

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

На правах рукописи

САЗАНОВА КСЕНИЯ НИКОЛАЕВНА

**ХИМИКО-ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО (*FILIPENDULA ULMARIA* (L.)
MAXIM.) И ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО
(*FILIPENDULA HEXAPETALA* GILIB.)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
доцент С.Х. ШАРИПОВА

Самара – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>FILIPENDULA</i> КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1. Этимология названия растений рода <i>Filipendula</i> L. и историческая справка.....	15
1.2. Арёалы обитания и места возделывания растений рода <i>Filipendula</i>	17
1.3. Ботаническое описание рода <i>Filipendula</i>	19
1.4. Химический состав растений рода <i>Filipendula</i>	21
1.5. Фармакологические свойства лекарственных препаратов на основе сырья лабазника и их применение в медицине	27
1.6. Стандартизация сырья лабазника	33
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	36
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Объекты исследования	38
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Методы морфолого-анатомического анализа	39
2.2.2. Физические методы анализа	40
2.2.3. Химические методы анализа.....	40
2.2.4. Хроматографические методы анализа	43
2.2.5. Физико-химические методы анализа	45
2.2.6. Технологические методы анализа	49
2.2.7. Фармакологические методы анализа	55
2.2.8. Микробиологические методы анализа.....	57
2.2.9. Статистические методы обработки результатов исследования	58
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНЫХ И ПОДЗЕМНЫХ ЧАСТЕЙ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО И ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО.....	59

3.1. Морфолого-анатомическое исследование надземной части лабазника вязолистного	60
3.1.1. Морфолого-анатомическое исследование плодов лабазника вязолистного	60
3.1.2. Морфолого-анатомическое исследование подземной части лабазника вязолистного	68
3.2. Изучение вопросов диагностики примесного вида к лабазнику вязолистному	71
3.2.1. Морфолого-анатомическое исследование надземной части лабазника шестилепестного	71
3.2.2. Морфолого-анатомическое исследование подземной части лабазника шестилепестного	86
ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНОЙ И ПОДЗЕМНОЙ ЧАСТЕЙ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО И ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО	94
4.1. Выделение индивидуальных веществ из плодов лабазника вязолистного	94
4.1.1. Физико-химические и спектральные характеристики выделенных индивидуальных веществ из плодов лабазника вязолистного	96
4.2. Сравнительное хроматографическое и спектральное исследование надземной и подземной частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного	101
4.3. Сравнительное исследование фракционного состава белков и малатдегидрогеназы в сырье лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного	106
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	113
ГЛАВА 5. ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЛОДОВ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО	115
5.1. Разработка методик стандартизации плодов лабазника вязолистного	115
5.1.1. Исследование влияния различных параметров экстракции на выход действующих веществ из плодов лабазника вязолистного	117

5.1.2. Разработка методик качественного анализа плодов лабазника вязолистного	118
5.2. Разработка методик количественного определения содержания фенольных веществ в плодах лабазника вязолистного	122
5.2.1. Анализ содержания суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного в зависимости от года сбора сырья	125
5.3. Числовые показатели для нового вида ЛРС «Лабазника вязолистного плоды»	126
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	128
ГЛАВА 6. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО И ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО	130
6.1. Разработка способа получения густого экстракта из плодов лабазника вязолистного и его стандартизация	130
6.2. Определение острой токсичности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного	133
6.3. Изучение диуретической активности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного	134
6.4. Изучение антидепрессантной активности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного	136
6.5. Изучение противовоспалительного действия водных и водно-спиртовых извлечений из плодов лабазников двух видов	137
6.6. Сравнительное изучение антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилистного	138
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ	147
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	148
ПРИЛОЖЕНИЯ	170

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время 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, все большую значимость приобретает создание отечественных лекарственных препаратов. 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. Лекарственные препараты на основе растительного сырья отличаются относительно низким риском 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).

Как известно, многие растения обладают определенными лечебными свойствами и входят в арсенал средств, используемых в современной врачебной практике. Основными критериями для отбора растительного сырья в качестве источника биологически активных соединений являются: высокое содержание действующих веществ, доступность сырья в природе или несложная технология его культивирования. К таким растениям можно отнести лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазник шестилепестный (*Filipendula hexapetala* Gilib.), которые широко распространены в Европейской части России и Сибири. По данным отечественных и зарубежных исследователей препараты на основе различных органов растений указанных видов, обладают рядом фармакологических свойств. Надземная часть лабазника вязолистного включена в Фармакопеи ряда стран (Германия, Великобритания, Франция), а

в Государственной Фармакопее (ГФ) Российской Федерации имеется лишь Временная фармакопейная статья (ВФС) на цветки лабазника вязолистного.

На наш взгляд, одним из перспективных растительных источников получения импортозамещающих лекарственных средств, являются плоды лабазника. Внедрение их в качестве сырья в фармацевтическое производство будет способствовать решению важной задачи рационального и комплексного использования сырьевых ресурсов страны.

Однако химический состав плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного изучен недостаточно. Это не позволяет успешно решать проблемы стандартизации и разработки рациональной технологии получения препаратов на основе данного сырья.

Анализ научной литературы демонстрирует перспективность создания лекарственных препаратов из сырья лабазника вязолистного и шестилепестного, но препараты на их основе в настоящее время на фармацевтическом рынке Российской Федерации отсутствуют. Создание новых лекарственных средств с использованием плодов лабазника позволит расширить ассортимент препаратов, а также решить вопрос о возможности более широкого использования исследуемых растений.

В связи с этим, актуальным вопросом является углубленное фармакогностическое изучение плодов лабазника вязолистного и шестилепестного с целью научного обоснования целесообразности использования в медицинской практике.

Степень разработанности темы. На территории Российской Федерации фармакопейным сырьем являются лишь цветки лабазника вязолистного (ВФС 42-1777-87), а другие виды сырья данного растения в официальной медицине не применяются. ВФС 42-1777-87 оценивает цветки лабазника методом дифференциальной спектрофотометрии по количественному содержанию флавоноидов (не менее 2%) в пересчете на гликозиды кверцетина (спиреозид).

Сырьевая часть – цветы (верхняя часть травы) упоминается в Европейской фармакопее VI издания, Немецкой фармакопее 2008 года издания, Британской травяной фармакопее (1991, 1996), Французской фармакопее X издания в разделе статей - монографий. Кроме того, цветки лабазника вязолистного свежие включены во Французскую Гомеопатическую фармакопею, трава лабазника вязолистного включена в Немецкую Гомеопатическую фармакопею. Лабазника вязолистного трава и цветки включены в Государственную фармакопею Республики Беларусь.

Предложены различные методики для стандартизации наземных органов растений, вопрос о преимуществах их остаётся дискуссионным.

В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют методики стандартизации плодов лабазника вязолистного, а также методики качественного анализа и количественного определения БАС в препаратах на основе данного сырья. Введение нового вида лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды» в фармацевтическую практику позволило бы расширить ассортимент препаратов на основе ЛРС, а также позволило бы решить проблемы комплексного использования всей надземной части обсуждаемого растения, причём, как в период цветения, так и в период плодоношения.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью настоящей работы является химико-фармакогностическое исследование надземной и подземной частей лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) для обоснования перспективности использования их в качестве сырьевого источника в производстве отечественных лекарственных препаратов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Анализ и систематизация литературных данных о состоянии исследований растений рода Лабазник.

2. Исследование морфолого-анатомических признаков сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного.
3. Сравнительное фитохимическое исследование сырья двух видов лабазника.
4. Изучение химического состава плодов лабазника вязолистного с выделением индивидуальных веществ и их идентификацией.
5. Разработка методики качественного анализа плодов лабазника вязолистного.
6. Разработка методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного.
7. Разработка метода получения препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой».
8. Исследование биологической активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья двух видов лабазника.
9. Обоснование целесообразности создания лекарственных препаратов на основе плодов лабазника вязолистного.
10. Разработка проекта ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды».

Научная новизна. Морфолого-анатомическое исследование плодов двух видов лабазника позволило впервые выявить новые, не описанные ранее в литературе, морфолого-анатомические признаки, которые характерны для плодов исследуемых растений.

Изучение химического состава плодов лабазника позволило определить, что среди фенольных соединений доминируют флавоноиды и количественное содержание их не ниже, чем в цветках, что свидетельствует о перспективности комплексного использования данного вида сырья.

Показана целесообразность проведения стандартизации плодов лабазника вязолистного по ведущей группе биологически активных веществ - флавоноидам, методами ТСХ и УФ-спектроскопии.

В ходе настоящих исследований впервые выявлено, что отвар (1:10) и настойки (1:5) плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного на 40% и 70% спирте этиловом обладают антимикробной активностью и противовоспалительным действием, а изготовленный «Плодов лабазника экстракт густой» - антидеперессантным и диуретическим действием.

Обоснована целесообразность использования в фармацевтической практике нового вида ЛРС «Лабазника вязолистного плоды».

Теоретическая и практическая значимость работы

В выполненном обзоре научной литературы дан анализ современного состояния исследований растений рода Лабазник, обобщены и систематизированы сведения о химическом составе, методах извлечения действующих веществ, идентификации, фармакологической активности, применению в медицинской практике этих растений.

Полученные экспериментальные результаты расширили представления о морфолого-анатомических признаках, химическом составе, биологической активности растений рода Лабазник и препаратов на их основе.

Разработан раздел «Микроскопия» для проекта ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды».

Разработаны методики качественного анализа методом ТСХ и количественного определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии в плодах лабазника вязолистного, позволяющие определить качество и подлинность ЛРС, отвечающие принципам унификации, которые предъявляются к методам современного фармацевтического анализа.

Предложен способ получения лекарственного препарата «Плодов лабазника экстракт густой» с методиками качественного анализа и количественного определения содержания суммы флавоноидов в препарате.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедрах фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ

Минздрава России, используются в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы».

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы основана на изучении и систематизации данных литературы по фармакогностическому исследованию растений рода Лабазник для научного обоснования целесообразности комплексного использования растительного сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного в фармацевтической и медицинской практике, оценки актуальности и степени разработанности выбранной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объекты диссертационного исследования - образцы ЛРС двух видов лабазника, произрастающих в Самарской области, препараты на их основе. В процессе выполнения работы использован комплекс физико-химических, физических и химических методов исследования (тонкослойная и бумажная хроматография, электрофорез, цифровая микроскопия, УФ-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия и др.).

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

Связь задач исследования с планами научных работ

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

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты морфолого-анатомических исследований плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного.

2. Результаты фитохимического исследования различных видов сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного.

3. Методики качественного и количественного анализа ЛРС «Лабазника вязолистного плоды» и изготовленного препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой».

4. Результаты исследования биологической активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья двух видов лабазника, препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой» и обоснование целесообразности использования препаратов на основе плодов лабазников в медицинской и фармацевтической практике.

5. Результаты исследования по разработке проекта фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Лабазника вязолистного плоды».

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

Апробация результатов. Материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (г. Рязань, 2015), на III Международной научно-практической конференции «Современные проблемы развития фундаментальных и прикладных наук» (г. Прага, 2016), на Межвузовских научно-практических конференциях (г. Самара, 2016, 2017, 2018), на конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2016; 2017; 2018), на XII Научно-практической конференции молодых учёных и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвящённой «Году молодёжи» - «Роль молодежи в развитии медицинской науки» (г. Душанбе, 2017).

Публикации. Основное содержание диссертационного исследования опубликовано в 19 научных работах, из них 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России.

Внедрение результатов исследования

Полученные в результате диссертационных исследований данные используются в учебном процессе на кафедрах химии фармацевтического факультета, фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, управления и экономики фармации, фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы».

Личный вклад автора. Все приведенные экспериментальные результаты диссертационного исследования получены самим автором. Автором выполнены исследования по изучению морфологических признаков и анатомо-гистологических особенностей строения плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного, идентифицированы и выявлены диагностические признаки для плодов указанных растений. В ходе изучения химического состава плодов лабазника вязолистного, с помощью колоночной хроматографии выделены и идентифицированы компоненты этого ЛРС. Разработана технология получения препаратов на основе сырья двух видов лабазника. Изучена антимикробная и противовоспалительная активность водных и водно-спиртовых извлечений из сырья двух видов лабазника. Изучена в эксперименте острая токсичность, диуретическая и антидепрессантная активность густого экстракта из плодов лабазника вязолистного. Предложены и обоснованы методики качественного и количественного анализа препаратов на основе плодов лабазника вязолистного методом ТСХ и УФ-спектроскопии. Разработан проект ФС «Лабазника вязолистного плоды».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные положения, изложенные в диссертации, 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 169 страницах машинописного текста, полученные данные представлены в форме 17 таблиц и проиллюстрированы 39 рисунками. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, 4 глав, в которых приведены результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и библиографического списка, включающего 178 источников, из которых 23 – на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, отмечены новизна и практическая значимость полученных результатов, изложены положения, выносимые на защиту.

Глава 1 содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный исследованиям сырья и препаратов растений рода Лабазник. Представлены сведения по ареалу обитания растений, химическому составу различных органов и методам стандартизации. Описаны основные фармакологические эффекты препаратов на их основе,

которые имеют длительный положительный опыт применения в народной медицине. Обоснована актуальность запланированных исследований.

В главе 2 представлены и описаны объекты и методы исследования. Глава включает методики идентификации и количественного определения содержания БАС в сырье двух видов лабазника и препаратах на их основе.

В главе 3 представлены результаты морфолого-анатомического анализа, описаны диагностические признаки сырья двух видов лабазника, которые выявлены с использованием метода световой микроскопии и цифрового микроскопа, метода люминесцентной микроскопии.

Глава 4 отражает результаты фитохимических исследований надземной и подземной частей двух видов лабазника, выделения индивидуальных БАС из плодов лабазника вязолистного и установления их структуры.

В главе 5 приведены результаты собственных исследований по разработке методик качественного анализа и определения количественного содержания суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного; рекомендуемые числовые показатели для ЛРС «Лабазника вязолистного плоды» в виде цельного сырья, измельченного сырья и порошка.

Глава 6 посвящена разработке способа получения и стандартизации препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой», исследованиям фармакологической активности.

Диссертационная работа завершается заключением, общими выводами и библиографическим списком публикаций, на которые ссылается автор.

В Приложение вынесены таблицы с информацией о химических соединениях, обнаруженных в разных органах исследуемых растений, о результатах микроскопического исследования; ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР-, масс-спектры выделенных веществ, акты внедрения результатов работы, проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Лабазника вязолистного плоды».

ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *FILIPENDULA* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Этимология названия растений рода *Filipendula* L. и историческая справка

Родовое название *Filipendula* образовано от латинского "*filum*" (нить) и "*pendere*" (висеть) или "*pendulus*" (висячий), так как корневые клубни как бы подвешены на нитевидных корнях [87].

Видовое определение *hexapelata* (шестилепестной), образованное от греческого "*hex*" (шесть) и "*petalon*" (лист, цветок), указывает на количество чашелистиков и лепестков, которых обычно шесть [87].

Род лабазник, или таволга (*Filipendula*) относится к семейству Розоцветные (*Rosaceae*). К. Линней в своём труде "Species plantarum" отнёс два известных на то время вида к роду Спирея (*Spiraea*). Однако в дальнейшем К.И. Максимович отделил лабазники – травянистые растения – от кустарниковых видов рода спирея, в собственный род *Filipendula*.

В некоторых источниках (например, в изданиях «Флора СССР», 1934-1964) для рода *Filipendula* приводится единственное русское название рода – Лабазник, для рода *Spiraea* – Таволга. В то же время, во многих других изданиях в качестве русского названия указаны и Таволга, и Лабазник, при этом иногда на первом месте стоит Лабазник, а иногда – Таволга.

В древних легендах лабазник впервые обнаружили на острове Кипр, в месте появления на свет прекрасной Афродиты-Киприды. Рожденная из морской пены, богиня любви явилась перед жителями острова одетая лишь в пенные кружева. А там, где пена падала на берег, впоследствии выросли куртины высоких трав с душистыми соцветиями.

Лабазник вязолистный используются людьми уже более 400 лет. Это растение было описано европейским травником и ботаником Д. Джерардом в

1597 году и Николаем Кулпеппером в 1652 году. В Европе таволгу называли царицей полей за многообразие полезных свойств, характерный медовый запах (растение – хороший летний медонос, даёт много нектара и пыльцы) и белоснежие полей и лугов в период цветения. Заросли цветущей таволги поэтически называют белой пеной прибоя.

Традиционно таволгу или лабазник использовали как пищевое растение, в нём много полезных веществ, большое количество аскорбиновой кислоты. Это хорошее витаминное добавление к еде. Все части растения идеально подходят для сладких фруктовых блюд и напитков, которым она придаёт сладко-терпкий вкус. Чай с лабазником имеет сладкий вкус, но не повышает сахар в крови. Растение используется в бельгийской и французской кухне. В России корни лабазника употребляют в пищу, они богаты крахмалом и имеют приятный вкус. Листья имеют кислый привкус, их добавляют в салаты и супы. Все части растения применяют для ароматизации сладкого десерта, а также напитков. Аромат таволги издавна считали приятным и использовали для ароматизации помещений, вещей и постельного белья, как современные саше [69, 102, 106, 109, 117, 126].

В «Словаре садовода» Филипа Миллера, изданном в середине XVIII в. в Англии, содержатся сведения о выращивании двух видов лабазников: вязолистного и обыкновенного или шестилепестного. Тогда были известны махровые и пестролистные садовые формы. Позже, в конце XVIII в., из Северной Америки в Европу завезли еще один вид – лабазник красный, с изящными пальчатыми листьями и темно-розовыми цветками. Растение быстро заняло место в европейских ботанических и частных садах, парках.

Японские цветоводы также отдали должное красоте этих растений. На острове Хонсю в садах не редкость изящное невысокое растение с метелками темно-пурпурных цветков – лабазник пурпурный. Это садовый гибрид, полученный в результате скрещивания трех встречающихся в Японии дикорастущих видов: лабазников голенького, многопарного и камчатского.

1.2. Ареалы обитания и места возделывания растений рода

Filipendula

В общем, Род *Filipendula* (сем. *Rosaceae*) насчитывает более 20 видов.

На территории России и стран СНГ встречаются одиннадцать представителей рода лабазник: Л. степной (*F. stepposa*), Л. обнаженный (*F. denudata*), Л. средний (*F. intermedia*), Л. узколопастной (*F. angustiloba*), Л. дланевидный (*F. Palmate*), Л. пурпуровый (*F. purpurea*), Л. голый (*F. Glabra*), Л. камчатский (*F. kamtchatica*), Л. крупноплодный (*F. megalocarpa*), Л. шестилепестный (*F. hexapetala*), Л. вязолистный (*F. ulmaria*).

Лабазник степной распространен в европейской части России. Произрастает на Южном Урале, в Западной Сибири. Описан в Башкирии, Северном Казахстане. На лугах и в луговых степях растение стало редким вследствие распашки степей и лугов [93, 130].

Лабазник крупноплодный встречается по берегам горных рек Закавказья, Северной Турции и Северного Ирана.

Лабазник обнаженный встречается в Средней Европе, Скандинавии, Арктике. Произрастает на сырых и болотистых лугах, по берегам ручьев, в сырых и болотистых хвойных и лиственных лесах, среди кустарников.

Лабазник средний произрастает на Дальнем Востоке и в Восточной Сибири.

Лабазник узколопастной встречается на Дальнем Востоке и в Восточной Сибири. Произрастает на лесных лугах и возле жилья, является эндемиком Амурской области [130].

Лабазник дланевидный встречается в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке на сырых разнотравных лугах, в лесах, по берегам рек [130].

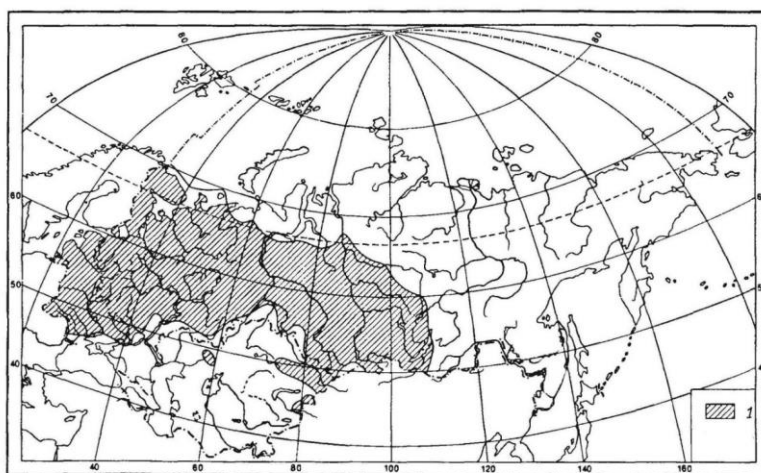
Лабазник пурпуровый встречается на Дальнем Востоке. Широко распространен в Японии (Нагасаки, Хаконе, Иокогама).

Лабазник голый описан на Дальнем Востоке. Широко распространен в Японии и Китае. Типичен в Токио.

Лабазник камчатский встречается на Дальнем Востоке в высокотравных лугах, по берегам рек. Используется как декоративное растение. Молодые побеги употребляют в пищу в сыром виде, как зелень.

Лабазник шестилепестный (обыкновенный) распространен почти во всей Европе кроме Арктики и большей части Балканского полуострова. Места произрастания: верхний Днепр, Волжско–Камский, Верхне-Волжский и все южнее расположенные районы. Все районы Западной и Восточной Сибири, все районы Кавказа. Встречается как одичалое растение в Северной Америке и Малой Азии. Произрастает на недостаточно увлажненных почвах - в степях и сухих лугах, лесных полянах и опушках лесов, в светлых лесах, среди кустарников, на каменистых склонах холмов [45, 87, 93, 130].

