

На правах рукописи

Росихин Данил Владимирович

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2018

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

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор *Куркин Владимир Александрович*

Официальные оппоненты:

Пупыкина Кира Александровна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, профессор кафедры

Ханина Миниса Абдуллаевна – доктор фармацевтических наук, профессор государственного образовательного учреждения высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Министерства образования Московской области, кафедра химии, заведующая кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» октября 2018 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса, д. 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, д. 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2018/rosihin/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.085.06,
доктор фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

Масло расторопши – второй продукт комплексной переработки плодов расторопши, применяемый внутрь и наружно. Данная субстанция обладает анти-

оксидантным, высокими репаративными и противовоспалительными свойствами (масло расторопши - Натурсил). При этом не до конца решенной остается проблема стандартизации масла расторопши пятнистой, связанная с недостаточной изученностью его жирнокислотного состава.

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

Ряд зарубежных авторов высказывают предположения о возможном наличии перспективных биологических активных соединений (БАС) в листьях расторопши пятнистой, в частности, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, стероидов (С. Pereira, L. Barros, A.M. Carvalho, C. Santos-Buelgab, I. Ferreira, 2007). Однако сведения о химическом составе надземной части расторопши пятнистой, культивируемой в Российской Федерации, отсутствуют.

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

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

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

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

Следует отметить, что большая часть фитомассы – трава расторопши - после сбора плодов не используется в медицинской и фармацевтической практике. На

данный момент в Российской Федерации, а также в мировой практике отсутствуют разработанные методики стандартизации травы расторопши пятнистой, в том числе методики качественного анализа и количественного определения БАС. Возможности комплексного использования всей надземной части расторопши пятнистой в научной литературе также не описаны.

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

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проведение морфолого-анатомического исследования травы расторопши пятнистой.
2. Изучение химического состава травы расторопши пятнистой.
3. Разработка методики качественного анализа травы расторопши пятнистой.
4. Разработка методики количественного определения содержания суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой.
5. Разработка методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой.
6. Разработка методики качественного анализа масла расторопши пятнистой методом ГХ/МС.
7. Научное обоснование состава и методики получения сиропа из субстанции «Силимар» («Расторопши сироп»).
8. Разработка методик качественного и количественного анализа лекарственного растительного препарата «Расторопши сироп».
9. Научное обоснование способа получения водорастворимой соли силимарина.
10. Исследование диуретической активности настоя и препарата «Расторопши пятнистой настойка» на основе травы расторопши пятнистой.
11. Разработка проекта ФС «Расторопши пятнистой трава».

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

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

водные гидроксикоричных кислот - 5-*n*-кумароилхинная кислота и хлорогеновая кислота.

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

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

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

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

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

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

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

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

Предложены подходы к повышению растворимости флаволигнанов на примере силибина. В результате реакции полусинтеза образуется сначала сложный эфир силибина с ангидридом янтарной кислоты, а затем полученный продукт

первой стадии переводят в водорастворимую соль с помощью реакции со спиртовым раствором натрия гидроксида и получением дигемисукцината силибина натриевой соли.

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

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

Объектами диссертационного исследования являлись образцы ЛРС расторопши пятнистой и препараты, полученные из расторопши пятнистой. Исследования проводили с помощью цифровой микроскопии, с применением метода тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектроскопии, ГХ/МС, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии. В диссертационной работе использовались пробирочные и гистохимические реакции на отдельные группы БАС.

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

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

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты морфолого-анатомического исследования травы расторопши пятнистой.
2. Результаты фитохимического исследования травы расторопши пятнистой.
3. Результаты исследования по разработке методик качественного анализа травы расторопши пятнистой.
4. Результаты исследования по разработке методик количественного определения содержания суммы фенилпропаноидов и флавоноидов в траве рас-

торопши пятнистой, а также суммы флаволигнанов в лекарственном препарате «Расторопши сироп».

5. Результаты качественного анализа масла расторопши пятнистой методом ГХ/МС.
6. Результаты исследования по разработке способов получения лекарственных препаратов на основе ЛРС расторопши пятнистой (настойка травы расторопши пятнистой, «Расторопши сироп», водорастворимая натриевая соль дигемисукцината силибина).
7. Результаты исследования по стандартизации лекарственных препаратов на основе ЛРС расторопши пятнистой и разработке методик их качественного и количественного анализа.
8. Результаты исследования диуретической активности настоя и настойки травы расторопши пятнистой.
9. Результаты исследования по разработке проекта фармакопейной статьи «Расторопши пятнистой трава».

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

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

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

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

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования применяются в образовательном процессе на кафедре фармакогно-

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

Личный вклад автора. Все приведенные экспериментальные результаты диссертационного исследования получены самим автором. Автором выполнены исследования по изучению морфологических признаков и анатомо-гистологических особенностей строения стебля и листа расторопши пятнистой, идентифицированы и выявлены диагностические признаки для данного вида сырья. Изучен химический состав травы расторопши пятнистой. Разработаны методики анализа травы расторопши пятнистой. Разработаны состав и технология получения препаратов – «Расторопши травы настойка» и «Расторопши сироп». Изучен качественный состав масла расторопши методом газожидкостной хроматографии. Изучена в эксперименте диуретическая активность препаратов из травы данного растения.

