с поверхности прозенхимные с усеченными концами, угловатые, что не отличает их

от эпидермальных клеток цветоносов одуванчика лекарственного. Устьичные аппараты анамоцитного типа, встречаются редко (рис. 39Б).

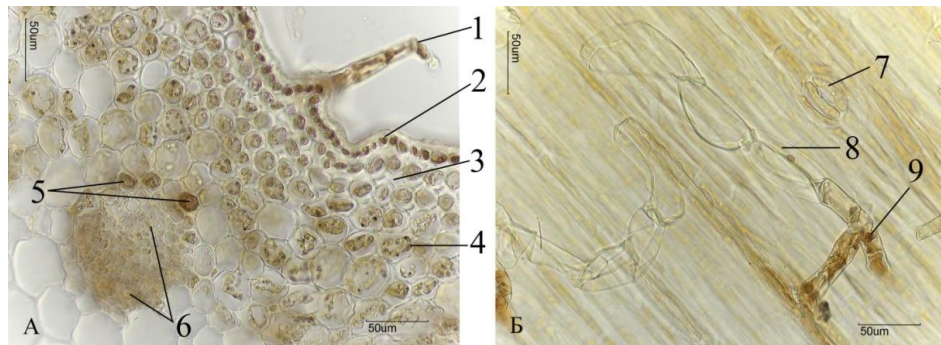


Рисунок 39 – Трихомы на эпидерме цветоноса (x400).

А – трихома на поперечном срезе; Б – трихомы, вид с поверхности.

Обозначения: 1 – трихома; 2 – эпидермис; 3 – колленхима; 4 – хлоренхима; 5 – млечники; 6 – пучок; 7 – устьичный аппарат; 8 – непигментированные клетки трихом; 9 – пигментированные клетки основания трихом.

Эпидермальные клетки цветоносов одуванчика позднего при рассмотрении на поперечном сечении округлые, с сильно утолщенными, целлюлозными оболочками (рис. 39А). Протопласты эпидермальных клеток, аналогично с эпидермисом листа пигментированы в бурый цвет. Кроме того, при микрокопировании в УФ-свете протопласты клеток эпидермы флуоресцируют оранжево-розовым цветом (Приложение 1, рис. 5Б).

Как указывалось выше, поверхность цветоносов сильно опушена. При микрокопировании хорошо заметны скопления крупных кроющих волосков схожих по строению с однорядными волосками на нижнем эпидермисе одуванчика лекарственного (рис. 9). Волоски в основании имеют ряд округлых тонкостенных клеток с пигментированным протопластом в бурый цвет (Приложение 1, рис. 7А). Конечные клетки волосков крупные тонкостенные смятые. Протопласты в них не выражены (рис. 39).

При микрокопировании поверхности цветоноса в УФ-свете оболочки трихом флуоресцируют неодинаково. У клетки основания волосков бурая флуоресценция, у конечных клеток – желтая (Приложение 1, рис. 7Б).

3.3.2. Морфолого-анатомические особенности надземной части цикория обыкновенного

Морфологические особенности строения цикория достаточно хорошо изучены и описаны во многих определителях растений [31, 57, 69, 91]. Как известно, цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) - многолетнее травянистое зелёное или сизоватое растение высотой до 120 см (рис. 40). Стебель цикория прямой, с оттопыренными ветвями, более или менее шершавый, как и лист. Нижние листья цикория собраны в прикорневую розетку. По форме листовая пластинка цикория выемчато-перистораздельного типа, с более крупной верхушечной долей [31, 57, 68, 91]. Стеблевые листья цикория стеблеобъемлющие, имеют ланцетную форму. Их край острозубчатый, реже ровный [31, 57, 68, 91].

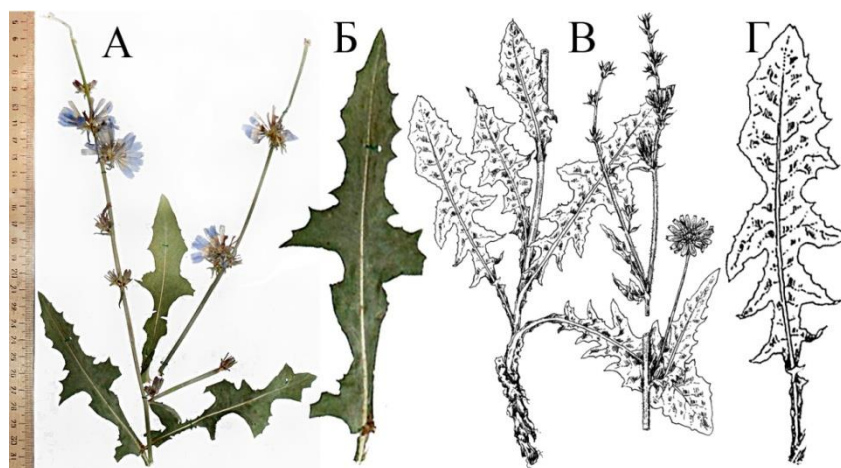


Рисунок 40 - Цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.).

А – гербарный экземпляр кафедры фармакогнозии СамГМУ, общий вид; Б – гербарный экземпляр кафедры фармакогнозии СамГМУ, лист цикория [106]; В – схематичный рисунок цикория, общий вид; Г - схематичный рисунок листа цикория [31].

Соцветия цикория – сидячие корзинки, диаметром от 2,5 до 4,5 см. Они расположены на верхушках стебля, его боковых ветвей и в пазухах верхних и нижних листьев [31, 57, 69, 91]. Обёртки соцветий по краям реснитчатые, наружные листочки обертки яйцевидно-ланцетные, острые; внутренние -

линейные, туповатые. Все цветки цикория язычковые, обычно длиннее обёртки. Они обоеполые, голубого, розово–голубого, синего цвета, реже белые [31, 57, 69, 91].

Нами проведен сравнительный обзор научной литературы, описывающей морфологию надземной части одуванчика лекарственного и цикория обыкновенного, а также проведены собственные исследования. С целью выявления селективных морфологических признаков, отличающих один вид от другого, известные литературные признаки и результаты собственных исследований занесены в сравнительную таблицу (Приложение 2, табл.1).

Из таблицы видно, что большая часть морфологических признаков листьев сравниваемых видов недостаточно диагностичны. Наиболее отличительными чертами листа цикория можно считать особенности строения основания листовой пластинки и характер ее опушения (Приложение 2, табл.1).

Очевидно, что морфологические особенности играют большую роль особенно на этапе заготовки сырья, а также при его приемке в цельном виде. Однако в фармацевтической практике лекарственное растительное сырье, как правило, измельчают, при этом морфологические признаки теряют свое диагностическое значение. Ввиду выше сказанного, для более тонкой диагностики и выявления примесного вида необходимы данные о характерных анатомо-гистологических признаках растительного объекта.

Надземная часть цикория в отличие от одуванчика в процессе вегетации помимо прикорневой розетки листьев образует ветвистый стебель с соцветиями. Для более полной диагностики цикория нами были изучены отдельные его части, а именно, листья и стебли (рис. 40).

Анатомически лист цикория дорзовентрального типа строения (рис. 41). При этом из-за рыхлой структуры ассимиляционной ткани столбчатый и губчатый мезофилл плохо диагностируется (приложение 3, рис. 5). Столбчатый мезофилл расположен с обеих сторон листа, что наиболее заметно в листовых пластинках ближе к центральной жилке (приложение 3, рис. 1). Рыхлый мезофилл,

расположенный в центре листовой пластинки, выражен слабее (приложение 3, рис. 5).

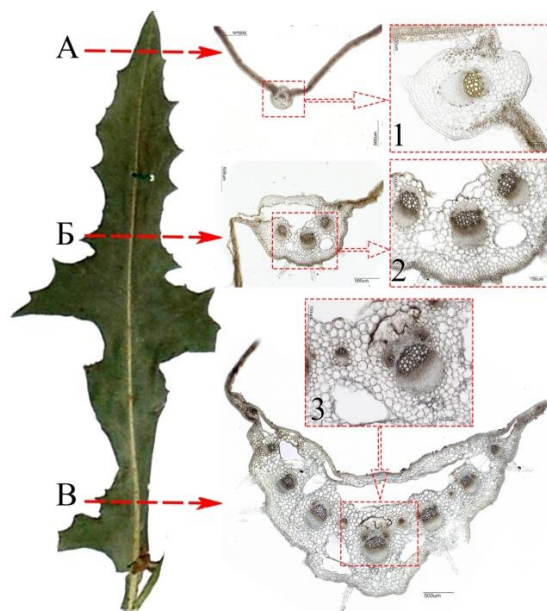


Рисунок 41 - Поперечные сечения листа цикория обыкновенного.

А - апикальная часть листовой пластинки; Б – медиальная часть листовой пластинки; В – базальная часть листовой пластинки.

Обозначения: 1 – центральная жилка листа; 2 – пучки медиальной части; 3 – пучок центральной жилки базальной части.

Клетки мезофилла паренхимные, тонкостенные, их протопласт окрашивается 0,5% раствором Судана III в розовый цвет. В мезофилле встречаются мелкие коллатеральные пучки вторичных жилок (приложение 3, рис. 5Б).

Центральная часть листа цикория сильно паренхимизирована округлыми клетками с целлюлозными оболочками. В паренхиме встречаются мелкие межклетники (рис. 41). Протопласт клеток паренхимы слабо диагностируется (приложение 3, рис. 6).

Центральная часть листа армирована уголково-пластинчатой колленхимой. Колленхима насчитывает 1-2 ряда клеток с верхней и нижней стороны центральной жилки, с ее бортов колленхима может отсутствовать (приложение 3, рис. 6, 7).

В паренхиме средней части, по всей длине листа встречаются полости респираторного происхождения. При этом ближе к основанию листа полости наиболее крупные (рис. 41).

Проводящая система центральной части листа цикория представлена совокупностью разноразмерных закрытых коллатеральных пучков. Количество пучков варьирует по длине листа. Наибольшее их количество в основании (рис. 41В).

Пучки на поперечном сечении овальной формы. Флоэмная часть наиболее выражена. Она значительно армирована клетками с сильно утолщенными целлюлозными оболочками (приложение 3, рис. 2Б). Проводящие элементы флоэмы мелкоклеточные, сгруппированы непосредственно вблизи ксилемы. По периферии со стороны флоэмной части пучка расположены млечники хорошо заметные по аморфному латексу, окрашиваемому в розовый цвет 10% раствором Судана III (приложение 3, рис. 3).

Ксилемная часть пучка сложена из радиально расположенных сосудов с паренхимой сердцевинных лучей. Со стороны ксилемы пучок незначительно армирован клетками с толстыми целлюлозными оболочками (приложение 3, рис. 2Б).

Эпидермис обеих сторон листа относительно однородный. Клетки эпидермы с обеих сторон тонкостенные паренхимные с волнисто извилистыми целлюлозными клеточными стенками (приложение 3, рис. 8А, 11Б). На верхней стороне изредка встречаются растрескивания с бурыми краями (приложение 3, рис. 8Б).

При рассмотрении на поперечном сечении эпидермальные клетки листовой пластинки овальной формы с заметно утолщенными клеточными стенками с поверхности листа. Эпидермис покрыт тонким слоем кутикулы, проявляющимся по розовой окраске 10% раствором Судана III (приложение 3, рис. 5А).

Эпидермис над крупными центральными жилками сложен из вытянутых веретеновидных клеток. В протопласте эпидермальных клеток над жилкой диагностируются пластиды (приложение 3, рис. 12Б).

Лист цикория амфистоматический. Устьица анамоцитного типа локализованы на обеих его сторонах.

С поверхности лист опушен многоклеточными волосками. Волосков два типа. Первый тип встречается реже и представлен однорядными тонкостенными волосками с темноокрашенным протопластом клеток. Волоски описанного типа встречаются в основном с нижней стороны как на основной эпидерме (приложение 3, рис. 11Б), так и по эпидерме над жилкой (приложение 3, рис. 12А).

Трихомы второго типа многорядные, с широким многоклеточным основанием, от двух (приложение 3, рис. 9) до четырех клеток в толщину (приложение 3, рис. 11А, 13А, 14Б). Основание волосков сложено из толстостенных клеток, расположенных по окружности (приложение 3, рис. 13Б). Клетки многорядных трихом покрыты бородавчатой кутикулой (приложение 3, рис. 14А).

Многорядные трихомы могут быть железистыми и кроющими. Кроющие трихомы оканчиваются сильно спавшимися клетками (приложение 3, рис. 15). Железистые трихомы оканчиваются небольшой железистой головкой (приложение 3, рис. 18А).

При рассмотрении на поперечном сечении стебель цикория имеет переходный тип строения, то есть его центральный цилиндр представлен совокупностью хорошо развитых открытых коллатеральных пучков, перемежающихся с мелкими вторичными пучками, образованными межпучковым камбием (рис. 42).

В центре стебля локализована крупная неослизняющаяся полость. Паренхима сердцевины мощная, клетки ее округлые, разноразмерные, с лигнифицированными оболочками. Паренхима сердцевины занимает до 1/3 всего объема стебля (рис. 42).

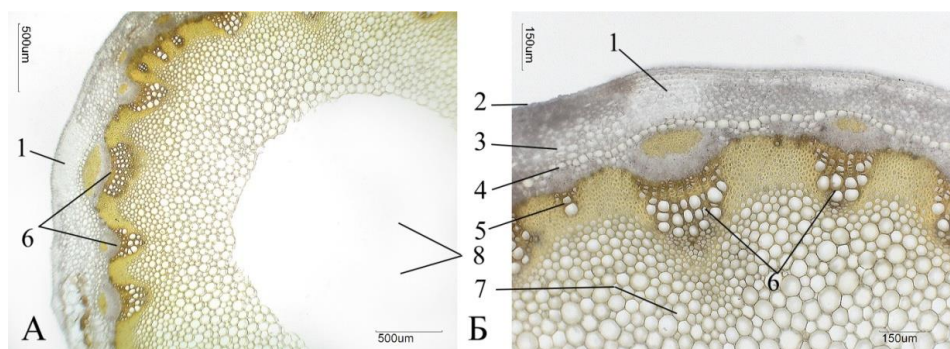


Рисунок 42 - Стебель цикория. Поперечный срез.

А – общий вид (x40); Б – фрагмент коровой части и центрального цилиндра (x100).

Обозначение: 1 – *угловато-пластинчатая колленхима*; 2 – *эпидермис*; 3 – *хлоренхима первичной коры*; 4 – *эндодерма*; 5 – *вторичный пучок*; 6 – *коллатеральные пучки*; 7 – *паренхима сердцевины*; 8 – *полость*.

Стебель с поверхности покрыт эпидермой, имеющей слой мелко бородавчатой кутикулы, хорошо диагностирующейся по розовой окраске раствором Судана III (приложение 3, рис. 17, 19Б). При рассмотрении на поперечном сечении эпидермис сложен из округлых клеток с сильно утолщенными внешними стенками.

При рассмотрении с поверхности эпидермальные клетки неправильной многоугольной формы. Они слабо вытянутые и имеют заметно утолщенную клеточную стенку. Устьица в эпидерме стебля встречаются редко. Они анамоцитного типа (приложение 3, рис. 16А).

Под эпидермой прерывистыми блоками расположена угловато-пластинчатая колленхима, наиболее выраженная над крупными пучками (приложение 3, рис. 19А).

Паренхима первичной коры тонкостенная, с большим количеством хлоропластов (приложение 3, рис. 19Б). Она подстигается хорошо заметной эндодермой, клетки которой отличаются от хлоренхимы коры большими размерами и заметно утолщенной клеточной стенкой (приложение 3, рис. 19А).

Клеточные стенки эндодермы окрашиваются в розовый цвет при обработке раствором Судан III (приложение 3, рис. 20А).

Открытые коллатеральные пучки конической формы. Ксилема представлена радиально расположенными крупными сосудами (приложение 3, рис. 21). Флоэмная часть пучка представлена мелкими тонкостенными клетками с целлюлозными оболочками. К периферии флоэма армирована группой склеренхимных волокон (приложение 3, рис. 20).

Между пучками локализован мощный слой склерифицированных клеток с заметно утолщенными клеточными стенками, образующими непрерывный склерифицированный слой (приложение 3, рис. 19).

Стебли цикория, как и листья жестко опушены. Опушение стеблей составляют трихомы с аналогичной структурой, описанной ранее для листа. Многоклеточные многорядные трихомы часто обламываются у основания (приложение 3, рис. 19А), оставляя след, который со временем темнеет и легко диагностируется на поверхности эпидермы (приложение 3, рис. 16Б).

Полученные данные морфолого-анатомического анализа надземной части цикория позволили нам провести сравнение известных признаков гистологического строения листа одуванчика. Результаты сравнения приведены в таблице 2 приложения 2.

Из сравнительной таблицы видно, что наиболее значимыми отличительными признаками являются следующие гистологические элементы:

- Особенности развития паренхимы центральной жилки листа; у одуванчика она представлена аэренхимой, у цикория – основной паренхимой с рексигенными полостями.
- Особенности проводящей системы, заключающейся в размере и количестве проводящих пучков центральной жилки, а также особенностях их расположения (приложение 2, табл. 2).
- Различие в строении трихом. У одуванчика отсутствуют железистые трихомы. Опушение листа одуванчика представлено двумя типами волосков двух и многорядными (с широким коническим основанием). У цикория три типа

трихом: однорядные тонкостенные с темным протопластом; двурядные кроющие и двух-,трехрядные железистые с небольшой головкой.

Таким образом, нами изучены морфолого-анатомические признаки травы одуванчика лекарственного, произрастающего в различных районах Российской Федерации в сравнении с примесными видами. Подтверждены и дополнены имеющиеся зарубежные и отечественные данные об особенностях их строения.

По результатам проведенных исследований разработан раздел «Микроскопия» для проекта ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Одуванчика лекарственного трава» (приложение 5).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.

В результате проведенных морфолого-анатомических исследований надземной части одуванчика лекарственного и возможных примесных видов (одуванчика позднего и цикория обыкновенного) были сделаны следующие выводы:

1. Виды рода *Taraxacum* имеют высокую степень сходства морфологических признаков ввиду их полиморфизма. В качестве примесных видов к одуванчику лекарственному также могут выступать представители семейства *Asteraceae*, имеющие сходные морфологические особенности листовой пластинки, в частности, цикорий обыкновенный.

2. Морфологические признаки листовых пластинок не позволяют селективно выявлять примесные виды. При макроскопическом анализе единственным достоверным признаком может являться особенность опушения листовых пластинок, которые у одуванчика лекарственного голые, у одуванчика позднего – слабо-войлочные, у цикория – жестко-волосистые. Что касается формы, она может значительно варьировать в зависимости от экологических факторов и не значительно отличает сравниваемые виды друг от друга.

3. Наличие стеблевой части имеет значение в зависимости от времени заготовки. Учитывая наши рекомендации заготовки травы одуванчика лекарственного в весенний период (см. главу 4 настоящих исследований), наличие стеблей является актуальным признаком, позволяющим выявлять фальсификацию сырья в виде подмеси цикория обыкновенного.

4. В качестве селективных признаков, позволяющих достоверно отличать листовые пластинки сравниваемых видов, могут выступать анатомо-гистологические особенности строения поперечных сечений в базальной и медиальной части, а также особенности их опушения.

5. Основными диагностическими признаками для использования в подтверждении подлинности нового ЛРС «Одуванчика лекарственного трава» являются:

- Форма (очертание) поперечного сечения базальной и медиальной части листа;
- Наличие крупной ослизняющей полости в центре медиальной части листа;
- Выраженная аэренхима центральной жилки с крупными ослизняющимися межклетниками;
- Опушение, представленное двумя типами кроющих многоклеточных трихом: с узким двух-, трехрядным основанием и с широким многорядным основанием.

6. К второстепенным (дополнительным) признакам, общим для представителей рода *Taraxacum* и позволяющим отличать одуванчик от примесей других родов, является:

- Наличие крупных и мелких коллатеральных пучков с выраженной флоэмной частью и млечниками с бурым млечным соком;
- Эпидермальные клетки с нижней стороны листовой пластинки неправильной формы с сильно извилистыми стенками, с верхней стороны эпидермиса – угловатые, слабовытянутые;
- Лист одуванчика лекарственного амфистоматический, устьица аномоцитного типа, чаще встречаются на листовой пластинке, чем на жилке, размер устьиц варьирует.

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО

Трава одуванчика лекарственного широко применяется в отечественной и зарубежной народной медицине благодаря широкому спектру фармакологической активности [91]. Однако отсутствие нормативной документации в РФ на данный вид сырья препятствует его использованию в официальной медицинской практике. Для разработки проекта фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Одуванчика лекарственного трава», а также для обоснования методик качественного анализа и количественного определения БАС, потребовались исследования химического состава надземной части одуванчика лекарственного.

По литературным данным известно [53, 57, 127, 139, 156, 163], что в корнях и надземной части одуванчика лекарственного содержатся флавоноиды (лютеолин, цинарозид, 7-рамнозилглюкозид лютеолина), фенилпропаноиды, или гидрокискоричные кислоты и их производные (*n*-кумаровая, кофейная, феруловая кислоты, хлорогеновая кислота, цикориевая кислота), тритерпеновые сапонины (тараксастерин и др.), стерины (β -ситостерин и др.) и целый ряд других вторичных и первичных метаболитов. Однако, несмотря на высокую степень изученности химического состава надземной части одуванчика лекарственного, до сих пор существует противоречивость взглядов относительно подходов к стандартизации сырья данного растения [131, 150]. На наш взгляд, это связано с тем, что на фоне обилия литературных данных о химическом составе надземной части одуванчика лекарственного не существует четкого представления относительно того, какая группа биологически активных соединений является преобладающей и имеется ли среди них доминирующее вещество.

4.1. Выделение индивидуальных веществ из надземной части одуванчика лекарственного

Выделение БАС проводили методом колоночной хроматографии. Исследованию подвергали настойку одуванчика лекарственного, полученную методом модифицированной дробной мацерации на 70% спирте этиловом. Из 210

г сырья получили 1050 мл настойки. Для проведения колонки 950 мл настойки упарили в роторном вакуумном упаривателе до жидкого экстракта, объем которого составил примерно 100 мл. Полученный жидкий экстракт наносили на сорбент - силикагель L 40/100 (КСКГ измельченный, фр. 0,04 – 0,10 мм ГОСТ 39 56-76 Sorbis Group 05.2012) и высушивали полученную пробу. Навеска сорбента для пробы 57,0 г, что составило примерно 30% от массы сырья. Приблизительно такое же количество сорбента отмеривали для колонки.

Высушенный порошок с пробой (сухой экстракт + силикагель) наносили на слой силикагеля (диаметр – 8 см, высота – 6 см), сформированный в виде взвеси в хлороформе. Хроматографическую колонку элюировали хлороформом и смесью хлороформ-этанол и этанол-вода в различных соотношениях. Ход элюации представлен в таблице 3.

Таблица 3

Схема элюирования хроматографической колонки

Хлороформ	Спирт	Объём	№ фракции
100%	0%	800 мл	1-7
93%	7%	500 мл	8-10
90%	10%	500 мл	11-12
85%	15%	1200 мл	13-18
80%	20%	1000 мл	19-23
75%	25%	200 мл	24
70%	30%	600 мл	25-27
60%	40%	600 мл	28-30
50%	50%	600 мл	31-33
40%	60%	7000 мл	34-37
Вода	96%	500 мл	38-39
30%	70%	400 мл	40-42
100%	0%	400 мл	43-45

Полученные фракции собирали в маркированные емкости и упаривали в вакуумном выпарителе до объема 10 мл. Полученные концентрированные фракции количественно переносили в пенициллиновые флаконы и подвергали дальнейшему исследованию.

Детектирование хода элюации проводили визуально (по интенсивности окрашивания раствора), а также с использованием метода тонкослойной хроматографии. На хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», предварительно активированную в сушильном шкафу при 105°C, наносили концентрированные фракции. Разделение проводили в системе растворителей *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2). После прохождения фронтом 7-8 см пластинку вынимали, высушивали и просматривали в УФ-свете при длине волны 366 нм и 254 нм, а затем обрабатывали щелочным раствором ДСК или ФМК.

В качестве объекта-свидетеля использовали настойку травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом, а также РСО рутина, хлорогеновой кислоты, цинарозида, трицина и лютеолина.

4.2. Исследования фракций, содержащих важнейшие индивидуальные вещества из надземной части одуванчика лекарственного

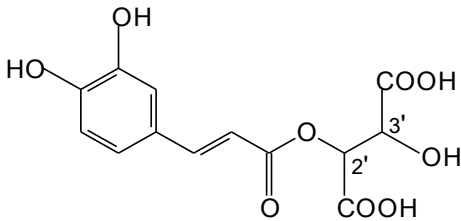
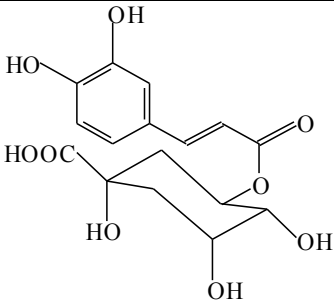
По результатам ТСХ-анализа были определены фракции, содержащие доминирующие вещества. Фракции (элюент - хлороформ), содержащие соединение **7**, были объединены, выпавший из них осадок был отделен и перекристаллизован из спирта этилового. Фракции (хлороформ-этанол, 40:60), содержащие доминирующее вещество **1**, были объединены, упарены и подверглись рехроматографии на полиамиде (элюирование водой и водным раствором спирта этилового с концентрацией 20%, 40%, 70%, 96%). Окончательную очистку соединения **1** осуществляли рехроматографией на силикагеле, элюируя хроматографическую колонку спирто-хлороформной смесью в различных соотношениях. При этом получено вещество **1** с выходом 0,1 % от массы воздушно-сухого сырья. Фракции (элюент - этанол), содержащие вещество **2**, также последовательно рехроматографировали на полиамиде и силикагеле аналогично веществу **1**. Фракции (хлороформ-этанол, 93:7 и 90:10), содержащие соединения **3-5**, наносили на полиамид «Wolem» с целью дальнейшей очистки. Сухой порошок (упаренные фракции+полиамид) переносили в хроматографическую колонку (высота сорбента – 5,0 см, диаметр – 4 см), которую элюировали водой и водным раствором спирта этилового (20%; 40%; 70%; 96%). В результате проведенной очистки на колонке с полиамидом были получены вещество **3** (элюент – вода), вещество **4** (элюент - 70% этиловый спирт) и вещество **5** (элюент - 96% этиловый спирт), очистка которых осуществлялась перекристаллизацией из водного спирта. Фракции, полученные на первой колонке (хлороформ-этанол, 90:10; 85:15; 80:20; 70:30) и содержащие соединение **6**, рехроматографировали на полиамид «Wolem», элюируя водой и водным раствором спирта этилового (20%; 40%; 70%; 96%). Полученное при этом вещество **6** (элюент - 40% этиловый спирт) очищали путем перекристаллизации из водного спирта.

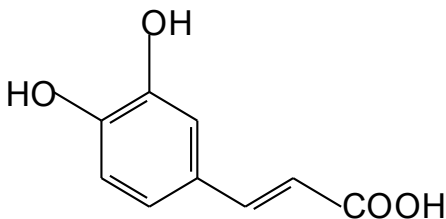
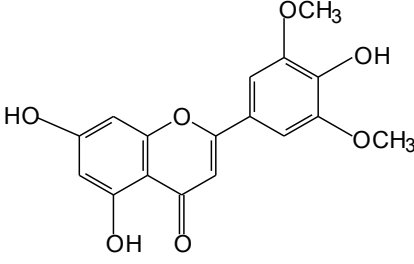
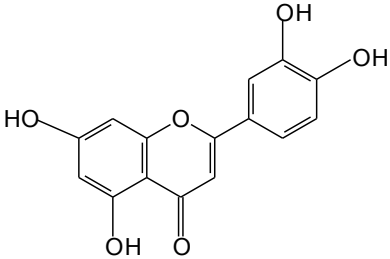
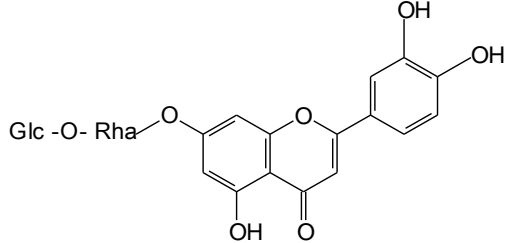
4.2.1. Физико-химические и спектральные характеристики выделенных индивидуальных веществ

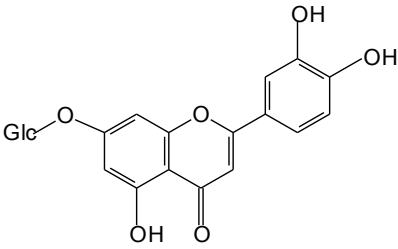
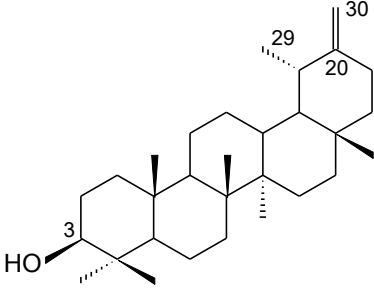
В результате проведения пробоподготовки были выделены индивидуальные вещества из фракций №1-2, 10, 11, 24-27, 42-43. Для установления структуры полученных соединений выделенные вещества исследовали методом ТСХ, спектроскопии, масс-спектропии и ЯМР. Спектры ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C получали на приборах «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30», регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena). Полученные экспериментальные данные представлены в таблице 4.

Таблица 4

Физико-химические и спектральные характеристики выделенных веществ

№ п/п	Название	Химическая формула	Физико-химические характеристики
1.	Кафтаровая кислота $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_9$ 2 ¹ – кофеилвинная кислота		Аморфное вещество светло-желтого цвета. УФ-спектр: λ_{max} 217, 243, 299 нм, 330 нм (EtOH).
2.	Хлорогеновая кислота $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$		Кристаллы белого цвета, т. пл. 201-203 °С (вода). УФ-спектр: λ_{max} 217, 243, 297 нм, 330 нм (EtOH).