Лабазник вязолистный распространен по всей Европе, включая арктические районы (Европейская Арктика), все районы европейской части России, кроме Нижне-Волжского. Растёт во всех районах Западной и Восточной Сибири, в Средней Азии. Произрастает в изобилии на болотистых и заливных лугах, травянистых болотах, по берегам рек, озёр, ручьёв и канав, опушкам лесов, на вырубках. В природе размножается преимущественно корневищами, реже семенами. Природные ресурсы значительны, по мощи ресурсного потенциала растение – одно из перспективных травянистых растений России (рис. 1) [45, 87, 91, 93, 130].



Ареал *Filipendula ulmaria* (1)

Рисунок 1 – Ареал произрастания лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria*)

В средней полосе России распространены четыре представителя рода Лабазник: лабазник шестилепестный, лабазник обнаженный, лабазник вязолистный и лабазник степной. На территории Самарской области наиболее встречаемы лабазники вязолистный и шестилепестный [93].

1.3. Ботаническое описание рода *Filipendula*

Лабазник (*Filipendula*) – род многолетних травянистых растений семейства Розоцветные (*Rosaceae*), класса Магнолиописиды (*Magnoliopsida*) или Двудольные (*Dicotyledones*), отдела Могнолиевые (*Mognoliophyta*) или Покрытосеменные (*Angiosperme*), подцарство Побеговые пестичные – *Cormobionta gynoeciatae* или Антофилы, высшие или зародышевые растения – *Embriobionta* [122]. Жизненная форма растений рода лабазник – это крупные многолетние травы с ползучим коротким или довольно длинным тонким или толстым корневищем [33, 34, 130].

Наиболее распространенными видами на территории Средней Волги являются два вида лабазника: вязолистный и шестилепестный.

Лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) – крупное многолетнее растение высотой до 2 м, с корнем без клубневидных утолщений и ползучим корневищем [45, 93] (рис. 2).

Стебли крепкие, густо олиственные почти до соцветия, простые или ветвистые, в верхней части всегда без паутинистого опушения [45, 93].

Листья прерывисто-перистые, сверху голые, темно-зеленые, снизу с тонким беловойлочным опушением, при растирании с резким запахом. Крупных боковых листочков от 2 до 6 пар, конечный листочек 3-5-рассеченный, более крупный, чем боковые; все листочки острые, широкояйцевидные, по краям надрезанно-пильчатые. Между крупными листочками расположены промежуточные, остро-зубчатые, мелкие [45].

Многочисленные цветки собраны в густое метельчатое соцветие длиной до 20 см. Цветоножка и оси соцветий без войлочного опушения. Гипатий плоский. Чашелистиков и лепестков по 5 (редко лепестков 6);

лепестки с длинным ноготком, желтовато-белые. Тычинки в 1,5-2 раза длиннее лепестков. Плод – многолистовка, состоящая из 10-15 односемянных листовок, спирально закрученных, голых или изредка с опушением по брюшному шву, твердеющих по мере созревания [45, 93].



Рисунок 2 – Гербарный образец лабазника вязолистного из гербарного фонда кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Цветет в июне-июле, плодоносит в июле-августе. Размножается семенами, переносимыми ветром или водой. Одно растение дает до 500 семян [45].

Лабазник шестилепестный (*Filipendula hexapetala* Gilib.) (рис. 3) - многолетник высотой до 80 см, с коротким корневищем и корнями, имеющими округлые или веретеновидными утолщения («орешки») [45, 93].

Стебель простой, в верхней части безлиственный или с 1-2 сильно уменьшенным листовым чашелистиком или лепестком в основном по шесть. Листья в очертании ланцетные, прерывисто-перистые, обычно с 15-25 парами боковых, относительно крупных, продолговатых листочков, перисто-зубчатых или глубоко надрезанных и сидящими между ними парами мелких

листочков. Стеблевые листья сходны с прикорневыми, но мельче и с меньшим числом пар листочков. Листья с обеих сторон зеленые, сверху голые, снизу по жилкам несколько волосистые. Плоды – прямые с прижатым опушением по всей поверхности листовки [45, 93].



Рисунок 3 – Гербарный образец лабазника шестилепестного из гербарного фонда кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Цветки белые или бледно-розовые, собранные в конечных щитковидно-метельчатых соцветиях. Чашелистиков и лепестков по шесть. Тычинки обычно по длине равны лепесткам или несколько длиннее их. Цветет растение в мае-июне; плодоносит в июле-августе [45].

1.4. Химический состав растений рода *Filipendula*

Из множества видов растений рода *Filipendula* особый интерес вызывают лабазник вязолистный и лабазник шестилепестный в силу значительного ресурсного потенциала на территории Самарской области, что позволяет их рассматривать как перспективные виды ЛРС.

Растения издавна использовались в народной медицине для лечения широкого спектра болезней. Очевидно, что широкий спектр фармакологической активности обусловлен большим комплексом биологически активных соединений, содержащихся в этих растениях. Исследование компонентного состава биологически активных веществ представляет, как научную, так и практическую ценность. Интерес к этим исследованиям демонстрируют публикации результатов работы учёных, представленные в научной литературе. Данные о растениях рода Лабазник представлены в учебных пособиях по фармакогнозии. Химический состав растений представлен широким спектром веществ разных классов. В качестве объектов исследования чаще всего использовалась надземная часть растения в виде листьев и цветов [43, 44, 46, 53, 86-90, 92, 97, 100, 127, 129].

При описании указывают, что листья и цветы лабазника вязолистного содержат ароматические соединения, в частности, простые фенолы, спирты, альдегиды, кислоты и их производные (салициловый альдегид, метилсалицилат, этилбензоат, бензальдегид, бензиловый и фенилэтиловый спирты, ванилин, гелиотропин или пиперональ), фенолокислоты (галловая, салициловая, хлорогеновая *n*-кумаровая и ванилиновая), флавоноиды (кверцетин, спиреозид, гиперозид, авикулярин, кверцетин-3-глюкоронид, 3'-глюкопиранозид кверцетина, кемпферол-4'-глюкозид, рутин, кемпферол, лютеолин), феногликозиды (изосалицин, спиреин, монотропитин или гаультерин); монотерпеноиды (1,8-цинеол, зукарвон), кумарины (следовые количества), катехины, лейкоантоцианидины; аскорбиновую кислоту, азотсодержащие соединения (изобутиламин, изоамиламин); высшие жирные кислоты (стеариновая, линоленовая), дубильные вещества (наибольшее содержание в фазу стеблевания и цветения) и микроэлементы [98]. В цветках растения есть эфирное масло (0,2% предположительно 5-гидроксиметилфурфурол) [60, 61, 63, 80]. Пыльца растения содержит незаменимые аминокислоты, тритерпеновые кислоты, каротиноиды (β -каротин), аскорбиновую кислоту, фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая),

флавоноиды, в том числе катехины. В составе плодов присутствуют дубильные вещества, флавоноиды; семян – дубильные вещества, жирное масло, воск. Корневища и корни содержат дубильные вещества, фенольные соединения (салициловый альдегид, метилсалицилат, ванилин), феногликозиды (спиреин, монотропитин), флавоноиды, фенолокислоты, кумарины, витамин С. Обнаружены медь, цинк, молибден, свинец, кадмий, уран, калий, фосфор [22, 23, 56, 57, 59, 60, 62, 64, 82, 83, 110, 111, 113, 134, 135].

Надземная часть лабазника шестилепестного содержит: феногликозиды (монотропитин), флавоноиды (3,28%; кверцетин, лютеолин, гиперозид, авикулярин, кверцитрин, спиреозид, рутин, халконы), фенолокислоты (салициловая), кумарины (следовые количества), дубильные вещества (9,9%), витамин С, аминокислоты (9,65 мг% свободных и 21,5 мг% связанных) [79, 81, 111, 165].

В цветках лабазника шестилепестного обнаружены азотсодержащие соединения (изоамиламин), флавоноиды (0,67-0,99 г%; кверцетин, кемпферол, спиреозид, авикулярин, рутин, дипентозид кверцетина, содержащий углеводы D-ксилоза, L-арабиноза; катехины, лейкоантоцианидины), фенолкарболовые кислоты (1,94-2,33%; кофейная, хлорогеновая, *n*-кумаровая, синаповая, сиреневая, галловая), дубильные вещества, тритерпеновые и жирные кислоты, полисахариды, каротиноиды (β -каротин), витамин С. Корневища и корни лабазника обыкновенного имеют в химическом составе феногликозиды (монотропитин – 0,03%), флавоноиды (кверцетин, гиперозид, авикулярин, изокверцитрин, кверцитрин, рутин, спиреозид, халконы), фенолокислоты, кумарины в следовых количествах, дубильные вещества (4,8-5,9%), сапонины, полисахариды, состоящие из глюкозы, маннозы, арабинозы, ксилозы, рамнозы, галактозы, крахмал, красящие вещества, аминокислоты и витамин С [87, 111]. Корневище с клубневидными утолщениями содержит гликозид гаультерин [111]. Содержащиеся в надземной части аминокислоты, аналогичны таковым в

подземных частях растения, хотя содержание отдельных аминокислот варьирует в зависимости от части растения: аспарагиновая кислота, аргинин и гистидин (в наибольшей концентрации), глутаминовая кислота, аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, лизин, тирозин, треонин, серин, фенилаланин [22, 79]. В надземной и подземной частях лабазника обыкновенного выявлено наличие микроэлементов (калий, кальций, кремний, фосфор, железо, натрий, магний, алюминий, сера, хлор, титан, хром, марганец, кобальт, гафний, цирконий, никель, медь, цинк, мышьяк, ниобий, молибден, барий и стронций) [23, 24].

В последние годы интерес к растениям рода Лабазник не снизился, поскольку ресурсный потенциал и спектр фармакологической активности их значителен, появились и расширяются возможности использования современных методов исследования. Продолжается изучение как отдельных видов лабазника, так и в сравнении с другими видами этого растения или в сравнении с другими растениями. Так, исследования, проведенные в Йошкар-Оле с использованием 2-мерной хроматографии, показали наличие в образцах лабазника вязолистного флавоноидов (кверцетин, изофлаван, мирицитин, рутин, спиреозид, кемпферол). Содержание флавоноидов от 1,3% до 3% в зависимости от формы сбора (в листьях 1,28-1,43, в соцветиях до 3%) примерно равное их содержанию в луковой шелухе: не более 3% с преобладанием в компонентном составе рутина и кверцетина.

В Санкт-петербургской ГХФА провели сравнительный фитохимический анализ листьев дикорастущего лабазника вязолистного и культивируемого в Ленинградской области лабазника камчатского, поскольку последнее растение в научной медицине не используется. В результате определили сходство и отличие по содержанию основных групп БАС. В образцах сырья обоих видов лабазника обнаружили флавоноиды, фенольные кислоты, дубильные вещества, каротиноиды, сапонины, полисахариды. Наиболее полное извлечение суммы флавоноидов достигалось при использовании раствора спирта этилового концентрации

70% (по сравнению с растворами концентрации 40% и 95%), причём большее количество (8,41%) флавоноидов извлекалось из листьев лабазника вязолистного, заготовленных в фазу цветения. Результат определения методом ГЖХ моносахаридного состава водорастворимых полисахаридов (после гидролиза кислотой трифторуксусной) показал наличие кислых маннанооксилогалактанов в листьях лабазника камчатского и нейтральных рамноглюкоманнанов в листьях лабазника вязолистного. Общее содержание свободных моносахаридов и водорастворимых полисахаридов оказалось несколько выше в листьях лабазника вязолистного, а содержание пектиновых веществ значительно больше в сырье лабазника камчатского. Содержание дубильных веществ несколько выше в листьях лабазника камчатского [116].

Белорусские исследователи провели сравнительный анализ водноспиртовых экстрактов соцветий, листьев и подземной части (корни и корневища) лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного с использованием газохроматографического анализа с масс-селективным детектором. Экстракцию проводили 90%-ным спиртом, результаты показали близость экстрактов по химическому составу. В экстрактах соцветий идентифицировали 31 компонент, из них в наибольшем количестве оказался пирогаллол в экстракте соцветий лабазника шестилепестного (36,4%). Содержание метилсалицилата оказалось больше в экстракте лабазника вязолистного (2,60% в пересчете на нормировочные проценты). В экстрактивных веществах листьев идентифицировали 22 компонента у лабазника вязолистного, 27 - у лабазника шестилепестного со сходным содержанием основных из них. Различия составили фурфурол, 2-фуранметанол, 2-гидроксоциклопент-2-ен-1-он, бензенметанол и метил- α -D-рибопиранозид. В экстракте подземных органов лабазника вязолистного идентифицировали 12 веществ, а у лабазника шестилепестного – 10. ВЭЖХ анализ показал наличие флавоноидов кверцетин в гидролизатах экстрактов листьев и соцветий, акацетин в гидролизатах экстрактов листьев и соцветий только лабазника шестилепестного. В гидролизатах экстрактов из подземной

части растений не обнаружили кверцетин и акацетин. Обнаруженное повышенное содержание флавоноидов в кислотных гидролизатах экстрактов изученных видов, по сравнению с теми, что не подвергались гидролизу, авторы объяснили тем, что идентифицированные соединения являются агликоновой частью гликозидов, освобождённой при гидролизе [11, 13, 16].

В цветках лабазника вязолистного, заготовленного в окрестности г. Витебска Республики Беларусь, используя жидкостную хроматографию и УФ-спектроскопию, показали наличие шести флавоноидов, из которых смогли идентифицировать четыре: кверцетин, изокверцитрин, гиперозид, спиреозид [99].

Много исследований растений рода лабазник провели сибирские учёные [32, 151, 152, 153]. В обзорной статье [77] представлены собственные и опубликованные другими авторами результаты изучения химического состава нескольких видов рода Лабазник. Приведены сведения об обнаруженных в надземных и подземных частях растений алифатических соединениях, ароматических соединениях (фенолокислотах, производных бензола, флавоноидах, танинах и др.), тритерпеновых соединениях, алкалоидах, полисахаридах, витаминах, аминокислотах, элементном составе. Показано, что содержание флавоноидов в растениях рода Лабазник варьирует в зависимости от места произрастания от 3,3% до 9,8%. Отмечено, что особое внимание учёных привлекает лабазник вязолистный.

При изучении химического состава экстракта на 70%-ном спирте этиловом надземной части лабазника вязолистного, собранной в Томской области, установлено наличие 18 фенольных соединений, из которых 7 – флавоноиды. С использованием колоночной хроматографии выделили в индивидуальном виде четыре флавоноида (кверцетин, изокверцитрин, 4¹-глюкозид кверцетина, рутин) и фенолкарбоновую кислоту (галловую кислоту). Кроме того, в бутанольной фракции экстракта надземной части лабазника вязолистного на 70%-ном спирте этиловом идентифицировали флавоноиды (кемпферол), ароматические кислоты (коричная, хлорогеновая,

кофейная, гентизиновая), кумарины (эскулетин), дубильные вещества гидролизуемой группы, аминокислоты (в т.ч. валин, гистидин) [144].

В ходе исследования методом ВЭЖХ содержания фенольных соединений цветков и листьев четырёх видов рода Лабазник, произрастающих на территории Сибири и Дальнего Востока России, сделан вывод о том, что все исследованные виды лабазника содержат значительное количество флавоноидов (от 5,14% до 10,54%), качественный состав главных компонентов флавоноидного комплекса видоспецифичен. Выявлены особенности накопления отдельных соединений в цветках и листьях в зависимости от вида и органа растения. Сравнительный анализ хроматограмм водно-этанольных экстрактов показал наличие в цветках лабазника вязолистного ((*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) восьми компонентов: авикулярин, спиреозид, гиперозид, астрагалин, изокверцитрин, эллаговая кислота, кверцетин, кемпферол (перечислены в порядке уменьшения содержания). В листьях этого растения 7 компонентов: гиперозид, изокверцитрин, эллаговая кислота, астрагалин, авикулярин, спиреозид, кверцетин. В листьях не обнаружен кемпферол. Ни в цветках, ни в листьях не обнаружено наличие рутина [136].

Некоторые химические соединения, обнаруженные в сырье лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного, представлены в таблице 1 Приложения 1.

1.5. Фармакологические свойства лекарственных препаратов на основе сырья лабазника и их применение в медицине

Перед медицинской промышленностью и фармацевтической наукой стоит задача обеспечения населения лекарственными средствами отечественного производства. Несмотря на большое количество синтетических лекарственных веществ, препараты растительного происхождения и до настоящего времени не утратили своего значения. Более того, с каждым годом расширяются перспективы их использования в силу

определённых достоинств и традиций. Сотни растений в течение тысячелетий успешно применяются для лечения и профилактики заболеваний человека [5, 7, 25, 27, 29, 35, 48, 67, 69, 73, 84, 121, 161, 162].

Растения рода Лабазник используются в народной медицине уже не одну сотню лет и в разных формах. Благодаря присутствию аскорбиновой кислоты растение обладает иммуномодулирующим и общеукрепляющим действием. В цветках растения содержится антикоагулянт гепарин, поэтому лабазник рекомендуют употреблять при варикозном расширении вен, тромбофлебите. Наличие салицилатов объясняет противовоспалительную активность, поэтому отвар с успехом применяют при сильных болях воспалительного характера в желудке (иногда добавляют крапиву и зверобой в равных количествах) [96]. Как наружное средство отвар травы и препараты из корневища лабазника вязолистного (отвар, иногда сгущенный) употребляются для лечения различных кожных заболеваний, для промывания гноящихся ран, как примочка от язв, фурункулов и чирьев, для спринцевания при болях, для клизм при упорных поносах [49].

Порошком из цветков засыпают раны и ожоги. Порошок используют при опрелости ног и экземах. Иногда применяют мазь из порошка корня лабазника. При укусах змеи или бешеной собаки к пораженному месту прикладывают свежерезанный (лучше истолченный) корень растения. Корень является более активным средством, чем трава [49, 96].

Настой из цветков лабазника благодаря наличию дубильных веществ – замечательное вяжущее средство, популярное для лечения расстройства желудка. Народная медицина отвар корней использует против геморроя, а отвар травы как мочегонное и потогонное средство [83].

Настой цветущих верхушек лабазника применяют при грыже, удушье, нервных расстройствах, бессоннице, малокровии. Настой верхушек стеблей с листьями и цветками лабазника применяют при подагре, ревматизме, болях в желудке, как мочегонное, как потогонное, при болезнях сердца, удушье, головной боли, поносах, при дизентерии, при истерических судорогах, болях

в желудке и кишечнике, в груди, в горле и как антитоксическое средство при укусах змей [105, 125]. Отвар соцветий и корней пьют при гипертонии, заболеваниях нервной системы [8, 66]. Экспериментально установлено, что препараты таволги снижают кровяное давление на 40% в течение 20 минут. Отвар из цветков применяют при нефрите, цистите, геморрое, бронхиальной астме и как желчегонное средство.

Все виды лабазника применяют при злокачественных опухолях [158, 177].

В Европе это растение издавна применяли как противоглистное средство, при проказе, поносе, судорогах и женских болезнях, как жаропонижающее и противовоспалительное при простуде. После появления синтетического аспирина его значение в фитотерапии упало, но в последние годы интерес возрос вновь. В связи с содержанием салицилатов, лабазник применяют при подагре и артрите, как противовоспалительное и бактерицидное средство при воспалениях мочевого пузыря и уретритах. Как мочегонное используют при заболеваниях почек. Цветки и траву лабазника используют при заболеваниях верхних дыхательных путей, как потогонное, при бронхиальной астме, как спазмолитическое средство. Они обладают седативным действием, их назначают при гипертонической болезни, эпилепсии, неврастении, ипохондрии и других неврозах, как снотворное [164, 166, 167, 168, 169, 170, 171].

В Российской Федерации трава лабазника вязолистного выпускается в качестве биологически активной добавки к пище.

Цветки лабазника вязолистного являются фармакопейным сырьем в РФ (ВФС 42-1777-87) и разрешены к применению в официальной медицине в форме отваров и горячих настоев в качестве противовоспалительного, вяжущего и ранозаживляющего средства для лечения воспалительно-деструктивных заболеваний кожи и слизистых [31]. Они применяются в форме настоя (1:20, 1:50 и 1:100), который оказывает противовоспалительное, кровоостанавливающее, вяжущее и

ранозаживляющее действие, в виде полосканий, ванночек и повязок [91]. Настой рекомендуют при лечении заболеваний полости рта, при экземах конечностей, трофических язвах, геморрое, зудящих дерматозах, пролежнях, потертости, опрелости [87, 91].

Сырьевая часть корневище и корень, а также цветки лабазника шестилепестного внесены в государственный реестр РФ 2004, 2008 г. [71].

Корневище с корнями лабазника шестилепестного используют для приготовления сбора по прописи М.Н. Здренко, применяемого при папилломатозе мочевого пузыря, анацидном гастрите и язвенной болезни желудка. Настой применяется как кровоостанавливающее (при геморрое), вяжущее и мочегонное средство [49, 83, 87].

Лабазник или таволга – это лекарственное растение, которое сумело найти свое широкое применение не только в традиционной медицине, но и в гомеопатии. Существует гомеопатический препарат *Spiraea ulmaria*, который изготовлен из корневищ растения. Препарат принято считать прекрасным средством в борьбе не только с хроническим, но и еще с острым суставным ревматизмом. С его помощью осуществляют терапию и такого заболевания как ишиас. Выпускается медикамент в форме настойки. В гомеопатии таволгу используют и в случае таких заболеваний как водянка и подагра. Используется растение как внутрь, так и наружно, но назначается крайне осторожно и в минимальных дозах, поскольку препараты, в состав которых входит таволга, являются достаточно сильными. В случае их очень длительного применения либо использования в больших дозировках может развиваться какая-либо патология желудочно-кишечного тракта. Помимо этого, нерациональное использование таволги может вызвать тошноту и рвоту.

В настоящее время имеются данные о предложении мягкой лекарственной формы на основе экстракта из цветков лабазника вязолистного на 70% спирте этиловом. В качестве оптимальной основы для геля выбран карбопол-940 [51, 52]. Авторами проведена валидация методики

количественного определения суммы флавоноидов в геле с экстрактом цветков лабазника вязолистного [118].

Предложена технология производства таблеток из экстракта надземной части лабазника вязолистного (1:1) на 70% спирте этиловом, рекомендуемых в качестве ноотропного, адаптогенного средства [147, 172, 173].