Автором диссертационного исследования предложены и обоснованы методики качественного и количественного анализа препаратов на основе ЛРС расторопши пятнистой методом ТСХ и УФ-спектроскопии. Осуществлен синтез дигемисукцината силибина натриевой соли.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, изложенные в данной работе, соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пункту 2 «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; пункту 3 «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; пункту 5 «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье» и пункту 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. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, полученные данные представлены в форме 18 таблиц и проиллюстрированы 32 рисунками. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4 глав, в которых приведены результаты собственных исследований и их обсуждение,

заклучения и списка литературы, включающего 152 источника, из которых 38 - на иностранных языках.

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

В обзоре литературы раскрыты актуальные вопросы по созданию новых ЛП на основе расторопши пятнистой, что еще раз подтверждает актуальность диссертационных исследований.

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

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

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

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

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

Объектами диссертационного исследования служили образцы сырья – трава и плоды расторопши пятнистой [*Silybum maritimum* (L.) Gaertn.], собранные на территории Самарской области в период с 2015 по 2017 гг. Исследованию подлежали ЛРП – настойка травы расторопши пятнистой 1:5 на 70% спирте, настой травы расторопши пятнистой, сироп на основе субстанции «Силимар»; масло расторопши пятнистой, масло облепиховое, масло подсолнечное, расторопши экстракт жидкий (1:1), расторопши экстракт сухой; индивидуальные вещества: силибин, силидианин, силикристин, дигидрокверцетин, хлорогеновая кислота, цинарозид, рутин; реактивы и растворители, используемые при синтезе: янтарный ангидрид, пиридин, этилацетат, гидроокись натрия.

Морфолого-анатомическое исследование травы расторопши пятнистой проводили с использованием цифровых микроскопов «Motic DM-111» и «Motic DM-39» с увеличениями x20, x40, x100, x400. Кроме того, использовался метод люминесцентной микроскопии на микроскопе «Альтами ЛЮМ -2» (Россия) с использованием голубого светофильтра 32 мм. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: 420-550 нм.

Изучение химического состава травы расторопши пятнистой проводили методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии с использованием силикагеля марки L 40/100 мкм и L 100/250 мкм (Чехия), сефадекса LH-20 (Швеция) и полиамида марки «Woelm» (Германия). Элюирование веществ осуществляли хлороформом, смесью хлороформ-этанол в различных соотношениях, спиртом этиловым 95%. Для анализа извлечений из сырья, субстанций, выделенных веществ и ЛП препаратов методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» (Россия). Бумажную хроматографию (БХ) сахаров и других компонентов осуществляли на бумаге FN-11, FN-15 в нисходящем токе растворителя. Спектральные исследования проводили на спектрофотометрах «Specord 40» («Analytik Jena») и СФ-2000 («ОКБ Спектр») в кюветах с толщиной слоя 10 мм. ¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР-спектры регистрировали на приборе «Bruker AM 300». Масс-спектры электронного удара регистрировали на приборе «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и варьировании температуры ионного источника от 100 до 250 °С.

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

ры по методике ГОСТ 31665-2012, переэтерификацией с метанольным раствором гидроксида калия.

Получение настойки травы расторопши пятнистой осуществляли методом модифицированной дробной мацерации. Получение сиропа проводили в соответствии с классическими правилами фармацевтической технологии.

Синтез водорастворимой натриевой соли дигемисукцината силибина осуществляли при взаимодействии силибина с ангидридом янтарной кислоты. В результате реакции образовался эфир, из которого впоследствии при взаимодействии со спиртовым раствором натрия гидроксида получали натриевую соль дигемисукцината силибина.

Проводили исследования диуретической активности настоя и настойки на основе травы расторопши пятнистой.

2. Морфолого-анатомическое исследование травы расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Морфолого-анатомическому анализу подвергали воздушно-сухое сырье – траву расторопши пятнистой. К основным диагностическим признакам сырья «Расторопши пятнистой трава» относятся характерные особенности стебля и листа. Цветоносы растения на поперечном сечении округлой формы с равномерной волнообразной ребристостью края (**рис. 1**).