3.	<p>Кофейная кислота C₉H₈O₄</p>		<p>Кристаллы желтого цвета, т. пл. 217-220 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ_{max} 217, 242, 298 нм, 328 нм (EtOH).</p>
4.	<p>Трицин C₁₇H₁₄O₇ 5,7,4¹-тригидрокси- 3¹,5¹- диметоксифлавонон</p>		<p>Игольчатые кристаллы желтого цвета, т. пл. 279- 281 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ_{max} 270, 351 нм (EtOH).</p>
5.	<p>Лютеолин C₁₅H₁₀O₆ 5,7,3¹,4¹- тетрагидроксифлавонон</p>		<p>Кристаллы желтого цвета, т. пл. 227-230 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ_{max} 256, 266 нм, 358 нм (EtOH).</p>
6.	<p>C₂₁H₂₀O₁₁ 7-O-α-L- рамнопиранозил-β- D-глюкопиранозид лютеолина</p>		<p>Кристаллы светло- желтого цвета, т. пл. 232-234 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ_{max} 257, 266 нм, 352 нм (EtOH).</p>

7.	<p>Цинарозид</p> <p>$C_{21}H_{20}O_{11}$</p> <p>7-O-β-D- глюкопиранозид лютеолина</p>		<p>Кристаллы светло-желтого цвета, т. пл. 232-234 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ_{max} 257, 266 пл, 352 нм (EtOH).</p>
8.	<p>Тараксастерин</p> <p>$C_{30}H_{50}O$</p>		<p>Игольчатые кристаллы белого цвета, т. пл. 220-222 °С (этанол).</p>

4.2.2. Идентификация выделенных веществ

Кафтаровая кислота (2¹-кофеилвинная кислота) (**1**). Аморфное вещество светло-желтого цвета состава $C_{13}H_{12}O_9$. УФ-спектры (EtOH, λ_{max} , нм): 217, 243, 299 пл, 330 нм; +AlCl₃ 305 пл, 338 нм. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 272 (55%), 257 (23%), 180 (32%), 162 (33%), 138 (43%), 137 (56%), 136 (100%), 123 (66%), 110 (84%). ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д., J/Гц): 7.48 (д, 16 Гц, H-7), 7.08 (д, 2 Гц, H-2), 7.03 (дд, 9 и 2 Гц, H-6), 6.76 (д, 9 Гц, H-5), 6.30 (д, 16 Гц, H-8), 5.53 (с, H-2¹), 3.65 (с, H-3¹). ¹³C-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д., J/Гц): 174.31 (C-9), 168.31 (C-1¹), 165.59 (C-4¹), 148.63 (C-4), 147.59 (C-7), 145.63 (C-3), 125.70 (C-1), 121.47 (C-6), 117.43 (C-5), 115.87 (C-2), 114.68 (C-8), 77.12 (C-2), 73.98 (C-3).

Хлорогеновая кислота (**2**). Кристаллы белого цвета состава $C_{16}H_{18}O_9$ с т. пл. 201-203 °С (вода). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 217, 243, 297 пл, 330 нм. ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д., J/Гц): 7,45 (д, 16 Гц, H-7), 7,09 (д, 2 Гц, H-2¹), 7,03 (дд, 2 и 8 Гц, H-6¹), 6,83 (д, 8 Гц, H-5¹), 6,21 (д, 16 Гц, H-8), 5,11 (дт, 5 и 9 Гц, H-5), 4,03 (кв, 3 Гц, H-3), 3,61 (дд, 3 и 9 Гц, H-4).

Кофейная кислота (3). Кристаллы желтого цвета состава $C_9H_8O_4$ с т.пл. 217-220 °С (водный спирт). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 217, 242, 298пл, 328 нм. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 180 (M^+ , 100%), 179 (15), 163 (20), 135 (18), 134 (41). 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 7.50 (д, 16 Гц, H-7), 7.09 (д, 2 Гц, H-2), 7.02 (дд, 9 и 2 Гц, H-6), 6.80 (д, 9 Гц, H-5), 6.31 (д, 16 Гц, H-8).

Трицин (5,7,4¹-тригидрокси-3¹,5¹-диметоксифлавонон) (4). Игольчатые кристаллы желтого цвета состава $C_{17}H_{14}O_7$ с т.пл. 279-281 °С (водный спирт). УФ-спектры (EtOH, λ_{max} , нм): 270, 351 нм; +NaOAc 275, 385 нм; + NaOAc + H_3BO_3 270, 352 нм; +AlCl₃ и AlCl₃ + HCl 278, 364, 395 нм. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 330 (M^+ , 100%). 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.97 (1H, с, 5-OH группы), 7.33 (с, 2H, H-2¹ и H-6¹), 6.99 (с, H-3), 6.57 (д, 2 Гц, H-8), 6.22 (д, 2 Гц, H-6), 3.80 (с, 6H, 2OCH₃).

Лютеолин (5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавонон) (5). Кристаллы желтого цвета состава $C_{15}H_{10}O_6$ с т.пл. 227-230 °С (водный спирт). УФ-спектры (EtOH, λ_{max} , нм): 256, 266 пл, 358 нм; +NaOAc 258, 268 (пл), 390 нм; +AlCl₃ 278, 330, 355, 400. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 286 (M^+ , 100%). 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.98 (1H, с, 5-OH группы), 7.44 (дд, 9 и 2 Гц, H-6¹), 7.42 (д, 2 Гц, H-2¹), 6.90 (д, 9 Гц, H-5¹), 6.68 (с, H-3), 6.45 (д, 2 Гц, H-8), 6.20 (д, 2 Гц, H-6).

7-O-- α -L-рамнопиранозил- β -D-глюкопиранозид лютеолина (6). Кристаллы светло-желтого цвета состава $C_{21}H_{20}O_{11}$ с т.пл. 232-234 °С (водный спирт); λ_{max} EtOH 257, 266 пл, 352 нм; +NaOAc 258, 268 (пл), 380 нм; +AlCl₃, 276, 330, 350, 394. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 286 (M^+ агликона, 100%), 153 (35), 137 (10). 1H -ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.92 (1H, с, 5-OH группы), 7.41 (дд, 9 и 2 Гц, H-6¹), 7.39 (д, 2 Гц, H-2¹), 6.92 (д, 9 Гц, H-5¹), 6.62 (с, H-3), 6.44 (д, 2 Гц, H-8), 6.21 (д, 2 Гц, H-6), 5.32 (д, 2 Гц, H-1¹¹ рамнозы), 4.25 (д, 7 Гц, H-1¹¹¹ глюкозы), 3.7-2.8 (м, 6H глюкозы + 4H рамнозы), 0.85 (д, 6 Гц, 3H, CH₃ рамнозы).

Цинарозид (7-О-β-D-глюкопиранозид лютеолина) (7). Кристаллы светло-желтого цвета состава $C_{21}H_{20}O_{11}$ с т.пл. 232-234 °С (водный спирт). УФ-спектры (EtOH, λ_{max} , нм): 257, 266 пл, 352 нм; +NaOAc 258, 268 (пл), 380 нм; +AlCl₃, 276, 330, 350, 394. Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 286 (M⁺ агликона, 100%). ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.98 (1H, с, 5-OH группы), 7.47 (дд, 9 и 2 Гц, H-6¹), 7.22 (д, 2 Гц, H-2¹), 6.92 (д, 9 Гц, H-5¹), 6.78 (д, 2 Гц, H-8), 6.73 (с, H-3), 6.45 (д, 2 Гц, H-6), 5.08 (д, 7.2 Гц, H-¹¹), 3.9-3.2 (м, 6H глюкозы).

Траксастерин (8). Игольчатые кристаллы белого цвета состава $C_{30}H_{50}O$ с т.пл. 220-222 °С (этанол). Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): M⁺ 426 (55%), 357 (4%), 315 (7%), 272 (7%), 218 (27%), 207 (63%), 189 (43%), 175 (34%), 136 (68%), 135 (100%), 122 (63%), 121 (72%), 109 (77%). ¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J/Гц): 0.75 (3H, с, H-24), 0.86 (3H, с, H-23), 0.88 (3H, с, H-28), 0.90 (3H, с, H-25), 0.91 (3H, с, H-27), 0.98 (3H, с, H-26), 1.00 (3H, д, J= 6 Гц, H-29), 3.20 (1H, дд, J= 4 и 8 Гц, H-3), 4.60 (2H, м, 2H-30). ¹³C-ЯМР-спектр (CDCl₃, 300 MHz, δ): 14.84 (C-27), 15.49 (C-26), 15.60 (C-25), 16.39 (C-24), 18.41 (C-6), 18.54 (C-28), 21.72 (C-11), 23.64 (C-29), 23.79 (C-21), 27.15 (C-12), 27.35 (C-15), 27.52 (C-2), 27.75 (C-23), 34.35 (C-7), 34.50 (C-17), 36.43 (C-10), 36.82 (C-4), 37.22 (C-16), 38.70 (C-1) 38.88 (C-13), 39.34 (C-19), 41.84 (C-8), 42.45 (C-14), 48.84 (C-18), 50.54 (C-9), 55.41 (C-5), 79.13 (C-3), 121.84 (C-30), 139.97 (C-20).

4.2.3. Описание структурных особенностей выделенных веществ

В ПМР-спектре соединения **1** (рис. 43) обнаруживаются сигналы ароматических протонов H-2 при 7.08 (д, 2 Гц), H-6 при 7.03 (дд, 9 и 2 Гц,) и H-5 при 6.76 (д, 9 Гц,) что в совокупности с сигналами протонов H-7 при 7.48 (д, 16 Гц) и H-8 при 6.30 (д, 16 Гц), а также данными масс-спектра (пик с m/z 180) и УФ-спектра свидетельствуют о наличии в молекуле остатка кофейной кислоты. Кроме того, в ПМР-спектре присутствуют сигналы протонов при 5.53 (с, H-2¹), 3.65 (с, H-3¹), соответствующие молекуле винной кислоты, что позволило идентифицировать соединение **1** с 2-кофеилвинной кислотой (кафтаровая кислота), широко встречающейся в растениях семейства *Asteraceae* [146, 161].

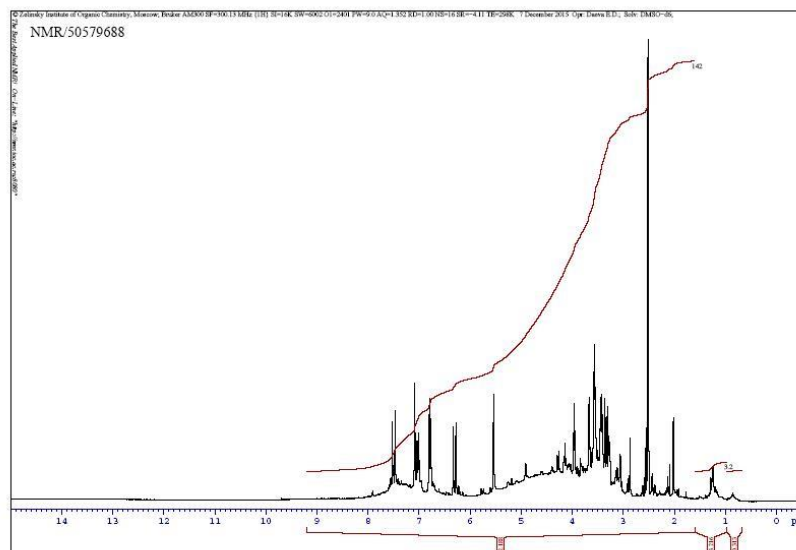


Рисунок 43 – ^1H – ЯМР спектр кафтаровой кислоты (1), выделенной из травы одуванчика лекарственного.

Структура кафтаровой кислоты подтверждается также и данными ^{13}C -ЯМР-спектром (рис. 44), приведенными в литературе для исследуемого вещества [146, 161].

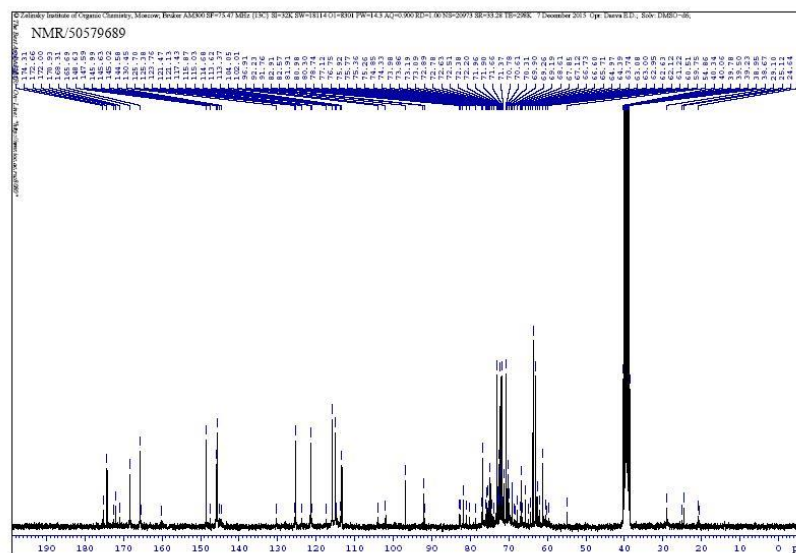


Рисунок 44 – ^{13}C – ЯМР спектр кафтаровой кислоты (1), выделенной из травы одуванчика лекарственного.

Соединение **3** идентифицировано нами на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР- и масс-спектров как кофейная кислота [55, 59].

Флавоноиды **4** и **5** имеют агликоновую природу и идентифицированы нами на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР- и масс-спектров как трицин [55, 60] и лютеолин [141], соответственно (рис. 45).

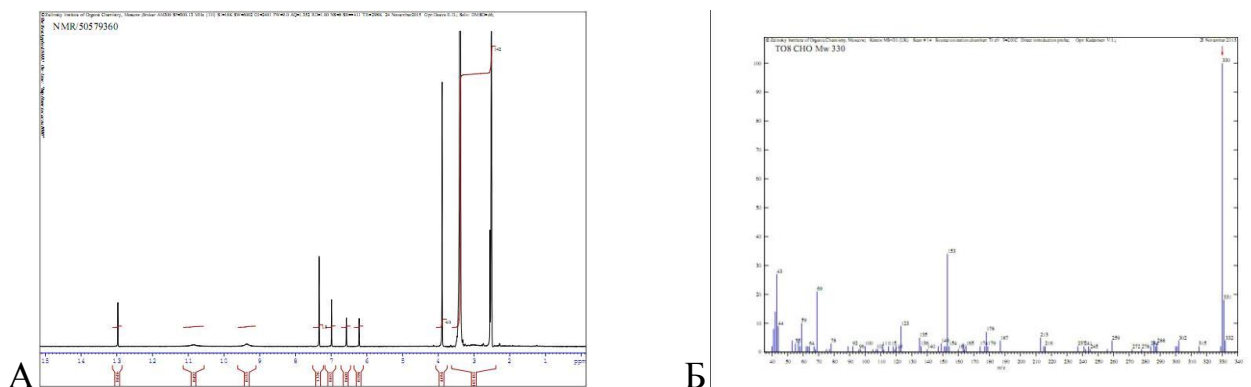


Рисунок 45 - ^1H -ЯМР- спектр (А) и масс-спектр (Б) трицина (4), выделенного из надземной части одуванчика лекарственного

О гликозилировании 7-ОН-группы в соединении **7** свидетельствуют данные УФ-спектров: отсутствие батохромного сдвига коротковолновой полосы электронного спектра в присутствии NaOAc и появление данного эффекта в случае агликона (**5**), полученного в результате кислотного гидролиза. Конфигурация гликозидной связи соединения **7** подтверждается наличием в ПМР-спектре дублетного сигнала при 5.08 м.д. с КССВ 7 Гц, принадлежащего аномерному протону глюкозы (рис. 46).

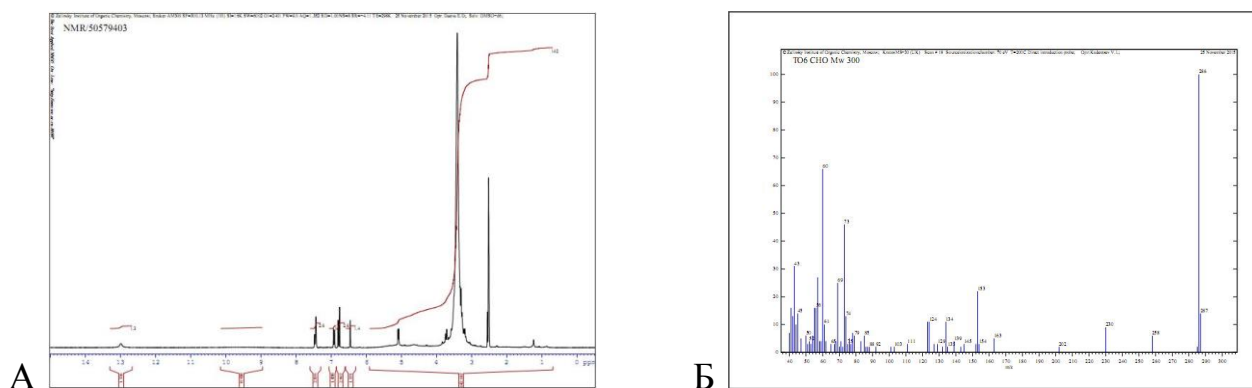


Рисунок 46 - ^1H -ЯМР- спектр (А) и масс-спектр (Б) цинарозида (7), выделенного из надземной части одуванчика лекарственного

Соединения **5** и **7**, идентифицированные как 5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавонон (лютеолин) и 7-*O*-β-*D*-глюкопиранозид 5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавонона (цинарозид), соответственно, а также хлорогеновая кислота (**2**), кофейная кислота (**3**) и соединение **8**, идентифицированное как тараксастерин [157] (рис. 47), ранее были выделены из надземной части одуванчика лекарственного [91].

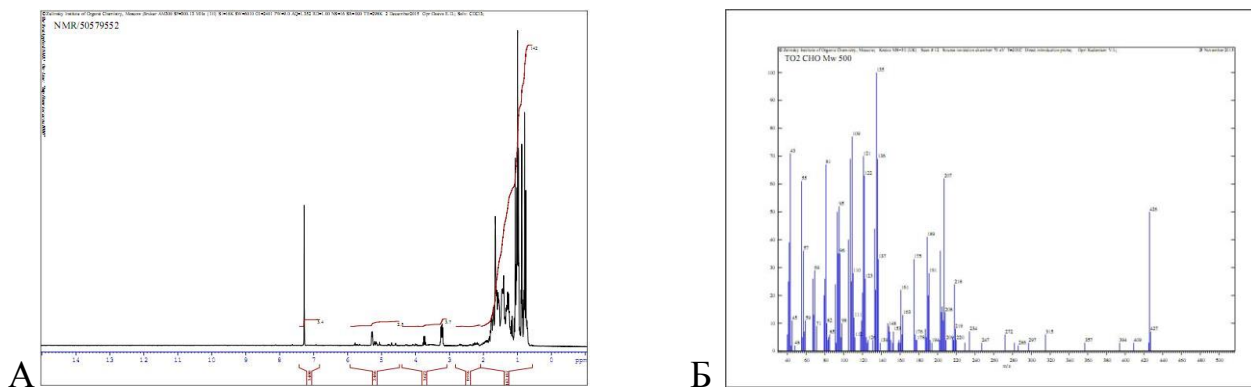


Рисунок 47 - ¹H-ЯМР- спектр (А) и масс-спектр (Б) тараксастерина (**8**), выделенного из надземной части одуванчика лекарственного

Таким образом, в результате изучения компонентного состава надземной части одуванчика лекарственного впервые выделены и охарактеризованы с использованием ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии фенолпропаноид каftarовая кислота (2¹-кофеилвинная кислота) и трицин (5,7,4¹-тригидрокси-3¹,5¹-диметоксифлавонон), а также известные для данного растения вещества - кофейная кислота, лютеолин (5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавонон), цинарозид (7-*O*-β-*D*-глюкопиранозид 5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавонона) и тараксастерин (тритерпеновый сапонин).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.

1. Из надземной части одуванчика лекарственного впервые в Российской Федерации выделены и идентифицированы кафтаровая кислота и трицин. В результате проведенных хроматографических и спектральных исследований определено, что кафтаровая кислота является доминирующим веществом надземной части одуванчика лекарственного.

2. Из надземной части одуванчика лекарственного также получены фенилпропаноиды кофейная и хлорогеновая кислота, флавоноиды цинарозид, лютеолин и лютеолина 7-О-глюкозилрамнозид, тритерпеновый сапонин тараксастерин.

3. Полученные данные о химическом составе травы одуванчика лекарственного были приняты за основу при разработке методик стандартизации сырья одуванчика лекарственного и препаратов на его основе.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО

В настоящее время для придания растению статуса фармакопейного вида и для разработки нормативной документации, регламентирующей качество сырья, требуется разработка таких разделов, как качественные реакции (результаты микро-, гистохимических реакций, хроматографических проб) и числовые показатели (количественное содержание БАС, биологическая активность, количественное содержание экстрактивных веществ и др.) [45, 100]. В Российской Федерации в настоящее время в качестве ЛРС используются корни одуванчика лекарственного, тогда как на траву одуванчика лекарственного нормативная документация в России отсутствует [26, 45].

В зарубежных фармакопеях предложены методики качественного анализа травы одуванчика лекарственного методом тонкослойной хроматографии (Китайская Фармакопея, Европейская Фармакопея) [131, 150]. Однако использование в качестве веществ-стандартов кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты и рутина, на наш взгляд, является недостатком представленных методик, так как данные вещества не являются специфичными для травы одуванчика лекарственного и применяются для стандартизации многих видов сырья [45, 131, 150].

Количественное содержание БАС в Европейской Фармакопее предлагается определять по сумме экстрактивных веществ [131]. Данный подход не является специфичным, так как не позволяет определить содержание отдельных групп БАС (например, фенольных соединений), отвечающих за развитие фармакологического эффекта.

5.1. Разработка методик качественного анализа травы одуванчика лекарственного

Для разработки подходов к стандартизации травы одуванчика лекарственного использованы результаты исследований компонентного состава сырья данного растения.

С целью проведения качественного анализа травы одуванчика лекарственного нами предлагается использовать метод ТСХ с использованием в качестве стандартного образца флавоноида цинарозида, а также метод спектроскопии с последующим описанием полученного электронного спектра водно-спиртового извлечения из травы одуванчика лекарственного.

5.1.1. Тонкослойная хроматография

Исследованию подвергалась трава одуванчика лекарственного, собранная в период массового цветения (конец мая – начало июня 2014-2015 гг.).

1,0 г (точная навеска) помещали в термостойкую коническую колбу на 100 мл и добавляли 50 мл спирта этилового 70%. Колбу взвешивали вместе с содержимым, после чего подсоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч после закипания экстрагента. Через 2 часа колбы остужали, взвешивали, доводили массу содержимого до первоначального значения. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр во флакон темного стекла. Данное извлечение впоследствии наносили на хроматографические пластинки. С помощью метода ТСХ-анализа в извлечении из травы одуванчика лекарственного при разделении в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» удалось обнаружить зоны веществ, предположительно, фенилпропаноидной природы.

На линию старта хроматографической пластинки, предварительно активированной в сушильном шкафу при температуре 100-105°C, микропипеткой наносили 0,02 мкл водно-спиртового извлечения из травы одуванчика лекарственного. В качестве веществ-свидетелей на ту же пластинку наносили

спиртовой раствор ГСО рутина, спиртовой раствор ГСО лютеолина, спиртовой раствор ГСО цинарозида, спиртовой раствор РСО хлорогеновой кислоты. Пластинку помещали в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителей в течение 24 ч, и хроматографировали восходящим способом. После того, как фронт растворителя проходил около 8 см, пластинку доставали из хроматографической камеры, высушивали и детектировали зоны веществ.

Полученную хроматограмму просматривали при дневном свете, в УФ-свете при $\lambda=366$ нм и $\lambda=254$ нм, а также обрабатывали щелочным раствором ДСК. Схема полученной хроматограммы представлена на рисунке 48.

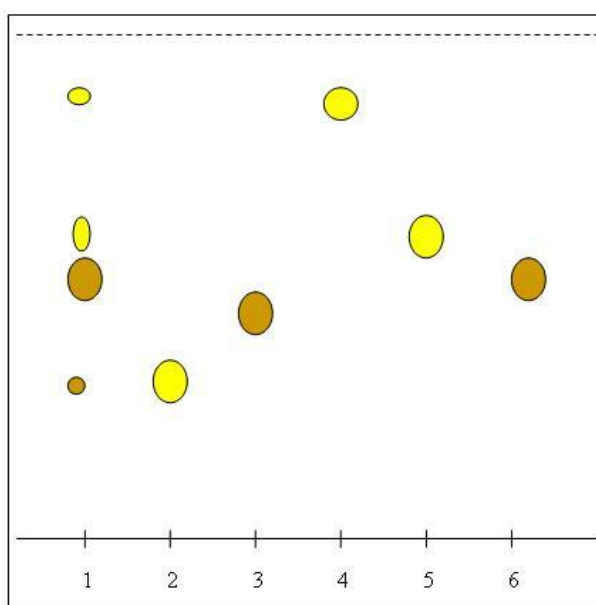


Рисунок 48 – Схема хроматограммы извлечения из травы одуванчика лекарственного. Система *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).

Обозначения: 1 – извлечение из травы одуванчика лекарственного (1:50); 2 – ГСО рутина; 3 – хлорогеновая кислота; 4 – ГСО лютеолина; 5 – ГСО цинарозида; 6 – кафтаровая кислота.

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

был сделан вывод, что данное вещество представляет собой фенилпропаноид – кафтаровую кислоту. Из веществ-свидетелей наиболее близким значением подвижности обладает РСО хлорогеновой кислоты ($R_f = 0,5$). Хлорогеновая кислота описана в качестве вещества-стандарта для ТСХ-анализа травы одуванчика лекарственного в Европейской Фармакопее, однако сама хлорогеновая кислота в извлечении травы одуванчика лекарственного не обнаруживается. Таким образом, целесообразно ввести значение R_s – коэффициент подвижности доминирующего вещества относительно хлорогеновой кислоты, который равен 1,1. Кроме того в извлечении из травы одуванчика лекарственного обнаруживаются вещества, совпадающие по подвижности с цинарозидом ($R_f = 0,64$). Также в извлечении обнаруживаются флавоноидные соединения, обладающие подвижностью, совпадающей по значению с R_f лютеолина 0,8. В Европейской Фармакопее рекомендуется использование второго стандарта – рутина, однако, как мы можем судить по полученным результатам, зона флавоноида рутина в извлечении из травы одуванчика лекарственного не обнаруживается. Таким образом, более рациональным является использование в качестве веществ-стандартов хлорогеновой кислоты и цинарозида с последующим расчетом значений R_s и R_f .

Данный подход важен, так как в отличие от методик зарубежных фармакопей [131, 150], которые предусматривают определение широко встречающихся во многих других растениях рутина, хлорогеновой и кофейной кислот, не являющихся специфическими для одуванчика лекарственного веществами, позволяет определять диагностически значимое вещество, доминирующее в сырье данного растения.

Разработанная методика качественного анализа травы одуванчика лекарственного методом ТСХ вошла в проект ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Одуванчика лекарственного трава» (приложение 5).

5.1.2. УФ-спектроскопия

Для изучения электронного спектра извлечения из травы одуванчика лекарственного готовили разведение. Для приготовления раствора А 1,0 г (точную навеску) помещали в термостойкую коническую колбу на 100 мл и добавляли 50 мл спирта этилового 70%. Колбу взвешивали вместе с содержимым, после чего подсоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 ч после закипания экстрагента. Через 2 часа колбу остужали, взвешивали, доводили массу содержимого до первоначального значения. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр во флакон темного стекла.

1 мл полученного раствора А помещали в мерную колбу на 50 мл и доводили спиртом этиловым 96% до метки. Электронный спектр снимали на сканирующем спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Полученный УФ-спектр имеет максимум при 334 ± 2 нм, а также «плечо» при 296 ± 2 нм. При добавлении 3% спиртового раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромный сдвиг (рис. 49). Сравнительное изучение УФ-спектров водно-спиртового извлечения из травы одуванчика лекарственного и растворов выделенных из травы одуванчика лекарственного кафтаровой, хлорогеновой и кофейной кислот свидетельствует о том, что основной вклад в кривую поглощения УФ-спектра водно-спиртового извлечения из травы одуванчика лекарственного вносят фенилпропаноиды (1-3, глава 4). Данные соединения имеют максимум поглощения при длине волны около 330 нм, характерный для гидроксикоричных кислот (рис. 49, 50).

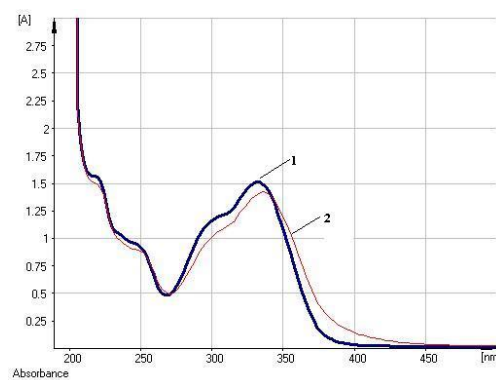
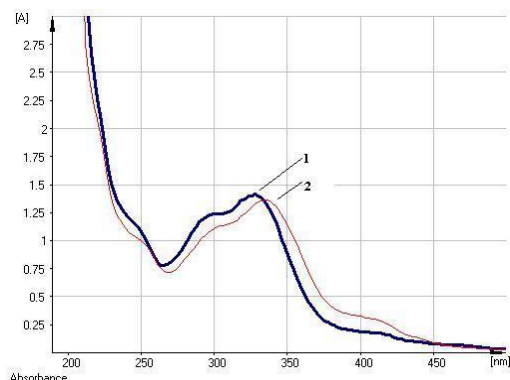


Рисунок 49 - УФ-спектр извлечения из Рисунок 50 - Электронные спектры
 травы одуванчика лекарственного исходного раствора кафтаровой кислоты
 (1:2500) исходный и в присутствии (1) и в присутствии AlCl_3 (2).
 AlCl_3

Принимая во внимание то обстоятельство, что в условиях ТСХ доминирующим компонентом является кафтаровая кислота, можно сделать вывод, что именно это вещество в основном определяет характер кривой поглощения УФ-спектра водно-спиртового извлечения из травы одуванчика лекарственного. (рис. 49, 50). Таким образом, спектроскопический анализ позволил подтвердить результаты ТСХ-анализа. Разработанная методика спектроскопического анализа травы одуванчика лекарственного была включена в проект ФС «Одуванчика лекарственного трава».

5.2. Разработка методик количественного определения содержания фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного

В рамках проведенного исследования были изучены образцы травы одуванчика лекарственного, собранной в мае – июне (в период массового цветения) 2014 года в Самарской области (п. Алексеевка, п. Смышляевка). При заготовке надземную часть отделяли от корней, сушили сырье в хорошо проветриваемом сухом помещении.

На кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ была разработана методика количественного определения суммы веществ фенольной природы в пересчете на флавоноид лютеолин [117]. Наряду с преимуществами (простота исполнения, учет вклада всех веществ фенольной природы) данная методика имеет ряд недостатков. Так, расчет удельного показателя поглощения комплекса ГСО лютеолина с алюминия (III) хлоридом проводили при длине волны 365 нм, в то время как максимум дифференциального спектра лютеолина приходится на 400 нм. Следовательно, определение содержания фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного в пересчете на лютеолин может быть отягощено ошибкой.

Для определения аналитической длины волны нами были изучены УФ-спектры спиртовых извлечений травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом, а также УФ-спектры РСО хлорогеновой кислоты (рис. 51).