Несмотря на то, что химический состав наземной части (трава и цветки) растений рода лабазник изучен достаточно хорошо, на фармацевтическом рынке РФ нет лекарственных препаратов на основе сырья лабазника. Однако, отечественными и зарубежными авторами продолжается изучение фармакологического действия сырья лабазника с выявлением дальнейших перспективных направлений по созданию новых лекарственных форм. Например, в настоящее время идет обширное изучение антиоксидантной активности водно-спиртовых вытяжек из растений рода лабазник [2, 14, 76, 139, 163, 178]. Выявлено, что наибольшую АОО проявляют экстракты 70% и 95% спирте этиловом из травы лабазника вязолистного. Основной вклад в антиокислительную активность лабазника вносят флавонолгликозиды и фенолокислоты, при этом наиболее активны изокверцитрин и спиреозид [2, 3, 72, 140, 144]. Имеются данные о проведении сравнительных исследований водно-спиртовых извлечений из сырья (цветков, листьев, корневищ и стеблей) 4-х видов лабазника: вязолистного, обыкновенного, камчатского и дланевидного. АОО проявляется в следующей последовательности: цветки < листья < корневища < стебли [9, 10, 142, 154].

Показано, что высокой ноотропной активностью обладает экстракт на 70% ном спирте этиловом из травы лабазника вязолистного [4, 119, 141, 143, 148, 150]. Сравнение экстрактов на 70% ном спирте этиловом из надземной части и цветков лабазника вязолистного, показало, что экстракт цветков уступает по активности экстракту надземной части [148]. Отмечены высокая ноотропная активность этилацетатной фракции и адаптогенные свойства

хлороформной фракции экстракта надземной части лабазника вязолистного на 70% ном спирте этиловом [141].

Обнаружена высокая ноотропная активность этилацетатной фракции из водного экстракта надземной части и экстракта на 40% ном спирте этиловом надземной части лабазника шестилепестного [150, 174, 176]. Известно противотревожное действие водной и водно-спиртовой (95%-ный этанол) вытяжки из надземной части лабазника шестилепестного [124].

Противоопухолевая активность выявлена у водного и водно-спиртового экстракта из подземной части лабазника шестилепестного и отвара цветков лабазника вязолистного [19].

Гепатопротекторная активность выявлена у экстракта надземной части лабазника вязолистного на 70% этаноле и его этилацетатной фракции [101, 145, 159].

Определена антигипоксическая активность спиртовых экстрактов из надземной части лабазника вязолистного. Выявлено, что спиртовой экстракт из надземной части увеличивает продолжительность жизни мышей в условиях гипоксии различного генеза [6].

Антимикробная активность водных экстрактов из соцветий лабазника вязолистного выявлена в отношении штамма *Bacillus polymixa*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* [12, 15, 160].

Изучались особенности влияния водных экстрактов лабазника вязолистного на тонус гладких мышц тонкой кишки крыс. Водное извлечение из цветков (1:10) вызывает резкое падение тонуса и полное угнетение перистальтики, но не препятствует спазмогенному действию ацетилхолина. А водное извлечение из листьев лабазника вязолистного (1:10), вызывает лишь резкое снижение тонуса кишки и перистальтики [103].

Имеются данные об иммуностимулирующей активности надземной части, гепатопротекторной и противоаллергической активности соцветий лабазника вязолистного [19, 145].

1.6. Стандартизация сырья лабазника

Цветки лабазника вязолистного являются фармакопейным сырьем в РФ (ВФС 42-1777-87). ВФС рекомендует оценивать цветки лабазника по количественному содержанию флавоноидов (не менее 2%) в пересчете на гликозиды кверцетина (спиреозид) (дифференциальная спектрофотометрия). ВФС на цветки лабазника также содержит раздел «Микроскопии», однако он не полон, есть некоторые неточности, не позволяющие оценить в полной мере принадлежность цветков лабазника к виду *F. ulmaria* [31, 91].

Сырьевая часть корневище и корень, а также цветки лабазника шестилепестного внесены в государственный реестр РФ 2004, 2008 г [71].

Лабазник вязолистный входит в состав лекарственных растений Британской фармакопеи (2008). Сырьевая часть – цветы (верхняя часть травы) упоминается в Европейской фармакопее VI издания, Немецкой фармакопее 2008 года издания, Британской травяной фармакопее (1991, 1996), Французской фармакопее X издания в разделе статей - монографий. Цветки лабазника вязолистного свежие включены во Французскую Гомеопатическую фармакопею, цветы и трава лабазника вязолистного включены в Немецкую Гомеопатическую фармакопею. В Государственную фармакопею Республики Беларусь включены лабазника вязолистного трава и лабазника вязолистного цветки. Что касается зарубежного опыта, то необходимо отметить, что более всего проработан вопрос по стандартизации травы лабазника вязолистного. В Европейской Фармакопее подробно изложен раздел «Внешние признаки» и «Микроскопия» [157].

В ГФ Республики Беларусь для определения подлинности сырья лабазника вязолистного описаны внешние признаки, микроскопия, числовые показатели. Качественный анализ травы дополнен методикой определения наличия салицилового альдегида и метилсалицилата в эфирном масле травы с использованием ТСХ на пластинках со слоем силикагеля в присутствии растворов сравнения (подвижная фаза: гексан-толуол в соотношении 50:50 по объёму). Количественный анализ ориентирован на определение

содержания эфирного масла в траве, а в цветках – на определение суммы флавоноидов по оптической плотности экстракта на 96%-ном спирте, в пересчёте на гликозиды кверцетина (спиреозид) [42].

Позже в Витебском ГМУ разработана методика идентификации и количественного определения флавоноидов в соцветиях лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* L.) методом жидкостной хроматографии. Для экстракции использовали 40%-ный спирт этиловый. Определение флавоноидов проводили на обращено-фазовой колонке (Zorbax SB C-18 250x4,6 мм, 5мкм) в изократическом режиме элюирования ПФ (0,01М KH_2PO_4 pH=3,0 и ацетонитрил в соотношении 80:20 по объему), температура колонки 30°C. По мнению авторов, это более простая и экспрессная методика, позволяющая сократить время пробоподготовки в 2,5 раза и провести более полное извлечение действующих веществ из растительного сырья (примерно в 1,3-1,5 раза) по сравнению с методикой, которая рекомендована ГФ Республики Беларусь [99].

Однако следует отметить, что в настоящее время и в РФ отмечается интерес к изучению и стандартизации сырья лабазника вязолистного.

Томскими учеными для стандартизации травы лабазника вязолистного предложен спектроскопический метод количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин. Содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин в траве растения должно составлять от 2,78% до 4,89%. Предложены нормы числовых показателей для данного растения [21, 146, 149, 175]. Представлен раздел «Микроскопия» для травы лабазника вязолистного, который позволяет установить подлинность данного сырья [1, 58, 78, 85, 120].

Казанские исследователи предложили стандартизировать цветки лабазника вязолистного по содержанию суммы водорастворимых окисляемых веществ, переходящих в настои. Количественное определение суммы водорастворимых окисляемых веществ предложили проводить по результатам титрования раствором калия перманганата (0,02 моль/л) в

присутствии индигосульфокислоты до золотисто-жёлтого окрашивания. Метрологические характеристики разработанной методики свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости методики [131].

Таким образом, в литературе представлены разные методы идентификации растений рода Лабазник. Они ориентированы на направленность использования сырья. От направления дальнейшего использования сырья зависит и метод экстракции, и выбор экстрагента, и методы качественного и количественного анализа. При рассмотрении в качестве основных действующих веществ флавоноидов, количественный анализ ориентирован либо на спектроскопическое определение суммы флавоноидов с пересчётом на ГСО кверцетина или его гликозида - спиреозида, либо на метод ВЭЖХ. Продолжаются исследования растений рода Лабазник, разработка методов качественного и количественного определения компонентного состава и действующих веществ.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Проведенный анализ литературных данных выявил высокий интерес исследователей разных стран к растениям рода лабазник. Несомненным достоинством этих растений является многообразие биологически активных веществ, которые содержатся во всех органах растений и обеспечивают множество фармакологических эффектов, значительная часть которых обусловлена высоким содержанием флавоноидных соединений.

2. Из более 20 видов растений рода *Filipendula* (сем. *Rosaceae*) лишь два – лабазник вязолистный (*F. ulmaria*) и лабазник шестилепестный (*F. hexapetala*) официально разрешены к применению в качестве лекарственных в РФ и наиболее встречаемы на территории Самарской области. Это подтверждает целесообразность исследования этих двух видов лабазника.

3. Выявленный состав БАВ разнообразен, но в основном представлен фенольными соединениями разных групп. Есть флавоноиды, гликозиды, сапонины, кумарины, каротиноиды, углеводы, тритерпеновые соединения, алкалоиды, витамины, аминокислоты, высшие жирные кислоты, дубильные вещества, эфирные масла, минеральные элементы, но качественный состав видоспецифичен и зависит от места произрастания лабазника.

4. Химический состав листьев, цветков, травы, корней и корневищ растений исследован довольно тщательно, но вопрос остаётся дискуссионным. В литературе не представлены результаты изучения химического состава плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного.

5. Особое внимание учёных привлекает лабазник вязолистный. Наземная часть этого растения включена в иностранные фармакопеи, однако на территории РФ имеется лишь ВФС на цветки лабазника вязолистного. Приведенные в литературе методики качественного и количественного анализа сырья различны, преимущества каждой из них требуют дальнейшего

обсуждения и уточнения. Отсутствует нормативная документация на сырье плодов лабазника.

Разработка нормативной документации на новый вид ЛРС «Лабазника вязолистного плоды» позволит применять всю доступную надземную часть данного растения с целью комплексного использования природных ресурсов и создания новых отечественных лекарственных препаратов с широким спектром фармакологической активности.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования служили образцы сырья - трава, цветки, плоды, корни и корневища лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного, собранные и заготовленные в период с 2016 по 2018 гг. на территории Самарской области, и препараты, изготовленные на их основе.

Индивидуальные вещества: рутин, кверцетин, кемпферол, β -ситостерин, олеаноловая кислота, салициловая кислота.

Растворители: спирт этиловый, хлороформ марки ч.д.а.

Экспериментальные данные диссертационного исследования 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, весы ВЛТ-150-П.
2. Набор сит с размером отверстий 0,2 мм; 0,5 мм; 1 мм; 2 мм; 3 мм.
3. Набор ареометров общего назначения ИСП.АІ.
4. рН-метр «МР-225».
5. Магнитная мешалка с регулируемым подогревом «ММЗМ 9619».
6. Термостат суховоздушный «ТС-1/80».
7. Хроматографическая бумага FN-11, FN-15.
8. Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ».
9. Хроматографические системы (смеси растворителей в различных соотношениях: хлороформ-спирт этиловый, хлороформ - спирт этиловый-вода, спирт *n*-бутиловый-кислота уксусная-вода).
10. Цифровые микроскопы марки Motic: DM-1802 и DM-39C-N9GO-A.
11. Цифровой люминесцентный микроскоп «Альтами ЛЮМ-2».
12. Спектрофотометр «Specord 40» (Analytik Jena, Германия).
13. Спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ Спектр, РФ).

14. Спектрометр «Bruker AM-300», используемый при проведении ЯМР-спектроскопии.
15. Масс-спектрометр «Kratos MS-30».
16. Камера для вертикального электрофореза VE-10 (компания «Хеликон».
17. Столик Кофлера для определения температуры плавления.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы морфолого-анатомического анализа

В работе использовали воздушно-сухие плоды лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. Сушку сырья проводили естественным путем под навесами без дополнительного нагрева. Высушенное сырье подвергали классической пробоподготовке в соответствии с требованиями ГФ СССР XI издания и ГФ РФ XIV издания [37, 38, 39, 40, 47].

Морфолого-анатомические особенности растительного сырья изучали методом световой микроскопии. Исследование микропрепаратов проводили в проходящем и отражённом свете с помощью цифровых микроскопов марки «Motic» DM-1802 и DM-39-N9GO при кратности увеличения x40, x100, x400. Люминесцентную микроскопию проводили световым люминесцентным микроскопом «Альтами ЛЮМ-2» (Россия) с использованием люминесцентных фильтров В (420-486 нм) и G (460-550 нм) диаметром 32 мм. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа НВО 100 Вт.

Гистохимические реакции, позволяющие установить наличие определённой группы действующих или сопутствующих веществ, и подготовку микропрепаратов проводили в соответствии с указаниями общей фармакопейной методики [17, 38, 39, 40].

Размеры исследуемых объектов определяли, используя линейки и программное обеспечение цифрового микроскопа. Цвет объектов оценивали при дневном освещении визуально; запах – при разламывании фрагментов сырья; вкус – пробуя водное извлечение измельченного сырья.

Оболочки клеток, которые подверглись одревеснению, наблюдали при окрашивании 1%-ным раствором сернокислого анилина; оболочки эпидермиса, содержащие кутин, - при окрашивании раствором Судана III (жирорастворимый краситель) и 5%-ным раствором щелочи [38, 40, 87] в соответствии с нижеописанными методиками.

1. Окраска клеточных оболочек, подвергшихся одревеснению и лигнификации. На предметное стекло с исследуемым срезом наносили капли раствора сернокислого анилина, затем покровным стеклом накрывали объект и рассматривали его под микроскопом. Наблюдалась желтая окраска клеточных оболочек, подвергшихся лигнификации [38, 47, 87].

Приготовление раствора сернокислого анилина. 2,0 г сернокислого анилина растворяли в смеси 194 мл спирта этилового 50% и 4 мл ледяной уксусной кислоты [40, 47].

2. Окраска клеточных оболочек эпидермиса, содержащих кутин. Объект исследования помещали на предметное стекло. На поверхность среза наносили капли раствора Судана III, затем покровным стеклом накрывали объект и рассматривали его под микроскопом. Наблюдала розоватую окраску клеточных оболочек эпидермиса, содержащих кутин [40, 47].

Приготовление раствора Судана III. 0,01 г Судана III растворяли в 5 мл спирта этилового 95% и добавляли 5 мл очищенного глицерина [40, 47].

2.2.2. Физические методы анализа

Плотность образцов настойки определяли с помощью набора ареометров общего назначения ИСП.АI по методике, описанной в ГФ РФ XIV издания [40].

2.2.3. Химические методы анализа

1. Качественные реакции.

В рамках предварительного фитохимического анализа провели ряд пробирочных реакций на основные группы БАС, наличие которых можно

предположить в извлечениях из сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного.

Цианидиновая реакция (проба Shinoda) – специфическая реакция на флавоноиды. К 1-2 мл исследуемого извлечения добавили 5 капель концентрированной хлороводородной кислоты и 5-10 мг цинка. Наблюдали красно-малиновое окрашивание, которое подтверждает наличие флавилиевых пигментов [87].

Цианидиновая реакция с модификацией по Брианту является продолжением пробы Shinoda, проводится при положительной цианидиновой реакции, позволяет отличить гликозиды от агликонов. 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 [87].

Реакция с алюминия (III) хлоридом является специфической для определения флавоноидов. К 1-2 мл исследуемого извлечения добавляли 1-2 мл спиртового 3%-ного раствора алюминия (III) хлорида. Наблюдали появление желтого окрашивания, а также желто-зеленой флуоресценции при $\lambda = 366$ нм. Таким образом подтвердили наличие флавоноидов.

Борно-лимонную реакцию (реакция Вильсона) использовали для определения наличия в исследуемых извлечениях из сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного 5-гидроксифлавонов и 5-гидроксифлавонолов. К 1-2 мл исследуемого извлечения добавили 1-2 капли раствора борной кислоты и 1 каплю раствора щавелевой кислоты. В результате образования батохромного комплекса наблюдали ярко-желтое окрашивание с желто-зеленой флуоресценцией. Устойчивость при добавлении щавелевой (реактив Таубека) или лимонной (реактив Вильсона) кислоты свидетельствует о присутствии свободной фенольной 5-ОН-группы.

Раствор аммиака в присутствии флавонов, флаванонов, флавонолов и флаванололов образуют комплекс, окрашенный в жёлтый цвет.

При нагревании наблюдали переход окраски из жёлтого в оранжево-красный цвет. При реакции с парами аммиака наблюдали жёлто-зеленую флуоресценцию 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 из сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного добавили 1-2 капли раствора ДСК. Наблюдали жёлтое 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 3',4',5' - ОН-группы).

Реакция Сальковского является реакцией, характерной для сапонинов. Сухой остаток растирали с небольшим количеством хлороформа и добавляли концентрированную серную кислоту. При этом развивалась окраска от желтой до красной [87].

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. Кислотный гидролиз.

10 мг вещества нагревают с 3 мл 2% раствора хлористоводородной кислоты на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Полноту гидролизу проверяют методом ТСХ. Из охлажденной смеси отфильтровывают

кристаллы агликона через взвешенный стеклянный фильтр, а в случае некристаллического агликона его извлекают хлороформом из кислотного гидролизата. Водный раствор упаривают в вакууме, затем используют для идентификации углеводов методом бумажной хроматографии (БХ) по сравнению со стандартами [37, 87].

2.2.4. Хроматографические методы анализа

1. Тонкослойная хроматография (ТСХ).

Методом ТСХ [28, 40, 70, 87, 115, 132] исследовали водные и водно-спиртовые извлечения из надземной и подземной частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного, настойки лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного, густой экстракт из плодов лабазника вязолистного и фракции, полученные при разделении экстрактивных веществ плодов лабазника вязолистного методом колоночной хроматографии.

При проведении хроматографического метода использовали хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» и «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». В результате исследований были апробированы системы растворителей: 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 растворителей в течение 24 ч. Исследование проводили при комнатной температуре.

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

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

Приготовление щелочного раствора диазобензолсульфокислоты: 0,01г диазобензолсульфокислоты растворяли в 10 мл 10%-ного раствора натрия карбоната. Раствор использовали свежеприготовленным (для выявления фенольных соединений) [68].

Приготовление раствора кислоты фосфорномолибденовой: 1,0 г кислоты фосфорномолибденовой растворяли в 10 мл 95 %-ного спирта. Раствор использовали свежеприготовленным [68].

Приготовление раствора кислоты фосфорновольфрамовой: 2,0 г кислоты фосфорновольфрамовой растворяли в 10 мл воды очищенной. Раствор использовали свежеприготовленным (для выявления тритерпеновых сапонинов) [68].

Приготовление раствора кислоты серной:

20 мл кислоты серной смешивали с достаточным количеством воды очищенной (50-70 мл), охлаждали до комнатной температуры и доводили водой до 100 мл (для выявления тритерпеновых сапонинов) [68].

2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография.

Методом адсорбционной жидкостной хроматографии [50, 87, 114] исследовали химический состав водно-спиртового извлечения из плодов лабазника вязолистного. В качестве сорбента использовали силикагель марки L 40/100 мкм и L 100/250 мкм (Чехия), сефадекс LH-20 (Швеция). В качестве элюентов использовали хлороформ, спирт этиловый 96%, спирто-хлороформные смеси в различных соотношениях, воду очищенную.

Получили фракции, содержащие отдельные БАС плодов лабазника вязолистного.

Для очистки индивидуальных соединений использовали полиамид для колоночной хроматографии (производитель *Woelm Pharma*, Германия), а также силикагель марки, указанной выше.

3. Бумажная хроматография.

Бумажную хроматографию (БХ) [87] сахаров и других компонентов осуществляли на бумаге FN-11, FN-15 в нисходящем токе растворителей.

Использовали системы растворителей: спирт *n*-бутиловый-кислота уксусная-вода очищенная в соотношении 4:1:2.

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

2.2.5. Физико-химические методы анализа

1. Спектрофотометрия.

Метод спектрофотометрического определения [40, 87, 88, 114] применяли для установления содержания суммы флавоноидов в извлечениях и препаратах лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного, а также для анализа индивидуальных веществ, выделенных из плодов лабазника вязолистного. Исследования проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 500 нм. В качестве раствора сравнения использовали этиловый спирт 96%. Обработку результатов, полученных в ходе эксперимента, осуществляли при помощи программного обеспечения «WinAspect Excel».

2. ¹H-ЯМР-спектроскопия.

Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) отражает взаимодействие с магнитным полем магнитного момента ядра [28, 39]. Явление основано на эффекте Зеемана, заключающемся в расщеплении спектральных линий или уровней в магнитном поле на отдельные компоненты. Метод ЯМР позволяет получить в радиоволновой области спектра информацию о тонкой структуре органических и биологических соединений. По табличным значениям резонансных сдвигов или по данным предварительной калибровки в исследуемой молекуле устанавливали наличие определенных атомных группировок (информация о структуре), а по интегральной интенсивности сигналов (площади пиков) определяли число ядер. ^1H -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре «Bruker AM 300» (300 мГц).

3. Масс-спектральный анализ.

Масс-спектрометрия в настоящее время является одним из наиболее информативных, чувствительных и надежных аналитических методов. Существенное отличие от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что она сочетает в себе и метод разделения и метод определения. Метод применяется для анализа твердых, жидких или газообразных проб, характеризуется высокой универсальностью, даёт возможность одновременного определения нескольких элементов, а также использования в работе небольших навесок. Качественный масс-спектрометрический анализ основан на измерении массы ионов [28, 39].

Регистрацию масс-спектров электронного удара проводили на приборе «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и колебании температурного режима ионного источника от 100 до 250°C.

4. Электрофоретический метод анализа [123].

Исследование проводили в камере для вертикального электрофореза VE-10 (компания «Хеликон»). Исходные растворы для электрофореза готовили по методикам, предложенным для электрофореза в щелочной

системе [128]. Для приготовления геля использовали акриламид и метиленбисакриламид фирмы «Reanal» (Венгрия).