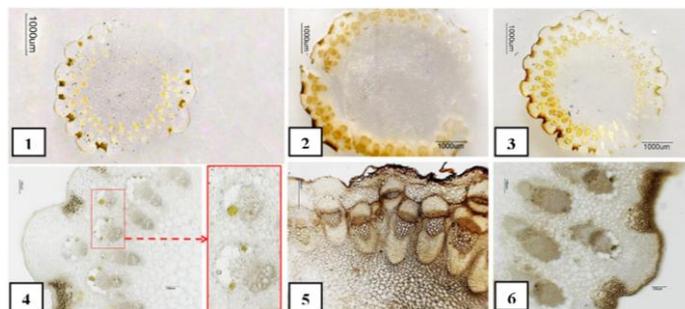


Рисунок 1 - Поперечное сечение стеблей расторопши пятнистой

Обозначения: 1 - цветонос (×40); 2 – стебель (d=1,5 см) (×40); 3 - стебель (d=1см) (×40); 4 – ребристость и пигментация обкладки пучков (×100); 5 – крупные сближенные пучки (×100); 6 – двухрядность стебля (×100)

В ложбинах ребер локализована хлоренхима, ярко заметная на фоне исходно слабоокрашенных тканей стебля. Проводящая система побега переходного типа строения. Пучки различаются по размеру и форме и нестандартно расположены в два круга. Центральная часть листовой пластинки на поперечном сечении сильно паренхимизирована (**рис. 2**). Основная паренхима крупноклеточная непигментированная. В паренхиме локализованы три коллатеральных пучка, далеко отстоящие друг от друга и приблизительно одинаковые по размеру. С флоэмной и ксилемной сторон пучки значительно армированы склеренхимными волокнами. На периферии флоэмы, выше склеренхимы, встречаются крупные клетки основной ткани со смолистым содержимым желтого цвета.



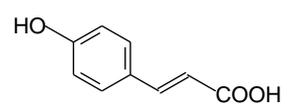
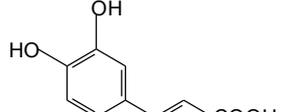
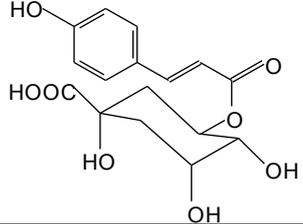
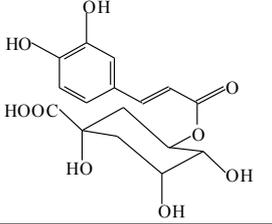
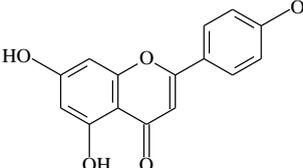
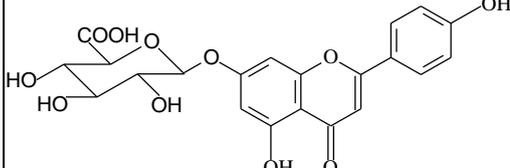
Рисунок 2 - Особенности анатомии листьев расторопши пятнистой на поперечном сечении

Обозначения: 1 – дорзовентральная листовая пластинка ($\times 100$); 2 – выраженный столбчатый мезофилл ($\times 400$); 3 – полости в губчатом мезофилле ($\times 400$); 4 – паренхимизация центральной жилки листа ($\times 100$); 5 - проводящий пучок коллатерального типа ($\times 400$); 6 - ксилемный участок пучка ($\times 400$); 7 – флоэмный участок с окрашенным смолистым содержимым ($\times 400$)

3. Фитохимическое исследование травы расторопши пятнистой

С целью обоснования подходов к качественному анализу и количественному определению содержания БАС травы расторопши пятнистой проведено выделение методом колоночной хроматографии. Для определения химической структуры использовались методы УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также различных химических превращений (кислотный и ферментативный гидролиз). В результате проведенных исследований впервые в РФ из травы расторопши пятнистой в виде индивидуальных веществ были выделены и идентифицированы флавоноидные гликозиды, фенилпропаноиды (гидроксикоричные кислоты) в виде индивидуальных соединений: *n*-кумаровая кислота, 5-*n*-кумароилхинная кислота, кофейная кислота, хлорогеновая кислота, апигенин, 7-О- β -D-глюкуронид апигенина (табл. 1). Соединения 1 и 2 относятся к гидроксикоричным кислотам и представляют собой *n*-кумаровую кислоту и кофейную кислоту соответственно. В ^1H -ЯМР-спектре *n*-кумаровой кислоты содержатся сигналы протонов ароматического ядра, характерные для замещения в положении С-4 (*n*-положение): 7,37 м.д. (2H, д, 9 Гц, H-2, H-6), 6,76 м.д. (2H, д, 9 Гц, H-3, H-5). О трансконфигурации двойной связи при С-7 и С-8 свидетельствует то, что ^1H -ЯМР-спектре *n*-кумаровой кислоты в присутствии однопротонные дублетные сигналы с константой спин-спинового взаимодействия 16 Гц при 7,47 м.д. (1H, д, 16 Гц, H-7), 6,32 м.д. (д, 16 Гц, H-8). В ^1H -ЯМР-спектре кофейной кислоты также содержатся однопротонные дублетные сигналы с константой спин-спинового взаимодействия 16 Гц при 7,47 (H-7) и 6,21 м.д. (H-8), однако, характер сигналов протонов ароматического ядра свидетельствует о нахождении гидроксильных групп в положении С-3 и С-4: 7,10 (д, 2,5 Гц, H-2), 7,04 (дд, 2,5 и 9 Гц, H-6), 6,82 (д, 9 Гц, H-5). Структура *n*-кумаровой кислотой (1) и кофейной кислоты (2) подтверждается данными УФ-, масс-спектров, физико-химических констант, а также сравнением с достоверно известными образцами веществ.