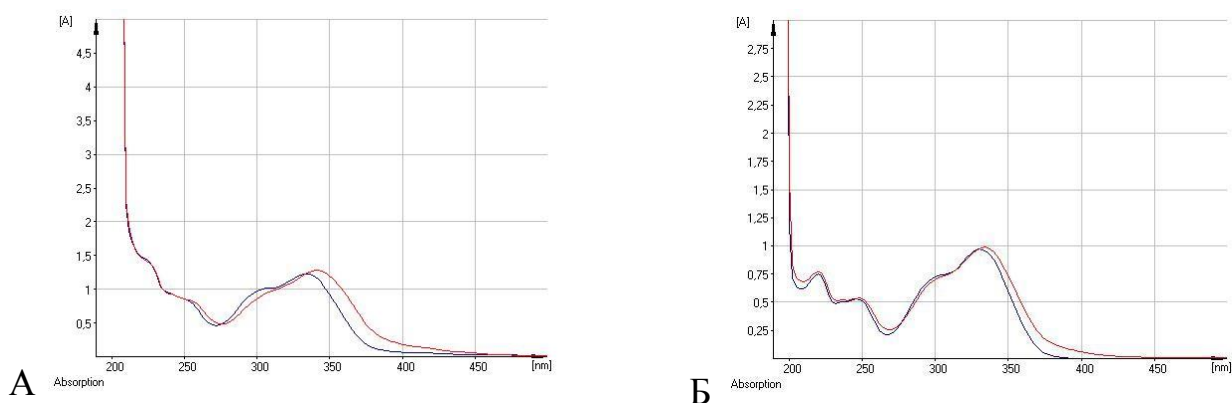


Рисунок 51 - УФ-спектры извлечения из травы одуванчика лекарственного (А) и спиртового раствора РСО хлорогеновой кислоты (Б)

Исследуемое извлечение из травы одуванчика лекарственного имеет максимум поглощения при 334 ± 2 нм и «плечо» при 296 ± 2 нм. Раствор РСО хлорогеновой кислоты имеет максимум поглощения при 330 ± 2 нм и «плечо» при 290 ± 2 нм. Ввиду близкого расположения максимумов поглощения исследуемого извлечения из травы одуванчика лекарственного и вещества-стандарта хлорогеновой кислоты, одним из целесообразных вариантов стандартизации является прямая спектрофотометрия.

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

Методика определения суммы фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного (прямая спектрофотометрия). Около 1 г травы одуванчика лекарственного (точная навеска), проходящей через сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в коническую колбу с притертой пробкой. К сырью добавляют 50 мл 70% спирта этилового, колбу закрывают пробкой и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Затем к колбе присоединяют дефлегматор и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч с момента закипания спирта этилового. Затем содержимое колбы охлаждают, взвешивают и доводят массу содержимого 70% спиртом этиловым до первоначального значения. Полученное водно-спиртовое извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

1 мл полученного извлечения (раствора А) помещают в мерную колбу на 50 мл и доводят спиртом этиловым 96% до метки. Оптическую плотность измеряют через на спектрофотометре «Specord 40» Analytik Jena при аналитической длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы веществ фенольной природы в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{497 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; m – масса сырья, г (точная навеска); W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты аналитической длине волны 330 нм. Метрологические характеристики разработанной методики количественного суммы веществ фенольной природы методом прямой спектрофотометрии представлены в таблице 5.

Таблица 5

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы веществ фенольной природы в траве одуванчика лекарственного (прямая спектрофотометрия)

N	f	\bar{X}	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
5	4	6,54	0,00152	0,0390	95	2,78	$\pm 0,1084$	$\pm 1,66$

С целью совершенствования методик количественного определения нами также изучена возможность применения дифференциальной спектрофотометрии. При добавлении к исследуемому извлечению из травы одуванчика лекарственного раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромный сдвиг. Максимум дифференциального спектра извлечения из травы одуванчика лекарственного находится при 364 ± 2 нм, а максимум дифференциального спектра хлорогеновой кислоты находится в области 360 ± 2 нм (рис. 52). Результаты данного исследования позволили понять, почему, несмотря на присутствие в траве одуванчика лекарственного флавоноидов, в УФ-спектре (дифференциальный вариант) обнаруживается максимум при 364 ± 2 нм – длине волны, не характерной для флавоноидов (в присутствии $AlCl_3$). Следовательно, в методе дифференциальной спектрофотометрии пересчет суммы веществ

фенольной природы в траве одуванчика лекарственного так же целесообразно проводить на хлорогеновую кислоту (рис. 52).

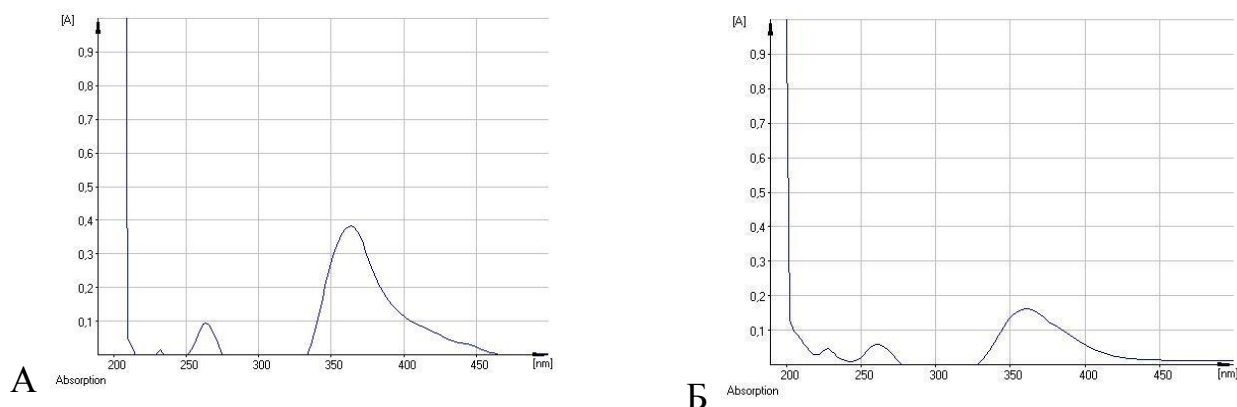


Рисунок 52 – Дифференциальные спектры поглощения извлечения из травы одуванчика лекарственного (А) и РСО хлорогеновой кислоты (Б)

С целью пересчета содержания суммы фенольных соединений на хлорогеновую кислоту нами изучены комплексы раствора РСО хлорогеновой кислоты со спиртовым раствором алюминия (III) хлорида. Удельный показатель поглощения $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ данного комплекса при аналитической длине волны 360 нм составляет 83 ± 2 . На этом основании в формулу расчета нами включено теоретическое значение $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 84$.

Методика определения суммы фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного (дифференциальная спектрофотометрия). Около 1 г травы одуванчика лекарственного (точная навеска), проходящей через сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в коническую колбу с притертой пробкой. К сырью добавляют 50 мл 70% спирта этилового, колбу закрывают пробкой и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Затем к колбе присоединяют дефлегматор и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч с момента закипания спирта этилового. Затем содержимое колбы охлаждают, взвешивают и доводят массу содержимого 70% спиртом этиловым до первоначального значения. Полученное водно-спиртовое извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

1 мл полученного извлечения (раствора А) помещают в мерную колбу на 50 мл, добавляют 2 мл спиртового 3% раствора алюминия (III) хлорида и доводят объем раствора до метки. Для приготовления раствора сравнения 1 мл раствора А помещают в мерную колбу на 50 мл и доводят спиртом этиловым 96% до метки. Оптическую плотность измеряют через 30 мин на спектрофотометре «Specord 40» Analytik Jena при аналитической длине волны 360 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы веществ фенольной природы в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{84 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; m – масса сырья, г (точная навеска); W – потеря в массе при высушивании сырья, %; 84 – удельный показатель поглощения комплекса хлорогеновой кислоты с алюминия (III) хлоридом при аналитической длине волны 360 нм.

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы веществ фенольной природы в траве одуванчика лекарственного методом дифференциальной спектрофотометрии приведены в таблице 6.

Таблица 6

Метрологические характеристики методик количественного определения суммы фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного (дифференциальная спектрофотометрия)

N	f	\bar{X}	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
5	4	11,89	0,00315	0,0561	95	2,78	± 0,156	± 1,31

Результаты статистической обработки полученных результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более ± 1,66% - для методики определения методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту; не

более $\pm 1,31\%$ - для методики определения методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту. Кроме того, при использовании дифференциальной спектрофотометрии нами были получены несколько завышенные результаты, так как существенный вклад в итоговое значение вносят флавоноиды. Методика количественного определения суммы фенольных веществ в пересчете на хлорогеновую кислоту с использованием прямой спектрофотометрии предлагается нами как более предпочтительная.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: линейность, прецизионность и правильность. Линейность методики определяли для серии растворов хлорогеновой кислоты (с концентрациями в диапазоне от 0,00976 до 0,03904 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99998. Для установления прецизионности проводили определение содержания для пяти параллельных измерений. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора хлорогеновой кислоты с известной концентрацией к исследуемому раствору. Открываемость находилась в пределах от 98% до 102%.

Таким образом, разработанная методика количественного определения суммы веществ фенольной природы отвечает параметрам валидации и может использоваться для оценки качества сырья «Одуванчика лекарственного трава». При анализе травы одуванчика лекарственного, собранной в различных регионах Российской Федерации, содержание суммы веществ фенольной природы варьировало от 5,50% до 7,04%. Полученные данные позволили рекомендовать минимальное содержание веществ фенольной природы в доброкачественном сырье в пересчете на хлорогеновую кислоту, которое должно составлять не менее 5%.

5.3. Определение динамики накопления фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного

Объектами исследования служили образцы травы одуванчика лекарственного, собранные в период с мая по сентябрь в п. Алексеевка Самарской области. Сушка сырья проводилась естественным путем, под навесами. Качественный анализ образцов сырья проводили по разработанным методикам методом ТСХ и спектроскопии.

Растворы А соответствующих образцов сырья для ТСХ-анализа и спектрофотометрического определения получали по ранее разработанной методике. Около 1 г (точная навеска) сырья, проходящего через сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в колбу с притертым шлифом на 100 мл, добавляли 50 мл спирта этилового 70%. Колбу закрывали притертой пробкой и взвешивали на аналитических весах, после чего присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Полученный раствор остужали, восполняли потерю экстрагента до первоначальной массы, фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл. Полученные растворы наносили на хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» стандартным капилляром в объеме 6 мкл. В качестве веществ-стандартов использовались ГСО лютеолина, хлорогеновая кислота, кафтаровая кислота и ГСО цинарозида.

Пластинку с нанесенными пробами помещали в вертикальную камеру со смесью растворителей *n*-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2), предварительно насыщенную в течение 1 часа, и хроматографировали восходящим способом.

Хроматограмму просматривали в дневном свете и в УФ-свете с длиной волны 254 и 366 нм. Для проявления веществ фенольной природы хроматограмму обрабатывали свежеприготовленным раствором ДСК в насыщенном растворе натрия карбоната (рис. 53).

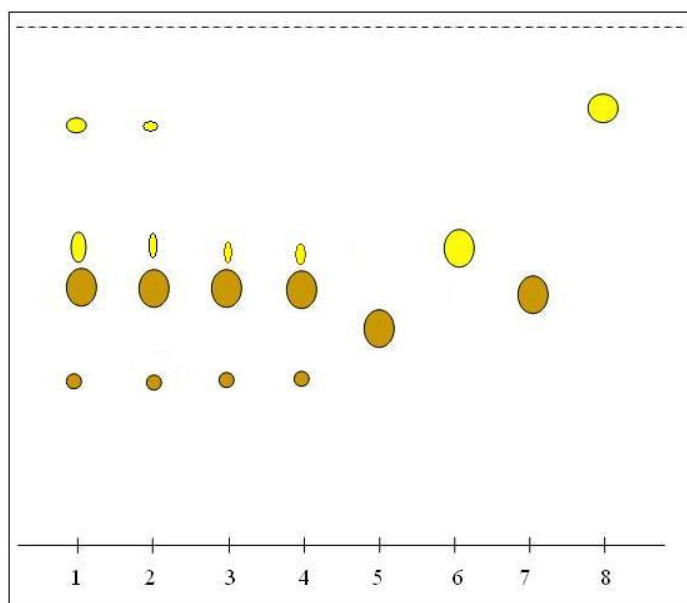


Рисунок 53 – Схема хроматограммы сравнения спирто-водных извлечений из травы одуванчика лекарственного, собранной в различные периоды вегетации.

Система *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2). Обработка щелочным раствором диазобензолсульфокислоты.

Обозначения: 1 – май; 2 – июнь; 3 – август; 4 – сентябрь; 5 – хлорогеновая кислота; 6 – ГСО цинарозида; 7 – кафтаровая кислота; 8 – ГСО лютеолина.

Как видно на представленной схеме хроматограммы, образцы сырья отличаются высокой степенью сходства фенольной гаммы, независимо от времени сбора. Во всех образцах обнаружено доминирующее вещество фенилпропаноидной природы – кафтаровая кислота с $R_f = 0,55$ и R_s относительно хлорогеновой кислоты 1,1. Также во всех исследуемых образцах обнаружены зоны веществ, совпадающих по подвижности с ГСО цинарозида ($R_f = 0,64$). В образце сырья, собранном в мае, обнаруживается зона флавоноида лютеолина ($R_f = 0,8$).

Для изучения спектральных характеристик использовался раствор А, описанный выше. Спектральный анализ проводят методом прямой спектроскопии на сканирующем спектрофотометре «Specord 40» (Analytic Jena). В качестве раствора сравнения использовался спирт этиловый 96%. Полученные спектры образцов травы одуванчика лекарственного свидетельствуют о том, что характер

кривой поглощения определяется в основном гидроксикоричными кислотами в любой период вегетации: «плечо» при $\lambda=296\pm 2$ нм и максимум при $\lambda=334\pm 2$ нм (рис. 54).

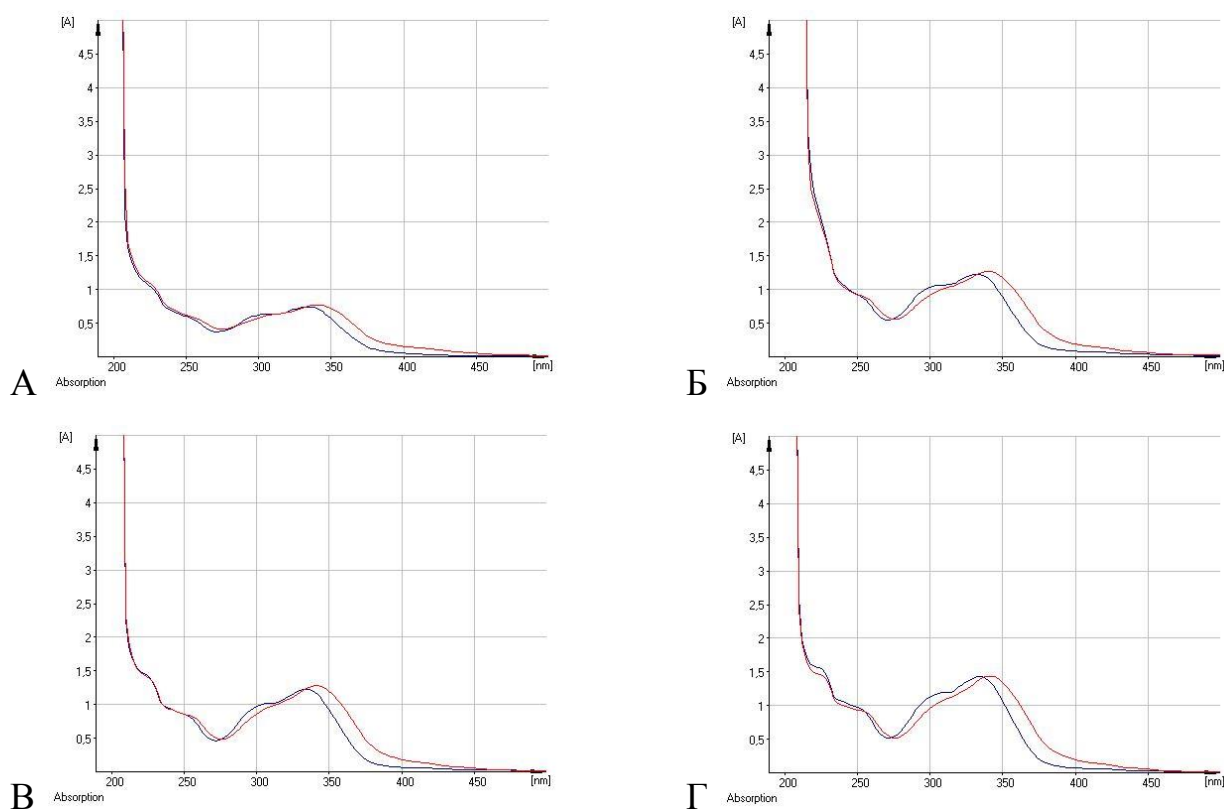


Рисунок 54 – УФ-спектры водно-спиртовых извлечений из образцов травы одуванчика лекарственного (1:2500), собранных в различные периоды вегетации.

А – май; Б – июнь; В – август; Г – сентябрь

По полученным результатам качественного анализа образцов травы одуванчика лекарственного можно сделать вывод о сходстве фенольной гаммы в исследуемом сырье в различные периоды вегетации. Следовательно, выводы о рекомендуемом времени сбора сырья можно будет сделать на основании результатов количественного определения содержания фенольных веществ.

Определение содержания суммы фенольных веществ в образцах проводили методом прямой спектрофотометрии. Содержание суммы фенольных веществ определяли в пересчете на хлорогеновую кислоту по разработанной методике. Динамика накопления фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного представлена на графике (рис. 55).

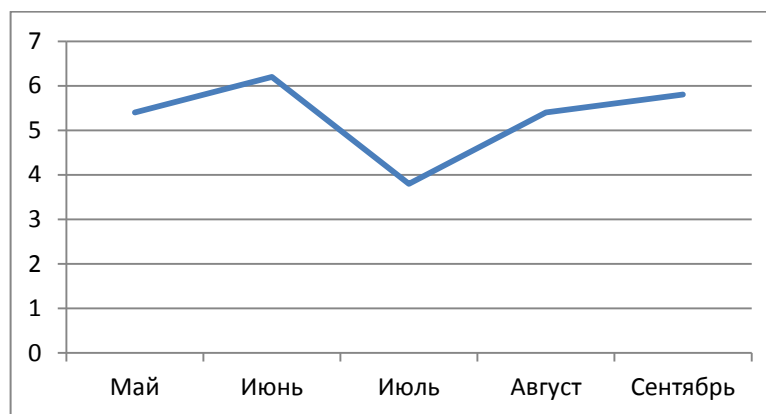


Рисунок 55 – Динамика накопления суммы фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного в течение вегетационного периода при расчете по методу прямой спектрофотометрии.

На полученном графике видно изменение накопления веществ фенольной природы в период с мая по сентябрь, что согласуется с имеющимися литературными данными [35, 73]. Таким образом, оптимальным временем сбора травы одуванчика лекарственного является начало июня, так как именно на это время приходится период массового цветения и наиболее мощное развитие фитомассы. В августе и сентябре происходит накопление фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного, однако в этот период фитомасса надземной части растения уменьшается. Кроме того, в отсутствии характерных соцветий возрастает вероятность случайной или намеренной фальсификации сырья ввиду высокой схожести листовой пластинки одуванчика лекарственного и возможных примесных видов (одуванчика позднего, цикория обыкновенного) [31, 35, 112].

5.4 Предварительное фитохимическое исследование одуванчика позднего (*Taraxacum sirotinum*)

В настоящее время официальным видом из рода *Taraxacum* – Одуванчик – является лишь одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg.). Однако на территории Российской Федерации встречается более 300 различных видов и подвидов одуванчика [69, 112]. Одним из наиболее часто встречающихся видов является одуванчик поздний. От одуванчика лекарственного данный вид отличается некоторыми морфологическими и анатомо-гистологическими признаками, а также временем цветения [35, 69, 112]. В Фармакопее Китайской Народной Республики в качестве сырья одуванчика выступает трава смеси различных видов одуванчика [150]. Следовательно, необходимо провести предварительное фитохимическое исследование травы одуванчика позднего, чтобы сравнить официальное сырье и возможный примесный вид по содержанию основных групп БАС.

Для исследования травы одуванчика позднего методом ТСХ использовали методику, разработанную для анализа травы одуванчика лекарственного.

По 1,0 г (точная навеска) травы одуванчика позднего помещали в три термостойких конических колбы на 100 мл и заливали 50 мл экстрагента (70% спирта этилового, 40% спирта этилового и воды очищенной). Затем колбы присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов. После этого содержимое колбы остужали и фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата, во флаконы темного стекла.

Полученное извлечение (раствор А) наносили на хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», предварительно активированную в сушильном шкафу при 105°C в течение 30 мин. В качестве растворов-стандартов использовали извлечения из травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом, 40% спирте этиловом и воде очищенной, а также раствор ГСО цинарозида, хлорогеновой кислоты, кафтаровой кислоты и ГСО лютеолина. Разделение проводили в системе *n*-бутанол - уксусная кислота – вода (4:1:2).

После прохождения фронтом 7-8 см пластинку доставали, высушивали, просматривали в УФ-свете при 366 нм и 254 нм, после чего обрабатывали реактивом ДСК (рис. 56).

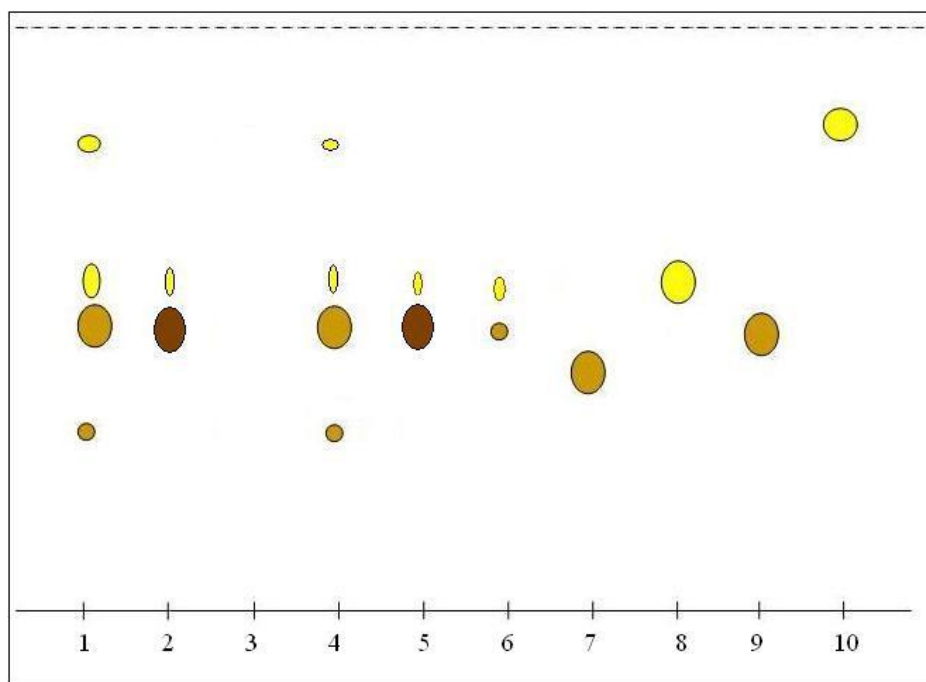


Рисунок 56 – Схема хроматограммы извлечений из травы одуванчика лекарственного и одуванчика позднего.

Обозначения: 1 – извлечение из травы о. лекарственного на 70% спирте этиловом; 2 – извлечение из травы о. лекарственного на 40% спирте этиловом; 3- извлечение из травы о. лекарственного на воде очищенной; 4 - извлечение из травы о. позднего на 70% спирте этиловом; 5 - извлечение из травы о. позднего на 40% спирте этиловом; 6 - извлечение из травы о. позднего на воде очищенной; 7 – хлорогеновая кислота; 8 – ГСО цинарозида; 9 – кафтаровая кислота; 10 – ГСО лютеолина.

На полученной хроматограмме видно, что наибольший выход БАС из травы одуванчика лекарственного и одуванчика позднего происходит в спирт этиловый 70% и 40%. В данных извлечениях заметны зоны доминирующего вещества фенилпропаноидной природы – кафтаровой кислоты с $R_f = 0,55$ и R_s относительно хлорогеновой кислоты 1,1. Также в данных образцах обнаружены зоны флавоноида цинарозида ($R_f = 0,64$) и флавоноида лютеолина $R_f = 0,80$.

Для изучения спектральных характеристик извлечений из травы одуванчика позднего использовали раствор А, полученный на 70% спирте этиловом. 1 мл раствора А помещали в мерную колбу на 50 мл и доводили объем раствора до метки 96% спиртом этиловым. Полученный раствор – раствор В – использовали в качестве раствора сравнения для получения дифференциального спектра. Для получения исследуемого раствора 1 мл раствора А помещали в мерную колбу на 50 мл, добавляли 2 мл 3% спиртового раствора алюминия (III) хлорида и доводили спиртом этиловым 96% до метки. Выдерживали в течение 40 минут, после чего проводили съемку на спектрофотометре «Specord 40» (Analytic Jena) (рис. 57).

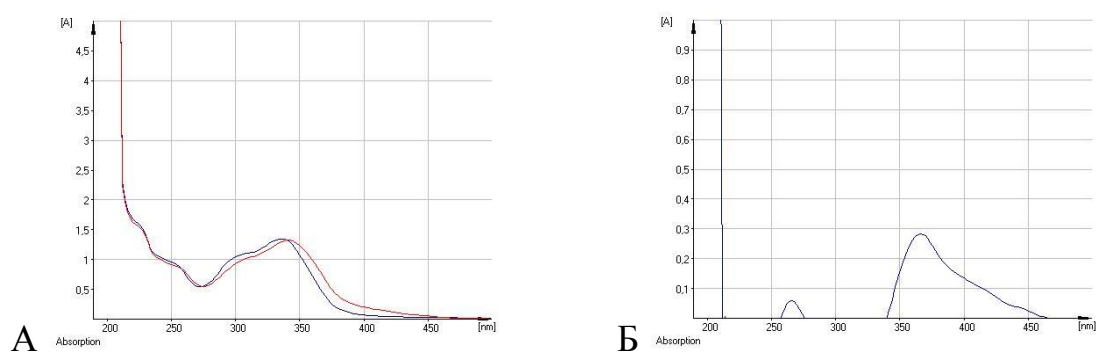


Рисунок 57 – УФ-спектр извлечения из травы одуванчика позднего (1:2500)

А – электронный спектр извлечения с добавлением спиртового раствора алюминия (III) хлорида; Б – дифференциальный спектр извлечения.

На полученных УФ-спектрах видно, что полученное извлечение имеет максимум при 336 ± 2 нм и «плечо» при 296 ± 2 нм. Максимум дифференциального спектра приходится на длину волны 366 ± 2 нм.

Таким образом, по результатам ТСХ-анализа, а также спектроскопии можно сделать вывод о сходстве фенольной гаммы БАС в извлечениях из травы одуванчика лекарственного и одуванчика позднего. Следовательно, возможное наличие примеси травы одуванчика позднего в траве одуванчика лекарственного не оказывает значительного влияния на хроматографические и спектральные характеристики извлечений, что свидетельствует об актуальности раздела «Микроскопические признаки».

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5:

1. Разработаны методики качественного анализа травы одуванчика лекарственного методом тонкослойной хроматографии с использованием в качестве веществ-свидетелей хлорогеновой кислоты и ГСО цинарозида в системе бутанол - уксусная кислота – вода (4:1:2).

2. Определены параметры УФ-спектра водно-спиртового извлечения из травы одуванчика лекарственного, а именно максимум при $\lambda=334\pm 2$ нм и «плечо» при $\lambda=296\pm 2$ нм. В присутствии спиртового раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромным сдвиг, максимум дифференциального спектра при $\lambda=364\pm 2$ нм.

3. По разработанной методике прямой спектрофотометрии определено суммарное содержание веществ фенольной природы в пересчете на хлорогеновую кислоту. В зависимости от места сбора сырья суммарное содержание фенольных веществ варьировало от 5,50 % до 7,04 %. Полученные данные позволили рекомендовать минимальное содержание веществ фенольной природы в доброкачественном сырье в пересчете на хлорогеновую кислоту - не менее 5%.

4. Определено оптимальное время сбора сырья – травы одуванчика лекарственного, которое приходится на период массового цветения, а именно, на конец мая – начало июня.

5. Проведено предварительное фитохимическое исследование возможного примесного сырья – травы одуванчика позднего. Извлечение из травы одуванчика позднего обладает сходными с одуванчиком лекарственным хроматографическими и спектральными характеристиками.

6. Разработанные методики стандартизации вошли в проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС - «Одуванчика лекарственного траву».

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА, СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ И МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРАВЫ ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО

Ведущей группой БАС в траве одуванчика лекарственного являются фенилпропаноиды, представленные кафтаровой кислотой (доминирующее вещество), а также кофейной и хлорогеновой кислотами. В лекарственном растительном сырье данная группа БАС отвечает за разнообразные фармакологические эффекты [1, 13, 51, 54, 58, 59, 118, 127, 139, 161]. Так, фенилпропаноиды отвечают за такие эффекты, как иммуномодулирующий, адаптогенный, гепатопротекторный, желчегонный, противовоспалительный и другие [1, 51, 58, 118, 161].

В настоящее время в Российской Федерации не представлены отечественные препараты на основе травы одуванчика лекарственного. Данный вид сырья входит в состав таких импортных препаратов, как «Тонзилгон», «Аристокхол» и др. [28, 29, 92, 93, 94]. Однако данные препараты являются многокомпонентными и содержание травы одуванчика лекарственного в них невелико. На наш взгляд, благодаря широкому спектру БАС трава одуванчика лекарственного может применяться в качестве индивидуального лекарственного средства. Для удобства применения травы одуванчика лекарственного целесообразным является создание галеновых препаратов на ее основе [72, 109].

В настоящее время в медицинской практике широко применяются настойки на основе различного лекарственного растительного сырья [50]. Настойки применяются в качестве самостоятельного лекарственного средства, а также могут входить в состав микстур, сиропов, капель и других лекарственных форм [72, 109].

В рамках фитохимического исследования травы одуванчика лекарственного было определено, что оптимальным экстрагентом для получения настойки является спирт этиловый 40% или 70%. Так как в траве одуванчика лекарственного отсутствуют сильнодействующие вещества, настойку получали в соотношении «сырье – экстрагент» 1:5.

6.1. Описание состава и способа получения настойки травы одуванчика лекарственного

Настойка травы одуванчика лекарственного было получена двумя способами: модифицированной дробной мацерацией (рис. 58) и дробной перколяцией (см. главу 2), - после чего настойки сравнивались по содержанию БАС фенольной природы. Лекарственные препараты были получены на основе спирта этилового 40% и 70% в соотношении «сырье – экстрагент» 1:5.

Полученные настойки представляют собой прозрачную или опалесцирующую жидкость коричнево-зеленого цвета, запах - специфический, вкус – горьковатый.