Перед употреблением проводили перекристаллизацию указанных компонентов с целью удаления акриловой кислоты. Заранее приготовленные и хранимые в холодильнике реактивы перед работой выдерживали некоторое время при комнатной температуре. Для электрофореза готовили 7,5 %-ный раствор полиакриламидного геля. Полученный раствор разделяющего геля заливали в кюветы прибора, далее шприцом на поверхность наслаивали холодную воду. Окончание полимеризации фиксировали по образованию хорошо видимой границе раздела между гелем и наслоенной водой. После удаления воды на поверхность мелкопористого геля наслаивали раствор крупнопористого геля, на который осторожно наносили охлаждённый верхний электродный буфер. Фотополимеризацию крупнопористого геля проводили с помощью ультрафиолетовой лампы. Окончание полимеризации крупнопористого концентрирующего геля устанавливали по образованию чётко видимой границы между гелем и наслоенным буферным раствором.

После окончания полимеризации гелей камеры заливали верхним и нижним буферными растворами. В качестве электродного буфера использовали трис-ЭДТА-боратный буфер концентрации 1М с рН 9,2.

Проведение пробоподготовки извлечений.

Высушенное лекарственное сырье получили из собранных образцов свежего растительного сырья. Для получения извлечения из 1,0 г свежего или высушенного лекарственного растительного сырья использовали 10,0 мл фосфатного буферного раствора концентрации 0,06 М (рН 7,2).

Высушенное и измельченное растительное сырье помещали в чашки Петри, инкубировали при комнатной температуре ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), увлажняя водой очищенной в течение 24, 72 и 120 часов.

После инкубации влажное растительное сырье, дезинтегрировали в фарфоровой ступке с 2,0 мл охлажденного до 4°C фосфатного буфера концентрации 0,06 М в течение 5 мин.

Далее дезинтеграт количественно переносили в колбу, добавляли 5,0 мл фосфатного буфера концентрации 0,06 М и тритон Х-100 в конечной концентрации 20 мг/мл. Колбу помещали на магнитную мешалку для солюбилизации фермента на 1 час.

Гомогенат из колбы количественно переносили в центрифужную пробирку, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин.

Полученный супернатант помещали в пробирку с пробкой и хранили в замороженном виде не более 6 суток.

В супернатанте определяли фракционный состав неспецифических неферментативных белков.

Анализируемые образцы супернатанта непосредственно перед началом электрофореза смешивали с 40 %-ным раствором сахарозы в соотношении 2:1 и 0,5 мл полученной смеси наносили на линию старта.

Режим электрофореза подбирали опытным путем в предварительных экспериментах. Первые 30 мин электрофорез проводили при силе тока 5,0 мА/см, затем 10,0 мА/см до окончания электрофореза. О времени окончания процедуры электрофореза судили по положению диска красителя бромфенолового синего.

По окончании электрофореза буферные растворы сливали, гели из кювет извлекали путем введения шприцем очищенной воды между поверхностью геля и стенкой кюветы.

Для установления фракционного состава неферментных белков клеток растений гелевые пластинки после электрофореза погружали в 1% раствор амидо черного в 7 %-ном растворе кислоты уксусной на 10 мин. Избыток красителя удаляли вымачиванием гелевых пластинок в 7 %-ном растворе кислоты уксусной в течение 14 дней.

В качестве маркеров использовали альбумин модифицированный из сыворотки крови с молекулярной массой 66000 – 69000 а.е.м. и инсулонг SP-6500 а.е.м.

Выявление на пластинках геля молекулярных форм малатдегидрогеназы проводили феназинметасульфат-тетразолиевой реакцией в чашках Петри.

В работе использовали оптимизированную инкубационную среду: водные растворы никотинамидадениндинуклеотида (NAD) (1 мг/мл) - 40 мл, нитросинего тетразолиевого (1 мг/мл) - 30 мл, 1 М раствор натрия малата (рН=7,0) - 10 мл, раствор феназинметасульфата (1 мг/мл) - 4 мл, трис-НСl буферный раствор концентрации 0,2 М (рН =7,1) - до 100 мл.

Гелевые пластины инкубировали 12 ч при 37°C. Молекулярные формы МДГ наблюдали в виде темно-синих полос.

Определение относительной электрофоретической подвижности белковых фракций проводили с помощью компьютерной программы ТСХ-Менеджер 3.12.

2.2.6. Технологические методы анализа

Настойки из надземных органов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного получали с использованием методов дробной мацерации и перколяции. Извлечения получали на 40%-ном и 70%-ном спирте этиловом в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:5 [26, 40].

Получение настойки (1:5) из надземных органов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного методом дробной мацерации [40]:

День 1. В три термостойкие колбы загружали по 1 части сырья лабазника вязолистного или лабазника шестилепестного, измельченных до размера частиц 2 мм. В колбу 1 добавляли 8 объемов спирта соответствующей концентрации в колбу 2–3 объема экстрагента соответствующей концентрации для намачивания. Колбы закрывали, оставляли на 24 часа.

День 2. Полученное извлечение из колбы 1 переливали в колбу 2. После этого в первую колбу наливали 5 объемов спирта этилового 40% или

70%. В колбу 3 добавляли 3 объема экстрагента соответствующей концентрации на намачивание. Колбы закрывали, оставляли на 24 часа.

День 3. Извлечение из колбы 2 переливали в колбу 3, извлечение из колбы 1 – во вторую. В колбу 1 заливали 5 объемов 40% или 70% этилового спирта. Колбы закрывали, оставляли на 24 часа.

День 4. Продукт из колбы 3 собирали в приемник, а затем в эту же колбу переносили извлечение из колбы 2. Содержимое колбы 1 тридцать минут нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником, после чего охлаждали и переносили полученное извлечение в колбу 2. Колбы 2 и 3 закрывали и оставляли на 24 часа. Колбу 1 разгружали.

День 5. Продукт из колбы 3 собирали в приемник. Содержимое колбы 2 тридцать минут нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником, после чего охлаждали и переносили полученное извлечение в колбу 3. Третью колбу укупоривали и оставляли на 24 часа. Колбу 2 разгружали.

День 6. Извлечение из колбы 3 тридцать минут нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником, после чего охлаждали и переносили полученный продукт в приемник. Разгружали колбу 3.

Готовое извлечение перемешивали и выдерживали при температуре не выше 10°C 48 часов для отстаивания. Затем выпавший осадок отфильтровывали, готовый продукт фасовали во флаконы темного стекла. Оформляли этикетку для флаконов.

Получение настойки (1:5) из наземных органов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного методом перколяции [26, 40]:

Из 200,0 г наземной части лабазника вязолистного или лабазника шестилепестного было получено 1000 мл настойки. Извлечение получали по описанной ниже схеме.

200,0 г наземной части лабазника вязолистного или лабазника шестилепестного, измельченных до размера частиц 2 мм помещали в банку и заливали 600 мл спирта этилового 40% или 70% для намачивания и

набухания сырья. Настаивали 3 часа. Набухшее сырье загружали в перколятор и до «зеркала» заливали спиртом этиловым необходимой концентрации. Оставляли для настаивания на 24 часа. После этого перколировали спиртом этиловым 40% или 70%. Скорость перколяции составляла около 1/24 рабочего объема перколятора в час (25-30 кап./мин.). При этом в перколятор непрерывно с той же скоростью подавали чистый экстрагент. Перколировали до получения 5 объемов настойки из 1 весовой части сырья. Отработанное сырье из перколятора разгружали.

Извлечение выдерживали для отстаивания при температуре 8-10°C в течение 48 часов для отстаивания. Готовый продукт фильтровали во флаконы темного стекла, оформляли этикетку.

Водные извлечения из сырья лабазника получали в форме настоя (1:10) из надземных частей растения и в форме отвара (1:10) из плодов.

Приготовление настоя (1:10) из надземных частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного [40]:

Измельченное растительное сырье с размером частиц 2 мм в количестве 5,0 г помещали в фарфоровую инфундирку, заранее прогретую на водяной бане в течение 15 минут, заливали водой очищенной комнатной температуры в количестве с учетом коэффициента водопоглощения (КВП равного 2 мл/г). Закрывали крышкой и настаивали на кипящей водяной бане 15 минут, периодически помешивая. После снятия с водяной бани извлечение настаивали при комнатной температуре в течение 45 минут, после чего фильтровали, отжимая лекарственное растительное сырье. Измеряли объем охлажденного извлечения, доводили водой очищенной до 50 мл.

Приготовление отвара (1:10) из плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного [40]:

Измельченное растительное сырье с размером частиц 2 мм в количестве 5,0 г помещали в фарфоровую инфундирку, заранее прогретую на водяной бане в течение 15 минут, заливали водой очищенной комнатной

температуры в количестве с учетом коэффициента водопоглощения (КВП равного 3 мл/г). Закрывали крышкой и настаивали на кипящей водяной бане 30 минут, периодически помешивая. После снятия с водяной бани извлечение настаивали при комнатной температуре в течение 10 минут, после чего фильтровали, отжимая лекарственное растительное сырье. Измеряли объем охлажденного извлечения, доводили водой очищенной до 50 мл.

Для определения оптимального способа получения густого экстракта из плодов лабазника вязолистного, использовали следующие методы: перколяция, реперколяция и реперколяция с нагреванием. Все образцы первичной вытяжки были получены в лабораторных условиях на основе 70% спирта этилового [40].

Приготовление первичной вытяжки для получения густого экстракта из плодов лабазника вязолистного методом реперколяции [40]:

День 1. В 3 термостойкие колбы помещали по одной части плодов лабазника вязолистного. В 1-ю колбу добавляли три объема 70% спирта этилового, во 2-ю колбу добавляли два объема 70% спирта этилового для смачивания сырья. Колбы плотно укупоривали и оставляли на 24 часа.

День 2. Из 1-й колбы полученное извлечение переливали во 2-ю колбу. В 1-ю колбу добавляли один объем 70% спирта этилового, в 3-ю колбу добавляли два объема 70% спирта этилового на смачивание. Колбы плотно укупоривали и оставляли на 24 часа.

День 3. Из 2-й колбы полученное извлечение переливали в 3-ю колбу, а извлечение из 1-й колбы – во 2-ю. В 1-ю колбу добавляли один объем 70% спирта этилового. Укупоривали колбу и оставляли на сутки.

День 4. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник, из 2-й колбы извлечение переносили в 3-ю колбу. Извлечение из 1-й колбы переносили во 2-ю колбу. 2-ю колбу и 3-ю колбу укупоривали и оставляли на 24 часа. Разгружали 1-ю колбу.

День 5. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник. Извлечение из 2-й колбы переносили в 3-ю колбу. 3-ю колбу укупоривали и оставляли на 24 часа. Разгружали 2-ю колбу.

День 6. Извлечение из 3-й колбы собирали в приемник. Разгружали 3-ю колбу. Перемешав суммарное извлечение, оставляли на 48 часов при температурном режиме не выше 10⁰С для отстаивания.

По истечению 48 часов извлечение отфильтровывали от осадка, передавали на выпаривание.

Приготовление первичной вытяжки для получения густого экстракта из плодов лабазника вязолистного методом реперколяции с нагреванием [40]:

День 1. В 3 термостойкие колбы помещали по одной части плодов лабазника вязолистного. В 1-ю колбу добавляли три объема 70% спирта этилового, во 2-ю колбу добавляли два объема 70% спирта этилового для смачивания сырья. Колбы плотно укупоривали и оставляли на 24 часа.

День 2. Из 1-й колбы полученное извлечение переливали во 2-ю колбу. В 1-ю колбу добавляли один объем 70% спирта этилового. В 3-ю колбу добавляли два объема спирта этилового 70% на смачивание сырья. Колбы плотно укупоривали, оставляли на 24 часа.

День 3. Из 2-й колбы полученное извлечение переливали в 3-ю колбу, а извлечение из 1-й колбы переливали во 2-ю колбу. В 1-ю колбу добавляли один объем спирта этилового 70%. Укупоривали колбу и оставляли на 24 часа.

День 4. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник, из 2-й колбы извлечение переносили в 3-ю колбу. Содержание 1-й колбы нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане с обратным холодильником, затем остужали извлечение до комнатной температуры и переносили извлечение во 2-ю колбу. 2-ю и 3-ю колбу плотно укупоривали и оставляли на 24 часа. Разгружали 1-ю колбу.

День 5. Из 3-й колбы извлечение собирали в приемник. Содержимое 2-й колбы нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане с обратным

холодильником, затем остужали при комнатной температуре и переносили извлечение в 3-ю колбу. Укупоривали 3-ю колбу и оставляли на сутки. Разгружали 2-ю колбу.

День 6. Содержимое 3-й колбы нагревали в течение 30 минут на кипящей водяной бане с обратным холодильником, затем остужали до комнатной температуры и переносили извлечение в приемник. Разгружали 3-ю колбу. Перемешав суммарное извлечение, оставляли на 48 часов при температурном режиме не выше 10°C для отстаивания.

По истечению 48 часов извлечение отфильтровывали от осадка, передавали на выпаривание.

Приготовление первичной вытяжки для получения густого экстракта из плодов лабазника вязолистного методом перколяции [40]:

Извлечение получали по описанной ниже схеме.

500,0 г плодов лабазника вязолистного, измельченных до размера частиц 2 мм, заливали 200 мл 70% спирта этилового для намачивания и набухания сырья. Оставляли на 4 часа. В перколятор загружали набухшее сырье и до «зеркала» заливали 70% спиртом этиловым. Оставляли для настаивания на 24 часа. После этого перколировали. Скорость перколяции составляла около $1/24$ рабочего объема перколятора в час. При этом в перколятор непрерывно с той же скоростью подавали чистый экстрагент. Перколировали до истощения сырья, что определяли по обесцвечиванию извлечения. Отработанное сырье из перколятора разгружали.

Первичную вытяжку оставляли при температуре не выше 10°C на 48 часов для отстаивания, затем фильтровали и передавали на выпаривание.

Полученное всеми способами очищенные извлечения упаривали под вакуумом для отгонки экстрагента на роторном испарителе модели «ИР-1М» для получения густого экстракта из плодов лабазника вязолистного с влажностью не более 25%.

2.2.7. Фармакологические методы анализа

Фармакологические исследования провели на кафедре фармакологии им. з.д.н. РФ А.А. Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Исследования проводили с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента или в научных целях (Страсбург, 1991).

1. Изучение острой токсичности.

Опыты по изучению острой токсичности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного провели на 20 белых беспородных крысах обоего пола массой 200-250 г. Животных содержали в виварии при свободном доступе к воде на обычном рационе. Животные были разделены на 2 группы по 10 крыс в каждой. Первая группа животных (водный контроль) получала однократно внутрижелудочно 3%-ную водную нагрузку. Вторая группа получала густой экстракт из плодов лабазника вязолистного в дозе 15 г/кг веса животного на фоне аналогичной водной нагрузки при помощи специального внутрижелудочного зонда [94, 107].

В первый день исследования острой токсичности густого экстракта лабазника вязолистного белые беспородные крысы находились под непрерывным наблюдением. Общая продолжительность эксперимента составляла 14 дней.

2. Изучение диуретической активности.

Исследования по изучению диуретической активности провели на 120 белых беспородных крысах обоего пола массой 200-250 г. в ходе 8 серий экспериментов. Животных содержали 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 [107].

В день эксперимента животным контрольной группы повторно вводили водную нагрузку, а животным опытной группы – внутрижелудочно лекарственный препарат в идентичном объеме. Исследовали густой экстракт

из плодов лабазника вязолистного (в дозе 50 мг/кг за 4 и 24 ч эксперимента). Животных помещали в обменные клетки на сутки, собирали 4- и 24-часовые порции мочи. 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 [18, 55, 75, 107, 112].

Статистическую обработку полученных данных проводили по критерию Манна-Уитни.

3. Изучение противовоспалительной активности.

Оценку противовоспалительной активности настоек (1:5) на 40%-ном спирте этиловом плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного проводили с использованием модели каррагенинового отёка согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [112]. Исследования проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 180-200 г, которых содержали в условиях вивария на обычном рационе. В каждом эксперименте крыс делили на группы: одна контрольная, одна группа сравнения и четыре опытных. Контрольная группа получала с помощью внутрижелудочного зонда только воду (2% от массы тела). Препаратом сравнения служил классический нестероидный противовоспалительный препарат диклофенак в дозе 8,5 мкг/кг. Введение фитопрепаратов проводили перорально через зонд в дозе 100 мкг/кг [112]. Настойки плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного на 40%-ном спирте этиловом предварительно разбавляли водой очищенной в 2 раза.

4. Изучение антидепрессантной активности.

Изучение антидепрессантной активности проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 200-220 г. с использованием теста «Отчаяния» [112]. В качестве синтетического препарата сравнения использовали амитриптилин в дозе 5 мг/кг. Контролем для исследования действия густого экстракта служила вода очищенная. Исследуемый густой

экстракт вводили однократно внутривентрикулярно через зонд в дозе 50 мг/кг [107] на фоне аналогичной водной нагрузки. Через час после введения препаратов наблюдали в течение 5 минут за поведением животных и фиксировали время активных попыток животных выбраться из воды. Полученные данные обрабатывали статистически по критерию Манна-Уитни.

2.2.8. Микробиологические методы анализа

На базе кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии СамГМУ проводили скрининговый анализ антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья двух видов лабазника. Препаратами сравнения служили 40%-ный и 70%-ный растворы спирта этилового, а также ряд лекарственных субстанций, обладающих антимикробным действием: 5%-ный спиртовой раствор салициловой кислоты (Biochem (Франция), серия 111017), 0,1%-ный раствор левомицетина спиртовой (ОАО «Синтез» (Россия), серия 130917), 0,1%-ный раствор бензилпенициллина (ОАО Биосинтез (Россия), серия 180317) [41].

Определение минимальной ингибирующей концентрации осуществляли с использованием метода двойных серийных разведений в бульоне (микрометод) в соответствии с МУ 4.2.1890-04. Учет результатов осуществляли визуально, сравнивая рост микроорганизма в присутствии препарата с ростом культуры в ячейке без него. За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма [104].

В качестве тестовых культур для определения антимикробной активности образцов настоек использовали следующие микроорганизмы: *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 27853), *Staphylococcus aureus* (штамм 25923), *Escherichia coli* (штамм 25922), *Bacillus cereus* (клинические штаммы),

Candida albicans (клинические штаммы). Штаммы предоставлены музеем микробиологических культур кафедры.

2.2.9. Статистические методы обработки результатов исследования

Математическую обработку данных проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания, а также с использованием компьютерных программ.

Статистическую обработку экспериментальных данных исследований ($P=95\%$) проводили с помощью программы Microsoft Excel, Statistica и критерия Стьюдента с вычислением граничных значений доверительного интервала среднего результата и определением ошибки единичного определения. Отсутствие систематической ошибки разработанных методик подтверждали опытами с добавками [54].

Таким образом, исследования проводили с помощью современных методов исследования лекарственного растительного сырья на современных моделях оборудования.

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНЫХ И ПОДЗЕМНЫХ ЧАСТЕЙ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО И ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО

Оценка подлинности и качества ЛРС посредством морфолого-анатомического анализа является одним из обязательных критериев стандартизации любого вида сырья [20, 40, 91, 133, 138]. Морфолого-анатомический анализ особенно важен для выявления случайных примесей или намеренной фальсификации сырья. В настоящее время на территории РФ отсутствует нормативная документация на плоды лабазника вязолистного, что препятствует разработке отечественных лекарственных препаратов на основе данного вида ЛРС.

В перспективе внедрение плодов лабазника вязолистного в качестве нового лекарственного растительного сырья наряду с цветками и травой создаст потенциальные возможности безотходного и рационального использования сырьевых ресурсов РФ [108]. Однако, очевидно, что внедрение нового вида сырья в практическую фармацию предполагает проведение исследований и разработки нормативной документации (ФС), в том числе и в разделе «Микроскопия» [38, 40, 87].

Многочисленные результаты ранее проведенных экспериментальных исследований показали, что зарубежные и отечественные ученые проявляют большую заинтересованность в поиске анатомо-морфологических, диагностических признаков сырья растений рода лабазник. Однако полной научной информации о гистологии и анатомии плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного в литературе нет [1, 30, 87].

Нами проведен морфолого-анатомический анализ надземной и подземной частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного как перспективных растений с источником биологически активных соединений (БАС), внедрение которых в фармацевтическое производство позволит использовать весь комплекс сырья надземной и подземной частей растений.

3.1. Морфолого-анатомическое исследование надземной части лабазника вязолистного

3.1.1. Морфолого-анатомическое исследование плодов лабазника вязолистного

По морфологическим особенностям **спелые плоды** лабазника вязолистного – это сухие сплюснутые, спирально завернутые вдоль оси многолистовки, расположенные на плодоножках щитковидно-метельчатого соцветия (рис. 4А) [93]. Каждая отдельная нераскрывающаяся односемянная листовка сильно уплощена, при рассмотрении сбоку листовка имеет продолговато-выпуклую форму, с оттянутым носиком на верхушке. На выпуклой стороне листовки имеются вертикальные мелкорассеянные жилки (рис. 4Б) [93].

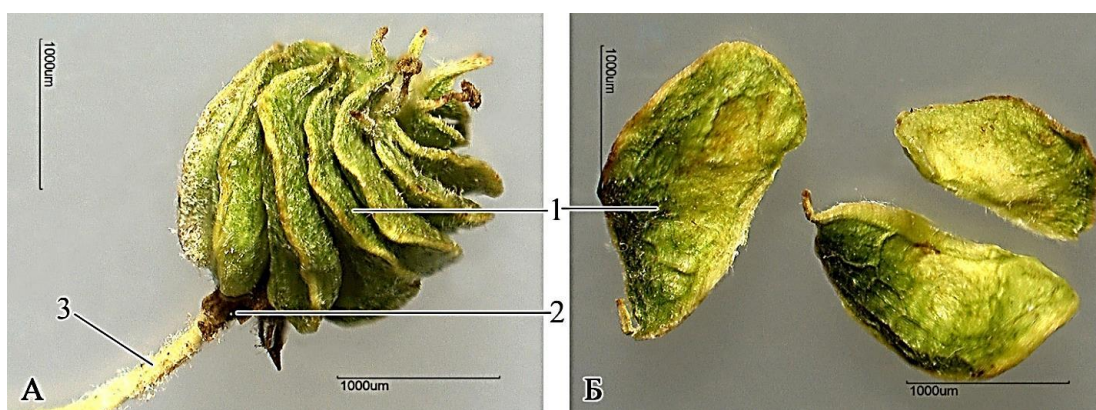


Рисунок 4 – Плод лабазника вязолистного (x20): А – общий вид сухой многолистовки; Б – односемянные листовки плода

Обозначения: 1 – листовка; 2 – остаток околоцветника; 3 – плодоножка

На одной плодоножке насчитывается до 12-ти листовок. В фазу полного созревания плодов, у основания групп листовок, имеются остатки околоцветника, представленные смятыми фрагментами золотисто-желтого по цвету венчика.