Таблица 1 - Выделенные вещества из травы расторопши пятнистой

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

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

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

В результате кислотного гидролиза (5% раствор серной кислоты при нагревании на водяной бане в течение 2 часов) доказано, что в гидролизате гликозида 6 содержатся глюконовая кислота и апигенин. Присоединение глюконовой кислоты к гидроксильной группе при С-7 свидетельствует то, что в УФ-спектре гликозида 6 в присутствии натрия ацетата bathochromный сдвиг не наблюдается, который характерен для свободной 7-ОН-группы флавоноидов. О β -конфигурации гликозидной связи свидетельствует тот факт, что ^1H -ЯМР-спектре при 5,07 м.д. имеется однопротонный дублетный сигнал аномерного протона ($\text{H}-1^{11}$) глюконовой кислоты с константой спин-спинового взаимодействия 7 Гц.

4. Разработка методик стандартизации травы расторопши пятнистой

Результаты фитохимического изучения травы расторопши пятнистой использовались при разработке методик качественного и количественного анализа сырья данного растения. Проводилось исследование зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья. Оптимальным подходом к анализу травы расторопши пятнистой является экстракция в течение 60 мин на кипящей водяной бане, где в качестве экстрагента используется 70% этиловый спирт в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:100.

4.1. Разработка методик качественного анализа травы расторопши пятнистой

Для оценки подлинности травы расторопши пятнистой рекомендовано применение двух методов – ТСХ и спектрофотометрии. Оптимальной системой растворителей для разделения веществ из водно-спиртовых извлечений травы расторопши пятнистой в условиях ТСХ является смесь растворителей *n*-бутанол – этанол– аммиак (7:2:5) с использованием стандартных образцов хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты, цинарозида. Детекцию проводили в УФ-свете при 254 нм и 366 нм, а также обработкой реактивом ДСК.

На хроматограмме водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой обнаруживается зона доминирующего вещества с $R_f = 0,5$. По характеру свечения в УФ-свете, а также по окрашиванию реактивом ДСК можно сделать вывод, что данное вещество представляет собой фенилпропаноид. Из веществ-свидетелей наиболее близким значением подвижности обладает РСО хлорогеновой кислоты ($R_f = 0,55$). Из веществ фенилпропаноидной природы детектируется также кофейная кислота, которая совпадает по подвижности $R_f = 0,7$ с веществом-свидетелем (РСО кофейной кислоты). Кроме того, в извлечении из травы расторопши пятнистой на хроматограмме обнаруживаются флавоноид с величиной R_f около 0,4, идентифицированный как 7-О- β -D-глюкуро-нид апигенина. На основе результатов ТСХ-анализа сделаны рекомендации по использованию стандартных образцов хлорогеновой кислоты и ГСО цинарозида для оценки подлинности травы расторопши пятнистой. На хроматограмме водно-спиртового извлечения должны обнаруживаться доминирующие пятна

хлорогеновой кислоты с величиной R_f около 0,5 и с величиной R_s около 0,8 (относительно ГСО цинарозида).

Сравнительное изучение УФ-спектров водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой свидетельствует о том, что основной вклад в кривую поглощения УФ-спектра водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой вносят фенилпропаноиды. Полученный УФ-спектр имеет максимум при 333 ± 2 нм, а также «плечо» при длине 296 ± 2 нм (рис. 3). При добавлении к исследуемому извлечению из травы расторопши пятнистой раствора алюминия (III) хлорида наблюдается батохромный сдвиг. Максимум дифференциального спектра извлечения из травы расторопши пятнистой находится при 392 ± 2 нм, что свидетельствует о возможности использования данных спектрофотометрии для количественного определения суммы флавоноидов.

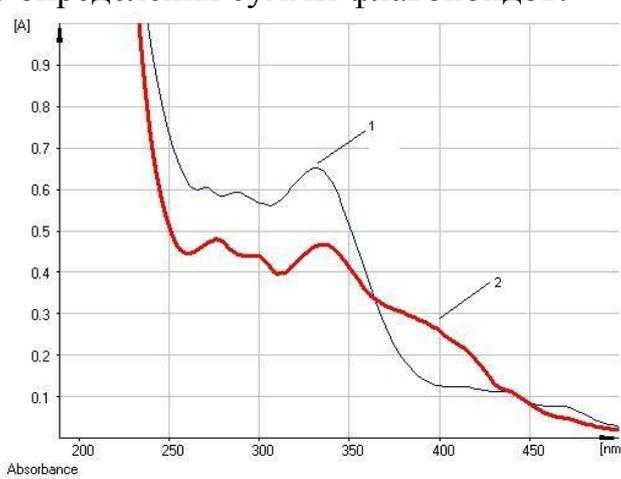


Рисунок 3 - УФ спектр водно-спиртового извлечения травы расторопши пятнистой

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

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

Поскольку в траве расторопши пятнистой среди фенольных веществ доминируют фенилпропаноиды и флавоноиды, целесообразна разработка методик количественного определения данных веществ. Определено, что характер кривой поглощения УФ-спектров водно-спиртового извлечения из травы расторопши пятнистой в основном определяется хлорогеновой кислотой и другими фенилпропаноидами. Это подтверждает целесообразность в качестве метода количественного определения использовать прямую спектрофотометрию, а пересчет содержания суммы фенилпропаноидов осуществлять на хлорогеновую кислоту.