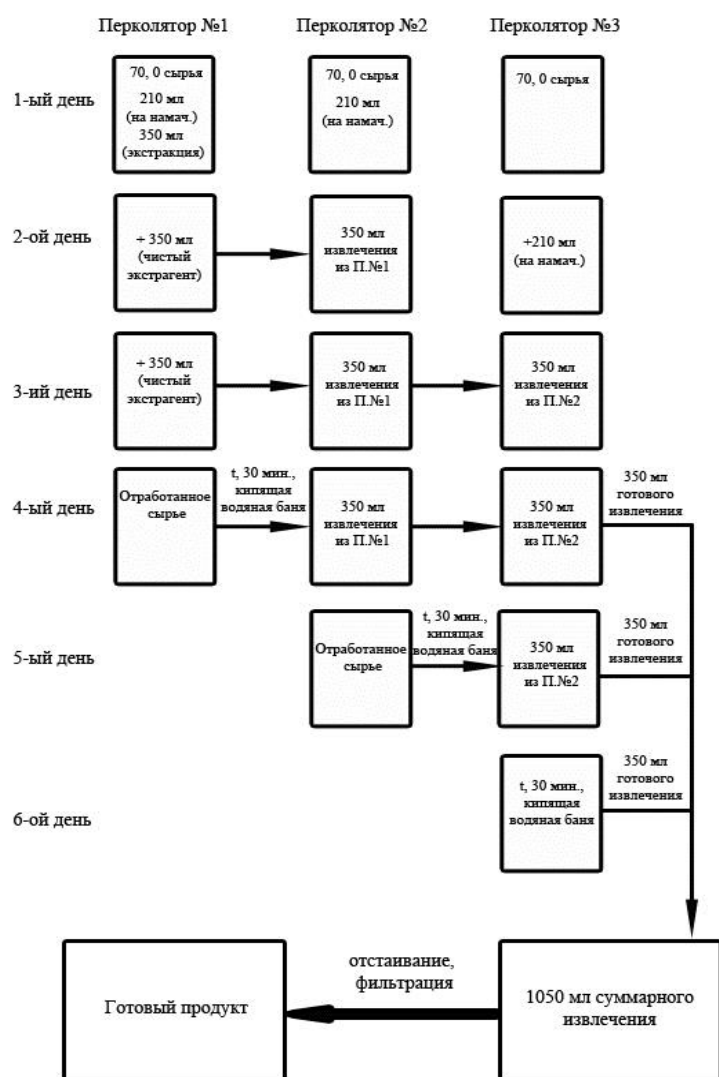


Рисунок 58 – Схема получения настойки методом модифицированной дробной мацерации.

6.2. Стандартизация настойки травы одуванчика лекарственного

Согласно действующей в настоящее время фармакопейной статье на настойки ГФ СССР XI издания для определения качества данной лекарственной формы необходимо определить содержание действующих веществ (по методикам соответствующих частных фармакопейных статей); содержание спирта или плотность, сухой остаток и тяжелые металлы [25, 26].

6.2.1. Качественный анализ настойки травы одуванчика лекарственного

В настоящее время все большую актуальность приобретает преимущество в вопросах стандартизации лекарственных растительных препаратов в цепочке сырье – субстанция – препарат [97, 98]. Следовательно, методики, разработанные для анализа сырья, должны быть адаптированы для анализа лекарственных препаратов на его основе.

Анализ настойки травы одуванчика лекарственного на 40% и 70% спирте этиловом проводили методом ТСХ в условиях, аналогичных условиям стандартизации травы одуванчика лекарственного.

На хроматографическую пластинку «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ», предварительно активированную при 100-105°C в сушильном шкафу, наносили образцы настоек, полученных методом модифицированной дробной мацерации и дробной перколяции на 40% и 70% спирте этиловом. В качестве образцов-свидетелей использовали извлечение из травы одуванчика лекарственного, ГСО цинарозида, хлорогеновую кислоту, ГСО лютеолина. Разделение проводили в системе *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).

После прохождения фронтом примерно 7-8 см хроматограмму вынимали из камеры, высушивали и просматривали при дневном свете, в УФ-свете при $\lambda=366$ нм и $\lambda=254$ нм, а также обрабатывали щелочным раствором ДСК.

На полученной хроматограмме настоек травы одуванчика лекарственного обнаруживалась зона доминирующего вещества (кафтаровой кислоты) с $R_f = 0,55$, характерная для извлечений из травы одуванчика лекарственного. R_s подвижности доминирующего вещества настоек относительно хлорогеновой

кислоты ($R_f = 0,5$) составил 1,1. Также в настойках травы одуванчика лекарственного обнаруживаются вещества, совпадающие по подвижности с цинарозидом ($R_f = 0,64$), и флавоноидные соединения, обладающие подвижностью, совпадающей по значению с R_f лютеолина 0,8. Зоны веществ, характеризующих извлечения из травы одуванчика лекарственного, обнаруживались в настойках как на 40% спирте этиловом, так и на 70% спирте этиловом. Однако, в настойках на 70% спирте этиловом зоны веществ проявлялись в виде более ярких и крупных пятен, что позволяет сделать вывод о лучшем извлечении действующих веществ из травы одуванчика лекарственного 70% спиртом этиловым.

Ранее нами была обоснована возможность использования метода УФ-спектроскопии для качественного анализа травы одуванчика лекарственного. С целью гармонизации подходов к стандартизации лекарственных растительных средств был получен электронные спектры образцов настоек травы одуванчика лекарственного, полученных на 40% и 70% спирте этиловом.

1 мл исследуемой настойки травы одуванчика лекарственного помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили спиртом этиловым 70% до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 96% (раствор В). Полученный раствор В снимали на сканирующем спектрофотометре «Sperecord 40» (Analytik Jena). Полученные УФ-спектры показали идентичность УФ-спектру извлечения из травы одуванчика лекарственного (рис. 59).

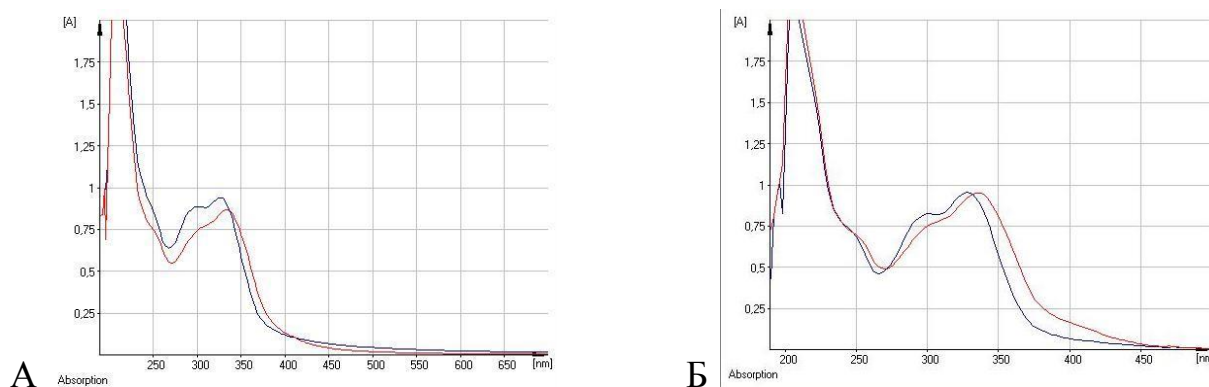


Рисунок 59 – УФ-спектры образцов настоек травы одуванчика лекарственного на 40% (А) и 70% (Б) спирте этиловом.

На УФ-спектрах настоек травы одуванчика лекарственного, полученных на 40% и 70% спирте этиловом, имеется «плечо» при 296 ± 2 нм и максимум при 334 ± 2 нм. Кроме того, при добавлении спиртового раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромный сдвиг. Следовательно, по результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что в характер кривой поглощения основной вклад вносят вещества фенилпропаноидной природы. Полученные результаты указывают на возможность использования УФ-спектроскопии для стандартизации настойки травы одуванчика лекарственного.

6.2.2. Количественное определение содержания фенольных веществ в настойке травы одуванчика лекарственного

Ранее нами была разработана и описана методика количественного определения суммы фенольных веществ в траве одуванчика лекарственного в пересчете на хлорогеновую кислоту. Так как УФ-спектр образцов настоек травы одуванчика лекарственного имеет сходные характеристики, разработанные методики могут быть адаптированы для данной лекарственной формы.

Методика количественного определения суммы веществ фенольной природы в настойке травы одуванчика лекарственного (прямая спектрофотометрия).

1 мл настойки травы одуванчика лекарственного на 40% или 70% спирте этиловом помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят спиртом этиловым 70% до метки (раствор А). Затем, 1 мл раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят спиртом этиловым 96% до метки (раствор В). Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре «Specord 40» Analytik Jena при аналитической длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы веществ фенольной природы в пересчете на хлорогеновую кислоту в 1 мл настойки в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 25}{497 \cdot 1 \cdot 1},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; 497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты аналитической длине волны 330 нм.

Результаты расчетов содержания веществ фенольной природы в настойках травы одуванчика лекарственного представлены в таблице 7.

Таблица 7

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенольных веществ в образцах настоек травы одуванчика лекарственного

Вид настойки	N	F	\bar{X}	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
40% спирт этиловый	5	4	0,55	0,000023	0,0048	95	2,78	± 0,013	± 2,43
70% спирт этиловый	5	4	0,66	0,000042	0,0065	95	2,78	± 0,018	± 2,73

Результаты статистической обработки полученных результатов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной

вероятностью 95% составляет не более $\pm 2,72$ % при определении суммы фенольных веществ методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Таким образом, полученные результаты количественного определения суммы веществ фенольной природы позволяют рекомендовать минимально допустимое содержание БАС в настойке травы одуванчика лекарственного на 40% и 70% спирте этиловом на уровне 0,5%.

6.2.3. Числовые показатели настойки травы одуванчика лекарственного

Согласно требованиям ГФ СССР XI издания и ГФ РФ XIII издания для настоек регламентируются такие показатели, как плотность, сухой остаток и тяжелые металлы [24, 26].

Плотность настойки определяли по методике, описанной в ГФ РФ XIII издания, том 2 [24]. Чистый сухой пикнометр взвешивали с точностью до 0,0002 г, заполняли водой дистиллированной немного выше метки, закрывали пробкой и выдерживали в термостате при 20°C в течение 20 мин. Уровень воды в пикнометре доводили до метки, закрывали пробкой и выдерживали в термостате еще 10 мин, проверяя положение мениска по отношению к метке. Затем пикнометр вынимали из термостата, вытирали внутреннюю поверхность горлышка и весь пикнометр снаружи фильтровальной бумагой и оставляли под стеклом аналитических весов на 10 мин, после чего взвешивали с той же точностью [24].

Пикнометр освобождали от воды, высушивали, последовательно споласкивая спиртом и эфиром, удаляли остатки эфира, после чего заполняли пикнометр настойкой травы одуванчика лекарственного на 40% и 70% спирте этиловом и производили те же операции, что и с дистиллированной водой [24]. Плотность настоек вычисляли по формуле, приведенной в ГФ РФ XIII издания, том 2 [24].

Сухой остаток определяли по методике, описанной в ГФ СССР XI издания, том 2 [26] и ГФ РФ XIII издания, том 2 [24]. 5 мл настойки помещали во

взвешенный бюкс, выпаривали досуха на водяной бане, сушили 2 часа при 102°C, затем охлаждали в эксикаторе 30 мин и взвешивали [26].

Испытания на тяжелые металлы также проводили по методике ГФ СССР XI издания и ГФ РФ XIII издания [24, 25, 26]. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 8.

Таблица 8

Числовые показатели настоек травы одуванчика лекарственного.

Показатель	Значение для настойки на 40% спирте этиловом	Значение для настойки на 70% спирте этиловом
Плотность (г/см ³)	0,953	0,902
Сухой остаток	1,65%	1,23%
Микробиологическая чистота	Не более 10 ⁴ аэробных бактерий Не более 10 ² грибов Отсутствуют <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Не более 10 ⁴ аэробных бактерий Не более 10 ² грибов Отсутствуют <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Тяжелые металлы	Не более 0,001%	Не более 0,001%
Сумма фенольных веществ (%)	0,55 %	0,66 %

6.3. Описание состава и способа получения сиропа одуванчика лекарственного

По определению, приведенному в ГФ СССР XI издания, сиропы – концентрированные водные растворы сахарозы, которые могут содержать лекарственные вещества, фруктовые пищевые экстракты [26]. Согласно формулировке ОСТа 91500.05.001-00 сироп – это жидкая лекарственная форма для внутреннего применения, представляющая собой концентрированный раствор различных сахаров, а также их смеси с лекарственными веществами [79]. Сироп – лекарственная форма удобная в применении. В случае использования в качестве источника БАС сырья, содержащего горечи, решается вопрос коррекции вкусовых характеристик лекарственного препарата. Благодаря этому сиропы широко используются в педиатрической практике [28, 29, 41, 43, 44, 72]. Кроме того, использование в качестве основы для приготовления сиропа сорбита или фруктозы позволяет применять такие лекарственные формы в терапии пациентов, страдающих сахарным диабетом [43, 44, 104].

Сиропы готовятся растворением сахара в воде или в извлечениях из ЛРС. Другим вариантом приготовления лекарственного сиропа является добавление лекарственных веществ (экстракта или настойки) к сахарному сиропу [13, 26, 41, 72, 74, 104, 109].

Для приготовления сиропа травы одуванчика лекарственного было приготовлено три варианта базовых сиропов: сахарный сироп, сорбитный и сироп на фруктозе по стандартной методике приготовления сиропа (см. главу 2 «Объекты и методы исследования»). В качестве действующего компонента в сироп добавляли настойку травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом в количестве, составляющем 5% от массы сиропа.

6.4. Стандартизация сиропа одуванчика лекарственного

Согласно существующим в настоящее время требованиям к стандартизации фитопрепаратов должна осуществляться преемственность в вопросах стандартизации в цепочке лекарственное растительное сырье – субстанция – лекарственный препарат [97]. Следовательно, методики стандартизации, разработанные для травы одуванчика лекарственного и настойки травы одуванчика лекарственного (как полуфабриката для получения сиропа), должны быть адаптированы для качественного анализа и количественного определения БАС в сиропе травы одуванчика лекарственного [97].

6.4.1. Качественный анализ сиропа одуванчика лекарственного

Для определения состава БАС использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Пластинку предварительно активировали в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 40 мин. Перед нанесением образцов на пластинку сиропы подвергали пробоподготовке, разработанной ранее для сиропов, содержащих гидроксикоричные кислоты в качестве основного компонента БАС [13]. 5 мл сиропа помещали в делительную воронку, добавляли 1 каплю ледяной уксусной кислоты (ЛУК), тщательно перемешивали, добавляли 5 мл ацетона и экстрагировали в течение 10 мин. Ацетоновый слой отделяли и упаривали на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл 96% спирта этилового. Полученный раствор наносили на линию старта микропипеткой в объеме 0,05 мл. Разделение проводили в вертикальной камере, которую предварительно насыщали не менее 24 ч смесью растворителей бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2). Полученные хроматограммы высушивали и просматривали в ультрафиолетовом свете при $\lambda = 254$ нм и $\lambda = 366$ нм, после чего обрабатывали свежеприготовленным щелочным раствором диазобензолсульфо кислоты (ДСК). В качестве образцов-свидетелей выступали настойка травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом, ГСО лютеолина, хлорогеновая кислота, кафтаровая кислота и ГСО цинарозида (рис. 60).

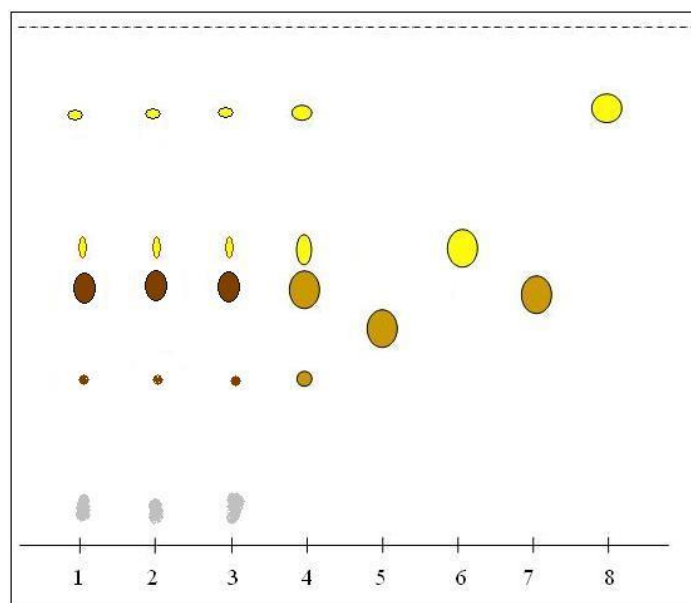


Рисунок 60 – Схема хроматограммы сиропов травы одуванчика лекарственного. Система *n*-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2). Обработка щелочным раствором ДСК.

Обозначения: 1 – сироп 5% на фруктозе; 2 – сироп 5% на сахарозе; 3 – сироп 5% на сорбите; 4 – настойка травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом; 5 - хлорогеновая кислота; 6 – ГСО цинарозида; 7 – кафтаровая кислота; 8 – ГСО лютеолина.

Во всех образцах, содержащих извлечение из травы одуванчика лекарственного, обнаруживается доминирующая зона кафтаровой кислоты с $R_f = 0,55$. Также, в сиропах и настойке травы одуванчика лекарственного обнаруживается зона флавоноида цинарозида $R_f = 0,64$ и флавоноида лютеолина с $R_f = 0,8$. Кроме того, другие БАС, присутствующие в настойке одуванчика лекарственного, также обнаруживаются в образцах сиропа.

Таким образом, использованная методика пробоподготовки может применяться для стандартизации сиропов на основе настойки травы одуванчика лекарственного.

Спектральные характеристики сиропов определяли методом спектроскопии на спектрофотометре Specord 40 (Analytik Jena). Для приготовления раствора А 5 мл сиропа помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили водой очищенной до

метки. 2 мл полученного раствора А помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом этиловым 96% (раствор Б) (рис. 61).

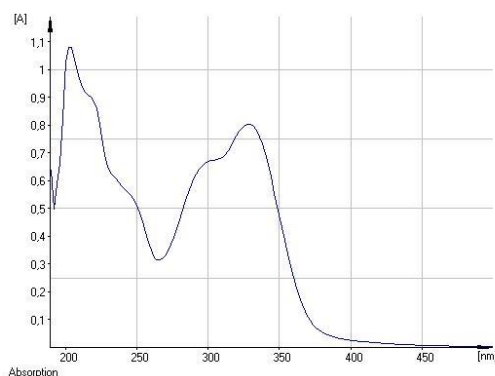


Рисунок 61 – УФ-спектр 5% сиропа травы одуванчика лекарственного.

Электронный спектр снимали на сканирующем спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кювете с толщиной слоя 10 мм. Полученный УФ-спектр имеет максимум при 334 ± 2 нм, а также «плечо» при 296 ± 2 нм. Аналогичный УФ-спектр был получен для исходного сырья (травы одуванчика лекарственного), а также для настойки травы одуванчика лекарственного. Следовательно, можно сделать вывод о применимости разработанных методик стандартизации для лекарственного препарата «Одуванчика лекарственного травы сиропа».

6.4.2. Количественное определение содержания фенольных веществ в сиропе одуванчика лекарственного

Количественное определение суммы фенольных соединений проводили методом прямой спектрофотометрии с пересчетом суммы веществ фенольной природы на РСО хлорогеновой кислоты.

Методика определения суммы фенольных веществ в сиропе травы одуванчика лекарственного (прямая спектрофотометрия). 5 мл 5% сиропа травы одуванчика лекарственного (на 70% спирте этиловом) помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки водой очищенной (раствор А). 2 мл раствора А помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят спиртом этиловым 96% до метки (раствор В). Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре

«Specord 40» Analytik Jena при аналитической длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы веществ фенольной природы в пересчете на хлорогеновую кислоту в 1 мл исследуемого сиропа в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 25}{497 \cdot 5 \cdot 2},$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; 497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты аналитической длине волны 330 нм.

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы веществ фенольной природы в сиропе травы одуванчика лекарственного представлены в таблице 9.

Таблица 9

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенольных веществ в 5% сиропе травы одуванчика лекарственного

N	F	\bar{X}	S^2	S	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
5	4	0,0314	0,00000038	0,000616	95	2,78	0,0017	± 5,41

Таким образом, содержание суммы веществ фенольной природы в 5% сиропе травы одуванчика лекарственного, согласно полученным результатам, должно составлять не менее 0,03%.

6.4.3. Числовые показатели сиропа одуванчика лекарственного

Согласно ОСТу 91500.05.001 «Стандарты качества лекарственных средств», а также согласно ГФ РФ XIII издания для стандартизации разрабатываемого сиропа необходимо определить ряд показателей качества сиропа, а именно, плотность, показатель преломления, рН, концентрация спирта, микробиологическая чистота, а также содержание суммы фенольных веществ [24, 78, 80] (табл. 10).

Числовые показатели 5% сиропа травы одуванчика лекарственного

Показатель	Значение
Плотность (г/см ³)	1,32±0,002
Показатель преломления	1,4370±0,001
рН	5,1±0,1
Концентрация спирта (%)	2,1±0,05
Микробиологическая чистота	Аэробных бактерий – 200 Грибов – 30 Отсутствуют бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Сумма фенольных веществ (%)	0,03±0,001

6.5. Изучение влияния разработанных препаратов на выделительную функцию почек

В настоящее время актуальным является поиск новых лекарственных препаратов, обладающих нефропротекторными свойствами (стимуляция почечной экскреции воды и электролитов, выведение из организма токсических агентов и др.) [37, 56, 124]. В ходе исследований фитохимического состава травы одуванчика лекарственного были обнаружены флавоноиды и фенилпропаноиды, что позволяет предположить наличие диуретического эффекта у препаратов на его основе. Исследованию подвергались настойки на 40% и 70% спирте этиловом, а также настой травы одуванчика лекарственного. Исследование проводилось по методике, описанной в гл. 2 «Объекты и методы исследования».

Результаты исследований приведены в таблице 11.

Таблица 11

Влияние спиртовых и водных извлечений из травы одуванчика лекарственного в дозе 50 мкл/кг на почечную экскрецию воды, натрия, калия и креатинина

Препарат	Время опыта, ч	Контроль/ Опыт	Диурез, мл	Натрийурез, мкмоль	Калийурез, мкмоль	Креатининурез, мг
Настой травы одуванчика	4	К	1,08±0,07	160,88±11,34	99,58±10,29	0,75±0,05
		О	1,24±0,07	208,32±17,80*	113,68±11,27	0,82±0,09
	24	К	2,38±0,09	530,56±51,13	278,95±31,79	2,07±0,14
		О	2,57±0,14	621,38±32,17	307,62±46,94	2,30±0,16
Настойка травы одуванчика на 40% спирте этиловом	4	К	0,99±0,07	208,86±25,15	118,27±15,68	0,69±0,06
		О	1,11±0,10	250,54±30,32	145,64±21,11	0,72±0,08
	24	К	2,53±0,13	791,51±50,59	564,51±47,51	0,76±0,08
		О	2,70±0,16	875,18±89,80	706,68±64,34	0,77±0,11

Настойка травы одуванчик а на 70% спирте этиловом	4	К	0,63± 0,04	129,44±14,72	85,66±9,85	0,56±0,05
		О	1,03±0,06*	273,20±29,56*	116,53±10,48*	0,74±0,14
	24	К	1,30±0,08	826,00±76,56	351,23±45,03	4,34±0,25
		О	1,80±0,06*	897,54±59,06	484,08±55,02	5,80±0,64*

Примечание: здесь и далее * - $p < 0,05$.

В ходе исследований при однократном внутрижелудочном введении настоя одуванчика лекарственного в дозе 50 мкл/кг по истечении 4 ч от начала опыта было выявлено изолированное достоверное повышение натрийуреза на 29% в опытной группе, $p=0,037$. Через 24 ч эксперимента отмечалось недостоверное увеличение всех исследуемых показателей экскреторной функции почек (таблица 11).

Введение настойки травы одуванчика лекарственного на 40% спирте этиловом в дозе 50 мкл/кг также привело к недостоверным колебаниям показателей диуреза, натрийуреза, калийуреза и креатининуриза в опытной группе относительно водно-спиртового контроля.

Разовое внутрижелудочное введение настойки одуванчика на 70% этаноле в дозе 50 мкл/кг за 4 ч опытного периода способствовало достоверному возрастанию следующих исследуемых показателей экскреторной функции почек: диуреза - на 63% ($p=0,000$), натрийуреза - на 111% ($p=0,000$), калийуреза - на 37% ($p=0,046$). По истечении суток тот же препарат в аналогичной дозе привел к статистически значимому повышению диуреза на 38% ($p=0,000$) и креатининуриза на 34% ($p=0,049$) в опытной группе по сравнению с водно-спиртовым контролем.

Таким образом, в ходе исследований был выявлен препарат, оказывающий стимулирующее влияние на все изучаемые параметры выделительной функции почек, а именно – настойка травы одуванчика лекарственного на основе спирта этилового 70%. Такой эффект можно объяснить более высоким содержанием веществ фенольной природы в данном препарате по сравнению с настойкой на 40% спирте этиловом и водным извлечением.

6.6. Изучение антимикробных свойств разработанных препаратов

Исследованию антимикробной активности подвергались разработанные препараты, а именно, настойка травы одуванчика лекарственного на 40% спирте этиловом и на 70% спирте этиловом в соотношении сырье – экстрагент 1:5, а также настой травы одуванчика лекарственного в соотношении сырье – экстрагент 1:10 (как вариант экстемпоральной лекарственной формы). Исследование проводилось методом двойных серийных разведений в бульоне на тестовых культурах *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherihia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*. В качестве препарата сравнения использовался спирт этиловый 40% и 70% в аналогичных разведениях.

Исследование настойки травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом показало, что данная лекарственная форма не проявляет дополнительной противомикробной активности по сравнению со спиртом этиловым 70% в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Однако в отношении *Staphylococcus aureus* лекарственный препарат оставался активен в разведении 1:8 и 1:16, в то время как активность спирта этилового 70% прекращается при разведении 1:4. В отношении штаммов *Escherihia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* активность определить не удалось из-за образования стойкой эмульсии во время приготовления разведений (табл. 12, 13). Обнаруженная противомикробная активность настойки травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом может быть объяснена, на наш взгляд, присутствием в данной лекарственной форме БАС фенилпропаноидной природы, а именно – каftarовой, хлорогеновой, кофейной кислот [1, 58, 159].

Антимикробная активность настойки травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом.

Наименование микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Staphylococcus aureus</i>	Роста нет	Роста нет	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Escherihia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 13

Антимикробная активность препарата сравнения - спирта этилового 70%.

Наименование микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Staphylococcus aureus</i>	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Escherihia coli</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Bacillus cereus</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Candida albicans</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

При исследовании настойки травы одуванчика лекарственного на 40% спирте этиловом были получены результаты, указывающие на то, что препарат обладает антимикробной активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и

Антимикробная активность препарата сравнения – спирта этилового 40%.

Наименование микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Staphylococcus aureus</i>	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Escherihia coli</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Bacillus cereus</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Candida albicans</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

В качестве одной из возможных экстемпоральных лекарственных форм исследованию подвергался настой травы одуванчика лекарственного в соотношении сырье – экстрагент 1:10. При этом принималось во внимание, что вода очищенная (как препарат сравнения) не обладает антимикробной активностью. Данная лекарственная форма не проявила противомикробной активности в отношении *Escherihia coli* – рост микроорганизмов наблюдался при всех исследуемых разведениях. В отношении *Staphylococcus aureus* препарат оказался активен в минимальном разведении – 1:2. В отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus cereus* настоем травы одуванчика лекарственного проявлял активность до разведения 1:8 включительно. Рост *Candida albicans* настоем травы одуванчика лекарственного подавлял до разведения 1:16 включительно (табл. 16).

Антимикробная активность настоя травы одуванчика лекарственного.

Наименование микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Escherihia coli</i>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Bacillus cereus</i>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Candida albicans</i>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	<u>Роста</u> <u>нет</u>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

Вещества фенилпропаноидной природы практически отсутствуют в водном извлечении из травы одуванчика лекарственного, следовательно, наличие противомикробной активности у настоя может быть объяснено присутствием полисахаридного и пептидного комплекса БАС, которые легко извлекаются водой [2, 122, 138, 152, 153, 154, 162].

Таким образом, основываясь на полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод о наличии у препаратов травы одуванчика лекарственного противомикробной активности в отношении патогенных микроорганизмов *in vitro*. Наличие данной активности может быть связано с наличием в лекарственных препаратах БАС фенилпропаноидной природы, а также с противомикробным действием полисахаридов и пептидных соединений одуванчика лекарственного [1, 2, 122, 152, 153, 159, 154, 162].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.

1. Обоснованы способ получения и состав настойки травы одуванчика лекарственного. Разработаны методики качественного анализа препарата и количественного определения БАС.
2. Обоснованы способ получения и состав сиропа травы одуванчика лекарственного. Разработаны методики качественного анализа данного препарата и количественного определения БАС.
3. Рекомендуемое содержание суммы веществ фенольной природы в пересчете на хлорогеновую кислоту в 5 % сиропе одуванчика лекарственного должно составлять не менее 0,03 %.
4. Для разработанных лекарственных препаратов травы одуванчика лекарственного определены параметры диуретической активности. Настойка на 70% спирте этиловом обладает более высокой диуретической активностью, чем настойка на 40% спирте этиловом. Настойка травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом достоверно повышала выведение воды и электролитов через 4 ч и 24 ч эксперимента. Кроме того, препарат проявил калийсберегающую активность.
5. Для настойки травы одуванчика лекарственного на 70% спирте этиловом определена антимикробная активность в отношении *Staphylococcus aureus*. Для настойки травы одуванчика лекарственного на 40% спирте этиловом определена антимикробная активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*. Для настоя травы одуванчика лекарственного определена антимикробная активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ:

1. Определены морфолого-анатомические особенности строения нового вида ЛРС «Одуванчика лекарственного трава», имеющие диагностическое значение, а именно: форма поперечного сечения базальной и медиальной части листа; наличие крупной ослизняющей полости в центре медиальной части листа; выраженная аэренхима центральной жилки с крупными ослизняющимися межклетниками; опушение, представленное двумя типами кроющих многоклеточных трихом: с узким двух-, трехрядным основанием и с широким многорядным основанием. Выявленные признаки позволяют достоверно идентифицировать исследуемый вид ЛРС.

2. В результате сравнительного морфолого-анатомического и гистохимического изучения травы одуванчика лекарственного и потенциальных примесных видов (одуванчика позднего, цикория обыкновенного) установлено, что выявленные общие и отличительные признаки позволяют объективно диагностировать вышеперечисленные виды.