Цвет листовок зелено-желтый, светлый; при хранении плоды темнеют до светло-бурого цвета. Запах сухих плодов характерный травянистый, слегка пряный. Вкус слабый специфический.

Анализ анатомического строения поперечных сечений плодоножки позволил выявить её особенности. Анатомически плодоножка переходного типа строения. Очертания поперечного сечения плодоножек округлые, слегка волнистые. Поверхность плодоножек представлено эпидермой (рис. 5). Эпидермальные клетки на поперечном сечении округло-овальной формы, с заметно утолщенными стенками. С поверхности эпидермис слабо кутикулизирован, что диагностируется окрашиванием кутикулы в розовый цвет после обработки 0,5%-ным раствором Судана III (рис. 5Б).

Под слоем эпидермы расположена 3-4 рядная уголково-колленхима. Её клеточные стенки целлюлозные, характерно утолщенные, без выраженных поровых каналов (рис. 5В).

Клетки основной ткани первичной коры значительно крупнее колленхимных, округлой формы, с тонкими клеточными стенками. В толще паренхимы первичной коры локализованы неравномерно расположенные крупные лизигенные вместилища. Оболочки клеток по периферии вместилищ окрашиваются в розовый цвет после обработки 0,5%-ным раствором Судана III (рис. 5Б), что говорит о липофильной природе их секрета. Эндодерму первичной коры от основной паренхимы отличают меньшие размеры клеток с более толстыми клеточными стенками (рис. 5Б).

Центральный цилиндр плодоножки представлен совокупностью разноразмерных открытых коллатеральных пучков, расположенных по кольцу (рис. 5А). Со стороны флоэмной части пучки армированы мощным блоком склеренхимных волокон. Значительно утолщенные клеточные стенки волокон лигнифицированы, что подтверждается характерной реакцией с 10%-ным раствором сернокислого анилина (рис. 5В). Проводящие элементы флоэмы на поперечном сечении мелкоклеточные, их протопласт слабо-пигментирован (рис. 5В).

Ксилема плодоножки выражена слабо, представлена мелкими кольчатыми и спиральными сосудами, расположенными радиальными

рядами (рис. 5В). В пучках, в области первичной ксилемы, локализованы полости рексигенного происхождения (рис. 5Г).

Сердцевина плодоножки крупноклеточная, её клетки с лигнифицированными оболочками разноразмерные (рис. 5Г).

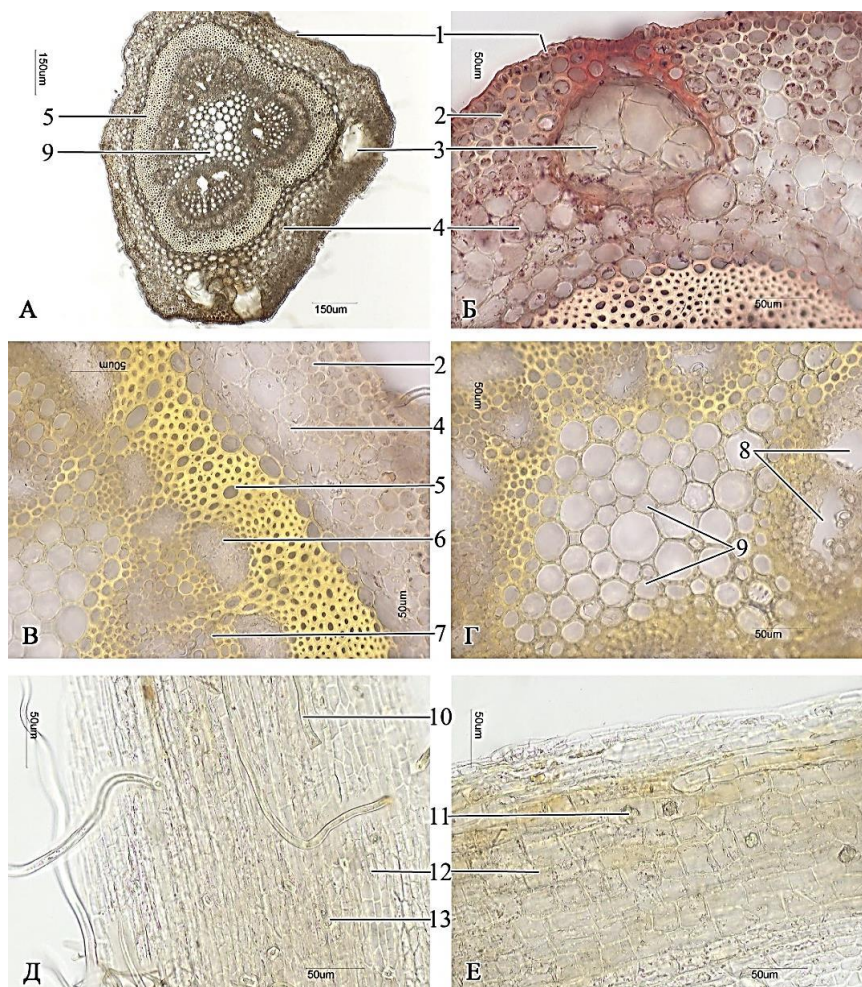


Рисунок 5 – Гистология эпидермиса и поперечных сечений плодоножки плода: А – общий вид до окрашивания (x100); Б – фрагмент поперечного сечения после окраски 0,5 % раствором Судана III (x400); В – фрагмент поперечного сечения после окраски 10%-ным раствором сернокислого анилина (x400); Г – фрагмент паренхимы сердцевины плодоножки (x400), Д – фрагмент эпидермы с волосками (x400), Е – фрагмент эпидермы с включениями (x400)

Обозначения: 1 – эпидерма; 2 – колленхима; 3 – вместилище; 4 – паренхима; 5 – склеренхима; 6 – флоэма; 7 – ксилема, 8 – рексигенная полость; 9 – паренхима сердцевины; 10 – одноклеточный волосок; 11 – друзы оксалата кальция; 12 – клетки эпидермы; 13 – место прикрепления волоска

При анализе особенностей эпидермиса плодоножки с поверхности видны вытянутые клетки, угловатые по форме. В клетках изредка встречаются монокристаллы оксалата кальция (рис. 5Е). Эпидермис плодоножки слабо опушен простыми одноклеточными волосками (рис. 5Д).

Облучение поперечных срезов плодоножки лабазника вязолистного УФ-светом с длиной волны 360 нм обнаруживается, что пробковая ткань люминесцирует светло-голубым цветом, а при свете с длиной волны 420 нм - желтым, что обусловлено наличием в стенках фенольного полимера суберина (рис. 6). Флоэмная ткань светиться неоднородно.

При облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм общий тон свечения - светло-коричневый, однако видны более яркие области флоэмных клеток, люминесцирующих ярко-желтым цветом при облучении светом с длиной волны 420 нм (рис. 6Б, рис. 6В). При облучении ксилемы УФ-светом с длиной волны 360 нм клеточные стенки ярко светятся голубым цветом (рис. 6Б). При облучении ксилемы светом с длиной волны 420 нм наблюдается слабое желто-зеленое свечение (рис. 6В). Характер люминесценции ксилемы обусловлен лигнификацией клеточных стенок, а также наличием вторичных метаболитов фенольной природы (рис. 6).

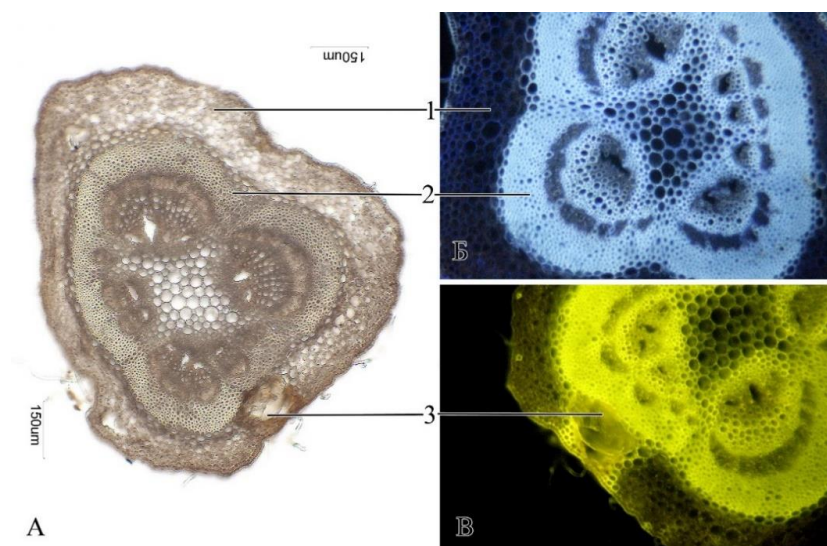


Рисунок 6 – Строение плодоножки лабазника вязолистного на поперечном срезе: А – видимая область (x100); Б – фрагмент в УФ-свете с $\lambda=360$ нм;

В – фрагмент в УФ-свете с $\lambda=420$ нм

Обозначения: 1 – паренхима, 2 – склеренхима, 3 – вместилище

Эпидермис листовки представлен продолговатыми, неправильной формы клетками. Клеточные стенки извилистые, тонкостенные, плотно прилегающие друг к другу. Устьичные аппараты аномоцитного типа (рис. 7Б). Сквозь эпидермис хорошо просвечиваются большое количество монокристаллов, расположенных в глубине тканей плода. Изредка на поверхности эпидермиса встречаются простые одноклеточные волоски, подобные описанным ранее на плодоножке (рис. 7А).

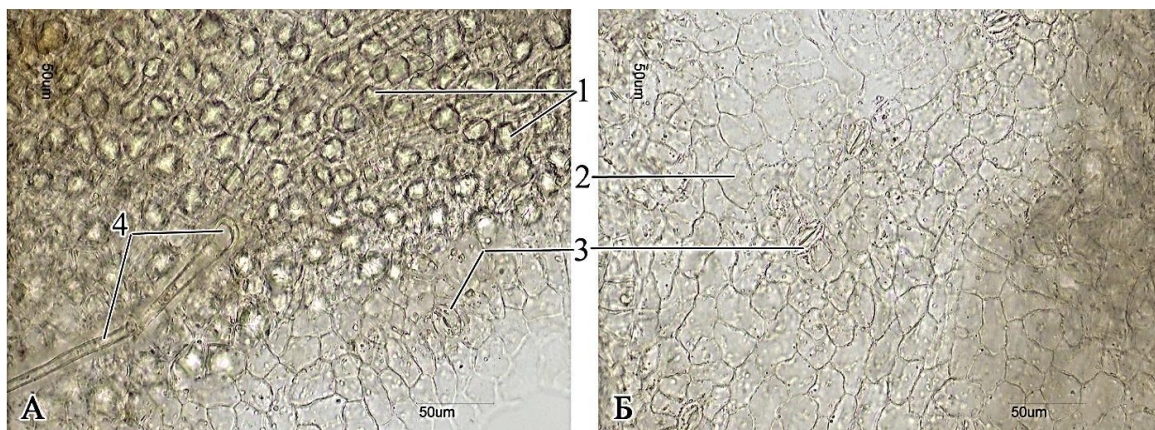


Рисунок 7 – Особенность эпидермиса плодолистика (листовки) (x400):
А – фрагмент эпидермы с простыми волосками; Б – фрагмент эпидермы с устьицами

*Обозначения: 1 – друзы оксалата кальция; 2 – клетки эпидермиса;
3 – устьица; 4 – простые одноклеточные волоски*

На поперечном сечении плода оболочка листовки (перикарпий) состоит из трех блоков тканей. Первый, внешний блок - эпидермальный. На поперечном срезе клетки эпидермы плодолистиков широкопросветные, округлой формы, с целлюлозной оболочкой, незначительно кутинизированной с поверхности (рис. 8Б, Г).

Под эпидермисом расположен блок мезокарпия (рис. 8Б). Паренхима состоит из крупных хлорофиллоносных клеток овально-округлой формы. Клетки имеют слабо утолщенные целлюлозные стенки и аморфный желто-зеленый по цвету протопласт. В клетках мезокарпия изредка встречаются монокристаллы и друзы оксалата кальция (рис. 8А; рис. 8В).

Со стороны шва листовки локализован один крупный коллатеральный пучок конусовидной формы (рис. 8А; рис. 8Б). Ксилема пучка развита слабо. Сосуды ксилемы мелкие, их оболочки лигнифицированы (рис. 8Б). Флоэмная часть пучка крупнее ксилемной, проводящие элементы флоэмы мелкоклеточные, тонкостенные. С периферии флоэмной части пучок значительно армирован группой склеренхимных волокон (рис. 8). Волокна склеренхимы узкопросветные с видимыми остатками протопласта. Клеточные стенки волокон заметно утолщены и лигнифицированы (рис. 8).

Третий внутренний слой – эндокарпий состоит из нескольких слоев склеренхимных волокон «паркетного типа», каждый слой расположен перпендикулярно предыдущему, они окрашиваются в ярко желтый цвет после обработки 10-% раствором сернокислого анилина (рис. 8В). По периферии эндокарпия локализованы многочисленные призматических монокристаллы оксалата кальция (рис. 8В).

УФ-микроскопия тканей листовки обнаруживает, что клетки эпидермиса при рассмотрении поперечного среза имеют округлую форму с незначительно целлюлозными клеточными стенками, которые при УФ-свете с $\lambda=360$ нм дают флуоресценцию синего цвета (рис. 9Б).

Со стороны шва листовки в паренхиме мезокарпия локализован один крупный коллатеральный пучок конусовидной формы. Ксилема пучка развита слабо, в основном представлена сосудами. С периферии флоэмной части пучок заметно армирован группой склеренхимных волокон которые в УФ-свете с $\lambda=360$ нм дают ярко голубую флуоресценцию (рис. 9Б).

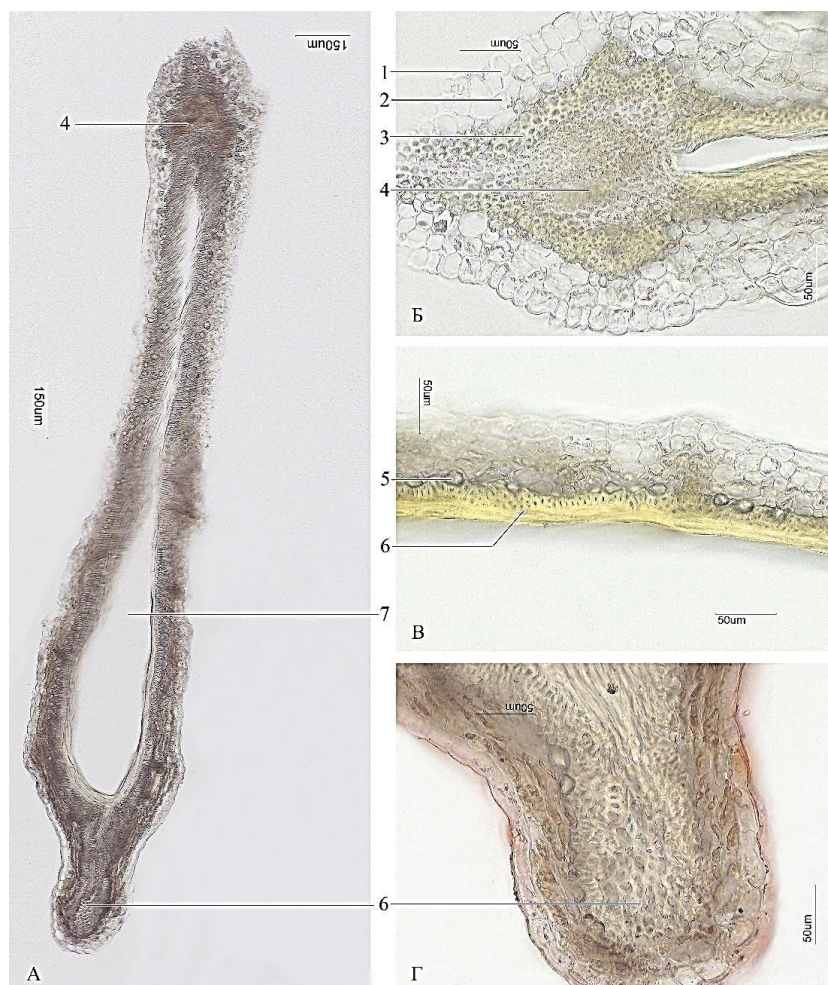


Рисунок 8 – Плодолистик (листовка): А – общий вид на поперечном сечении (x100); Б – жилка листовки на поперечном сечении окрашенная 10%-ным раствором сернокислого анилина (x400); В – фрагмент перикарпия на поперечном сечении окрашенная 10%-ным раствором сернокислого анилина (x400); Г – фрагмент, окрашенный раствором Судана III (x400)

Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – паренхима мезокарпия; 3 – склеренхима; 4 – ксилема; 5 – монокристаллы; 6 – слои склеренхимы эндокарпия; 7 – полость листовки

Склеренхима эндокарпия ярко люминесцирует желтым светом при облучении светом с $\lambda=420$ нм и ярко голубым с $\lambda=360$ нм (рис. 9А, Б). Такой характер свечения говорит о фенольной природе веществ, входящий в состав склеренхимы.

Трихомы, расположенные на поверхности плодолистика, также имеют ярко выраженную голубую флуоресценцию (рис. 9Б).

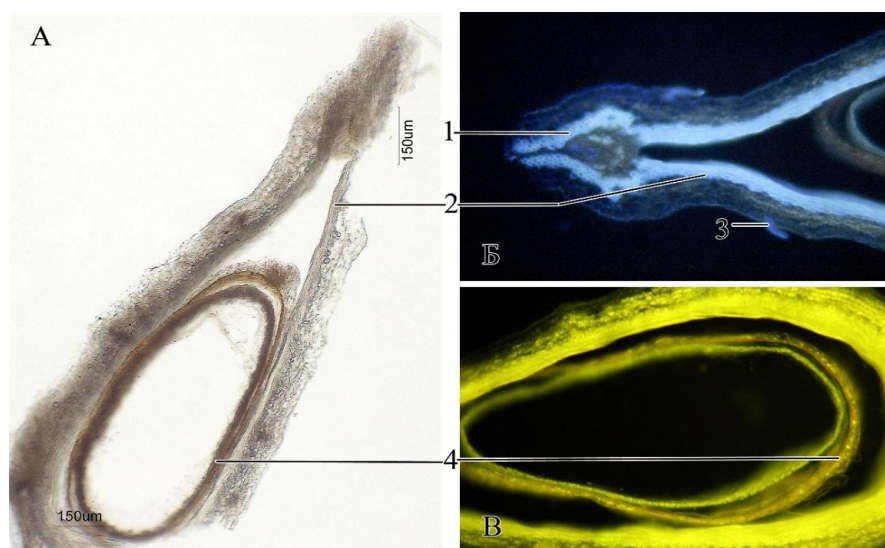


Рисунок 9 – Строение листовки плода лабазника вязолистного на поперечном сечении: А – видимая область (x100); Б – фрагмент в УФ-свете с $\lambda=360$ нм;

Б' – фрагмент в УФ-свете с $\lambda=420$ нм

Обозначения: 1 – склеренхима, 2 – склеренхима эндокарпия, 3 – трихома, 4 – оболочка семени

На поперечных сечениях плодов лабазника вязолистного заметны элементы зародыша (рис. 10), тело которого округлой или округло-яйцевидной формы достигает в длину 790 мкм, в ширину 400 мкм (рис. 10А).

Оболочка семени сложена клетками с бурым протопластом. Основная часть семени – эндосперм представлена крупноклеточной паренхимой; клетки её округлой формы с тонкостенными стенками. В центре семени визуализируется полость на месте выпавшего зародыша (рис. 10Б).

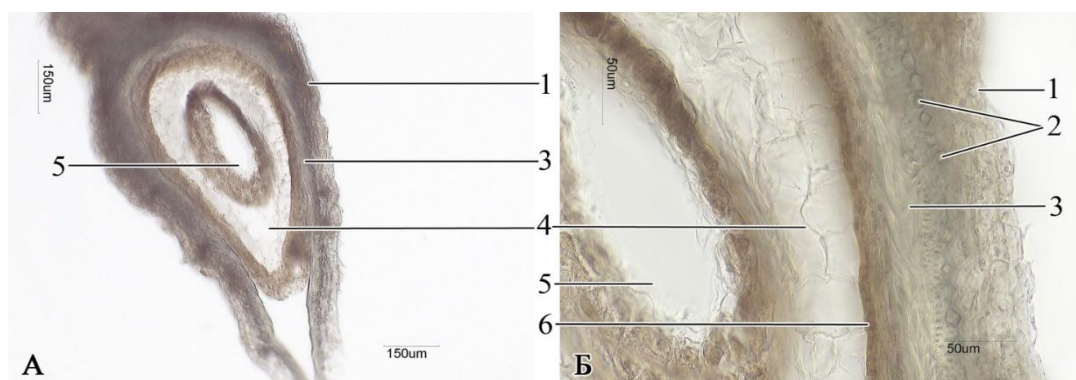


Рисунок 10 – Односемянная листовка с зародышем на поперечном сечении:

А – общий вид плода (x100); Б – фрагмент зародыша (x400)

Обозначения: 1 – эпидермис листовки; 2 – монокристаллы; 3 – склеренхима; 4 – клетки эндосперма; 5 – полость, 6 – оболочка семени

При облучении слоев склеренхимы эндокарпий в УФ-свете с $\lambda=360$ нм наблюдается ярко голубое свечение, а при УФ-свете с $\lambda=420$ нм ярко желтое, что говорит о вероятном наличии в слоях склеренхимы метаболитов фенольной природы (рис. 11Б, рис. 11В).