4.2.1. Методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой

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

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

D – оптическая плотность испытуемого раствора; 497 – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты; m – масса сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

Определено, что сумма фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту в сырье данного растения варьирует от $1,23 \pm 0,01\%$ до $2,81 \pm 0,01\%$

Результаты статистической обработки полученных результатов количественного определения суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 2,49\%$ - для методики определения методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту (табл. 2).

Таблица 2 - Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой

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

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по основным показателям: линейность, правильность и прецизионность.

Межлабораторная воспроизводимость проводилась на двух спектрофотометрах «Specord 40» («Analytik Jena», Германия) и СФ-2000 («ОКБ Спектр», РФ). Линейность данной методики определяли для серии растворов хлорогеновой кислоты (с концентрациями в диапазоне от 0,00979 до 0,03911 мг/мл). Коэффициент корреляции при этом составил 0,99987. Для установления прецизионности проводили определение содержания для пяти параллельных измерений. Правильность данной методики определяли методом добавок путем добавления раствора РСО хлорогеновой кислоты с известной концентрацией (25%, 50%, 75%) к исследуемому раствору. Открываемость находилась в пределах от 98% до 102%.

4.2.2. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой

В качестве дополнительного параметра для оценки качества травы расторопши пятнистой нами предложена методика дифференциальной спектрофотометрии для количественного определения содержания суммы флавоноидов при аналитической длине волны 392 нм в пересчете на цинарозид, имеющий близкие спектральные характеристики с флавоноидами, содержащимися в исследуемом сырье. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 400 нм через 40 мин после приготовления всех растворов. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

D – оптическая плотность испытуемого раствора; 350 – удельный показатель поглощения цинарозида; m – масса сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании, в процентах.

Результаты статистической обработки полученных результатов количественного определения суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет не более $\pm 2,94\%$ - для методики определения методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид (табл. 3).

Таблица 3 - Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве расторопши пятнистой

f	\bar{x}	S	S2	P (%)	t (P, f)	ΔX	E, %
10	1,36	0,0531	0,0028	95	2,228	$\pm 0,04$	$\pm 2,94$

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

5. Изучение жирнокислотного состава масла расторопши пятнистой

Изучение жирнокислотного состава масла расторопши пятнистой проводили методом газожидкостной хроматографии. По методике ГОСТ 31665-2012 предварительно переводили жирные кислоты в метиловые эфиры с помощью реакции переэтерификации с метанольным раствором гидроксида калия.

Основной профиль масла расторопши на хроматограмме создают ненасыщенные кислоты – линолевая ($C_{18:2}$; $34,8 \pm 3,0\%$), олеиновая кислоты ($C_{18:1}$; $25,7 \pm 3,5\%$), 11-эйкозеновая ($C_{20:1}$; $1,6 \pm 0,5\%$), а также насыщенные - стеариновая ($C_{18:0}$; $11,4 \pm 1,0\%$), пальмитиновая ($C_{16:0}$; $9,9 \pm 0,2\%$), арахидоновая ($C_{20:0}$; $6,9 \pm 0,6\%$) и бегеновая ($C_{22:0}$; $3,8 \pm 0,4\%$) (рис. 4).

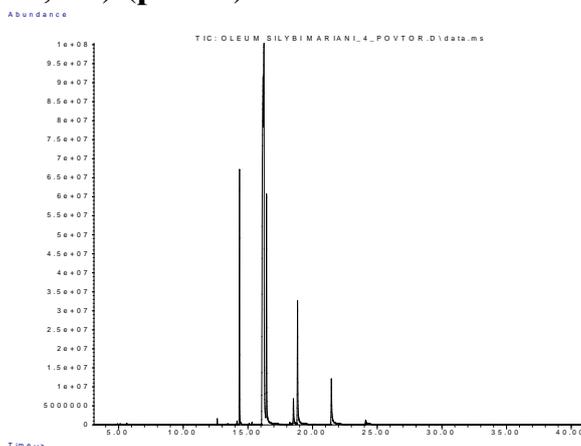


Рисунок 4 - Хроматограмма компонентного состава масла плодов расторопши пятнистой

Впервые были идентифицированы лауриновая кислота ($C_{12:0}$), пентадециловая кислота ($C_{15:0}$), гептадеценовая кислота ($C_{17:1}$), генэйкозановая кислота ($C_{21:0}$). В результате сопоставления полученных данных, а также литературных данных по количественному содержанию жирных кислот, необходимо рекомендовать в качестве критериев подлинности наличие пиков на хроматограмме, соответствующих метиловым эфирам линолевой (35-55% от общего содержания), олеиновой (22-30%), пальмитиновой (8-15%), стеариновой (4,5-12%), арахидиновой (2-7%), бегеновой (3-8%), 11-эйкозеновой (1-3%) кислот.