3. В результате фитохимического исследования с использованием хроматографических, спектральных и химических методов впервые выделены из травы одуванчика лекарственного в индивидуальном виде и идентифицированы фенилпропаноид кафтаровая кислота (2^1 -кофеилвинная кислота) и флавоноид трицин ($5,7,4^1$ -тригидрокси- $3^1,5^1$ -диметоксифлавонон). Кроме того, впервые в Российской Федерации выделены и идентифицированы известные для травы одуванчика лекарственного фенилпропаноиды хлорогеновая кислота и кофейная кислота, флавоноиды лютеолин, 7-О-рамнозилглюкозид лютеолина, цинарозид, а также тритерпеновый сапонин таракастерин.

4. Разработана методика качественного анализа травы одуванчика лекарственного методом ТСХ с использованием в качестве стандартов хлорогеновой кислоты и цинарозида с последующим расчетом значений R_f для цинарозида и кафтаровой кислоты и значения R_s для кафтаровой кислоты относительно хлорогеновой кислоты. Для целей идентификации ЛРС «Одуванчика лекарственного трава» может использоваться УФ-спектроскопия.

Спектр поглощения извлечения из травы одуванчика лекарственного имеет «плечо» при 296 ± 2 нм, а также максимум при 330 ± 2 нм.

5. Обоснована целесообразность стандартизации травы одуванчика лекарственного по содержанию суммы фенольных веществ (фенилпропаноиды, флавоноиды) в пересчете на хлорогеновую кислоту с использованием прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 330 нм.

6. Определены показатели качества нового вида лекарственного растительного сырья «Одуванчика лекарственного трава». Содержание фенольных веществ в доброкачественном сырье при определении методом прямой спектрофотометрии варьирует от 5,5% до 7%, что позволило обосновать числовой показатель содержания суммы фенольных веществ не менее 5%.

7. С использованием технологических, аналитических и химических методов обоснованы состав и технология получения лекарственных препаратов на основе травы одуванчика лекарственного – «Одуванчика лекарственного травы настойка» и «Одуванчика лекарственного травы сироп», а также доказана целесообразность внедрения данных препаратов в медицинскую практику.

8. Разработанные методики качественного анализа и количественного определения БАС фенольной природы травы одуванчика лекарственного адаптированы и апробированы для разработанных лекарственных препаратов «Одуванчика лекарственного травы настойки» и «Одуванчика лекарственного травы сиропа». Определено, что содержание веществ фенольной природы в исследуемых препаратах варьирует от 0,5% до 0,7% и от 0,05% до 0,07% соответственно.

9. В ходе изучения влияние настойки одуванчика лекарственного на выделительную функцию почек выявлен диуретический и калийсберегающий эффекты, свидетельствующие о возможности применения данного препарата в медицинской практике. Определен также характер антимикробной активности образцов настоек и настоя травы одуванчика лекарственного. Наибольшую противомикробную активность исследуемые препараты проявляли в отношении

Staphylococcus aureus. Наибольшую устойчивость к антимикробному действию БАС травы одуванчика лекарственного проявила *Escherihia coli*.

10. На основе результатов фармакогностических исследований разработан проект ФС «Одуванчика лекарственного трава», который отправлен в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» с целью включения в дополнения Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIII издания.

Библиографический список.

1. Авдеева, Е.В. Теоретическое и экспериментальное обоснование использования лекарственных растений, содержащих фенилпропаноиды, для получения гепатопротекторных и иммуномодулирующих препаратов: автореф. ...докт. фарм. наук: 15.00.02 / Авдеева Елена Владимировна. – Пермь, 2006. – 44 с.
2. Астафьева, А.А. Новые антимикробные соединения из одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) / А.А. Астафьева, Рогожин Е.А., Егоров Ц.А. // Тезисы докладов и стендовых сообщений XXIII Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – М., 2011. – С. 36.
3. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Под ред. Чикова П.С. – М., 1980. – 340
4. Баева, В.М. Полиморфизм лекарственных растений / В.М. Баева // Фармация. – 2005. - №2. – С. 40-42.
5. Баяндуров, С.Э. Фитотерапия как ингредиент восстановительного лечения больных хроническими бронхитами в условиях горноклиматического курорта Красная Поляна: дис. ...к. мед. наук: 14.00.51 / Баяндуров Сурен Эдуардович. – Сочи, 2007. – 160 с.
6. Беляева, А.И. Элементный состав *Taraxacum officinale* и *Tussilago farfara* (*Asteraceae*) в условиях г. Санкт-Петербурга / А.И. Беляева, И.В. Дроздова // Растительные ресурсы. – 2009. - №4. – С. 82-90.
7. Беляков, К.В. Изучение содержания полисахаридов в корнях одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale*) / К.В. Беляков, А.Ю. Акольцева, Д.М. Попов // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: Сборник научных трудов. Т.38. Ч.II – Москва, 1999. – С. 164-172.
8. Беляков, К.В. Применение физико-химических методов анализа в контроле качества и стандартизации сырья девясила высокого, мать-и-мачехи обыкновенной, одуванчика лекарственного: дис. ...к. фармац. наук: 15.00.02 / Беляков Кирилл Владимирович. – М., 1999. – 200 с.

9. Болотов, А.Т. О сгонянии мозолей и бородавок / А.Т. Болотов // Экономический магазинь. – Ч.8, № 83. – 1781. – С. 77-78.
10. Бурмистров, А.Н. Медоносные растения и их пыльца / А.Н. Бурмистров, В.А. Никитина. – М.: Росагропромиздат, 1990. – 191 с.
11. Бурмистров, А.Н. Медоносные растения на вырубках в Красноярском крае и их нектарная продуктивность/ А.Н.Бурмистров, Т.А.Алиев// Растительные ресурсы. – 1974. – Т.10, №1. – С. 112-117.
12. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Книга 2: Физико-химические метода анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец.- 5-е изд., стереотип. / В.П. Васильев. – М.: Дрофа, 2005. – 383 с.
13. Вельмяйкина, Е.И. Фармакогностическое исследование эхинацеи пурпурной как источника иммуномодулирующих средств: дисс. ...канд. фарм. наук: 14.04.02 / Екатерина Ивановна Вельмяйкина. – Самара, 2013. – 147 с.
14. Вербовой, А.Ф. Сахароснижающие средства (клиническая фармакология): Учеб.-справ. пособие для системы ППОВ / А.Ф. Вербовой, О.В. Косарева. – Самара: Офорт, 2008. – 71 с.
15. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. – 333 с.
16. ГОСТ 22-94. Сахар-рафинад: техн. условия. – Введ. 01.07.96. – Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1994. – 10 с.
17. ГОСТ 2397-44 Одуванчик (корни).
18. ГОСТ 5833-75. Реактивы. Сахароза: техн. условия. – Введ. 01.01.77. – М.: Издательство стандартов, 1975. – 12 с.
19. ГОСТ Р 53904 – 2010. Добавки пищевые. Подсластители пищевых продуктов. Термины и определения. – Введ. 01.07.11. – М.: Стандартинформ, 2011. – 14 с.
20. Государственная Фармакопея Республики Беларусь / Министерство Здравоохранения Республики Беларусь; Республиканское унитарное предприятие

«Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». – Т. 2: Общие и частные фармакопейные статьи. – Минск, 2007. – 471 с.

21. Государственная Фармакопея Республики Казахстан / Министерство Здравоохранения Республики Казахстан. – Т. 1. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. – 592 с.
22. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е издание. Ч.1. / Москва: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
23. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.1 / М.– 2015. – 1470 с.
24. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т.2 / М.– 2015. – 1004 с.
25. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
26. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
27. Государственные стандарты Союза ССР. Лекарственное растительное сырье. – М.: Издательство стандартов, 1980. – 296 с.
28. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>. – 16.07.14.
29. Государственный реестр лекарственных средств. Т.1: офиц. изд. (по состоянию на 1 апреля 2008 г.) (VIII ежегод. периодич. изд.) / Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и соц. развития; Науч. центр экспертизы средств мед. применения. - М.: Медицина, 2008. – 1300 с.
30. Гравель, И.В. Корни одуванчика и фитопрепараты на его основе как источники микроэлементов / И.В. Гравель // I Российский фитотерапевтический съезд: сб. науч. тр. – М., 2008. – С. 272 – 273.

31. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 3: Покрывосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов. - М.: Товарищество научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. - С.496.
32. Гудзенко, А.В. Фармакогностическое изучение надземной части одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) и разработка способов анализа биологически активных веществ: автореф. ...канд. фарм. наук: 15.00.02 / Гудзенко Андрей Викторович. – Киев, 2008. – 23 с.
33. Гурьев, А.М. Химико-фармакологическое исследование полисахаридов высших растений и перспективы их использования в терапии злокачественных новообразований: дисс. ...д.фармац.наук:14.04.02 / Гурьев Артем Михайлович. – Пятигорск, 2011. – 297 с.
34. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1977. – 275 с.
35. Жмыхова, В.С. Сроки цветения и плодоношения лекарственных растений Курской области/ В.С. Жмыхова // Растительные ресурсы. – 1977. – Т.13, вып. 4. - С. 622-627.
36. Зайцева, Е.Н. Способ получения диуреза у лабораторных животных: патент на изобретение 2494703 Рос. Федерация. №2012104057/13; заявл. 06.02.12; опубл. 10.10.13 // Изобретения. Полезные модели. – 2013; 28: 11 с.
37. Зайцева, Е.Н. Препараты на основе травы зверобоя как средства коррекции экскреторной функции почек / Е.Н. Зайцева, В.А. Куркин, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева, Л.Н. Зимина // Известия Самарского научного центра РАН. - 2011. - Т. 13, № 1(8). - С. 1999-2002.
38. Иванова, М.С. О влиянии условий интродукции на некоторые морфологические признаки видов рода *Taraxacum* Wigg. / М.С. Иванова // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы VII Международной научно-практической конференции (21–24 октября 2008 г., Барнаул). - Барнаул, 2008. - С. 116 - 117.
39. Иванова, Р.Г. Дикорастущие съедобные растения Татарии / Р.Г. Иванова. – Казань: Татарское книжное издательство, 1988. – 200 с.

40. Иваншин, Д.С. К вопросу о введении в культуру дикорастущих лекарственных растений отечественной флоры/ Д.С. Иваншин // Растительные ресурсы. – 1971. – Т. 7, вып. 3. - С. 454-458.
41. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. – Т.2 / Н.В. Меньшутина [и др.]. – М.: БИНОМ, 2013. – 480 с.
42. Кашникова, М.В. Фармакогностическое изучение некоторых видов сырья, используемых в гомеопатии / М.В. Кашникова, Е.В. Яковлева, Е.М. Пшичкина // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: Сборник научных трудов. Т.38. Ч.II – Москва, 1999. – С. 224-226.
43. Ким, М.Е. Сиропы с фитопрепаратами: номенклатура, разработка, особенности состава, технологии (обзор) / М.Е. Ким, Т.А. Олейникова, С.Б. Евсеева // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2015. – №2-2. – С. 21-26.
44. Ким, М.Е. Сиропы: состав, технология, современное состояние исследований (обзор литературы) / М.Е. Ким, Э.Ф. Степанова, С.Б. Евсеева // Фармация и фармакология. – 2014. - №3. – С. 7-14.
45. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества/ Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. - М.: Издательство профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. - 295с.
46. Кит, С.М. Растения, применяемые при сахарном диабете/ С.М. Кит, Л.М. Будневская, В.С. Кит // Растительные ресурсы. – 1986. - Т. 22, вып. 3. – С. 405-415.
47. Коновалов, Д.А. Биологически активные вещества рода *Inula* L. / Д.А. Коновалов, Хубнева Ш.И. // Растительные ресурсы. – 1997. – Вып. 3. – С. 87-108.
48. Кравец, Н.В. Эффективность лечения разных типов папиллом кожи у больных суперинвазионным описторхозом / Н.В. Кравец // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. - № 4. – С. 37-39.
49. Краснов, Е.А. Гипогликемическое действие растительного полиэкстракта / Е.А. Краснов, Т.В. Якимова, С.Н. Удинцев, И.С. Иванов, М.Г. Винокурова // Вопросы

- биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. - №12. – С. 34-38.
50. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов/ В.А. Куркин, И.К. Петрухина // *Фундаментальные исследования*. – 2014. - №11. – С. 366-371.
51. Куркин, В.А. Антиоксидантная активность некоторых тонизирующих и гепатопротекторных фитопрепаратов, содержащих флавоноиды и фенилпропаноиды / В.А. Куркин, О.Л. Кулагин, Н.С. Додонов, А.А. Царёва, Е.В. Авдеева, С.В. Барабаш, М.В. Ляшенко, А.В. Куркина, Е.А. Дрёмова, Ф.Ш. Сатдарова, В.М. Рыжов // *Растительные ресурсы*. – 2008. - №1. – С. 122-130.
52. Куркин, В.А. Иллюстрированный словарь терминов и понятий в фармакогнозии: Учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов, врачей и фармацевтических работников/ В.А. Куркин, В.Ф. Новодранова, Т.В. Куркина. – Москва; Самара: ГП «Перспектива», СамГМУ, 2002. – 188с.
53. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие / В.А.Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрави», 2009. – 963 с.
54. Куркин, В.А. Проблемы стандартизации растительного сырья и препаратов, содержащих фенилпропаноиды / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева // *Фармация*. – 2009. - №1. – С. 51-54.
55. Куркин, В.А. Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов: Монография / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»: ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, 2015. – 240 с.
56. Куркин, В.А. Сравнительное исследование диуретической активности водно-спиртовых извлечений лекарственных растений, содержащих флавоноиды / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Куркина, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2015. - Т. 159, № 3. - С. 348-352.
57. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармац. вузов – Изд. 2-ое, перераб. и доп. / В.А. Куркин. - Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. – 1239 с.

58. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды как самостоятельных класс биологически активных соединений: Учебное пособие для студентов медицинских и фармацевтических вузов, врачей и фармацевтических работников/ В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, Е.В. Авдеева, В.Н. Ежков. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУВПО «СамГМУ», 2005. – 128 с.
59. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды каллусной культуры *Rhodiola rosea* / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, А.Г. Дубичев, Е.Д. Воронцов, И.В. Александрова // Химия природных соединений. - 1991. - № 4. – С. 481-490.
60. Куркин, В.А. Флавоноиды корневищ *Rhodiola rosea* / В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная, В.Г. Клязника // Химия природных соединений. - 1982. - № 5. – С. 581-584.
61. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды: автореф. ...докт. фарм. наук: 14.04.02 / Куркина Анна Владимировна. – Самара, 2013. – 48 с.
62. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография/ А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
63. Ладыгина, Е.Я. Одуванчик лекарственный / Е.Я. Ладыгина // Фармация. – 1991. - №3. – С. 91.
64. Ладыгина, Е.Я. Фармакогнозия. Атлас/ Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1989.
65. Лекарственные растения (дикорастущие) / Под ред. А.Ф. Гаммерман, И.Д. Юркевич. – Минск: Наука и техника, 1967. – 390 с.
66. Литвиненко, В.И. Углеводы корней одуванчика лекарственного / В.И. Литвиненко, В.Н. Бубенчикова, Т.П. Попова // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных трудов, посвященный 60-летию КГМУ. – Курск, 1997. – С. 635-636.
67. Лопатина, К.А. Водорастворимые полисахариды растений Сибири в комплексной терапии перевиваемых опухолей: дисс. ...к. мед. наук: 14.00.25 / Лопатина Ксения Александровна. – Томск, 2007. – 170 с.

68. Лубсандоржиева, П.Б. Антиоксидантная активность гипополидемического сбора и его компонентов *in vitro* / П.Б. Лубсандоржиева, Э.Г. Найданова // Бюллетень Восточно-сибирского научного центра СО РАМН. – 2006. – № 5. - С. 228-230.
69. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части СССР/ П.Ф. Маевский; под ред. члена-корреспондента АН СССР Б. К. Шишкина. - Ленинград: Колос, 1964. – 880 с.
70. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – Изд. 15-е, перераб., испр. и доп. – Москва: Новая Волна, 2006. – 1206 с.
71. Медведев, Ю.В. Исследование содержания фенолокислот в лекарственном и пищевом растительном сырье методом ВЭЖХ: автореф. ...канд. фарм. наук: 14.04.02 / Медведев Юрий Владимирович. – М., 2010. – 24 с.
72. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов: учебное пособие.- 2-е изд., перераб. и доп. / С.А. Минина, И.Е. Каухова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 560 с.
73. Мисин, В.М. Сезонная динамика изменения содержания антиоксидантов фенольного типа в листьях подорожника и одуванчика / В.М. Мисин, Н.Н. Сажина, А.Ю. Завьялов // Химия растительного сырья. – 2010. - №3. – С. 103-106.
74. Мичник, Л.А. Разработка технологии сиропа отхаркивающего действия на основе полисахаридов семян льна / Л.А. Мичник, О.В. Мичник, Е.В. Краснощекова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: научные труды, Вып. 60. – Пятигорск, 2005. – С. 126 – 127.
75. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: Учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
76. Нестерова, Ю.В. Противогипоксические свойства некоторых растительных препаратов / Ю.В. Нестерова, И.Л. Зеленская, С.Г. Аксиенко // Проблемы экспериментальной и клинической фармакологии: Сборник научных работ молодых ученых. – Томск: Издательство Томского университета, 2000. – С. 27-29.
77. Огородников, П.В. Этимологический словарь лекарственных растений, сырья и препаратов/ П.В. Огородников, О.Ф. Петюнина; под ред. д.м.н. проф. А.Н. Кудрина. - М.: Медицина, 1973.- 144 с.
78. ОСТ 42-2-72. Лекарственные средства. Порядок установления сроков годности.

79. ОСТ 64-02-003-2002. Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения.
80. ОСТ 91500.05.001-00 "Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения" – утв. приказом Минздрава РФ от 1 ноября 2001 г. N 388.
81. Патент 2134584 Российская Федерация, МКИ7 А61К35/78. Способ получения иммуномодулирующего препарата «Настойка эхинацеи пурпурной» / Куркин В.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель СамГМУ. – Бюл. №23 от 20.08.99.
82. Патент на ПМ 115651 Рос. Федерация №2011138631/13. Устройство для введения водной нагрузки лабораторным животным / Зайцева Е.Н.[и др.]; заявл. 20.09.11; опубл. 10.05.12 // Изобретения. Полезные модели. – 2012; 13: 2 с.
83. Попов, А.И. Минеральные вещества листьев одуванчика / А.И. Попов, К.Г. Громов // Вопросы питания. – 1993. - №3. – С. 57-58.
84. Попов, А.И. Фронтальный элементный анализ корней одуванчика / А.И. Попов // Химико-фармацевтический журнал. – 1994. – Т. 28, №8. – С. 33-34.
85. Потанина, О.Г. Совершенствование стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм из него на основе микроскопического метода исследования: дисс. ...д.фармац.наук: 15.00.02/ Потанина Ольга Георгиевна. – М., 2004. – 424 с.
86. Правдивцева, О.Е. Проблемы фитохимического исследования травы и корней одуванчика лекарственного / О.Е. Правдивцева, Е.А. Исаева // Экология и здоровье человека : тр. X всерос. конгресса – Самара, 2005. – С. 229 – 230.
87. Производственная практика по стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов: Учеб. пособие для студентов фармацев. вузов / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева и др. – Самара: Офорт, 2007. – 126 с.
88. Пронченко, Г.Е. Одуванчик (*Taraxacum officinale* Wigg.) / Г.Е. Пронченко // Медицинская помощь. – 1994. - №3. – С. 39-41.
89. Рабинович, А.М. Лекарственные травы и рецепты древних времен / А.М. Рабинович. – М.: Росагропромиздат, 1991. – 175 с.

90. Разина, Т.Г. Фитопрепараты и биологически активные вещества лекарственных растений в комплексной терапии злокачественных новообразований: экспериментальное исследование: дисс. ...д. биолог. наук: 14.00.25 / Разина Татьяна Георгиевна. – Томск, 2006. – 336 с.
91. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство *Asteraceae* (*Compositae*) / Под ред. П.Д. Соколова. – СПб.: Наука, 1993. – 352 с.
92. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств: Справ. / Под ред. Г.Л. Вышковского. – М.: Веданта, 2012. – 1612 с.
93. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая Управления) [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://www.consultpharma.ru/index.php/ru/register/reestr-bad>. - 16.07.14.
94. Реестр свидетельств о государственной регистрации (единая форма Таможенного союза, российская часть) [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://www.consultpharma.ru/index.php/ru/register/reestr-bad-ts>. - 16.07.14.
95. Рузляева, Е.А. Фармакологические свойства суммарного экстракта одуванчика лекарственного: автореф. ...к. биолог. наук: 14.00.25 / Рузляева Евгения Александровна. – Томск, 1996. – 22 с.
96. Саканян, Е.И. Вопросы стандартизации свежего лекарственного растительного сырья / Е.И. Саканян, И.В. Сакаева, Н.П. Рукавицына, М.Н. Лякина, Н.П. Антонова, Н.А. Постоюк // Фармация. - 2015. - № 7. - С. 46-48.
97. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. – 2004. - №2. – С. 39-41.
98. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т. 1. – 192 с.
99. Сатдарова, Ф.Ш. Исследование по стандартизации и созданию лекарственных средств на основе плодов и семян лимонника китайского (*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.): дисс. ...канд. фарм. наук: 15.00.02 / Сатдарова Фарида Шамилевна. – Самара, 2009. – 175 с.

100. Сборник методических рекомендаций по стандартизации лекарственных средств / Под ред. член-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. – М.: Пеликан, 2006. – 392 с.
101. Сладков, А.Н. Морфология пыльцы и спор современных растений в СССР / А.Н. Сладков. – М.: Издательство МГУ, 1962. – 256 с.
102. Смирнова, Ю.А. Разработка научно-методических подходов к расширению номенклатуры отечественного официального лекарственного растительного сырья: дисс...канд. фарм. наук /
103. Смолякова, И.Б. Некоторые клинические эффекты лекарственных растений при патологии печени / И.Б. Смолякова, В.А. Куркин, Л.Л. Попова и др.// Актуальные проблемы фармации. Межвузовский сборник трудов. – Тюмень, 1994. – С. 144-145.
104. Струпан, Е.А. Разработка технологии и ассортимента кондитерских изделий и отделочных полуфабрикатов для диетического и лечебно-профилактического питания с использованием функциональных ингредиентов дикорастущего сырья: дис. ...канд. тех. наук: 05.18.15 / Струпан Екатерина Анатольевна. – СПб., 2002. – 169 с.
105. Танхаева, Л.М. Методика количественного определения суммарного содержания полифруктанов в корнях одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) / Л.М. Танхаева, Д.Н. Оленников // Химия растительного сырья. – 2010. - №2. – С. 85-89.
106. Тарасенко, Л.В. Новые подходы к эколого-просветительской деятельности в учебно-образовательном процессе на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ / Л.В. Тарасенко, А.В. Куркина // Теория и практика эколого-просветительской деятельности в природоохранных и образовательных учреждениях Российской Федерации: Материалы II Всероссийской научно-практической конференции. - Тамбов, 2009. - С. 55-58.
107. Тигунцева, Н.П. Методы выделения и состав биологически активных веществ одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.): автореф.

- ...канд. хим. наук: 02.00.10 / Тигунцева Надежда Павловна. – Иркутск, 2014. – 18 с.
108. Уткин, Л.А. Библиография по лекарственным растениям / Л.А. Уткин, А.Ф. Гаммерман, В.А. Невский.- Москва-Ленинград: Издательство академии наук СССР, 1957. – 725 с.
109. Фармацевтическая технология. Руководство к лабораторным занятиям: учеб. пособие / В.А. Быков, Н.Б. Демина, С.А. Скатков, М.Н. Анурова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 304 с.
110. Фархутдинов, Р.Г. Определение содержания йода в растениях республики Башкортостан / Р.Г. Фархутдинов, Н.В. Кудашкина, С.Р. Хасанова, С.В. Трофимова // Растительные ресурсы. – 2013. – Т. 49, № 1. – С. 139-146.
111. Фитотерапия с основами клинической фармакологии: Справ./ Под ред. В.Г. Кукеса. – М.: Медицина, 1999. – 192 с.
112. Флора СССР: Т.29 / Под ред. Е.Г. Боброва, Н.Н. Цвелев. – М.: Наука, 1964. – 796 с.
113. Цаль, О.Я. Рациональное использование одуванчика лекарственного / О.Я. Цаль, М.Д. Литвинчук, М.А. Ситарчук, Л.Я. Роговская // Ресурсы и рациональное использование лекарственных растений: Сборник научных трудов. – Пермь: изд. Пермского фармацевтического института, 1991. – С. 77-79.
114. Цаль, О.Я. Фармакологические свойства и применение одуванчика лекарственного в медицине / О.Я. Цаль, М.А. Ситарчук, Л.Я. Роговская, Л.В. Бензель, М.Д. Литвинчук // Фармакология и токсикология: Республиканский межведомственный сборник. Вып. 26. – Киев: «Здоровья», 1991. – С. 79-83.
115. Чиков, П.С. Лекарственные растения: Справочник. – 2-е изд., перераб. и доп.- М.: Агропромиздат, 1989.- 431 с.
116. Шаталина, Н.В. Исследования различных биологически активных веществ различных вегетативных частей кровохлебки лекарственной, лопуха большого, тысячелистника обыкновенного, одуванчика лекарственного, произрастающих на территории Сибири: дис. ...канд. биолог. наук: 03.00.16 / Шаталина Наталья Владимировна. – Красноярск, 2002. – 158 с.

117. Ярцева, И.Б. Количественное определение суммы флавоноидов в траве одуванчика лекарственного/ И.Б. Ярцева, В.А. Куркин // Фармация. – 1996. - №4. – С.24-27.
118. Abbasi, A.M. Ethnomedicinal values, phenolic contents and antioxidant properties of wild culinary vegetables / A.M. Abbasi, M.H. Shah, Tong Li, X. Fu, X. Guo, R.H. Liu // Journal of Ethnopharmacology. – 2015. – Vol. 162. – P. 333-345.
119. Ali, S.E.F. A study of freeze-dried dandelion root: Ph.D: Health sciences, pharmacy / Salah El-Din Fawzi Ali. – The Ohio State University, 1961. – 79 p.
120. American Herbal Pharmacopeia: botanical pharmacognosy – microscopic characterization of botanical medicines / edited by: Roy Upton ... [et al.], 2011.
121. Asadi-Samani, M. Medicinal plants with hepatoprotective activity in Iranian folk medicine / M. Asadi-Samani, N. Kafash-Farkhad, N. Azimi, A. Fasihi, E. Alinia-Ahandani, M. Rafieian-Kopaei // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2015. – Vol. 5(2). – P. 146-157.
122. Astafieva, A.A. A novel cysteine-rich antifungal peptide ToAMP4 from *Taraxacum officinale* Wigg. flowers / A.A. Astafieva, E.A. Rogozhin, Y.A. Andreev, T.I. Odintsova, S.A. Kozlov, E.V. Grishin, T.A. Egorov // Plant Physiology and Biochemistry. – 2013. – Vol. 70. – P. 93-99.
123. Chkhikvishvili, I.D. Chicoric and chlorogenic acids in plant species from Georgia / I.D. Chkhikvishvili, G.I. Kharebava // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2001. – Vol.37. – No. 2. – P. 188-191.
124. Clare, B.A. The diuretic effect in human subjects of an extract of *Taraxacum officinale* folium over a single day / B.A. Clare, R.S. Conroy, K. Spelman // Journal of Alternative and Complementary Medicine. – 2009. – Vol. 15. – Issue 8. – P. 929-934.
125. Cortes, M. Microscopical descriptions and chemical analysis by HPTLC of *Taraxacum officinale* in comparison to *Hypochaeris radicata*: a solution for mis-identification / M. Cortes, C. Mora, K. Munoz, J. Diaz, R. Serna, D. Castro, E. Osorio // Brazilian Journal of Pharmacognosy. – 2014. – Vol. 24. – P. 381-388.
126. Davaatseren, M. *Taraxacum officinal* (dandelion) leaf extract alleviates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver / M. Davaatseren, H.J. Hur, H.J. Yang, J.-T.

- Hwang, J.H. Park, H.-J. Kim, M.J. Kim, D.Y. Kwon, M.J. Sung // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. – No. 58. – P. 30-36.
127. Dias, M.I. Nutritional composition, antioxidant activity and phenolic compounds of wild *Taraxacum* sect. *Ruderalia* / M.I. Dias, L. Barros, R.C. Alves, M. Beatriz P.P. Oliveira, C. Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira// *Food Research International*. – 2014. – Vol. 56. – P. 266-271.
128. Dudek, G. A spectrophotometric method for planr pigments determination and herb classification / G. Dudek, A. Strzelewicz, M. Krasowska, A. Rybak, R. Turzyn // *Chemical Papers*. 2014. No. 68 (5). – P. 579-583.
129. Eisenman, S.W. *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan* / S.W. Eisenman, D.V. Zaurov, L. Struwe. – Springer, 2013. – P. 236.
130. Escudero, N.L. *Taraxacum officinale* as a food source / N.L. Escudero, M.L. de Arellano, S. Fernandez, G. Albarracin, S. Mucciarelli / *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2003. – No. 10. – P. 1-10.
131. *European Pharmacopeia* / European Directorate for the quality of medicines and healthcare. – 6-th edition, Supplement 6.5. – Council of Europe, Strasbourg, 2008.
132. *German Homoeopathic Parmacopoeia, 5th supplement* / British homoeopathis association. – Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1993. – 401 p.
133. Gol'dberg, E.D. Effect of the extracts from medicinal plants on the development of metastatic process / E.D. Gol'dberg, E.N. Amosova, E.P. Zueva, T.G. Razina, S.G. Krylova, D.V. Reikhart // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2004. - Vol. 138. – No. 3. – P. 288-294.
134. Gulfraz, M. Effect of leaf extracts of *Taraxacum officinale* on CCl₄ induced hepatotoxicity in rats, in vivo study / M. Gulfaz, D. Ahamd, M.S. Ahmad, R. Qureshi, R.T. Mahmood, N. Jabeen, K.S. Abbasi // *Pakistan Journal of Pharmacology Science*. - № 27(4). – 2014. – P. 825-829.
135. Hfaiedh, M. Hepatoprotective effect of *Taraxacum officinale* leaf extract on sodium dichromate-induced liver injury in rats / M. Hfaiedh, D. Brahmi, L. Zourgui // *Environ Toxicology*. - №1. – 2014.