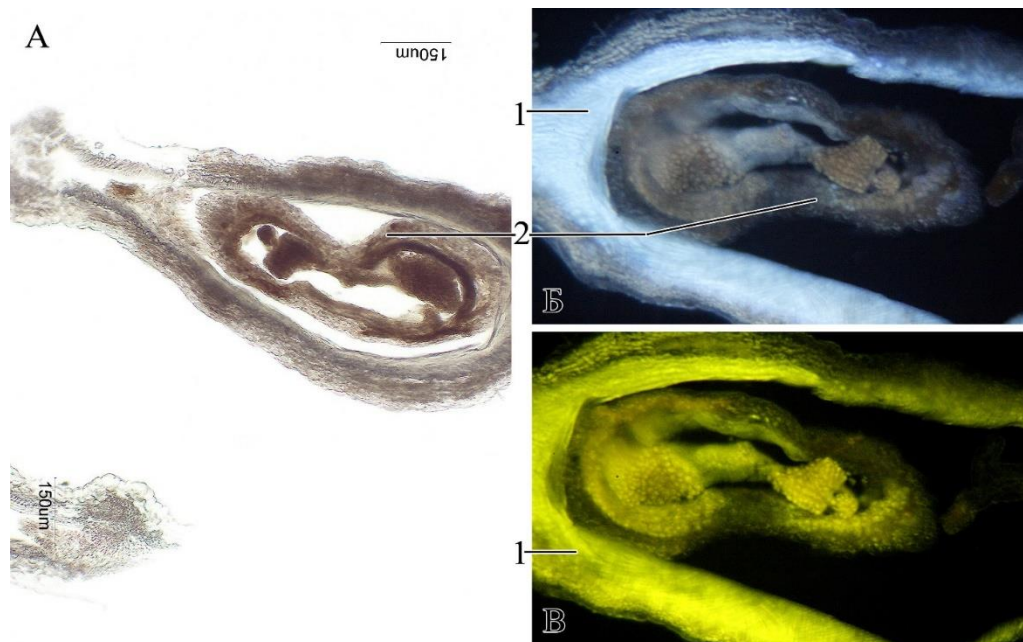


Рисунок 11 – Поперечное сечение односемянной листовки с зародышем:

А – видимая область (x100); Б – фрагмент в УФ-свете с $\lambda=360$ нм;

В – фрагмент в УФ-свете с $\lambda=420$ нм

Обозначения: 1 – слои склеренхимы эндокарпия; 2 – оболочка зародыша

Люминесцентная микроскопия оболочки семени зародыша представлена клетками с бурым протопластом, в УФ-свете с $\lambda=360$ нм не флуоресцирует, оставаясь бурой (рис. 11Б). При облучении в УФ-свете с $\lambda=420$ нм зародыш семени флуоресцирует ярко желтым свечением (рис. 11В).

3.1.2. Морфолого-анатомическое исследование подземной части лабазника вязолистного

Морфологически подземные органы лабазника вязолистного представлены ползучим корневищем и имеют мочку корней без утолщения [93]. Поверхность подземных органов растения по цвету от темно-бурого до черного. Размеры могут варьировать в зависимости от условий произрастания [93]. Анатомио-гистологический анализ поперечных сечений

образцов из мочки корней показал, что это придаточный корень переходного от первичного к вторичному типу строения (рис.12А).

В центре придаточного корня расположен центральный цилиндр, окруженный первичной корой с хорошо заметными по периферии элементами экзодермы и остатками эпиблемы. Клетки экзодермы округло-шестигранные по форме имеют равномерно утолщенные плотно сомкнутые оболочки. Экзодерма составляет до 6-ти наружных слоёв первичной коры придаточного корня (рис.12Б).

Паренхима мезодермы занимает значительно больший объем первичной коры и представлена тонкостенными клетками, с неструктурированным в них протопластом, с заметными межклетниками. Экзодерма первичной коры выражена слабо. Её клетки отличаются меньшими размерами от клеток мезодермы и бурой пигментацией клеточных стенок (рис. 12А).

В центре поперечного среза расположен пентархный радиальный проводящий пучок. Первичная ксилема пучка сильно паренхимизирована, в центре корня расположена древесная паренхима первичного происхождения.

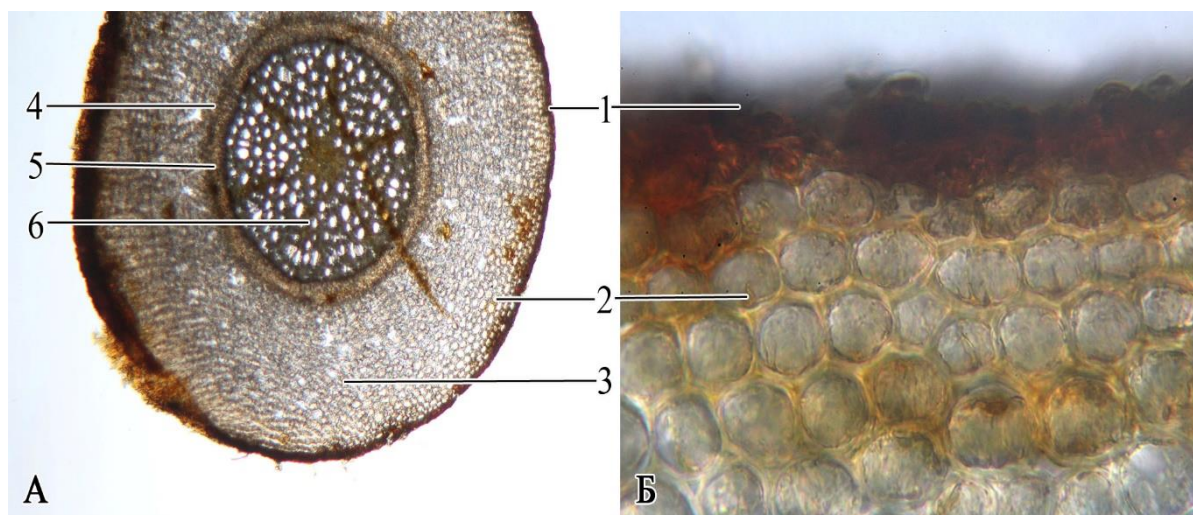


Рисунок 12 – Поперечный срез придаточного корня лабазника вязолистного диаметром 2 мм: А – общий вид (х40); Б – фрагмент первичной коры (х100)
 Обозначения: 1 – остатки эпиблемы, 2 – экзодерма, 3 – паренхима первичной коры, 4 – эндодерма, 5 – флоэма, 6 – ксилема

Проводящие элементы прокамбиальной флоэмы не диагностируются. Элементы твердого луба локализуются по периферии центрального цилиндра и представлены мелкоклеточной склеренхимой. Хорошо заметны формирующиеся открытые коллатеральные пучки, выраженные в первую очередь проводящими элементами вторичной ксилемы.

Корневище лабазника вязолистного при рассмотрении на поперечных сечениях имеет пучковый тип строения. Первичная кора корневища хорошо выражена и разделена на три блока тканей. Первый, внешний блок – уголковопластинчатая колленхима; её стенки нативно желтого цвета. Большая часть первичной коры занята основной крупноклеточной рыхлой паренхимой.

Внутренний слой первичной коры - эндодерма, хорошо диагностируется по тёмной пигментации клеточных стенок.

Пучки центрального цилиндра закрытые коллатеральные. Центральный цилиндр с периферии армирован мощным слоем толстостенной перициклической склеренхимы, которая при окрашивании 10%-ным раствором сернокислого анилина окрашивается в ярко желтый цвет (рис. 13А).



Рисунок 13 – Поперечный срез корневища лабазника вязолистного диаметром 2 мм (x100): А – фрагмент до окрашивания; Б – фрагмент после окрашивания 10-% раствором серного кислого анилина
Обозначения: 1 – паренхима первичной коры, 2 – склеренхима, 3 – ксилема

Сердцевина занимает большой объем органа. Она представлена крупноклеточной паренхимой с лигнифицированными клеточными стенками. В сердцевине встречаются полости рексигенного происхождения.

3.2. Изучение вопросов диагностики примесного вида к лабазнику вязолистному

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 [71, 114].

Для лабазника вязолистного в качестве примесного вида можно рассмотреть лабазник шестилепестный, произрастающий в схожих ареалах и экологических условиях среды (см. главу 1 настоящих исследований). Кроме того, лабазник шестилепестный имеет высокую степень сходства морфологических признаков с лабазником вязолистным [114]. Указанное сходство повышает вероятность случайного или намеренного подмешивания примесного вида в целевое сырье [74, 71, 95, 114].

В настоящей главе нами приводятся результаты собственных исследований по изучению морфологических и анатомо-гистологических признаков надземной и подземной частей лабазника шестилепестного как примесного вида к лабазнику вязолистному, произрастающего на территории Приволжского федерального округа.

3.2.1. Морфолого-анатомическое исследование надземной части лабазника шестилепестного

Имеются данные об особенностях морфологического и анатомо-гистологического строения цветков лабазника вязолистного которые включены в ВФС 42-1777-87. Flores Filipendule ulmarie - Цветки лабазника

вязолистного [31]. Также группой ученых проводились исследования по изучению и дополнению диагностических признаков для цветков лабазника вязолистного [1, 30, 85, 120], однако в настоящее время нет данных об особенностях анатомо-гистологического строения цветков лабазника шестилепестного, что позволило бы отличать данный вид растения, являющегося примесным видом к лабазнику вязолистному, произрастающего на территории Приволжского федерального округа.

Цветки лабазника шестилепестного актиноморфные по форме, с двойным околоцветником, лепестки белого цвета собраны в щитковидно-метельчатые соцветия [93].

Анатомо-гистологический анализ позволил установить гистологические особенности, некоторых частей цветка. Так, эпидермис лепестков имеет обширные межклетники, а также малое количество пигмента в клетках (рис. 14Б). Эпидермальные клетки паренхимные, округлой формы покрыты тонкой кутикулой. Клетки мезофилла лепестков тонкостенные, целлюлозные. Проводящая система представляет собой жилки, состоящие из спирально-кольчатых трахеид (рис. 14А, рис. 14Б). Лепесток имеет утолщения в местах, где проходит средняя жилка, а также у его основания (рис. 14А).

При люминесцентной микроскопии ($\times 400$) в области основании лепестка наблюдается ярко – синее свечение клеток мезофилла (рис. 14В).

Чашечка лабазника шестилепестного 6-ти членная, актиноморфная, сростнолистная, верхушки чашелистиков заостренные, густо опушенные у основания и середины пластинки чашелистика и имеет пигментные клетки продолговатой формы по краю, окрашенные в медовый цвет (рис. 15А).

Эпидермис чашелистиков имеет тонкую кутикулу, мезофилл листочков состоит из однородной, хлорофилоносной паренхимы, не дифференцируется и состоит из округлых клеток с межклетниками. Сосудисто-волокнистая система чашелистиков редуцирована, без вторичных утолщений, лубяные волокна, также, как и колленхима отсутствуют. Цветки

имеют нектарники, которые размещаются по одному на пластинке чашелистика у основания с внутренней и верхней стороны (рис. 15А). При люминесцентной микроскопии наблюдается ярко-синее свечение нектарника и клеток паренхимы у основания чашелистиков (рис. 15В).

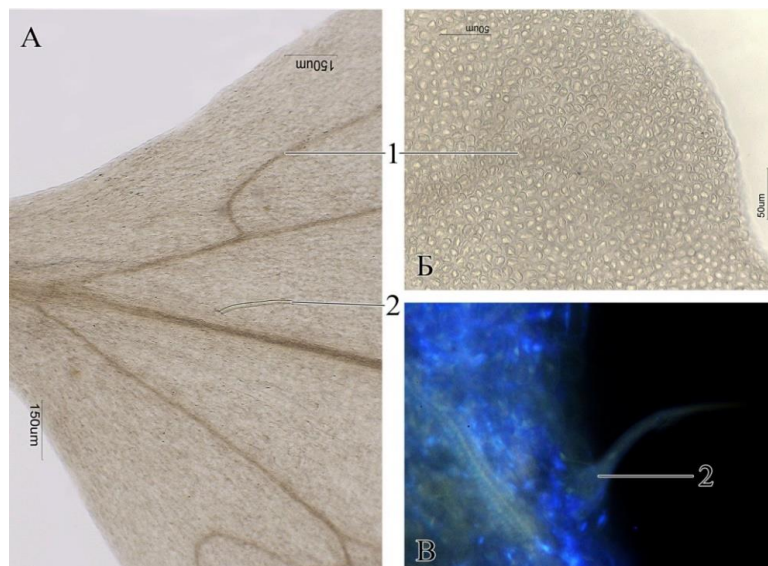


Рисунок 14 – Фрагмент лепестка лабазника шестилепестного: А – основание лепестка в видимой области спектра ($\times 100$); Б – отгиб венчика в видимой области спектра ($\times 400$); В – трихома на основании лепестка в УФ-свете при $\lambda=360$ нм

Обозначения: 1 – фрагмент жилки лепестка; 2 – трихома

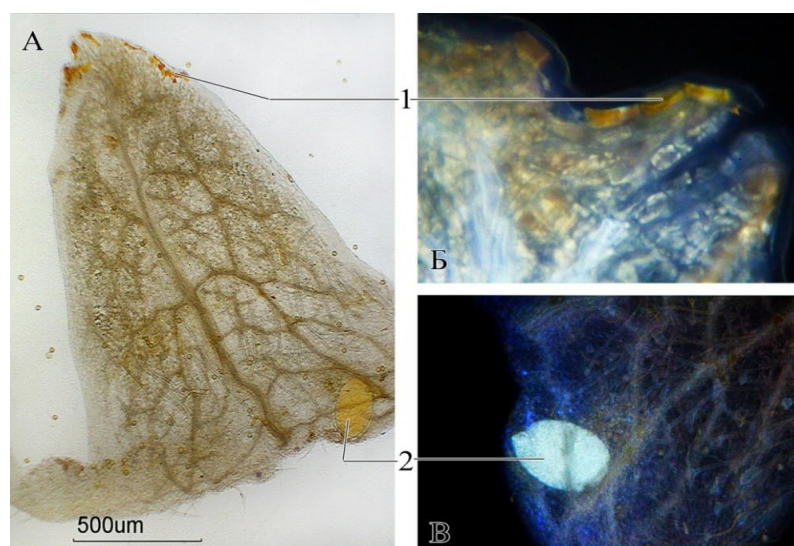


Рисунок 15 – Чашелистик цветка лабазника шестилепестного: А – фрагмент листовой пластины чашелистика ($\times 100$); Б – вершина чашелистика в УФ-свете при $\lambda=360$ нм; В – основание чашелистика в УФ-свете при $\lambda=360$ нм

Обозначения: 1 – пигментные клетки; 2 – нектарин

В эпидермисе чашечки с внешней стороны листочков имеются выросты, представленные простыми волосками, а также устьица. Средняя жилка является проводящей структурой и состоит предположительно из спирально-кольчатых трахеид (рис. 16А)

При люминесцентной микроскопии при длине волны 420 нм заметно ярко-желтое свечение эпидермиса, в том числе и простых волосков, а также проводящей системы (рис 16Б). При длине волны в 360 нм ярко-синего свечения не обнаружено (рис 16В).

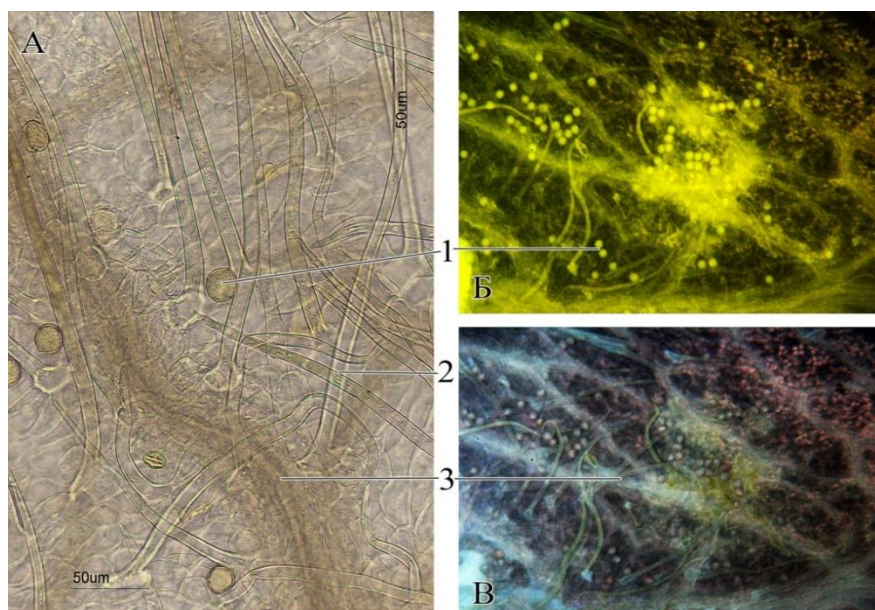


Рисунок 16 – Чашелистик цветка лабазника шестилепестного: А – эпидермис листовой пластины чашелистика ($\times 400$); Б – эпидермис листовой пластины чашелистика в УФ-свете при $\lambda=420$ нм; В – эпидермис листовой пластины чашелистика в УФ-свете при $\lambda=360$ нм

Обозначения: 1 – пыльца; 2 – простой волосок; 3 – фрагмент жилки

При люминесцентной микроскопии тычинок при длине волны 420 нм наблюдается ярко-желтое свечение пыльника и пыльцы (рис. 17Б). При длине волны в 360 нм наблюдается красное свечение фрагментов пыльника (рис. 17В). Эпидермис пыльника двуслойный, представлен двумя слоями живых клеток с тонкими целлюлозными клеточными стенками (рис. 18А). Пыльца, находящаяся внутри пыльника по форме округло-угловатая, гладкая. При

люминесцентной микроскопии пыльника (длина волны 420 нм) наблюдается ярко-желтое свечение пыльцы.



Рисунок 17 – Тычинки лабазника шестилепестного: А – видимая область спектра (х40); Б – фрагмент в УФ-свете при $\lambda=420\text{нм}$; В – фрагмент в УФ-свете при $\lambda=360\text{нм}$

Обозначения: 1 – тычиночная нить; 2 – пыльник

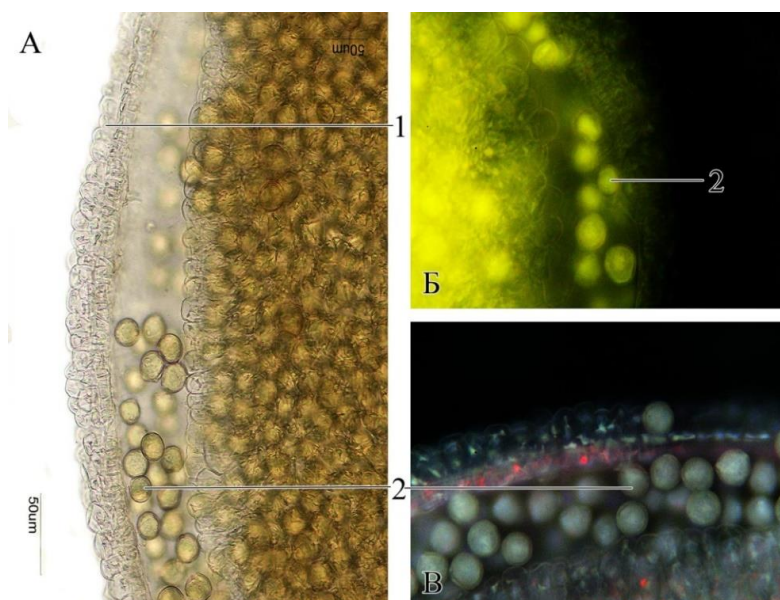


Рисунок 18 – Пыльца в пыльниках цветка лабазника шестилепестного: А – видимая область спектра ($\times 400$); Б – фрагмент в УФ-свете при $\lambda=420\text{ нм}$; В – фрагмент в УФ-свете при $\lambda=360\text{ нм}$

Обозначения: 1 – клетки эпидермиса пыльника; 2 – пыльца

При длине волны в 360 нм наблюдается ярко-синее свечение фрагментов в клетках эпидермиса, красное свечение в ниже лежащих гистологических структур пыльцевых гнезд (рис. 18В).

Гинецей сложный, апокарпный (рис. 19А). Рыльца пестиков покрыты большим количеством коротких сосочков, служащих для приёма пыльцы (рис. 6Б). Эпидермис в основании пестика имеет волоски (рис. 19Г).

При люминесцентной микроскопии фрагментов пестика наблюдается белое свечение коротких сосочков рыльца (рис. 19В), а также белое свечение паренхимы столбика при длине волны в 420 нм (рис. 19Д).