6. Обоснование состава, способа получения и методик стандартизации препаратов на основе расторопши пятнистой

В результате проведенных исследований обоснована целесообразность создания новых ЛРП на основе сырья расторопши пятнистой, а также разработаны методики стандартизации данных препаратов.

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

Для расширения ассортимента ЛП для педиатрической и гериатрической практики нами разработан препарат «Расторопши сироп» на основе сорбита, содержащий в качестве действующих компонентов флаволигнаны из ЛРП «Силимар». Методика качественного анализа препарата «Расторопши сироп» осуществлялась методом ТСХ после специальной пробоподготовки для данной лекарственной формы, основанная на экстракции флаволигнанов, из сиропа ацетоном с последующим нанесением на хроматографическую пластинку спиртового раствора упаренного ацетонового извлечения возможностью разделения и обнаружении их с использованием ГСО силибина. Для разработанного сиропа также адаптирована методика УФ-спектроскопии. Полученный электронный спектр имеет максимум при $\lambda_{max}=289\pm 2$ нм (флаволигнаны). Аналогичный УФ-спектр характерен для ГСО силибина. Количественное определение содержания суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» проводили методом прямой спектрофотометрии на приборе «Spectrum 40» (спектрофотометр «Analytik Jena») при длине волны 289 нм в пересчете на ГСО силибина. Содержание суммы флаволигнанов в препарате «Расторопши сироп» варьирует от 0,31% до 0,43% (в пересчете на силибин).

6.2. Разработка способа получения водорастворимой соли дигемисукцината силибина

Впервые в РФ разработана схема получения дигемисукцината силибина натриевой соли, заключающаяся в образовании эфира путем реакции силибина с ангидридом янтарной кислоты, с последующим переводом полученного эфира со спиртовым раствором натрия гидроксида в водорастворимую соль (рис. 5).

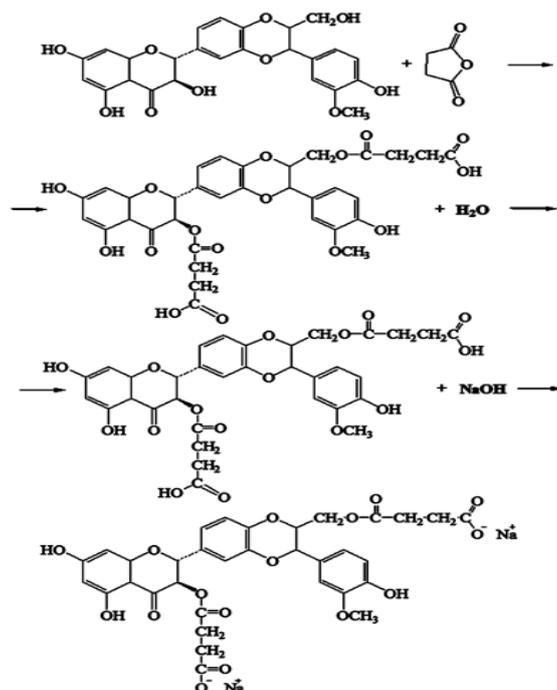


Рисунок 5 - Схема получения дигемисукцината силибина натриевой соли

Химическое строение полученного соединения доказано с использованием данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

В масс-спектре соединения 8 присутствует пик иона с m/z 727 $[\text{M} + \text{H}]^+$, подтверждающий молекулярную массу соединения 726. В ^1H -ЯМР-спектре полученного соединения присутствуют все сигналы протонов, характерные для силибина. Обнаружены также в ^{13}C -ЯМР-спектре полученного соединения сигналы углеродных атомов, характерные для силибина (рис. 6), однако при этом присутствуют дополнительные сигналы, свидетельствующие о наличии четырех карбонильных группы двух фрагментов янтарной кислоты, а также четырех метиленовых групп двух фрагментов янтарной кислоты.