136. Huang, D.-W. Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism via modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes / D.-W. Huang, S.-C. Chen // *Journal of Functional Foods*. – 2012. – Vol. 4. – Issue 1. – P. 358-366.
137. Ivanov, I.G. Polyphenols content and antioxidant activities of *Taraxacum officinale* F.H.Wigg. (Dandelion) / I.G. Ivanov // *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. – 2014. – Vol. 6. – Issue 4. – P. 889-893.
138. Jassim, Abdul Kadir M.N. Identification of dandelion *Taraxacum officinale* leaves components and study its extracts effect on different microorganisms / Abdul Kadir M.N. Jassim, Safanah Ahmed Farhan, Omar Mohammed Noori // *Journal of Al-Nahran University*. – 2012. - Vol.15 (3). – P. 7-14.
139. Kisiel, W. Further sesquiterpenoids and phenolics from *Taraxacum officinale* / W. Kisiel, B. Barszcz // *Fitoterapia*. – 2000. – Vol. 71. – P. 269-273.
140. Krak, K. Trichomes in the tribe Lactuceae (Asteraceae) – taxonomic implications / K. Krak, P. Mraz // *Biologia*. – 2008. – No. 63/5. – P. 616 – 630.
141. Kurkin V.A., Kharisova A.V. Flavonoids of *Cartamus tinctorius* flowers // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2014. - Vol. 50, No. 3. – P. 446-448.
142. Lee, S. Isolation and identification of phytochemical constituents from *Taraxacum coreanum* / S. Lee, S. Han, H.M. Kim, J.M. Lee, S.-Y. Mok, S. Lee // *Journal of Korean Socially Applied Biology and Chemistry*. – 2011. – No. 54 (1). – P. 73-78.
143. Li, Y. Antiviral agents from selected Chinese herbal medicines: Ph.D: Biology / Yaolan Li. – The Chinese University of Hong Kong, 2004. – 201 p.
144. Lim, T.K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Vol. 7. Flowers / T.K. Lim. – Springer, 2014. – 1115 p.
145. Liu, J. Effects of taraxasterol on ovalbumin-induced allergic asthma in mice / J. Liu, H. Xiong, Y. Cheng, C. Cui, X. Zhang, L. Xu, X. Zhang // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2013. – No.148. – P. 787-793.
146. Maas M., Petereit F., Hensel A. Caffeic Acid Derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. // *Molecules*. - 2009.- Vol. 14. – P. 36-45.

147. Martinez, M. *Taraxacum officinale* and related species – An ethnopharmacological review and its potential as a commercial medicinal plant / M. Martinez, P. Poirrier, R. Chamy, D. Prufer, C. Schulze-Gronover, L. Jorquera, G. Ruiz // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2015. – Vol. 169. – P. 244-262.
148. Medical Plants in China: A selection of 150 commonly used species / WHO regional publications, Western Pacific series, №2. – MANILA, 1989. – P. 279.
149. Petkova, N. Biologically active substances and *in vitro* antioxidant activity of different extracts from dandelion (*Taraxacum officinale*) roots / N. Petkova, I. Ivanov, S. Topchieva, P. Denev, A. Pavlov // *Scientific Buletin. Series F. Biotechnology*. – 2015. – Vol. XIX. – P. 190-197.
150. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. V.1 / Chinese Pharmacopoeia Commission, People's Medical Publishing House, 2005. - 975 p.
151. Popescu, M.-L. Contributions to the pharmacognostical and phytobiological study on *Taraxacum officinale* (L.) Weber. / M.-L. Popescu, M. Dinu, D.D. Ursache // *Farmacia*. – 2010. – V.58, №5. – P. 646-653.
152. Quian, L. Preparation and antibacterial activity of oligosaccharides derived from dandelion / L. Quian, Y. Zhou, Z. Teng, C.-L. Du, C. Tian // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – Vol. 64. – P. 392-294.
153. Rodino, S. Comparative studies on antibacterial activity of licorice, elderberry and dandelion / S. Rodino, A. Butu, M. Butu, P.C. Cornea // *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. – 2015. – Vol. 10. – Issue 3. – P. 947-955.
154. Saiah, H. Antioxidant and antibacterial activities of six Algerian medicinal plants / H. Saiah, R. Allem, F.Z. El Kebir // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2016. - Vol. 8. – Issue 1. – P. 367-374.
155. Schutz, K. Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* Web. ex Wigg.) root and herb by high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry / K. Schutz, D.R. Kammerer, R. Carle, A. Schieber // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2005. - Vol.19. – Issue 2. – P. 179-186.

156. Schutz, K. *Taraxacum* – A review on its phytochemical and pharmacological profile / K. Schutz, R. Carle, A. Schieber // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2006. - Vol.107. – P. 313-323.
157. Shakeri A., Ahmadian M. Phytochemical studies of Some Terpene compounds in roots of *Cynara scolymus* // *International Journal of Farming and Allied Science*. – 2014. - Vol. 3, No. 10. – P. 1065-1068.
158. Stylianou, N. Research regarding *Taraxacum officinale* (L.) Weber. with the intension of therapeutic exploring. Note 1. Studies of phenolcarboxylic acids / N. Stylianou, V. Gekas, V. Istudor, C. Ionita // *Farmacia*. – 2014. – Vol. 62. – Issue 2. – P. 358-365.
159. Sun, H.-Y. In vitro antibacterial activities of antibiotics and traditional Chinese medicinal herb extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / H.-Y. Sun, Z.-B. Li, W.-X. Liu, X.-Y. Wang, T.-J. Zhang, Z.-J. Feng // *Asian Journal of Chemistry*. – 2014. – Vol. 26. – Issue 1. – P. 298-302.
160. Sun, Z. Flavonoids extraction from *Taraxacum officinale* (dandelion): optimization using response surface methodology and antioxidant activity / Z. Sun, R. Su, J. Qiao, Z. Zhao, X. Wang // *Journal of Chemistry*. – Vol. 2014. – 7 p.
161. Terencio M.C., Giner R.M., Sanz M.J., Máñez S., Ríos J.L. On the Occurrence of Caffeyltartronic Acid and Other Phenolics in *Chondrilla juncea* // *Zeitschrift für Naturforschung*. – 1993. - Vol. 48C. – P. 417-419.
162. Wang, H.-B. Cellulase-assisted extraction and antibacterial activity of polysaccharides from dandelion *Taraxacum officinale* / H.-B. Wang // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – Vol. 103. – Issue 1. - P. 140-142.
163. Yarnell, E. Dandelion (*Taraxacum officinale* and *T. mongolicum*) / E. Yarnell, K. Abascal // *Integrative Medicine*. – Vol.8. – No.2. – 2009. – P. 35-38.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Микрофотоснимки надземной части одуванчика позднего (*Taraxacum serotinum*)

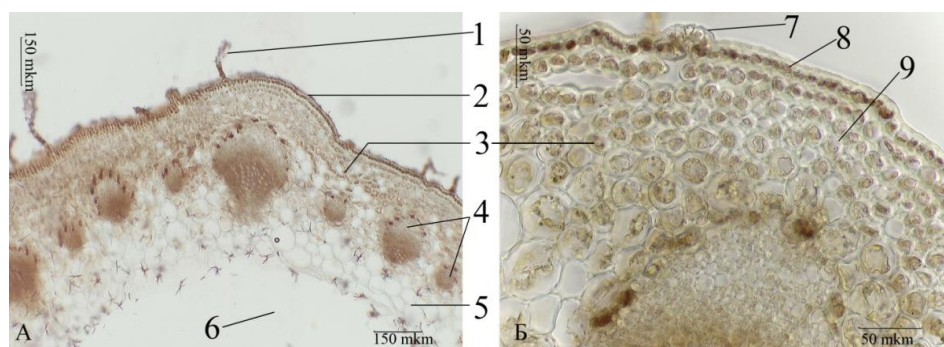


Рисунок 1 - Цветонос одуванчика позднего. Поперечный срез.

А – Окраска 0,1% раствором Судана III (x100); Б – Фрагмент коровой части (x400).

Обозначения: 1 – трихома; 2 – эпидермис с кутикулой; 3 – хлоренхима; 4 – коллатеральные пучки; 5 – паренхима сердцевины; 6 – полость; 7 – устьичный аппарат; 8 – пигментированные клетки эпидермы; 9 - колленхима.

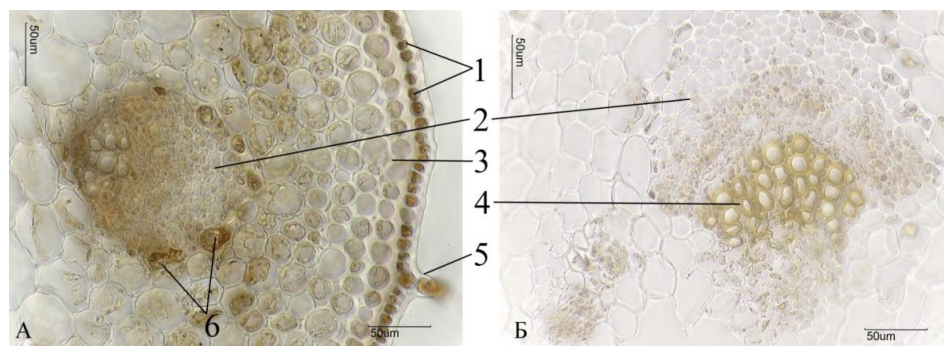


Рисунок 2 – Проводящие пучки цветоноса на поперечных срезах (x400).

А – нативный препарат; Б – окраска 10% раствором сернокислого анилина.

Обозначения: 1 – пигментированные клетки эпидермы; 2 – флоэма; 3 – колленхима; 4 – ксилема; 5 – трихома; 6 - млечники.

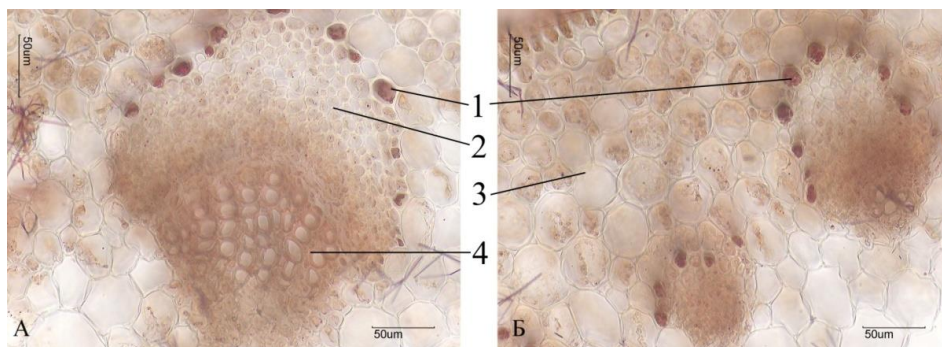


Рисунок 3 – Окраска поперечных срезов цветоноса 1% раствором Судана III (x40).

А – фрагмент с крупным пучком; Б – фрагмент с мелкими вторичными пучками.

Обозначения: 1 – млечники; 2 – флоэма; 3 – хлоренхима; 4 – ксилема.

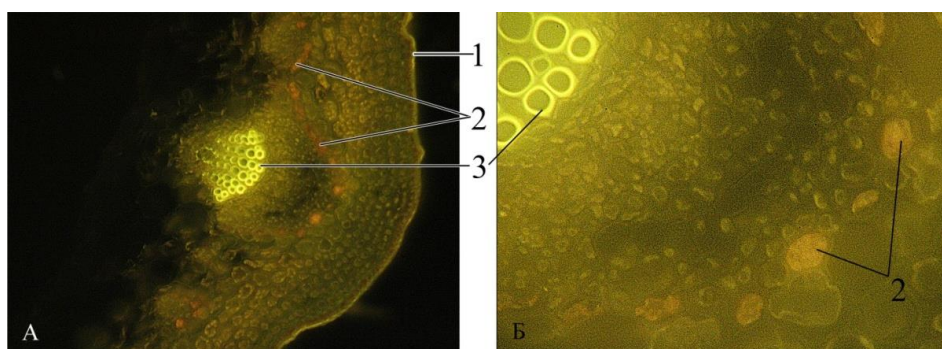


Рисунок 4 – Люминесценция тканей цветоноса одуванчика позднего на поперечном срезе (люминесцентный фильтр G).

А – фрагмент с пучком (x100); Б – фрагмент флоэмы пучка (x400).

Обозначения: 1 - кутикула, 2 - млечники, 3 – сосуды ксилемы.

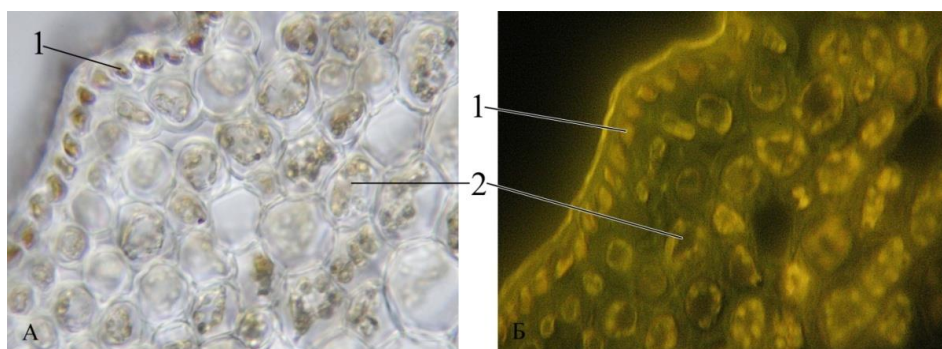


Рисунок 5 – Люминесценция тканей цветоноса одуванчика позднего на поперечном срезе (x400).

А – фрагмент эпидермы при дневном освещении; Б – фрагмент эпидермы при освещении УФ-светом (люминесцентный фильтр G).

Обозначения: 1 – протопласт эпидермальных клеток; 2 – протопласт паренхимных клеток.

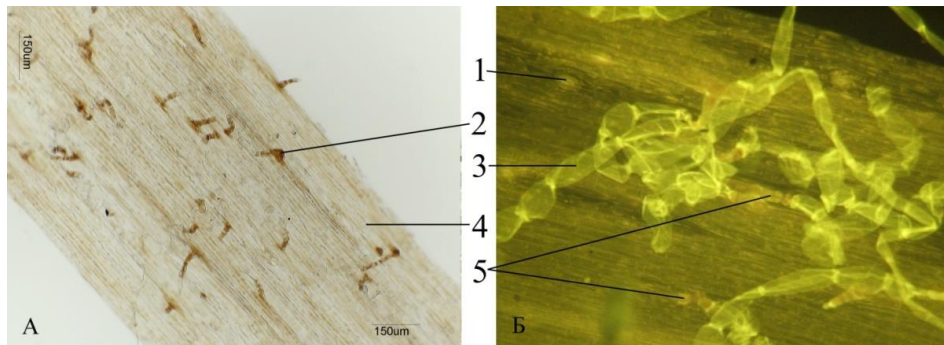


Рисунок 6 – Люминесценция трихом цветоноса одуванчика позднего при рассмотрении с поверхности (x100).

А – фрагмент эпидермы при дневном освещении; Б – фрагмент эпидермы при освещении УФ-светом (люминесцентный фильтр G).

Обозначения: 1 – устьичный аппарат; 2 – трихома; 3 – люминесценция кутикулы трихом; 4 – поверхность эпидермы; 5 – пигментированные клетки основания трихом.



Рисунок 7 – Люминесценция трихом цветоноса одуванчика позднего при рассмотрении с поверхности (x400).

А – фрагмент трихом при дневном освещении; Б – фрагмент трихом при освещении УФ-светом (люминесцентный фильтр G).

Обозначения: 1 – клетки эпидермы; 2 – кутикула трихом; 3 – пигментированные клетки основания трихом.

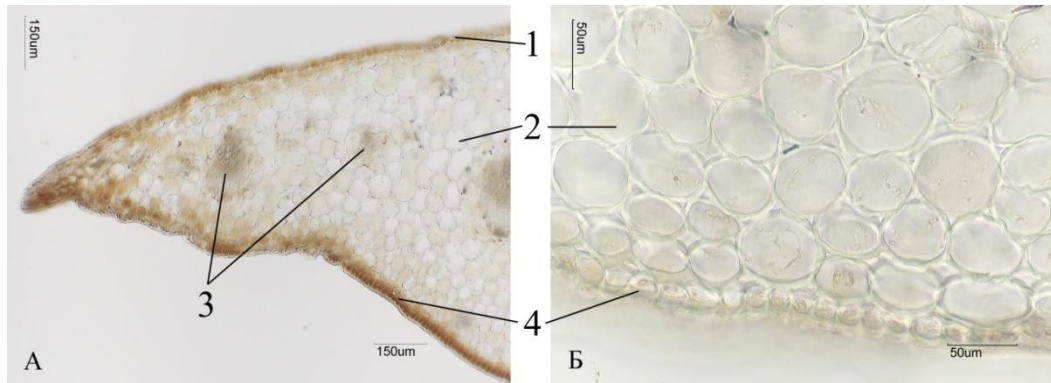


Рисунок 8 – Поперечное сечение листа одуванчика позднего в месте прикрепления.

А – Фрагмент края листовой пластинки (x100); Б – Фрагмент абаксиальной стороны (x400).

Обозначения: 1 – верхний эпидермис листа; 2 - паренхима; 3 - пучки; 4 – нижний эпидермис листа.

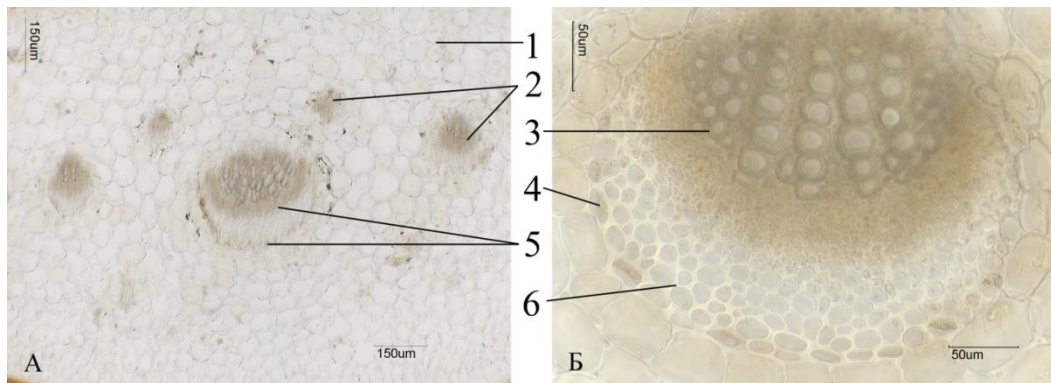


Рисунок 9 - Поперечное сечение листа одуванчика позднего в месте прикрепления.

А – Фрагмент центральной части среза (x100); Б – Основной пучок центральной жилки (x400).

Обозначения: 1 – паренхима; 2 – мелкие пучки; 3 - ксилема; 4 - млечники; 5 – центральный пучок; 6 - флоэма.

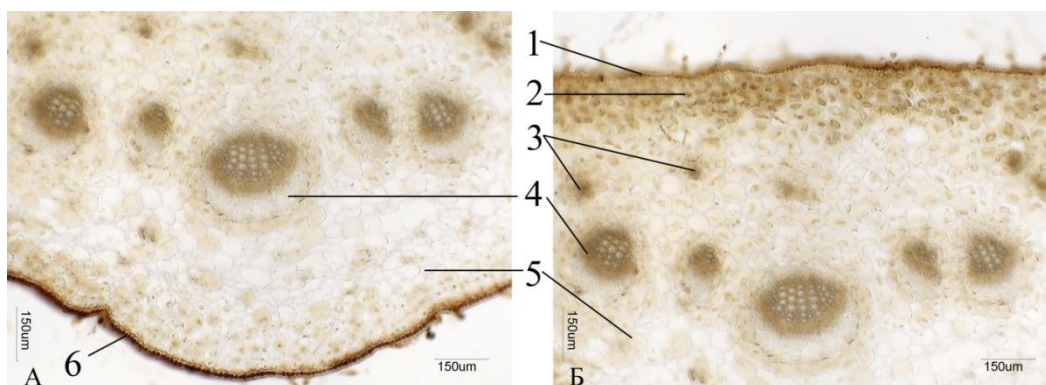


Рисунок 10 – Поперечный срез листа одуванчика позднего в медиальной части (x100).

А – Фрагмент абаксиальной стороны; Б – Фрагмент адаксиальной стороны.

Обозначения: 1 – верхний эпидермис; 2 - мезофилл; 3 – мелкие пучки; 4 – крупные пучки; 5 – паренхима жилки; 6 – нижний эпидермис.

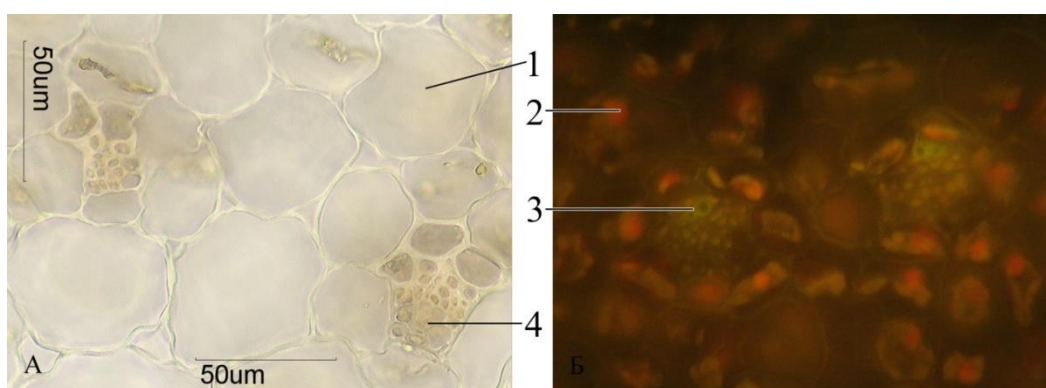


Рисунок 11 – Люминесценция тканей листа одуванчика позднего на поперечном срезе в базальной части (x400).

А – фрагмент эпидермы при дневном освещении; Б – фрагмент эпидермы при освещении УФ-светом (люминесцентный фильтр G).

Обозначения: 1 – протопласт эпидермальных клеток; 2 – протопласт паренхимных клеток; 3 – проводящие пучки; 4 - ксилема.

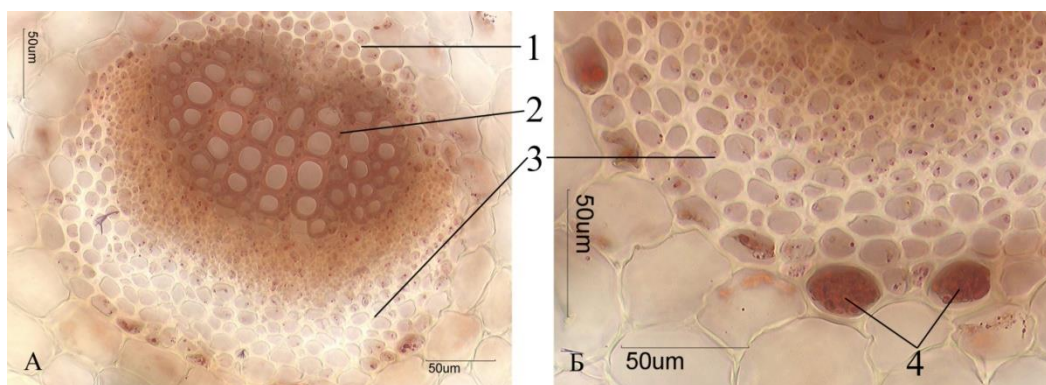


Рисунок 12 – Пучок центральной жилки. Окраска раствором Судана III (x400).

А – Общий вид пучка; Б - Фрагмент с млечниками.

Обозначения: 1 - склеренхима; 2 – ксилема; 3 - флоэма; 4 – млечный сок.

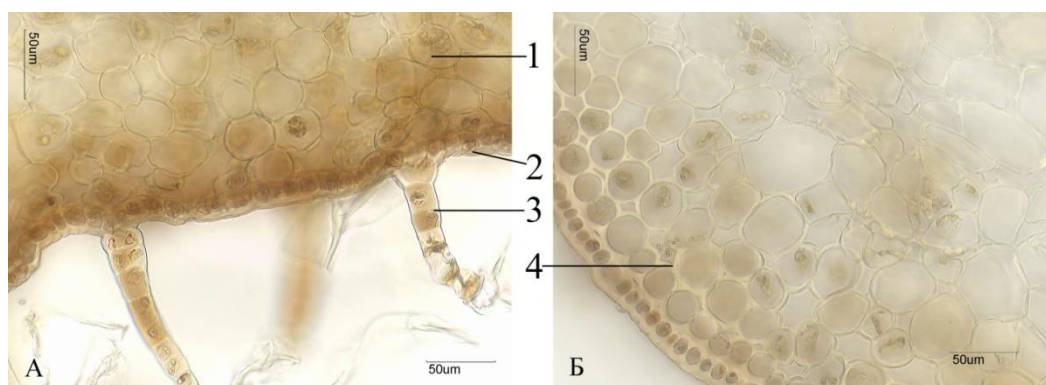


Рисунок 13 – Поперечное сечение листа одуванчика позднего в медиальной части (x400).

А – Фрагмент эпидермы с трихомами; Б – фрагмент эпидермы центральной жилки с колленхимой.

Обозначения: 1 - мезофилл; 2 - эпидермис; 3 – простой многоклеточный волосок; 4 – уголковая колленхима.

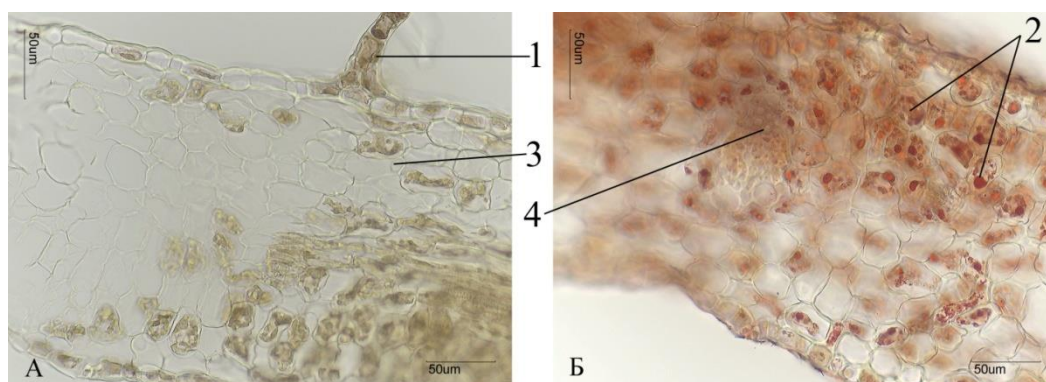


Рисунок 14 – Поперечное сечение листовой пластинки в апикальной части (x400).

А – До окрашивания; Б – Окраска раствором Судана III.

Обозначения: 1 – Трихома; 2 – столбчатый мезофилл; 3 – губчатый мезофилл; 4 – пучок.

Сравнительная характеристика морфологических диагностических признаков одуванчика лекарственного и цикория обыкновенного

<i>Морфологические признаки листа</i>		
Признак	Цикорий	Одуванчик
Размеры	В длину до 20 см Ширина по собственным данным – до 5 см.	10-25 см в длину, 1,5-5 см в ширину
Тип листа (простой сложный. Сидячий черешковый)	Простой, сидячий, прикорневые листья собраны в розетку	Простой
Форма листовой пластинки (округлая, яйцевидная, ланцетовидная и т.д. струговидная)	Струговидная Стеблевые листья ланцетные	Ланцетные, продолговатоланцетные, к основанию суженные
Степень изрезанности листовой пластинки (цельная, лопастная, раздельная, рассеченная)	От перистонадрезанных до цельных Нижние листья выемчато перистораздельные, с более крупной верхушечной долей	Выемчато-перистонадрезанные или немного паутинистые. Струговидно перистораздельные или перистолопастные, с более менее вниз отклоненными, часто зубчатыми по краю долями и более крупной конечной долей, реже цельные
Верхушка листовой пластинки	Клиновидная	Клиновидная
Основание листовой пластинки	Основание широкое, стеблеобъемлющее	Узкое избегающее
Край листовой пластинки	Стеблевые – острозубчатые, верхушечные – цельнокрайные	Выемчато-зубчатые
Жилкование листовой пластинки	Перистое	Перистое
Опушение листовой пластинки	С нижней стороны щетинисто и курчавоволосистые, с верхней стороны более менее курчавоволосистые	Немного паутинистые

Сравнительная характеристика анатомо-гистологических диагностических признаков одуванчика лекарственного и цикория обыкновенного

<i>Анатомо-гистологические признаки листа</i>		
Признак	Цикорий	Одуванчик
Анатомический тип листовой пластинки (дорзо/изо)	Дорзовентральный тип строения	Дорзовентральный
Выраженность и особенности мезофилла	Рыхлый мезофилл. Палисадная паренхима под верхним эпидермисом, одно-двурядная, с очень низкими клетками (нетипичная) Рыхлая структура ассимиляционной ткани - столбчатый и губчатый мезофилл плохо диагностируется. Столбчатый мезофилл расположен с обеих сторон листа. Рыхлый мезофилл, расположенный в центре листовой пластины, выражен слабее.	Палисадная паренхима расположена в 2 ряда. В губчатом мезофилле расположены крупные полости межклеточного пространства
Жилкование. Наличие выраженной центральной жилки	Главная жилка с 1-несколькими проводящими пучками, число проводящих пучков в главной жилке возрастает по мере продвижения вниз по листу	Полость внутри центральной жилки, вокруг полости расположены проводящие пучки ксилемой к полости
Количество проводящих пучков, Их тип. И особенности расположения в листе	Количество пучков варьирует по длине листа. Наибольшее их количество в основании. Проводящая система центральной части листа - разноразмерные закрытые коллатеральные пучки	Пучки коллатеральные, многочисленные, расположены вокруг центральной полости
Особенности структуры пучков. (армированность, гистология ксилемы/флоэмы, наличие выделительных элементов-млечников)	Членистые млечники по ходу пучка Пучки на поперечном сечении овальной формы. Флоэмная часть наиболее выражена. Она значительно армирована клетками с сильно утолщенными целлюлозными оболочками. Ксилемная часть пучка сложена из радиально расположенных сосудов с паренхимой сердцевинных лучей. Со стороны ксилемы пучок незначительно армирован клетками с толстыми целлюлозными оболочками/	Млечники расположены полукругом по наружному диаметру флоэмы
Паренхима центральной	Центральная часть листа сильно	Млечники расположены

жилки. (основная выполняющая, аэренхима, полость, млечники вне пучков)	паренхимизирована округлыми клетками с целлюлозными оболочками. В паренхиме встречаются мелкие межклетники. Протопласт клеток паренхимы слабо диагностируется. В паренхиме средней части, по всей длине листа встречаются полости респираторного происхождения. При этом ближе к основанию листа полости наиболее крупные/	параллельно жилкам и могут быть видны через нижний эпидермис; аэренхима.
АРМИРОВАННОСТЬ листовой пластинки Колленхима (локализация, тип утолщений стенок)	Центральная часть листа армирована уголково-пластинчатой колленхимой. Колленхима насчитывает 1-2 ряда клеток с верхней и нижней стороны центральной жилки, с ее бортов колленхима может отсутствовать.	Колленхима под эпидермисом с обеих сторон, также по ходу центральной жилки и других крупных жилок
Эпидермис низ/верх, жилка (характер клеток эпидермы: форма, размеры, извилистость, степень утолщенности клеточной стенки, особенности протопласта)	Сильноизвилистые, тонкостенные. Эпидермис обеих сторон листа относительно однородный. Клетки эпидермы с обеих сторон тонкостенные паренхимные с волнисто извилистыми целлюлозными клеточными стенками. На верхней стороне изредка встречаются растрескивания с бурыми краями. На поперечном сечении эпидермальные клетки листовой пластинки овальной формы с заметно утолщенными клеточными стенками с поверхности листа. Эпидермис покрыт тонким слоем кутикулы. Эпидермис над крупными центральными жилками сложен из вытянутых веретеновидных клеток. В протопласте эпидермальных клеток над жилкой диагностируются пластиды.	Верхний и нижний эпидермис схожи между собой, стенки клеток извилистые
Производные эпидермы. Устьичные аппараты (типы, локализация, размеры, характер замыкающих клеток)	Устьица аномоцитного типа, с обеих сторон листа, многочисленные, некрупные, от овальных до почти круглых. Устьица аномоцитного типа локализованы на обеих его сторонах	Устьица аномоцитного типа, 25-35 мкм в длину.
Производные эпидермы. Трихомы (типы, локализация, особенности-структуры: основание волоска,	1-рядные и 2-3-рядные (в нижней части). 1-рядные из сильно колеблющегося числа клеток, стенки утончаются к кончику волоска, базальная клетка выдвинута по отношению к смежным эпидермальным. 2-3-рядные	Встречаются однорядные волоски, основание из нескольких квадратных, хорошо развитых клеток и может быть двух- или многорядным. Конечные клетки

<p>окончание волоска).</p>	<p>расположены на многоклеточной подставке; подразделяются на простые и железистые. Длинноконические, покрыты грубой бородавчатой кутикулой. Железистые волоски с небольшой железистой головкой из нескольких клеток.</p> <p>Лист опушен многоклеточными волосками двух типов. Первый тип встречается реже и представлен однорядными тонкостенными волосками с темноокрашенным протопластом клеток. Волоски описанного типа встречаются в основном с нижней стороны как основной эпидермы, так и эпидермы над жилкой.</p> <p>Трихомы второго типа многорядные, с широким многоклеточным основанием, от двух до четырех клеток в толщину. Основание волосков сложено из толстостенных клеток, расположенных по окружности. Клетки многорядных трихом покрыты бородавчатой кутикулой.</p> <p>Многорядные трихомы могут быть железистыми и кроющими. Кроющие трихомы оканчиваются сильно спавшимися клетками. Железистые трихомы оканчиваются небольшой железистой головкой.</p>	<p>тонкостенные, смятые и часто большего диаметра, чем базальные клетки. Конечные клетки округлые. У основания трихом наблюдается морщинистость кутикулы.</p>
----------------------------	---	---

Микрофотоснимки листа цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.)