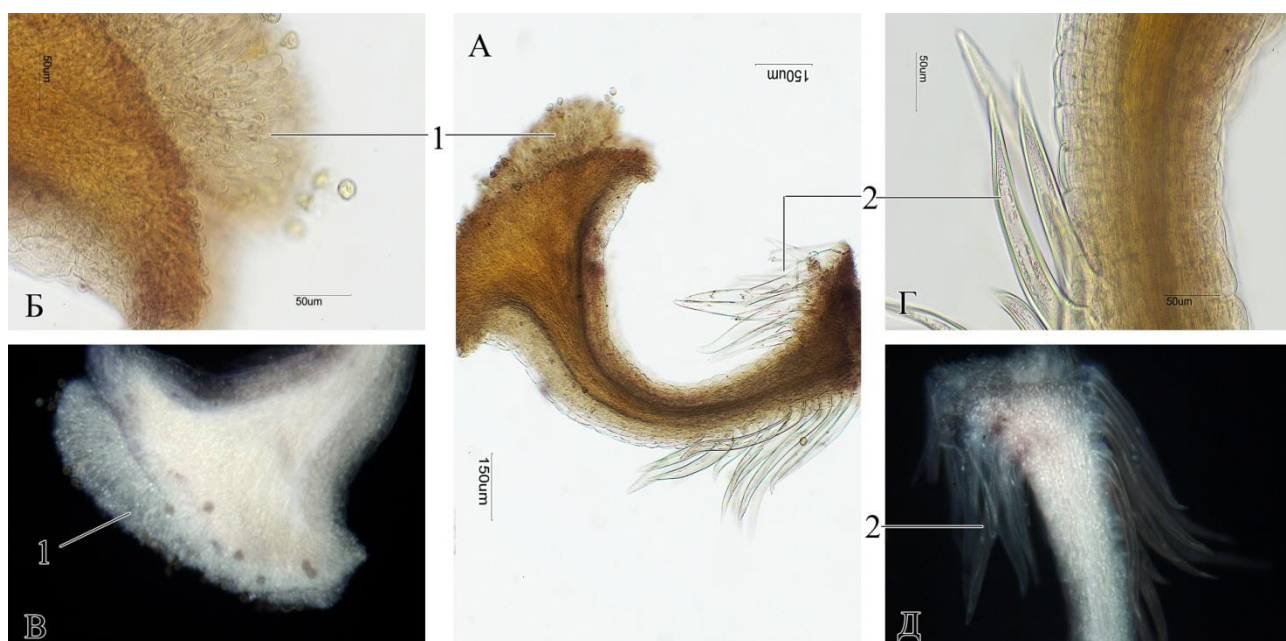


Рисунок 19 – Строение пестика цветка лабазника шестилепестного на поперечном сечении: А – фрагмент пестика цветка в видимой области (x100); Б – рыльце пестика в видимой области спектра (x400); В – фрагмент рыльца пестика в УФ-свете при $\lambda=360$ нм, Г – завязь пестика в видимой области спектра (x400); Д – фрагмент завязи пестика в УФ-свете при $\lambda=360$ нм
Обозначения: 1 – рыльце пестика; 2 – волоски

Плоды лабазника шестилепестного представляют собой сухие многолистовки, расположенные на плодоножках щитковидно-метельчатого соцветия (рис. 20А) [93]. Каждая отдельная нераскрывающаяся односемянная листовка каплевидная по форме, с прижатым по поверхности опушением и

горизонтально оттянутым на верхушке носиком (остатком рыльца пестика) (рис. 20Б) [93].

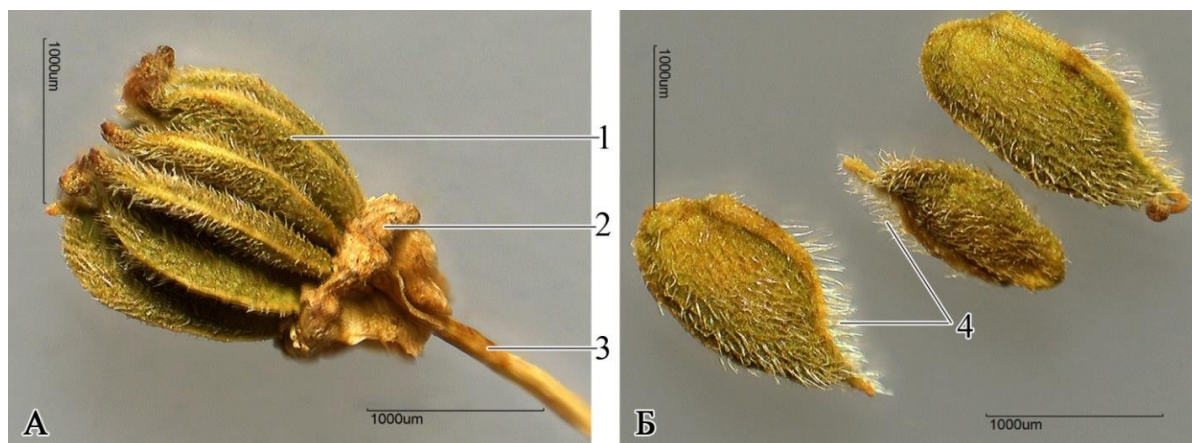


Рисунок 20 – Плод лабазника шестилепестного (x20): А – общий вид сухой многолистовки; Б – односемянные листовки плода

Обозначения: 1 – листовка; 2 – остаток околоцветника; 3 – плодоножка; 4 – волоски

Сидячие на цветоножке листовки расположены группой, по кругу (циклический тип) (рис. 20А). На одной плодоножке насчитывается до 10-ти листовок. В фазу полного созревания плодов у основания таких групп листовок имеются остатки околоцветника, представленные смятыми фрагментами венчика золотисто-желтого цвета.

Цвет листовок зелено-желтый, светлый, при хранении плоды темнеют до светло-бурого. Запах сухих плодов характерный, травянистый. Вкус слабый специфический.

Анализ анатомического строения поперечных сечений плодоножки позволил обнаружить, что она непучкового типа строения. Очертания поперечного сечения округлые, без ребер. Поверхность плодоножек представлена эпидермой (рис. 21). Эпидермальные клетки на поперечном сечении округлые по форме, с заметно утолщенными стенками, окрашивающимися после обработки 1% раствором сернокислого анилина в слабо желтый цвет (рис. 21Б). При рассмотрении эпидермиса с поверхности клетки его по форме вытянутые, угловатые. В эпидерме изредка встречаются пигментированные клетки (рис. 21В).

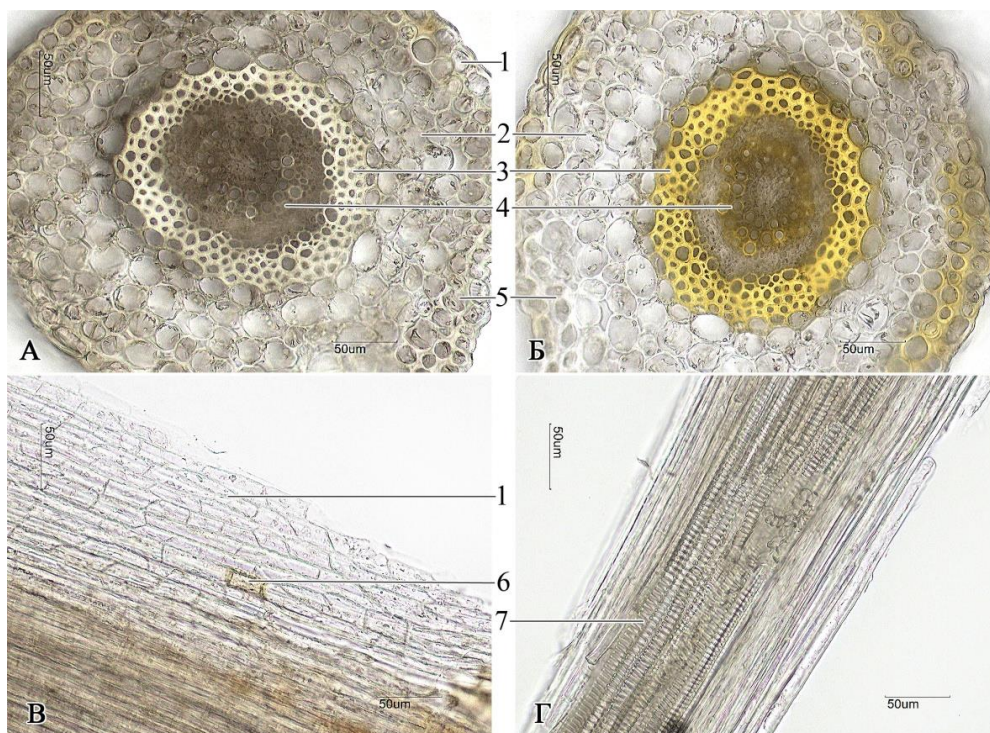


Рисунок 21 – Гистология поперечных и продольных сечений плодоножки плода (x400): А – фрагмент поперечного сечения до окрашивания;
 Б – фрагмент поперечного сечения после окраски 10%-ным раствором сернокислого анилина; В – фрагмент эпидермы на продольном сечении;
 Г – фрагмент ксилемы на продольном сечении
 Обозначения: 1 – эпидермис; 2 – паренхима коровой части; 3 – склеренхима;
 4 – ксилема; 5 – колленхима; 6 – пигментированная клетка; 7 – сосуды

Сразу под кожицей располагается один слой клеток уголковой колленхимы, реагирующей при обработке 1% раствором сернокислого анилина окрашиванием в слабо желтый цвет (рис. 21Б). Ксилема центрального цилиндра плодоножки выражена слабо и представлена мелкими сосудами кольчатого и спирального типа (рис. 21Г). Флоэма сильно армирована по периферии непрерывным кольцом склеренхимных волокон, насчитывающим до пяти слоёв в толщину. Проводящие элементы флоэмы мелкоклеточные, слабо пигментированные. Первичная кора хорошо заметная, сложенная из живых крупных округлых клеток с небольшими межклетниками. Как отмечалось нами в морфологическом описании плодов лабазника, на цветоносе, у основания расположенных по кругу листовок, сохраняются остатки околоцветника, попадающие в основное сырье.

Микроскопия околоцветника показала, что поверхность фрагментов венчика представлена эпидермисом, сложенным из мелко-размерных клеток неправильной формы. Их клеточные стенки извилисты. Устьичные аппараты аномоцитного типа многочисленны. Сквозь эпидермис просвечивают ниже лежащие ткани, в частности, хорошо видны крупные и мелкие жилки бурого цвета (рис. 22Г). По краю заметны проводящие элементы, а также сильно кутинизированные клетки эпидермы (рис. 22Г).

Поверхность околоцветника густо опушена. Опушение представлено простыми одноклеточными бичевидными волосками, расположенными, как правило, по краю (рис. 22В). На поперечном сечении остатков околоцветника отчетливо видны округлые жилки, чередующиеся со спавшимися областями мезофилла венчика (рис. 22А).

Мезофилл слабо пигментированный, желтого цвета. Проводящие пучки в жилках мелкие, состоящие, как правило, из элементов ксилемы. Эпидермис нижней стороны изучаемых фрагментов околоцветника - мелкоклеточный, с невыраженной кутикулой. С верхней стороны клетки эпидермы крупнее, кутикула значительно утолщена (рис. 22Б). Детальный анализ опушения плодов позволил выявить, что оно представлено многочисленными ретортовидными волосками. Волоски имеют округло-расширенные основания и острые оттянутые верхушки (рис. 22В). Клеточные стенки волосков сильно утолщены. Они исходно слабо окрашены в желтый цвет. Клетки эпидермы плода с поверхности угловатой неправильной формы с заметно утолщенными стенками. Протопласт светло-бурого цвета. В эпидерме изредка встречаются мелкие устьичные аппараты аномоцитного типа (рис. 22Г). Люминесцентная микроскопия остатков околоцветника с $\lambda=420$ нм выявила, что в области пучка наблюдается ярко – желтое свечение клеток мезофилла, эпидермальных клеток с нижней стороны венчика, а также лигнифицированных элементов пучка (рис. 23Б, В).

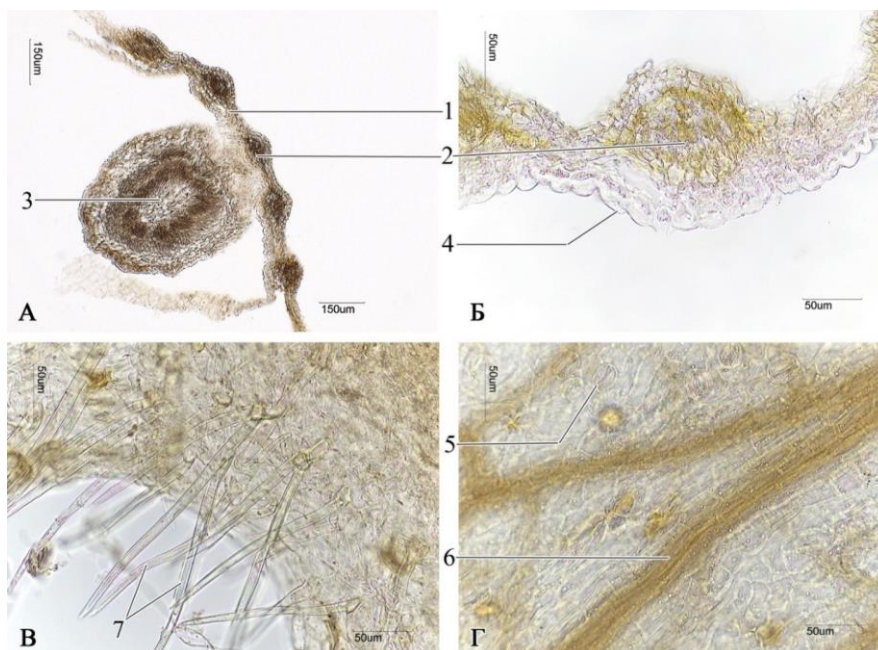


Рисунок 22 – Остатки околоцветника многолистовки: А – общий вид на поперечном сечении (x100); Б – фрагмент околцветника на поперечном сечении после окрашивания 10 % раствором сернокислого анилина (x400); В – фрагмент эпидермы с трихомами (x400); Г – поверхность околоцветника

Обозначения: 1 – остатки околоцветника; 2 – пучок; 3 – сердцевина; 4 – верхний эпидермис с кутикулой; 5 – устьице; 6 – жилка; 7 – простые бичевидные волоски

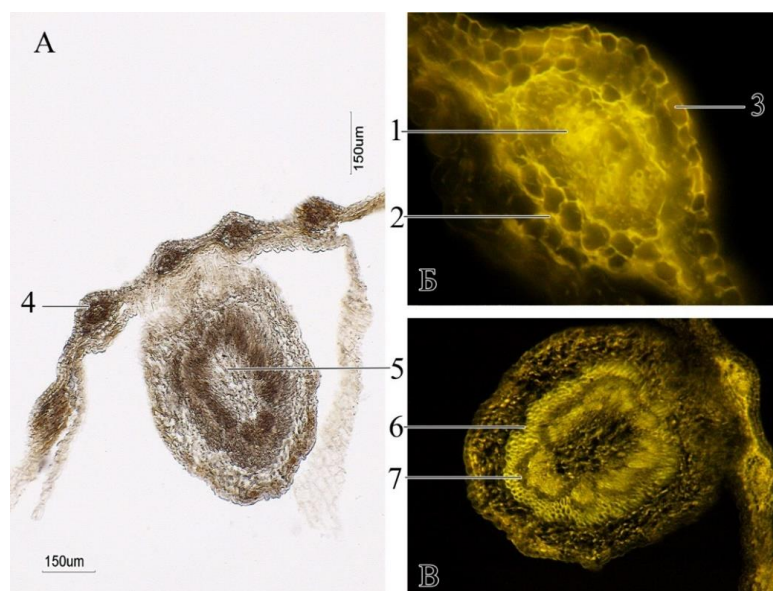


Рисунок 23 – Остатки околоцветника многолистовки на поперечном сечении: А – общий вид (x100); Б – фрагмент центральной жилки в УФ-свете с $\lambda=420$ нм; В – фрагмент пучка в околоцветнике в УФ-свете с $\lambda=420$ нм

Обозначения: 1 – ксилема; 2 – паренхима; 3 – эпидермис; 4 – пучок; 5 – сердцевина; 6 – склеренхима; 7 – флоэма

Клетки эпидермы вокруг трихом сложены в розетку. Клеточные стенки розетки значительно более утолщенные, чем стенки большинства клеток эпидермы (рис. 24А). При люминесцентной микроскопии с $\lambda=420$ нм клеточные стенки трихом имеют ярко выраженную желтую флуоресценцию (рис. 24Б, В).

Оболочка листовки – перикарпий – состоит из трех блоков. Первый, внешний эпидермальный блок, описан выше.

Непосредственно под ним располагается блок паренхимы мезокарпия, наиболее выраженный со стороны шва листовки (рис. 25Б). Паренхима состоит из мелких округлых клеток со слабо утолщенными целлюлозными стенками и светло зеленым аморфным протопластом. В области шва листовки паренхима насчитывает до 5-ти слоев клеток. В основной части перикарпия паренхима выражена слабо и насчитывает 1-2 слоя клеток (рис. 25А, рис. 25В).

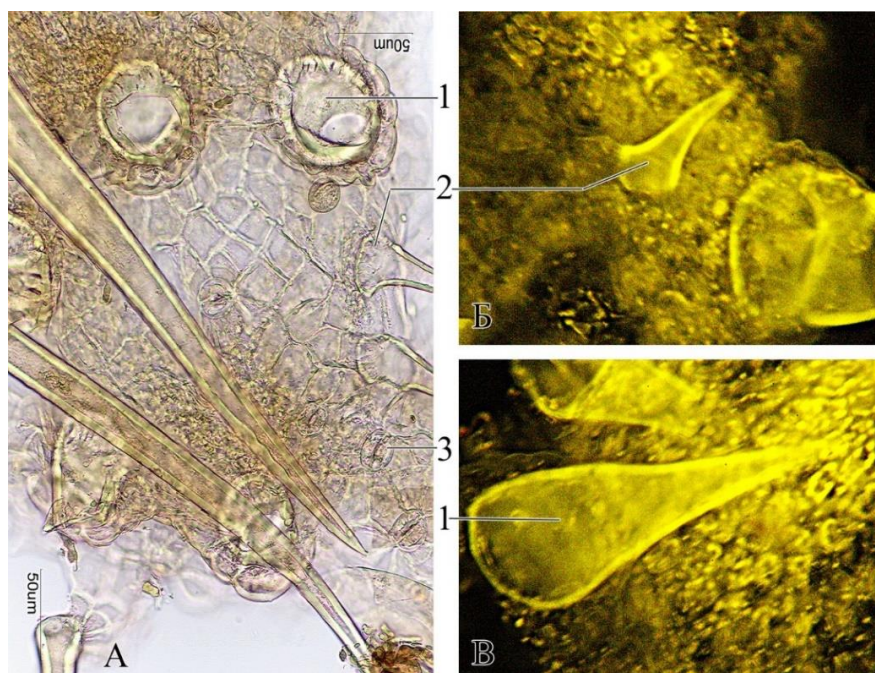


Рисунок 24 – Строение трихом на поверхности листовки: А – фокус на место прикрепления трихомы, окраска 0,5% раствором Судана III (x400);

Б – фрагмент с тонкостенным волоском в УФ-свете с $\lambda=420$ нм;

В – фрагмент с толстостенным волоском в УФ-свете с $\lambda=420$ нм

Обозначения: 1 – место прикрепления волосков; 2 – тонкостенный волосок;

3 – устьице

Со стороны шва листовки в паренхиме мезокарпия локализован один крупный коллатеральный пучок конусовидный формы (рис. 25А, рис. 25Б). Ксилема пучка развита слабо, представлена сосудами, расположенными в два ряда. Сосуды мелкие, их оболочки лигнифицированные (рис. 25Б). Флоэмная часть пучка хорошо развита, проводящие элементы флоэмы мелкоклеточные, тонкостенные. С периферии флоэмной части пучок сильно армирован группой склеренхимных волокон. Волокна склеренхимы широкопросветные с видимыми остатками протопласта. Клеточные стенки заметно утолщены и лигнифицированы (рис. 25).

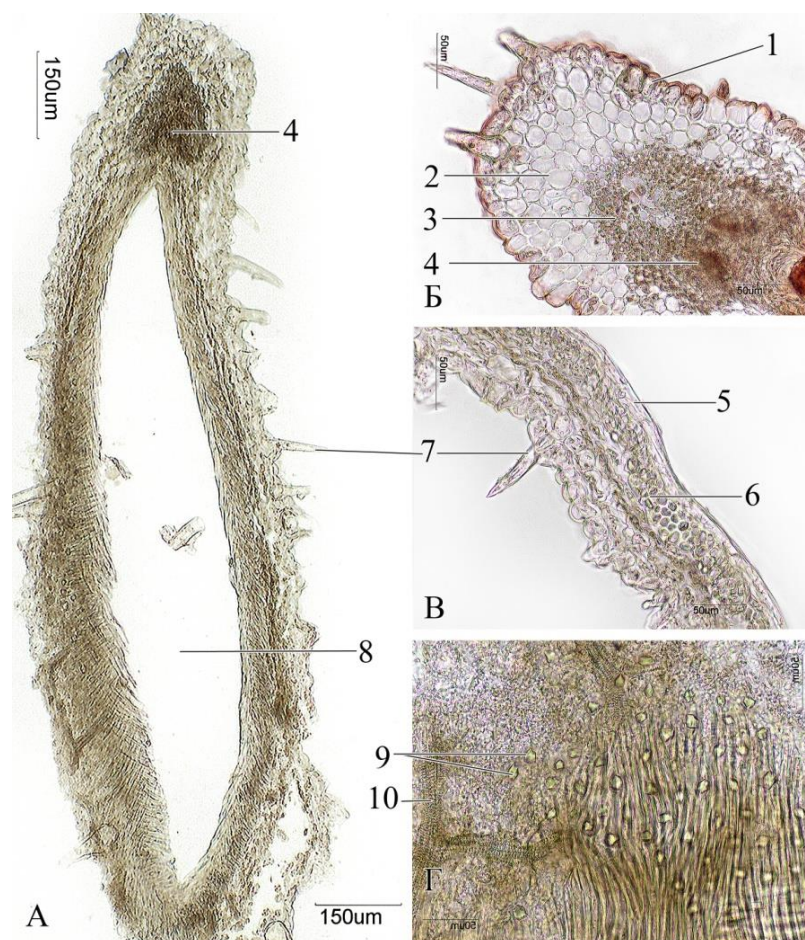


Рисунок 25 – Плодолистик (листовка): А – общий вид на поперечном сечении (x100); Б – жилка листовки на поперечном сечении окрашенная 0,5 % раствором Судана III (x400); В – фрагмент перикарпия на поперечном сечении (x400); Г – эндокарпий на тангентальном срезе (x400)

Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – паренхима мезокарпия; 3 – склеренхима; 4 – ксилема; 5, 6 – слои склеренхимы эндокарпия; 7 – волоски; 8 – полость листовки; 9 – монокристаллы; 10 – спиральные сосуды

В остальных частях мезокарпия пучки встречаются редко. Они мелкие и состоят, как правило, из кольчатых и спиральных сосудов.