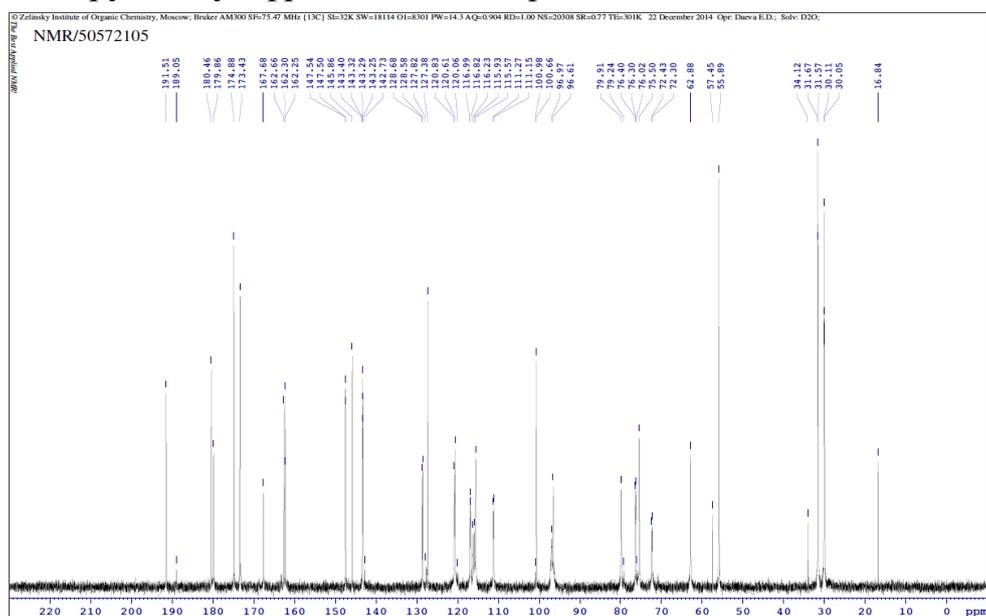


Рисунок 6 - ^{13}C -ЯМР спектр дигемисукцината силибина натриевой соли в D_2O

6.3. Изучения фармакологической активности настоя и настойки травы расторопши пятнистой

Для настоя и настойки травы расторопши пятнистой определены параметры диуретической активности. Полученные результаты наглядно свидетельствуют о диуретической и салуретической активности настоя травы расторопши пятнистой в дозе 100 мкл/кг за 4 ч и 24 ч эксперимента, сравнимой с действием препарата сравнения гипотиазида в средней терапевтической дозе, а также о креатининуретической активности препарата. Настойка травы расторопши пятнистой при однократном внутривенном введении в дозе 100 мкл/кг на фоне 3% водной нагрузки в первые 4 ч эксперимента вызывает достоверное увеличение следующих показателей экскреторной функции почек: натрийуреза (на 32%) и калийуреза (на 43%) по сравнению с водно-спиртовым контролем, диурез и креатининурез при этом изменяются недостоверно. Спустя 24 ч эксперимента – препарат не вызывает достоверных изменений в почечной экскреции воды, натрия, калия и креатинина по сравнению с водно-спиртовым контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного диссертационного исследования научно обоснована целесообразность использования нового вида ЛРС «Расторопша пятнистая трава» (наряду с плодами расторопши пятнистой) в качестве источника БАС для создания отечественных ЛП.

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

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

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

4. Разработана методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в траве расторопши пятнистой с использованием метода прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 330 нм. Определено, что сумма фенилпропаноидов в пересчете на хлорогеновую кислоту в сырье данного растения варьирует от $1,23 \pm 0,01\%$ до $2,81 \pm 0,01\%$.

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

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

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

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

9. Впервые в РФ разработана схема получения дигемисукцината силибина натриевой соли, заключающаяся в образовании эфира путем реакции силибина с ангидридом янтарной кислоты, с последующим переводом полученного эфира со спиртовым раствором натрия гидроксида в водорастворимую соль, химическое строение которой доказано с использованием данных ^1H -ЯМР спектра, ^{13}C -ЯМР-спектра и масс-спектра.

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

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

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

Перспективы дальнейшей разработки темы. Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих флаволигнаны, фенилпропаноиды, флавоноиды, а также разработки методик анализа и стандартизации лекарственного растительного сырья. Кроме того, важным является научное обоснование комплексного использования всей фитомассы расторопши пятнистой в медицинской и фармацевтической практике как перспективного нового вида лекарственного растительного сырья.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Куркин, В.А. Стандартизация сиропа расторопши / В.А. Куркин, Д.В. Росихин // **Фармация**. - 2017. - Т. 66, №1. - С. 19-22.
2. Куркин, В.А. Сравнительное исследование состава жирных кислот масла расторопши и подсолнечного масла / В.А. Куркин, Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // **Медицинский альманах**. - 2017. - № 1. - С. 99-102.
3. Куркин, В.А. Жирнокислотный состав масла плодов расторопши пятнистой, культивируемой в Самарской области / В.А. Куркин, О.В. Сазонова, Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // **Химия растительного сырья**. - 2017. - № 3. - С.101-105.
4. Росихин, Д.В. ВЭЖХ-анализ лекарственного препарата «Силимар» / Д.В. Росихин, В.А. Куркин, В.М. Рыжов и др. // **Современные проблемы науки и образования**. - 2015. - № 4. - URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=20837>.
5. Егорова, А.В. Исследование влияния факторов космического полета на развитие некоторых лекарственных растений / А.В. Егорова, В.В. Стеняева, Д.В. Росихин и др. // **Известия Самарского научного центра РАН**. - 2015. - Т.17, № 5 (3). - С. 944-946.
6. Росихин, Д.В. Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой / Д.В. Росихин, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // **Аспирантский вестник Поволжья**. - 2015. - № 5-6. - С. 342-346.
7. Куркин, В.А. Сравнительное изучение состава жирных кислот масла расторопши, подсолнечного масла и облепихового масла / В.А. Куркин, Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // **Фармация**. - 2017. - Т. 66, № 6. - С. 25-29.
8. Куркин, В.А. Сравнительное исследование антиоксидантной активности некоторых флавоноидов и гепатопротекторных лекарственных препаратов на основе плодов расторопши пятнистой / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Д.В. Росихин и др. // **Современные проблемы науки и образования**. - 2016. - №6; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25833>.
9. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации видов лекарственного растительного сырья, включенных в государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания / В.А. Куркин, Е.В.