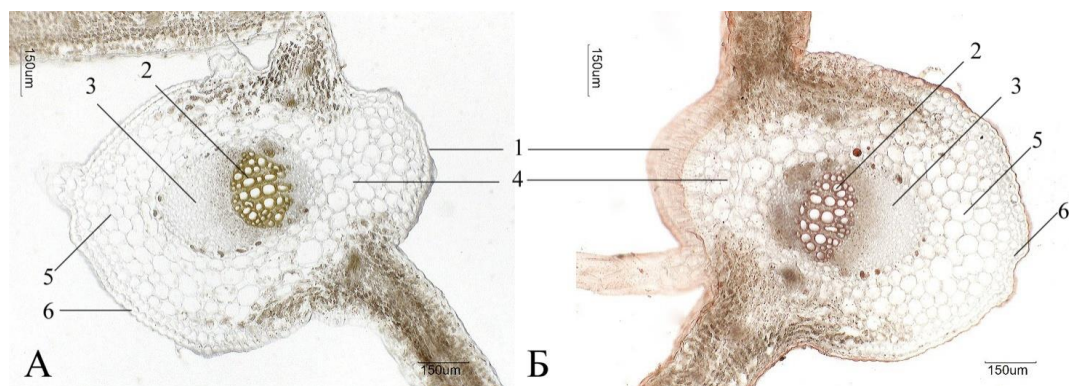


Рисунок 1 - Поперечный срез листа цикория обыкновенного (x100).

А - окрашивание сернокислым анилином; Б - окрашивание раствором Судана (III).

Обозначение: 1 – кутикула; 2 – ксилема; 3- флоэма; 4- клетки паренхимы с адаксиальной стороны; 5 – клетки паренхимы с абаксиальной стороны; 6 - эпидермис.

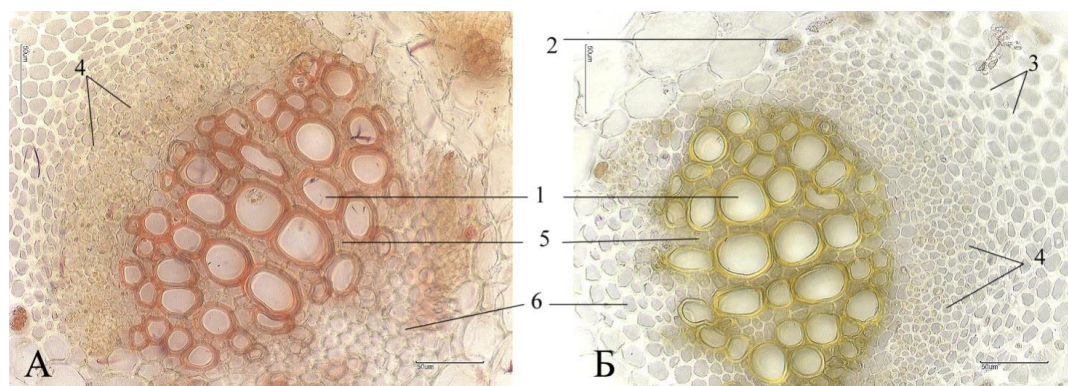


Рисунок 2 - Проводящий пучок центральной жилки листа цикория (x 400).

А - окрашивание раствором Судана (III); Б - окрашивание раствором сернокислого анилина.

Обозначение: 1 – сосуды ксилемы; 2 – млечник; 3- толстостенные клетки флоэмы; 4 – тонкостенные клетки флоэмы; 5 – сердцевинный луч; 6 – ксилемная паренхима.

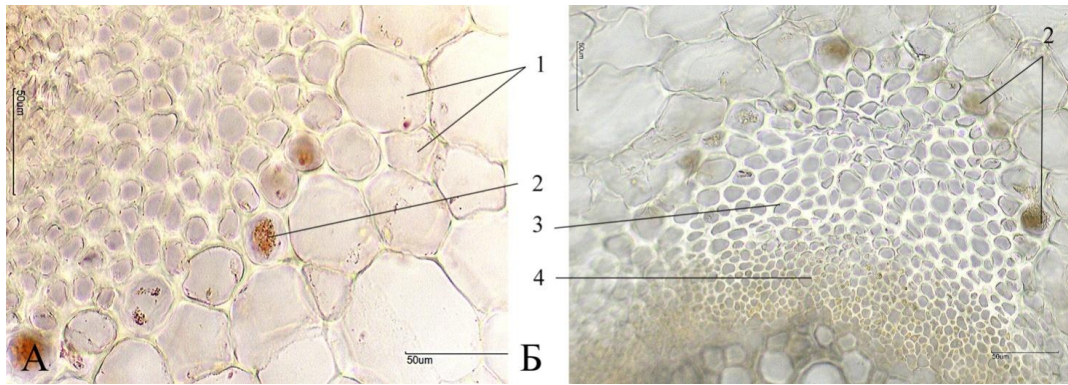


Рисунок 3 - Поперечный срез листа цикория обыкновенного (x 400).

А - окраска раствором Судана (III); Б – препарат до окрашивания.

Обозначение: 1 –клетки паренхимы; 2 – млечники; 3- толстостенные клетки флоэмы; 4 –тонкостенные клетки флоэмы.

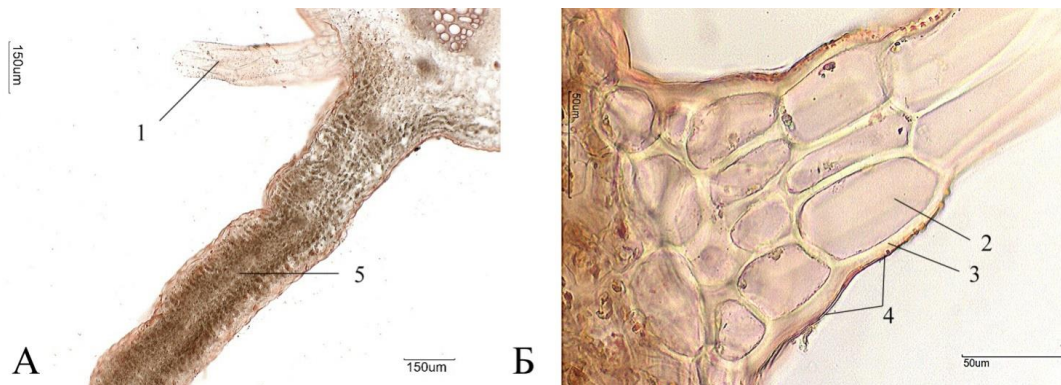


Рисунок 4 - Фрагмент поперечного среза листа с волоском. Окрашивание раствором Судана (III).

А - Поперечный срез листовой пластинки (x100); Б - основание многоклеточного волоска (x400).

Обозначение: 1 –фрагмент волоска; 2 – клетка основания волоска; 3- клеточная стенка волоска; 4- кутикула; 5 – мезофилл листа.

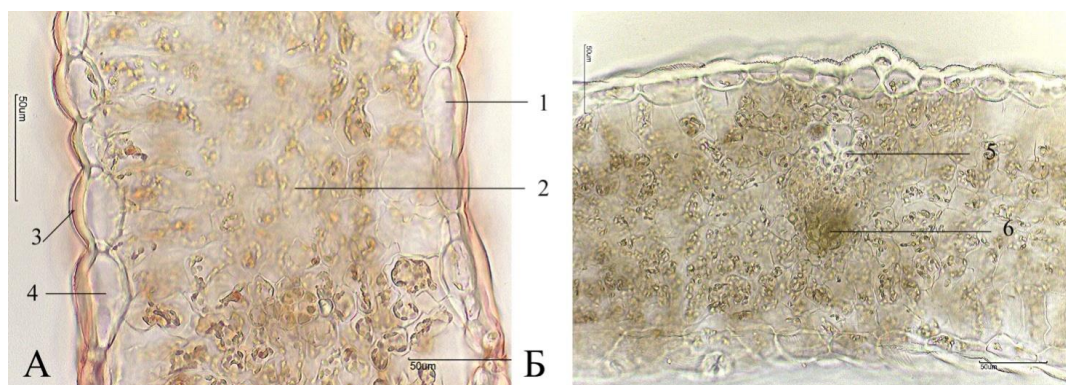


Рисунок 5 - Поперечный срез листовой пластинки (x400).

А - окраска раствором Судана (III); Б - препарат до окрашивания.

Обозначение: 1 – клетки нижнего эпидермиса; 2 – мезофилл листа; 3- кутикула; 4- клетки верхнего эпидермиса; 5- флоэма пучка; 6 – ксилема пучка.

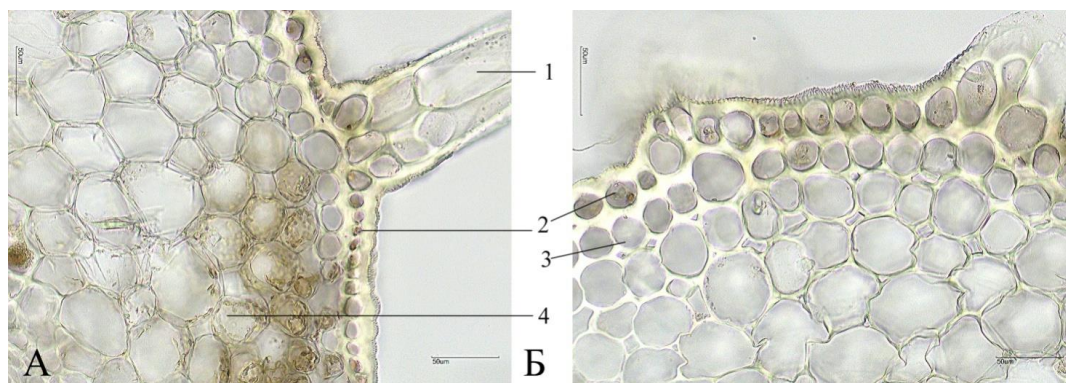


Рисунок 6 - Фрагмент поперечного среза листа (x400).

А - фрагмент эпидермиса с основанием волоска; Б - фрагмент эпидермиса.

Обозначение: 1 – клетка волоска; 2 – эпидермис; 3- колленхима; 4- хлорофиллоносная паренхима жилки.

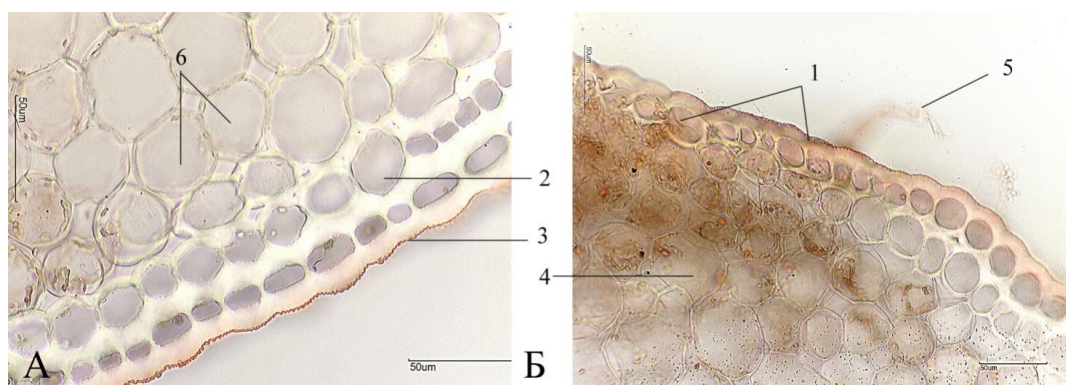


Рисунок 7 - Колленхима листа цикория обыкновенного (x400). Окрашивание

раствором Судана (III).

А – эпидермис центральной жилки; Б - фрагмент с трихомой.

Обозначение: 1 – клетки эпидермиса; 2 – колленхима; 3- кутикула; 4- клетки хлорофиллоносной паренхимы; 5 – волосок; 6 – клетки паренхимы.

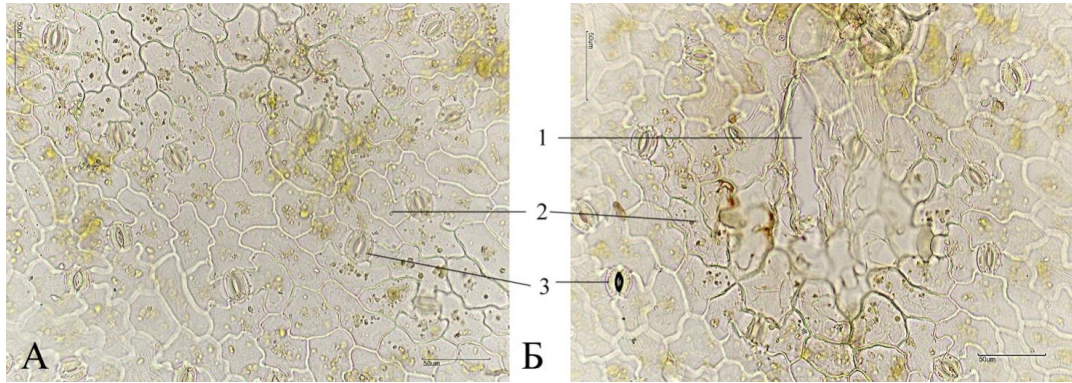


Рисунок 8 – Верхний эпидермис листа цикория обыкновенного (x400).

А - фрагмент эпидермы; Б - фрагмент с растрескиванием.

Обозначение: 1 – растрескивание эпидермы; 2 – клетки эпидермиса; 3- устьичные аппараты.

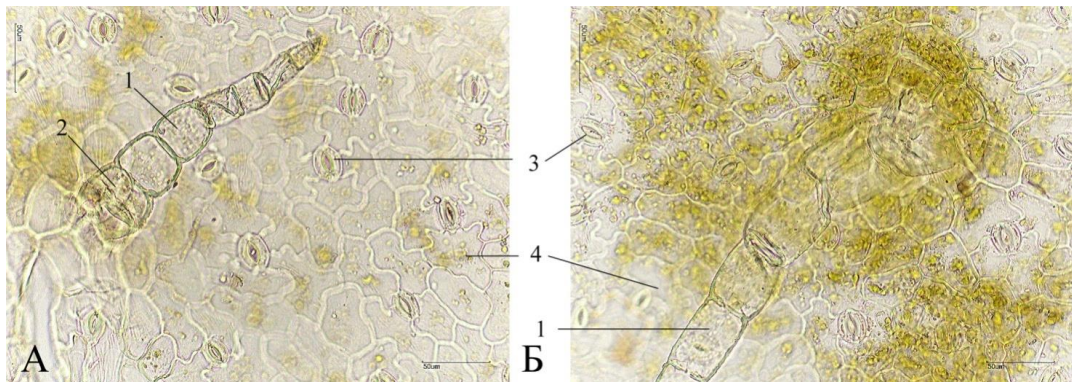


Рисунок 9 – Опушение верхнего эпидермиса листа цикория обыкновенного (x400).

А - фрагмент с трихомой; Б - фокус на основание трихомы.

Обозначение: 1 – клетки однорядного волоска; 2 – клетка основания волоска; 3 – устьичные аппараты; 4 - клетки эпидермиса.

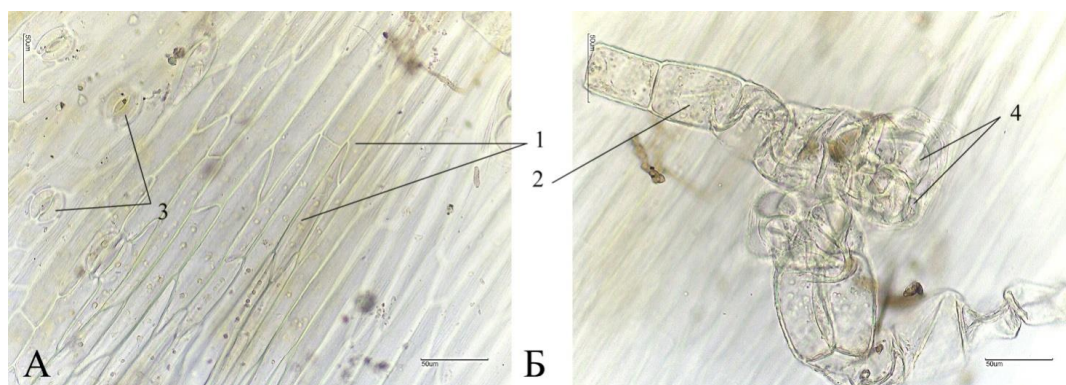


Рисунок 10 – Верхний эпидермис листа цикория обыкновенного над жилкой (x400).

А - верхний эпидермис над жилкой, общий вид; Б - опушение верхнего эпидермиса над жилкой.

Обозначение: 1 – клетки верхнего эпидермиса; 2 – клетки одноклеточного волоска; 3 – устьичные аппараты; 4 - клетки основания волоска.

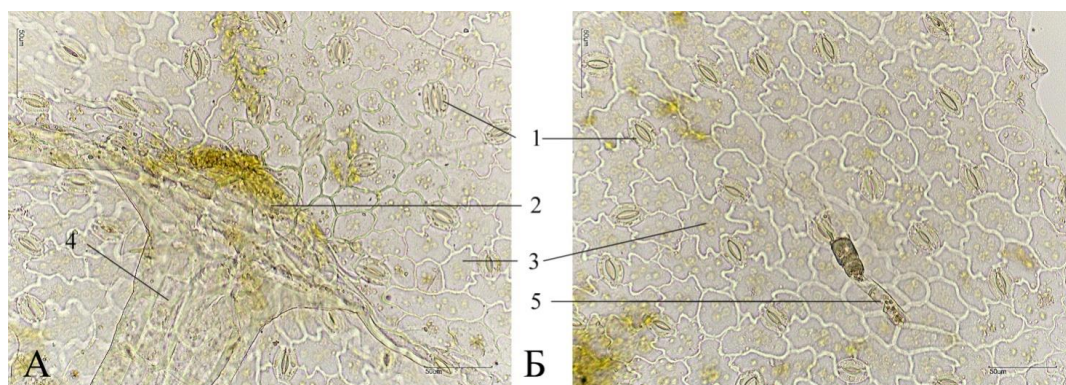


Рисунок 11 – Нижний эпидермис листа цикория обыкновенного (x400).

А - фрагмент эпидермиса с основанием многоклеточного волоска; Б - фрагмент нижнего эпидермиса с одноклеточным волоском.

Обозначение: 1 – устьичные аппараты; 2 – основание волоска; 3 - клетки нижнего эпидермиса; 4 - клетки многоклеточного волоска; 5 - одноклеточный тонкостенный волосок.

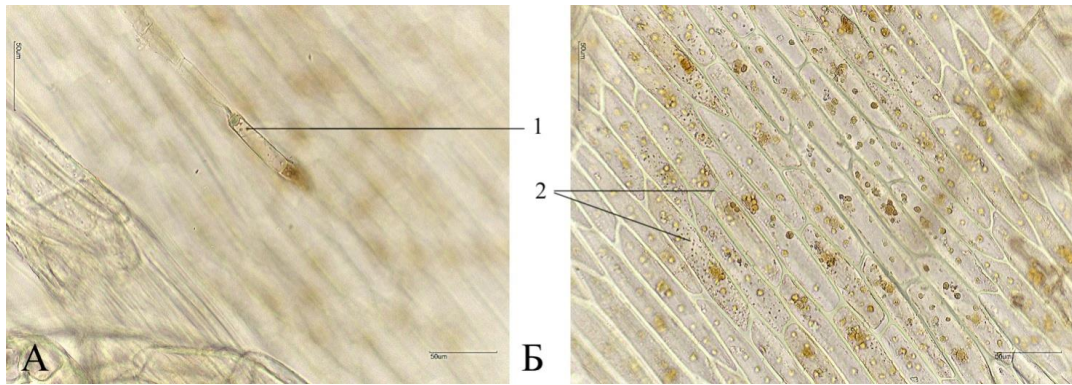


Рисунок 12 - Нижний эпидермис листа цикория обыкновенного над жилкой (x400).

А - фрагмент с трихомой; Б - общий вид эпидермы.

Обозначение: 1 – однорядный тонкостенный волосок; 2 – клетки с хлоропластами.

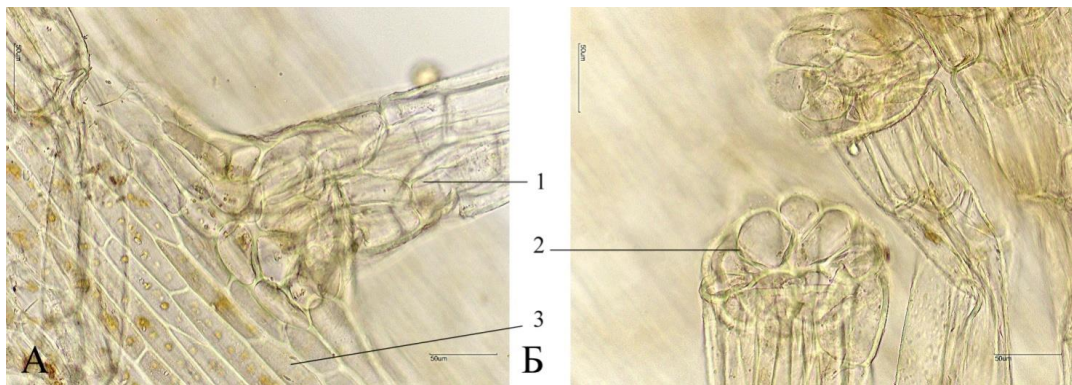


Рисунок 13 - Многоклеточные бичевидные волоски на эпидерме жилки нижней стороны листа (x 400).

А - фрагмент волоска с боку; Б- фрагмент основания.

Обозначение: 1 – клетки многоклеточного волоска; 2 – клетки основания волоска; 3- клетки эпидермиса над жилкой.

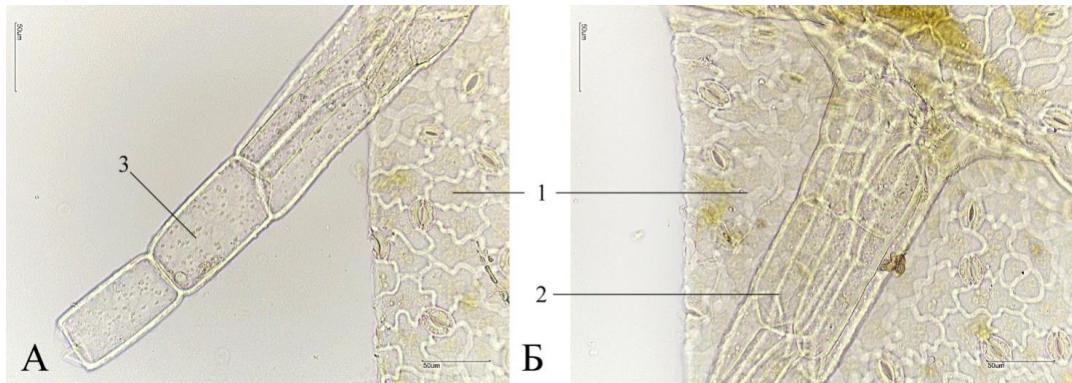


Рисунок 14 - Многорядные волоски на нижней эпидерме листовой пластинки (x 400).

А - фрагмент волоска с бородавчатой кутикулой; Б- фрагмент основания многорядного волоска.

Обозначение: 1 – клетки эпидермы; 2 – клетки волоска; 3- бородавчатая кутикула.

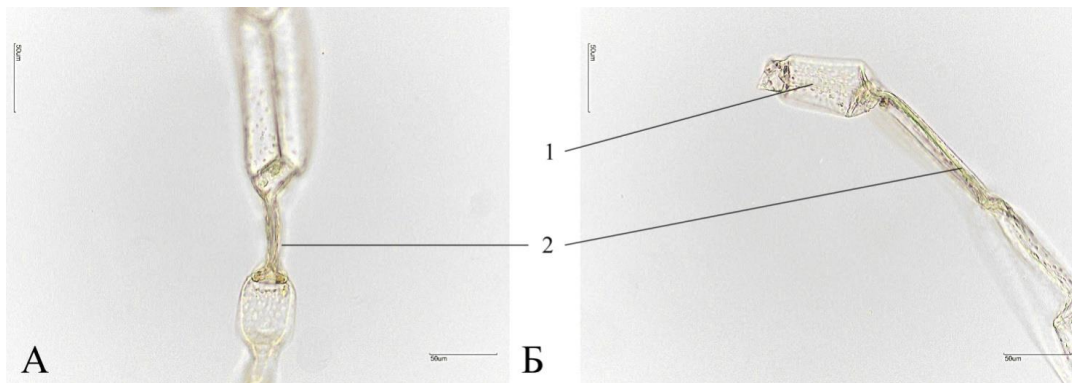


Рисунок 15 - Высыхающие клетки однорядной трихомы (x 400).

А - середина трихомы; Б - край трихомы.

Обозначение: 1 – конечная клетка трихомы; 2 – высыхающие клетки.

**Микрофотоснимки стебля цикория обыкновенного
(*Cichorium intybus* L.)**

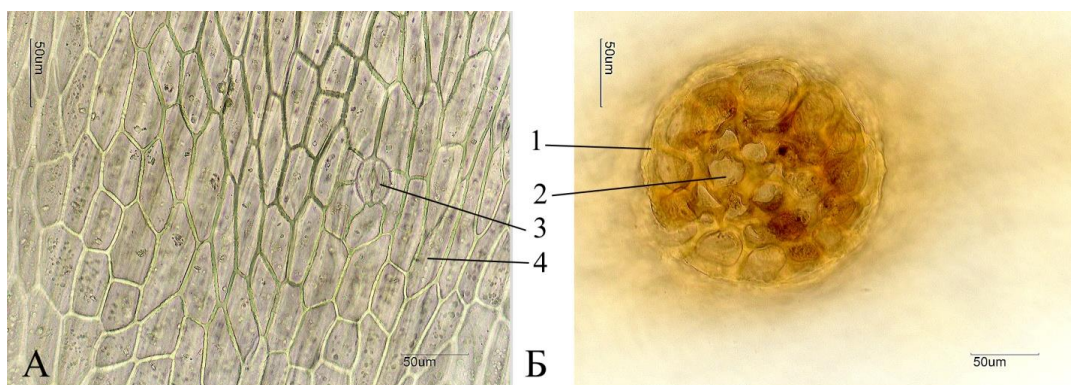


Рисунок 16 - Эпидермис стебля(х400). Вид с поверхности.

А – эпидермис с устьищем; Б – фрагмент эпидермы с местом прикрепления волоска.

Обозначение: 1 – кутикула; 2 – клетки основания трихомы; 3 – устьица; 4 – клетки эпидермы.

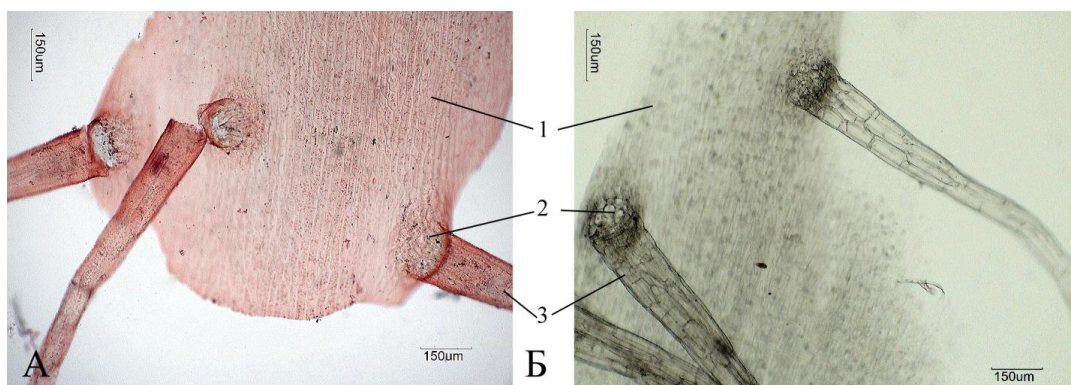


Рисунок 17 - Многоклеточные волоски стебля (х100). Вид с поверхности.

А – окраска 10% раствором Судана III; Б – фрагмент эпидермы без окраски.

Обозначение: 1 – эпидермис; 2 – основание волоска; 3 – клетки трихомы.

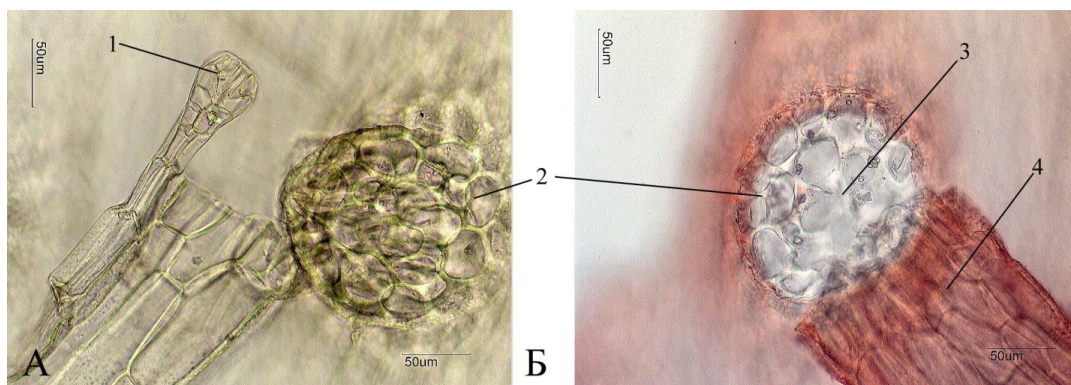


Рисунок 18 - Особенности структуры трихом не стебле (х400).

А – фрагмент трихомы с головкой; Б – окраска 10% раствором Судана III.

Обозначение: 1 – головка волоска; 2 – основание волоска; 3 – паренхима основания; 4 – клетки трихомы.

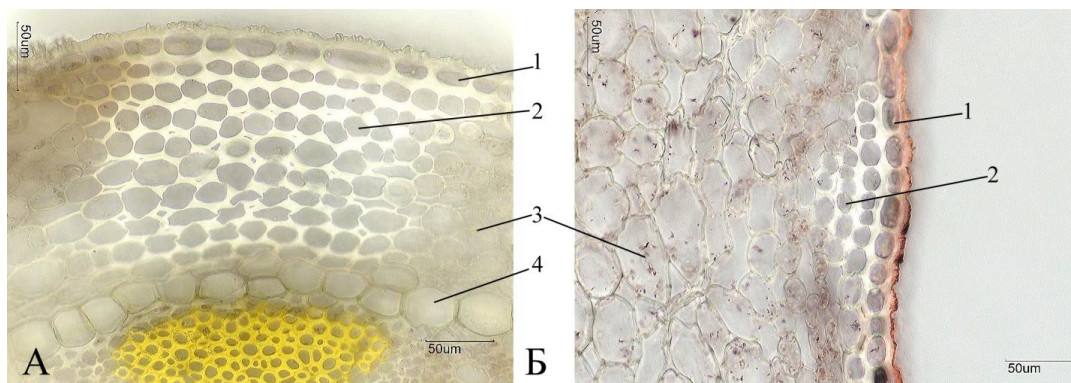


Рисунок 19 - Колленхима стебля (x400). Поперечный срез.

А – фрагмент колленхимы над пучком, окраска 5% раствором сернокислого анилина; Б – кутикула над эпидермой, окраска 10% раствором Судана III.

Обозначение: 1 – эпидерма; 2 – уголково-пластинчатая колленхима; 3 – хлоренхима первичной коры; 4 – эндодерма.

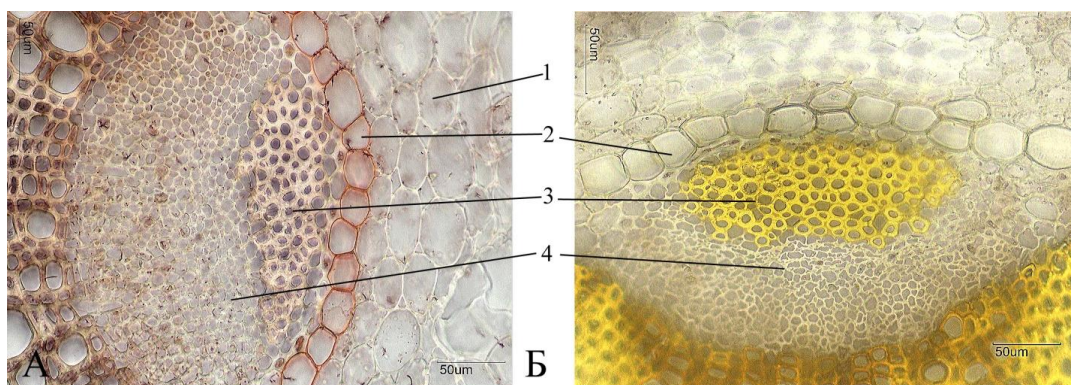


Рисунок 20 - Флоэмная часть проводящего пучка (x400). Поперечный срез.

А - окраска 5% раствором сернокислого анилина; Б - окраска 10% раствором Судана III.

Обозначение: 1 – хлоренхима первичной коры; 2 – эндодерма; 3 – склеренхима; 4 – проводящие элементы флоэмы.

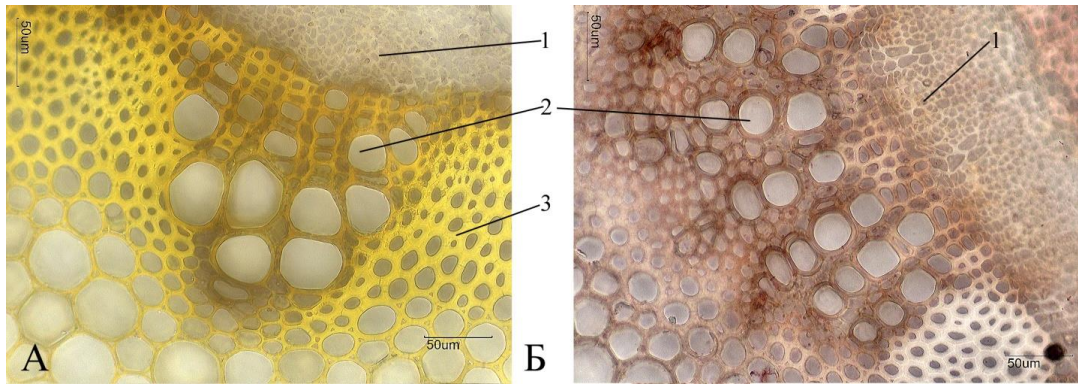


Рисунок 21 - Ксилемная часть проводящего пучка (x400). Поперечный срез.

А - окраска 5% раствором сернокислого анилина; Б - окраска 10% раствором Судана III.

Обозначение: 1 – проводящие элементы флоэмы; 2 – сосуды ксилемы; 3 – склеренхима.

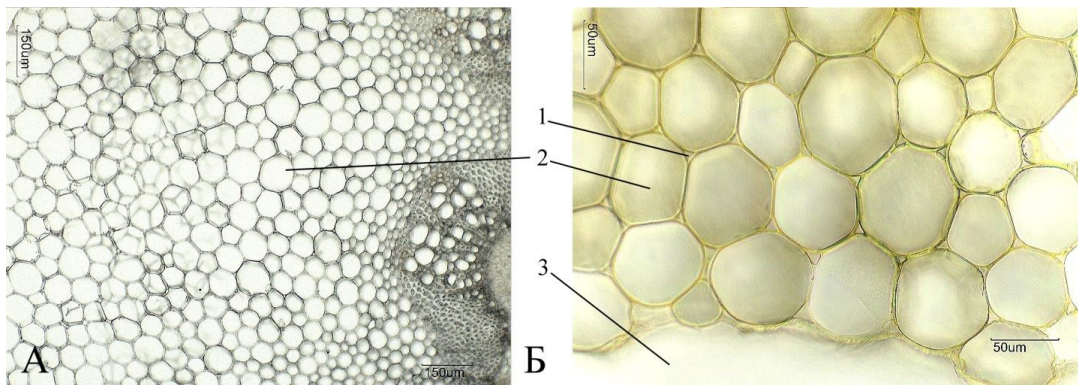


Рисунок 22 - Сердцевина стебля. Поперечное сечение.

А – общий вид сердцевины (x100); Б – фрагмент сердцевины, окраска 5% раствором сернокислого анилина (x400).

Обозначение: 1 – межклетник; 2 – клетки сердцевины; 3 – полость.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4**«Утверждаю»**

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава
 России, академик РАН,
 лауреат Государственной премии РФ,
 дважды лауреат премии Правительства РФ,
 заслуженный деятель науки РФ,
 профессор _____ Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ
 « _____ » _____ 2016 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Азнагуловой Анастасии Викторовны «Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

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

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе одуванчика лекарственного.

Члены комиссии:

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

И.Ф. ШАТАЛАЕВ

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

А.В. ВОРОНИН

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

С.Х. ШАРИПОВА

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

«Утверждаю»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава
 России, академик РАН,
 лауреат Государственной премии РФ,
 дважды лауреат премии Правительства РФ,
 заслуженный деятель науки РФ,
 профессор _____ Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ
 «_____» _____ 2016 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Азнагуловой Анастасии Викторовны «Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

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

Внедренные результаты способствуют разработке объективных методик диагностики и определения качества сырья одуванчика лекарственного и препаратов на его основе.

Члены комиссии:

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

В.А. КУРКИН

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

Е.В. АВДЕЕВА

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

О.Е. ПРАВДИВЦЕВА

«Утверждаю»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава
 России, академик РАН,
 лауреат Государственной премии РФ,
 дважды лауреат премии Правительства РФ,
 заслуженный деятель науки РФ,
 профессор _____ Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ
 «_____» _____ 2016 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Азнагуловой Анастасии Викторовны «Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

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

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

Члены комиссии:

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

С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры фармацевтической технологии,
 к. фарм. н.

Л.Д. КЛИМОВА

Старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии,
 к. фарм. н.
 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

О.В. БЕР

«Утверждаю»

Ректор ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава
 России, академик РАН,
 лауреат Государственной премии РФ,
 дважды лауреат премии Правительства РФ,
 заслуженный деятель науки РФ,
 профессор _____ Г.П. КОТЕЛЬНИКОВ
 « _____ » _____ 2016 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Азнагуловой Анастасии Викторовны «Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России

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

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе травы одуванчика лекарственного и создания конкурентоспособных желчегонных и диуретических лекарственных средств, в том числе импортозамещающих препаратов.

Члены комиссии:

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

И.К. ПЕТРУХИНА

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

Е.П. ГЛАДУНОВА

Доцент кафедры управления и экономики фармации,
 к. фарм. н.
 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

Е.Л. АБДУЛМАНОВА

«Утверждаю»

Начальник центра ГБУЗ

«Центр контроля качества лекарственных
средств Самарской области»

_____ Е.А. КАЛАБУХОВА

« ____ » _____ 2016 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Азнагуловой Анастасии Викторовны «Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» заместителя начальника центра Демидовой Г.А., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Мироновой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Азнагуловой А.В., посвященного фармакогностическому изучению одуванчика лекарственного при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы предприятия. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и УФ-спектроскопии в присутствии ГСО цинарозида и РСО хлорогеновой кислоты. Методики определения подлинности сырья и препаратов одуванчика лекарственного, а также методики определения суммы фенольных веществ воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Азнагуловой А.В. будет способствовать повышению объективности стандартизации травы одуванчика лекарственного, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

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

Г.А. ДЕМИДОВА

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

Г.И. ВЛАСОВА

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

Е.Е. МИРОНОВА

«Утверждаю»

Генеральный директор

ЗАО «Самаралектравы»

_____ Н.Д. ЛУЖНОВ

«____» _____ 2016 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Азнагуловой Анастасии Викторовны «Фармакогностическое исследование одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загрянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Азнагуловой А.В., посвященного разработке методик получения и анализа настойки и сиропа одуванчика лекарственного, а также изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья одуванчика лекарственного в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа травы одуванчика лекарственного, а также настойки и сиропа из данного лекарственного растительного сырья апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе одуванчика лекарственного.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»

А.Н. ЗАГРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»

А.В. НИКИТЕНКОВ

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

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

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

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

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

Одуванчика лекарственного
трава

ФС 42 –
Вводится впервые

Taraxaci officinalis herba

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

Собранная в период цветения и высушенная надземная часть многолетнего дикорастущего травянистого растения одуванчика лекарственного - *Taraxacum officinale* Wigg., сем. Астровых — *Asteraceae*, цельная, измельченная, используемая для производства лекарственных средств и применяемая в качестве лекарственного средства.

Спецификация
лекарственного растительного сырья
«Одуванчика лекарственного трава»

Показатели	Используемый метод	Нормируемое значение
1	2	3
Внешние признаки	Просмотр невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х) или стереомикроскопа (8х, 16х, 20х, 40х).	Соответствие морфологическим признакам.
Микроскопия	Просмотр под микроскопом с увеличением (не менее 40×).	Соответствие анатомическим признакам.
Качественные реакции	1. Качественная реакция. 2. УФ-спектр 3. ТСХ-анализ.	1. Положительная цианидиновая реакция: розовое окрашивание. 2. Соответствует приведенному рисунку. 3. ТСХ: наличие пятна цинарозида с R_f около 0,64 и пятна кафтаровой кислоты с R_f около 0,55 и R_s около 1,1 относительно хлорогеновой кислоты.

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

Цельное сырье. Листовые пластинки, цветоносы и фрагменты соцветий. Листовая пластинка простая, неравномерно-перисто-раздельная, или рассеченная (струговидной формы). Цветоносы полые, безлистные, слабо-опушенные. Соцветие – одиночная корзинка, диаметром до 2,5 см, состоит из язычковых обоеполых цветков. Соцветие окружено конусовидной оберткой. В сырье могут встречаться коричневые семянки с белыми летучками. Цвет листовой пластинки и цветоносов – от светло-зеленого до темно-зеленого,

цветков - желтый, листочков обертки — коричневатозеленый. Запах сырья своеобразный, вкус - горький.

Измельченное сырье – измельченные листовые пластинки, цветоносы и цветочные корзинки, отдельные язычковые цветки желтого цвета, фрагменты цветоложа и листочков обертки, фрагменты семян, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм.

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

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

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

Цельное сырье. При рассмотрении листовой пластинки с поверхности видна центральная жилка. Клетки верхнего эпидермиса листовой пластинки угловатые, слабо-вытянутые. Клетки нижнего эпидермиса неправильной формы с сильно-извилистыми стенками (рис. 1). Клетки эпидермиса над жилкой листовой пластинки с верхней и нижней стороны вытянутые, угловатые, заостренные на концах. Стенки клеток слабо и равномерно утолщены. Лист одуванчика лекарственного амфистоматический. Устьичные аппараты аномоцитного типа (окружены 4-6 околоустьичными клетками) встречаются как на верхней, так и на нижней стороне листовой пластинки (рис. 1). При рассмотрении с поверхности эпидермис цветоноса представлен вытянутыми прямоугольными клетками, иногда имеющими скошенные заостренные концы. Изредка встречаются устьичные аппараты (рис. 2). На поверхности листовой

пластинки, а также по жилке, встречаются многоклеточные бичевидные трихомы с дву- и многорядным основанием (рис. 3). Цветонос опушен слабо, чаще встречаются основания многоклеточных волосков. Основания чаще всего однорядные. Венчик язычкового цветка слабо опушен, опушение представлено двумя типами трихом. Ближе к основанию венчика располагаются многоклеточные кроющие трихомы, имеющие однорядное основание и длинную конечную клетку. Чаще встречаются одноклеточные остроконечные волоски, хаотично расположенные на трубке венчика (рис. 4). Клетки эпидермиса венчика вытянутые, с волнообразными извилистыми стенками. В протопласте клеток заметны пятна пигмента ярко-желтого цвета. На отгибе венчика клетки эпидермиса неправильной угловатой формы, бугристые с поверхности, хорошо заметна морщинистая кутикула. На отгибе венчика встречаются скопления устьиц - гидатоды (рис. 5).

На поперечном срезе листовой пластинки одуванчика лекарственного видно, что поперечное сечение листа неоднородно по длине, особенно в области центральной жилки. В центральной части поперечного сечения медиальной части листа обнаруживается хорошо заметная полость. Мезофилл листовой пластинки представлен клетками изодиаметричной формы, среди которых обнаруживаются ослизняющиеся воздушные полости, не содержащие выделений или секрета. В мезофилле диагностируются млечники (рис. 6).

Проводящие пучки открытые коллатеральные, имеют выраженную флоэмную часть, неоднородную по структуре. По периферии клетки плотно сомкнуты, с заметно утолщенными стенками, не лигнифицируются. По краю флоэмы встречаются млечники (рис. 7).

На поперечном сечении цветонос одуванчика лекарственного имеет округлую, слаборребристую форму. В центре обнаруживается полость, выстланная крупными уплощенными смятыми клетками, лишенными протопласта. Проводящие пучки открытого коллатерального типа, расположены по окружности, имеют строение, характерное для проводящих

пучков листовой пластинки одуванчика лекарственного. Между крупными пучками располагаются мелкие пучки (рис. 8).

Кроме фрагментов листовой пластинки и цветоноса в сырье могут встречаться фрагменты соцветия, а именно: листочки обертки, фрагменты цветоложа, язычковые цветки, семянки.

При рассмотрении поперечного сечения листочков обертки заметна колленхима, расположенная в концевых частях. Мезофилл представлен пигментированными паренхимными клетками неодинаковой формы. В паренхиме листочка образуются воздушные полости, не содержащие секрета или иных выделений (рис. 9).

Характерным признаком сырья является наличие в сырье плодов – семянок. Семянки голые с поверхности, от светло-бурого до темно-коричневого цвета. При микроскопировании семянки хорошо заметны острые выросты, повернутые к верхушке цветка. Они постепенно увеличиваются в размерах от середины семянки к ее верхушке (рис. 10).

Выше семянки располагается столбик пестика, к краю которого прикреплена анемохора – белый хохолок. Летучка сложена из длинных многоклеточных волоскообразных элементов – ресничек с острыми выступами отдельных клеток (рис. 11).

Фрагмент столбика от семянки до места прикрепления анемохоры может варьировать по длине в зависимости от степени созревания семян. Данная часть столбика неопущена, в просветах тканей обнаруживаются проводящие элементы ксилемы (рис. 11).

Столбик пестика имеет раздвоенное рыльце, густо опушенное волосками. Непосредственно на рыльце с внутренней стороны локализованы мелкие сосочковидные выросты, образующие сплошной покров (рис. 12). Остальная часть пестика (столбик и внешняя стороны рыльца) покрыта крупными остроконечными одноклеточными волосками (рис. 13).

Андроцей цветка представлен четырьмя тычинками. Пыльники тычинок крупные, удлинненные, окрашенные в желто-оранжевый цвет. Теки пыльников к верхушке остроконечные, стреловидные (рис. 14). Эпидермис пыльников неоднороден. Основная поверхность пыльника покрыта мелкоклеточным эпидермисом с пигментированным протопластом. В зоне связника клетки крупнее, их протопласт неокрашен.

Пыльники содержат большое количество округлой шиповатой пыльцы, неоднородно пигментированной с поверхности в желто-оранжевый цвет (рис. 15).



Рис. 1. Эпидермис нижней стороны листовой пластинки одуванчика лекарственного (x 400).



Рис. 2. Эпидермис поверхности цветоноса одуванчика лекарственного (x 400).

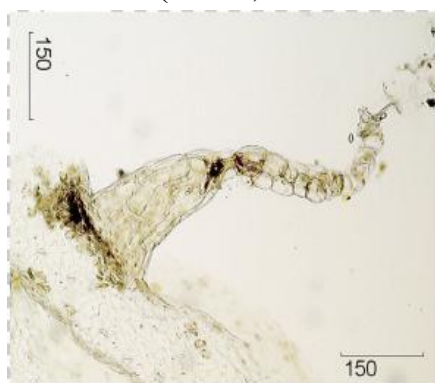


Рис. 3. Трихомы листовой пластинки одуванчика лекарственного (x 100).

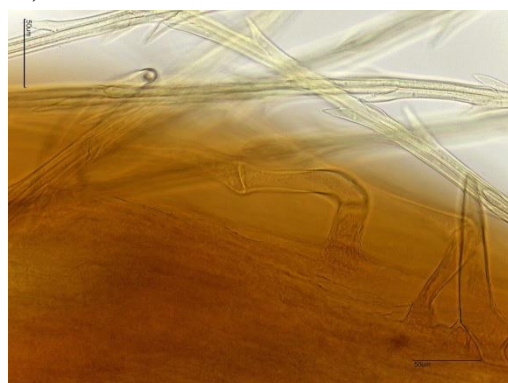


Рис. 4. Трихомы венчика язычкового цветка одуванчика лекарственного (x 400).



Рис. 5. Эпидермис отгиба венчика язычкового цветка одуванчика лекарственного (x 400).

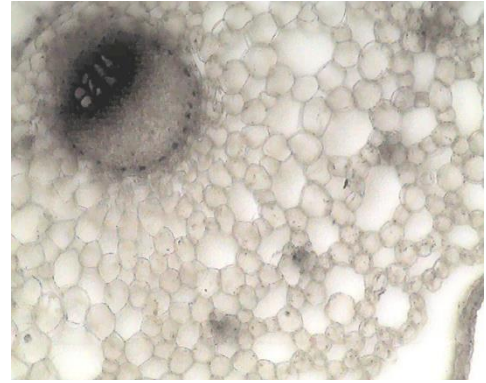


Рис. 6. Поперечный срез листовой пластинки одуванчика лекарственного (x 100).



Рис. 7. Проводящий пучок листовой пластинки одуванчика лекарственного (x 100).



Рис. 8. Поперечный срез цветоноса одуванчика лекарственного (x 40).



Рис. 9. Поперечный срез листочка обертки одуванчика лекарственного (x 400).

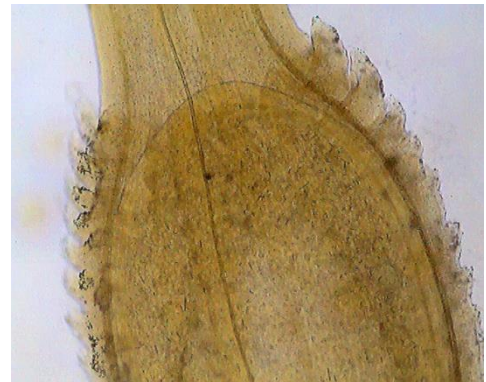


Рис. 10. Фрагмент семянки одуванчика лекарственного (x 400).



Рис. 11. Анемохора семянки одуванчика лекарственного (x 100).

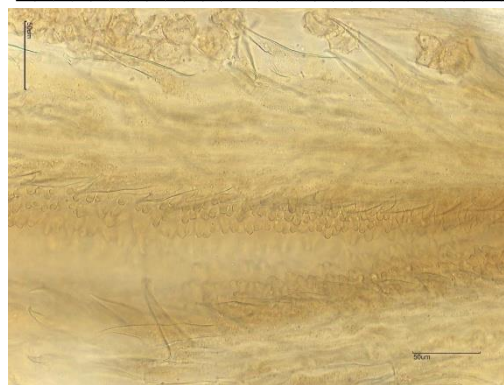


Рис. 12. Фрагмент внутренней стороны рыльца пестика язычкового цветка одуванчика лекарственного (x ...).

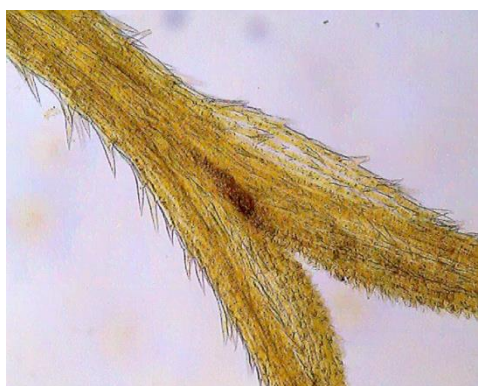


Рис. 13. Гинецей язычкового цветка одуванчика лекарственного (x 400).



Рис. 14. Андроцей язычкового цветка одуванчика лекарственного (x 100).

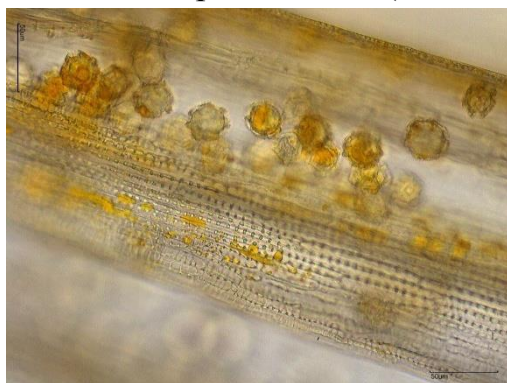


Рис. 15. Фрагменты пыльников язычкового цветка одуванчика лекарственного (x 400).

Измельченное сырье. При рассмотрении измельченной травы одуванчика лекарственного видны фрагменты листовых пластинок. К характерным фрагментам сырья можно отнести фрагменты околоцветника – желтые венчики

язычковых цветков. В измельченном сырье диагностируются фрагменты летучки, а также фрагменты семянки и цветоложа.

Примечание: Приготовление микропрепарата травы.

Образец кипятят в воде очищенной 1-2 мин. Жидкость сливают, помещают содержимое в чашку Петри и заливают смесью глицерин-вода-этанол (1:1:1), где выдерживают 1-2 часа. На предметное стекло наносят 1-2 капли воды очищенной и небольшое количество исследуемого материала, накрывают покровным стеклом, слегка постукивают по нему и немного нагревают до удаления пузырьков воздуха. Затем покровное стекло слегка придавливают и удаляют полоской фильтровальной бумаги выступившую по краям жидкость.

Качественные реакции. 1. К 1 мл полученного извлечения (раствор А, см. раздел «Количественное определение») прибавляют цинк металлический (1 таблетка) или 0,1 г порошка магния, после прибавляют 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты; постепенно появляется розовое окрашивание (флавоноиды).

2. Ультрафиолетовый спектр раствора А (см. раздел «Количественное определение») в области от 100 нм до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 330 нм \pm 2 нм, а также «плечо» в области 296 нм \pm 2 нм (гидроксикоричные кислоты) (рис. 16).

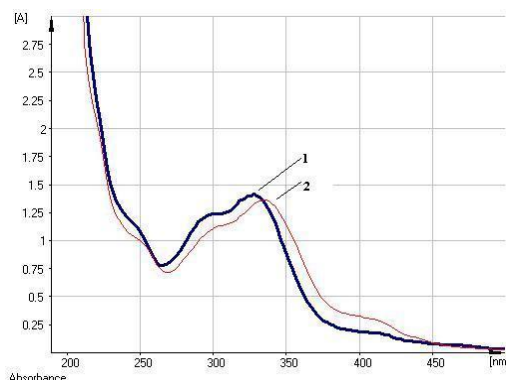


Рис. 16. УФ-спектр спиртового раствора водно-спиртового извлечения из травы одуванчика лекарственного (1:2500) исходный (1) и с добавлением спиртового раствора $AlCl_3$ (2).

3. Пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (ТУ 26-11-17-89) размером 10 x 10 см или размером 10 x 15 и перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100 - 105 °С в течение 1 ч. На линию старта пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» микропипеткой наносят 0,02 мл водно-спиртового извлечения (см. раздел «Качественные реакции», пункт 1) в виде точки. Рядом микропипеткой наносят 0,01 мл раствора ГСО цинарозида (раствор А) в виде точки (см. примечание «Приготовление раствора Государственного стандартного образца цинарозида») и 0,01 мл раствора хлорогеновой кислоты (раствор А) в виде точки. Хроматографическую пластинку помещают в камеру, которую предварительно насыщают в течение 1 часа смесью растворителей: *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2), и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 8 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм. При этом на хроматограмме обнаруживается пятно темно-синего цвета с величиной R_f около 0,55 (кафтаровая кислота) и величиной R_s около 1,1 относительно пятна хлорогеновой кислоты. Кроме того обнаруживается пятно фиолетового цвета R_f около 0,64, совпадающее по подвижности с ГСО цинарозида. Затем хроматограмму проявляют щелочным раствором

диазобензолсульфокислоты и нагревают при 100-105 °С. При этом пятно кафтаровой кислоты приобретает интенсивно-коричневую окраску; пятно цинарозида приобретает желто-коричневое окрашивание. Допускается наличие других пятен, в частности, лютеолина (величина R_f около 0,8), рутина (величина R_f около 0,4), а также хлорогеновой кислоты (величина R_f около 0,5).

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

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление раствора ГСО цинарозида. Около 0,02 г (точная навеска) цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15-20 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А).

3. Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- наблюдается четкое деление пятен основных флавоноидов, а именно цинарозида (R_f около 0,6), лютеолин (R_f около 0,8).

Раздел «Тяжелые металлы». В соответствии с ГФ РФ XIII издания.

Числовые показатели. Цельное сырье. Содержание суммы фенольных веществ в пересчете на хлорогеновую кислоту не менее 5 %; влажность не более 11,0%; золы общей не более 9%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 4,0%; органической примеси не более 1 %; минеральной примеси не более 0,5 %.

Измельченное сырье. Содержание суммы фенольных веществ в пересчете на хлорогеновую кислоту не менее 5 %; влажность не более 12,0%; золы общей не более 9%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 4,0%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,18 мм не

более 10%; органической примеси не более 1 %; минеральной примеси не более 0,5 %.

Порошок. Суммы веществ фенольной природы в пересчете на хлорогеновую кислоту не менее 3 %; влажность не более 12 %; золы общей не более 9 %; золы, нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, не более 5 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 10 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 10 %; минеральной примеси не более 0,5 %.

Количественное определение. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на аналитических весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 120 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой и охлаждают в течение 30 мин. Затем снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

1 мл полученного раствора А в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом (раствор В). В качестве раствора сравнения выступает спирт этиловый 95%. Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 330 нм.

Содержание суммы фенольных веществ в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * 50 * 50}{497 * m * (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность раствора;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании в процентах;

497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты.

Микробиологическая чистота. В соответствии с ГФ XII издания, часть 1, ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота», категория 4А.

Содержание радионуклидов. В соответствии с требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. – М.: Минздрав России, 2002. - С. 74, методиками ОФС 42-0011-03 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье. Стронций-90 и цезий-137. Отбор проб, анализ и оценка результатов» и ГФ РФ XIII издания.

Упаковка. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГОСТ 17768-90 в тканевые мешки по ГОСТ 30090-93 не более 40 кг нетто.

Транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка. В соответствии с ГОСТ 17768-90. На пачке указывают предприятие-изготовитель и его товарный знак, название лекарственного средства на латинском и русском языках, массу при влажности 12 %, назначение, способ употребления, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, штрих-код, срок годности, условия отпуска «Безрецептурный», соответствие продукции требованиям ВДУ ГН 2.6.005-93 по содержанию радионуклидов «Продукция прошла радиационный контроль СанПиН 2.3.2.560-96».

Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-77.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90 и ГОСТ 6077-80.

Хранение. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI, вып. 1, с. 296.

Срок годности. 3 года.

Фармакологическая группа. Диуретическое и желчегонное средство.

Назначение. Для получения лекарственных растительных препаратов, галеновых и новогаленовых препаратов.

Примечание. Реактивы и методики определения числовых показателей, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи РФ XII и XIII издания.

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

Г.П. Котельников
«__» _____ 2016 г.

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

В.А. Куркин
«__» _____ 2016 г.

Очный аспирант кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ГБОУ ВПО СамГМУ
Минздрава России

А.В. Азнагулова
«__» _____ 2016 г.