Авдеева, Д.В. Росихин и др. // **Известия Самарского научного центра РАН.** – 2016. –Т.18, №2-3. – С. 730-736.

10. Росихин, Д.В. Исследование по созданию отечественного гепатопротектора «Силимарин растворимый» / Д.В. Росихин // VIII Всероссийская (82-ая Итоговая) студенческая научная конференция. «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты», посвященная 95-летию СамГМУ. – Самара, 2014. – С.194.

11. Росихин, Д.В. Актуальные вопросы создания трансдермальных лекарственных форм на основе силимарина с высокой биологической доступностью / Д.В. Росихин, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // Материалы Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста». – Рязань, 2015. – С.174-175.

12. Росихин, Д.В. Скрининг флаволигнанов в различных сортах плодов расторопши пятнистой / Д.В. Росихин, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // Материалы X научно-практической конференции "Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику" – Душанбе, 2015. – С.393.

13. Росихин, Д.В. Актуальные проблемы создания лекарственных препаратов на основе расторопши пятнистой / Д.В. Росихин, В.А. Куркин // Сборник материалов I Межвузовская студенческая научно-практическая конференция «Современные проблемы фармакогнозии», посвященная 45-летию фармацевтического факультета Самарского государственного университета. – Самара, 2016. – С.127-133.

14. Росихин, Д.В. Актуальные вопросы по разработке сиропа на основе экстракта расторопши пятнистой / Д.В. Росихин, В.А. Куркин // Материалы научно-практической конференции «Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки». – Пермь, 2016 – С. 27.

15. Росихин, Д.В. Актуальные вопросы по увеличению биодоступности силимарина в трансдермальных лекарственных формах / Д.В. Росихин // Материалы научно-практической конференции «Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики». – Уфа, 2016. – С. 199.

16. Росихин, Д.В. Изучение содержания флаволигнанов в различных сортах расторопши пятнистой / Д.В. Росихин // Материалы научно-практической конференции «Молодые ученые – от технологий XXI века к практическому здравоохранению». Аспирантские чтения-2016. – Самара, 2016. – С.226-227.

17. Росихин, Д.В. Фармакогностическое изучение плодов расторопши пятнистой / Д.В. Росихин, В.А. Куркин, В.М. Рыжов // Сеченовский вестник. - 2016. - № 1 – С. 71-72.

18. Росихин, Д.В. Анализ жирнокислотного состава масла расторопши, подсолнечного масла и облепихового масла / Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // Материалы 89-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины». – г. Симферополь, 2017. – С. 588-589.

19. Росихин, Д.В. Анализ жирного масла расторопши пятнистой, культивируемой в Самарской области / Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2017. – № 17. – С.214-216.

20. Росихин, Д.В. Сравнительное изучение жирнокислотного состава масла расторопши и облепихового масла / Д.В. Росихин, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // Вестник Башкирского государственного медицинского университет. – 2017. – № 2. – С.761-768.

21. Росихин, Д.В. Исследования по разработке препаратов на основе расторопши пятнистой для лечения и профилактики профессиональных заболеваний / Д.В. Росихин, В.А. Куркин и др. // Совершенствование охраны труда в медицинских организациях – 2018. –№ 4. – С.44-48.

22. Росихин, Д.В. Исследования по разработке методики стандартизации травы расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn. / Д.В. Росихин, В.А. Куркин и др. // Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва, 2018. - С. 498-502.

23. Росихин, Д.В. Подходы к качественному анализу суппозиторий антигеморроидального действия, содержащих биологически активные соединения масла расторопши пятнистой / Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения-2017». – Самара, 2017. – С.178-179.

24. Куркин, В.А. Создание и стандартизация импортозамещающих лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Д.В. Росихин и др. // Материалы 7-й Международной научно-методической конференции "Фармообразование-2018". – Воронеж, 2018. – С. 487-490.

Патенты

Патент РФ на изобретение 2647452. – А61К36/28 (заявка № 2016138502 от 28.09.2016). «Способ получения сиропа расторопши пятнистой» / В.А. Куркин, Д.В. Росихин, В.М. Рыжов, Н.Д. Лужнов. – Решение о выдаче патента 15.03.2018 г.