Третий внутренний слой перикарпия – эндокарпий – состоит из нескольких слоев склеренхимных волокон, каждый слой, при этом, расположен перпендикулярно предыдущему. При рассмотрении на тангентальном сечении хорошо заметны разнонаправленные слои волокон, сосудов (рис. 25Г), а также большое количество призматических монокристаллов оксалата кальция (рис. 25Г).

На поперечном сечении волокна эндокарпия округлой, слабоугловатой формы. Клеточные стенки заметно утолщены, лигнифицированы. Внутри волокон заметны аморфные остатки протопласта (рис. 26).

При микроскопировании в УФ-свете с $\lambda=420$ нм наблюдается ярко желтая флуоресценция клеточных стенок склеренхимных волокон пучка, а также сосудов ксилемы (рис. 26Б, В).

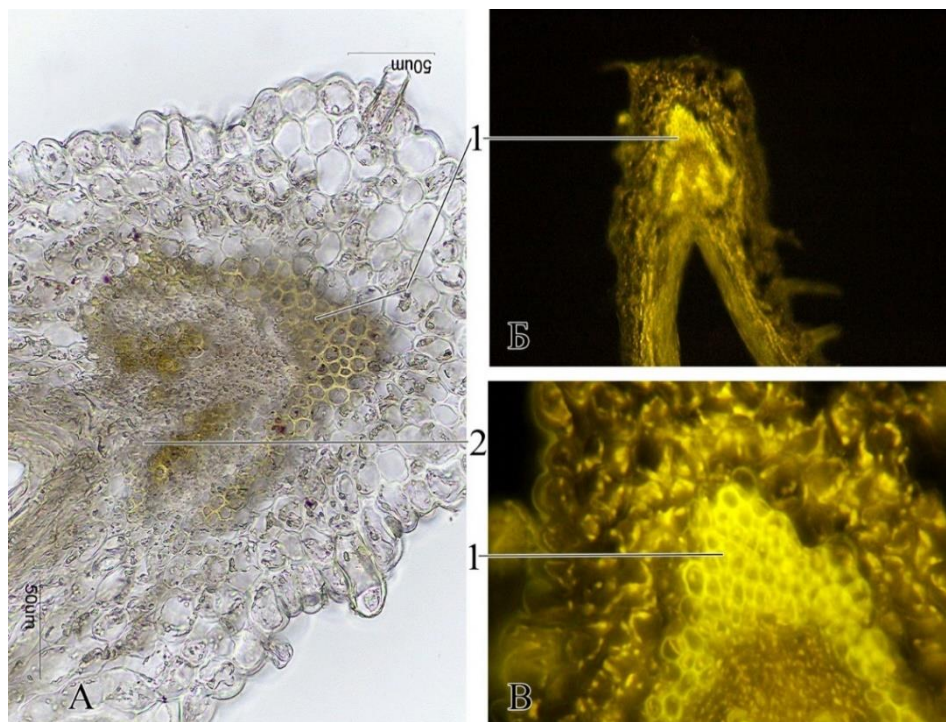


Рисунок 26 – Плодолистик листовки на поперечном сечении: А – фрагмент жилки, окраска 10% раствором сернокислого анилина (x400); Б – жилка в УФ-свете с $\lambda=420$ нм; В – фрагмент жилки в УФ-свете с $\lambda=420$ нм

Обозначения: 1 – склеренхима; 2 – ксилема

Трихомы, расположенные на поверхности плодолистика, также имеют ярко выраженную желтую флуоресценцию (рис. 27).

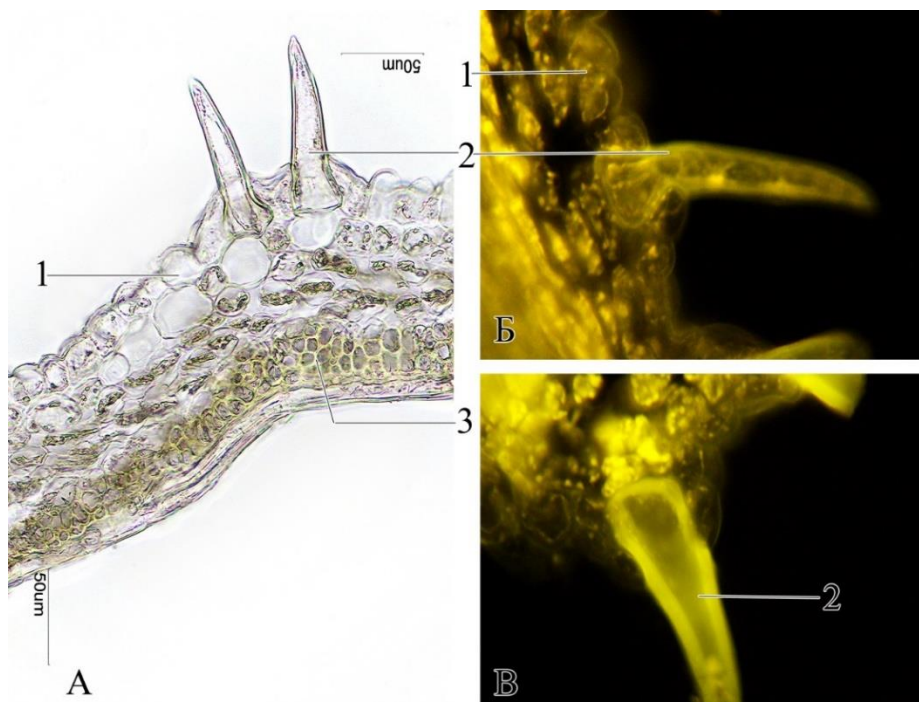


Рисунок 27 – Строение трихом на поверхности плодолистика:

А – перикарпий на продольном сечении, окраска 10% раствором сернокислого анилина (x400); Б – фокус на протопласт трихомы в УФ-свете с $\lambda=420$ нм; В – фокус на клеточную стенку трихомы в УФ-свете с $\lambda=420$ нм
Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – простые волоски; 3 – склеренхима эндокарпия

При рассмотрении поперечных сечений плодов лабазника шестилепестного хорошо заметны элементы зародыша (рис. 28В).

Тело зародыша округлой или округло-яйцевидной формы. В длину оно достигает 24 мкм, в ширину до 19 мкм (рис. 28).

Базальная часть зародыша (подвесок) слабо вытянута (до 500 мкм), паренхимизирована, в ее структуре заметны проводящие элементы (рис. 28).

При микроскопировании в УФ-свете с $\lambda=420$ нм описанные включения дают ярко-желтую люминесценцию (рис. 29Б, рис. 29В).

Место плацентарии, а также перикарпий при облучении с $\lambda=420$ нм дают ярко желтую флуоресценцию клеток (рис. 29Б, рис. 29В).

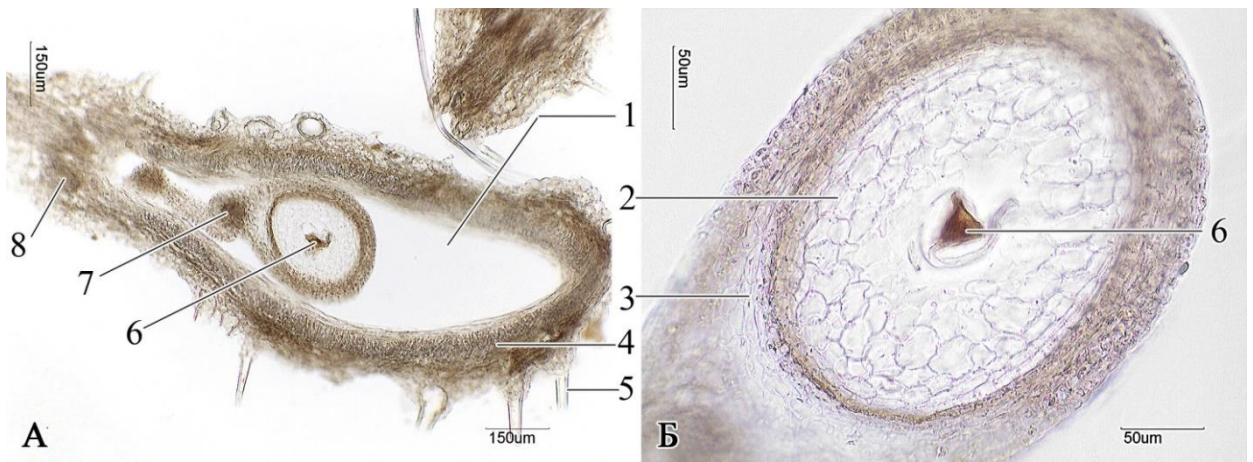


Рисунок 28 – Односемянная листовка с зародышем на поперечном сечении:

А – общий вид (x100); Б – фрагмент зародыша (x400)

Обозначения: 1 – полость листовки; 2 – фрагмент семядоли; 3 – оболочка семени; 4 – перикарпий; 5 – опушение перикарпия; 6 – пигментированные клетки зародыша; 7 – место плацентации; 8 – жилка

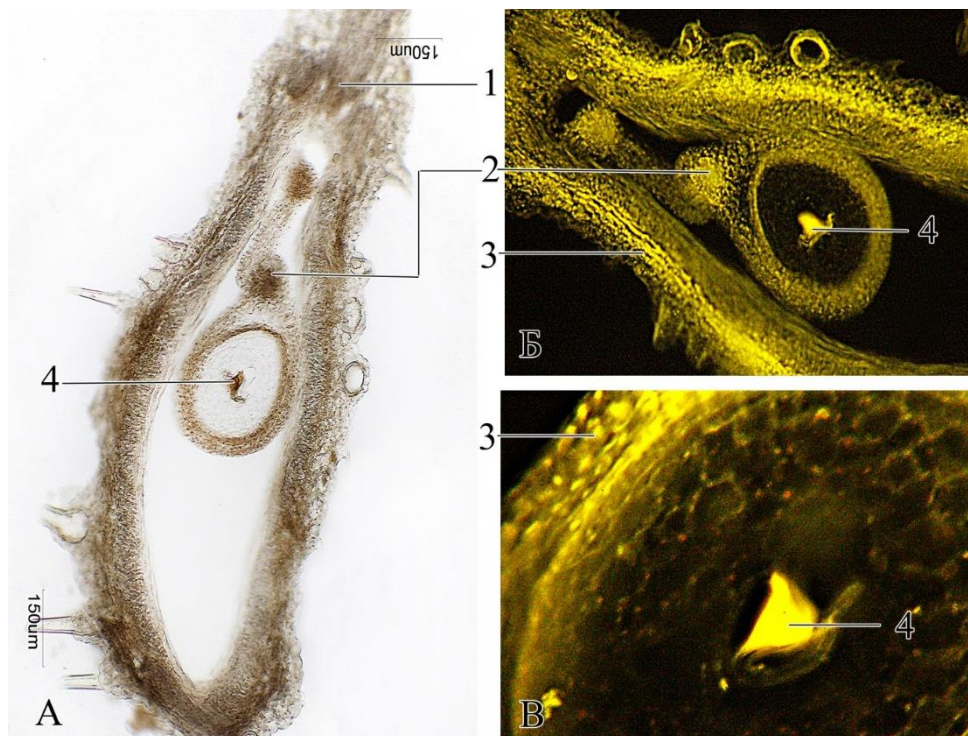


Рисунок 29 – Микроскопия односемянной листовки с зародышем на поперечном сечении: А – общий вид листовки (x100); Б – общий вид в УФ-свете; Б – фрагмент в УФ-свете с $\lambda=420$ нм

Обозначения: 1 – жилка; 2 – место плацентации; 3 – перикарпий; 4 – пигментированные клетки зародыша

3.2.2. Морфолого-анатомическое исследование подземной части лабазника шестилепестного

Морфологически **корневище** лабазника шестилепестного короткое, с клубнеобразным веретеновидно- или почти шаровидно-утолщенным придаточным корнем. Поверхность корней и корневищ темно-бурая до черного. Размеры могут варьировать в зависимости от условий произрастания [93].

Нами был проведен анализ поперечных сечений придаточных корней диаметром 2 мм отходящих от корневища округлой формы, со слабоволнистой поверхностью (рис. 30А).

Анатомо-гистологический анализ показал, что центральный цилиндр представляет собой совокупность мелких коллатеральных пучков, корня расположенных в центре органа по окружности. В центре корня выражена небольшая сердцевина, сложенная из клеток запасающей паренхимы с друзами оксалата кальция (рис. 30А, рис. 30Г, рис. 34Б).

Первичная кора корней значительно развита и превалирует в объеме над центральным цилиндром (рис. 30А). Это корни изначально первичного анатомического строения с элементами сформированных вторичных проводящих тканей.

Поверхность корней защищена слоем суберинезированной экзодермы. Она сложена из клеток, мало отличающиеся по форме, на поперечном сечении от клеток основной паренхимы первичной коры. Стенки клеток экзодермы исходно окрашены в желто–коричневый цвет, усиливающийся при окраске 10% раствором сернокислого анилина (рис. 31Б).

При рассмотрении на продольных срезах заметно, что клетки экзодермы уплощенные, прозенхимные, с бурым аморфным протопластом (рис. 32Б).

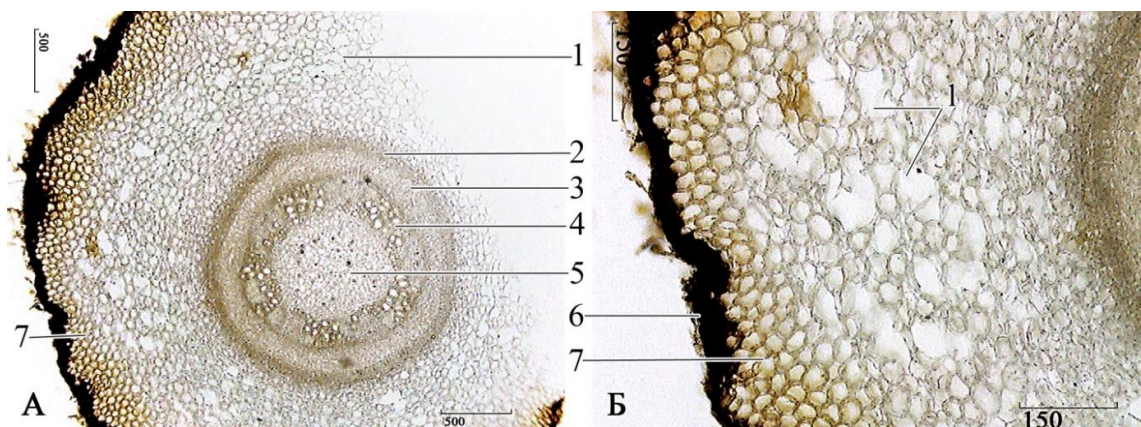


Рисунок 30 – Поперечный срез придаточного корня лабазника шестилепестного диаметром 2 мм: А – общий вид (x40); Б – фрагмент первичной коры (x100)

Обозначения: 1 – паренхима первичной коры, 2 – эндодерма, 3 – флоэма, 4 – ксилема, 5 – сердцевина, 6 – эпидермис, 7 – экзодерма

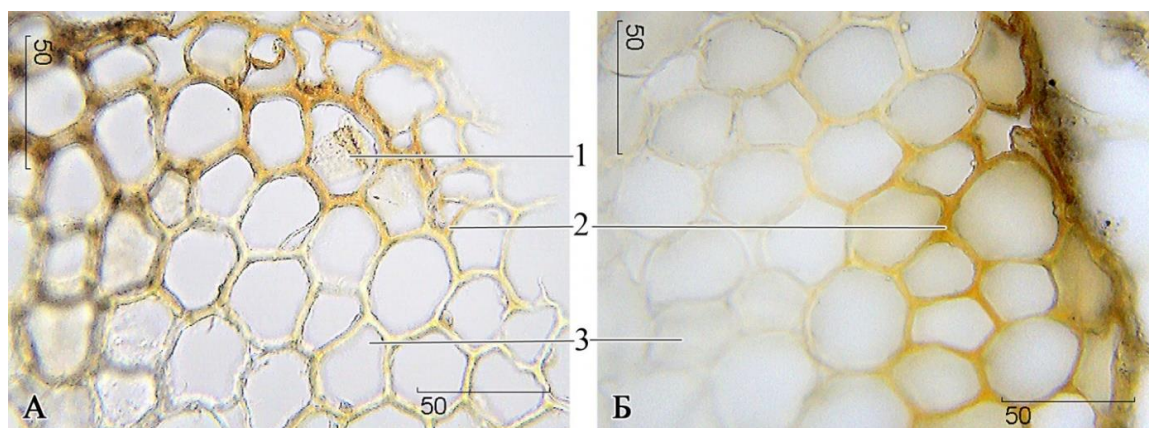


Рисунок 31 – Эндодерма корня лабазника шестилепестного диаметром 2 мм. Поперечный срез (x400): А – фрагмент до окрашивания; Б – окраска 10% раствором сернокислого анилина

Обозначения: 1 – протопласт, 2 – клеточная стенка, 3 – полость клетки

Первичная кора как видно на поперечных срезах сложена из тонкостенных паренхимных клеток, на поперечных срезах клетки овальной реже округлой формы с крупными межклетниками. Клеточные стенки их в основном целлюлозные (рис. 33А, рис. 33Б). Изредка встречаются клетки с лигнифицированными оболочками (рис. 33А). Протопласты клеток аморфные, слабо пигментированные. В паренхиме первичной коры

встречаются многочисленные мелкие друзы оксалата кальция, хорошо визуализированные на продольных срезах корней (рис. 32А, рис. 33В).

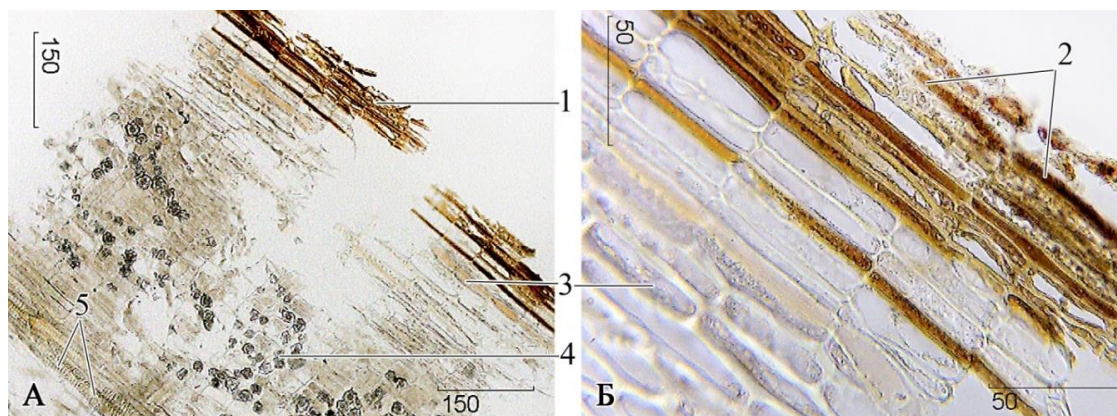


Рисунок 32 – Продольный срез корня лабазника шестилепестного диаметром 2 мм: А – фрагмент пробки (x100); Б – фрагмент пробки (x400)

Обозначения: 1 – экзодерма, 2 – бурый протопласт, 3 – клетки первичной коры, 4 – друзы оксалата кальция, 5 – сосуды

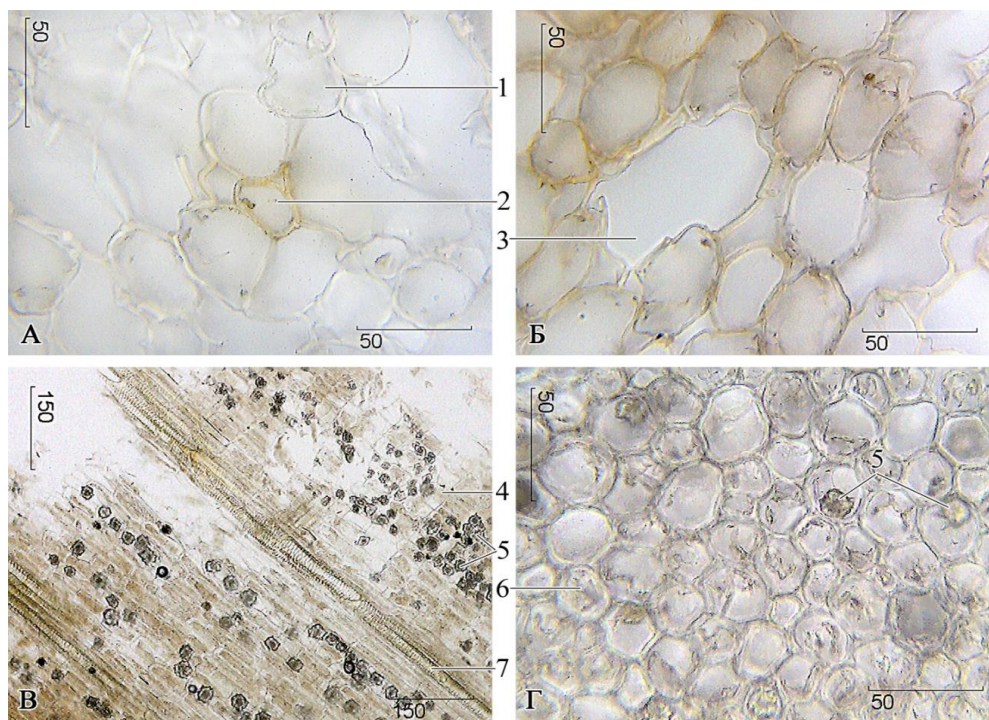


Рисунок 33 – Корень лабазника шестилепестного диаметром 2 мм:

А – окраска 10% раствором сернокислого анилина, поперечный срез (x400);
Б – окраска раствором Люголя, поперечный срез (x400); В – продольный срез (x100); Г – сердцевина, поперечный срез (x400)

Обозначения: 1 – клетка паренхимы, 2 – клетка с лигнифицированными останками, 3 – воздушная полость, 4 – паренхима первичной коры, 5 – друзы оксалата кальция, 6 – паренхима сердцевины, 7 – спиральные сосуды

На поперечных срезах хорошо заметны проводящие элементы ксилемы и флоэмы камбиального происхождения, собранные в пучки коллатерального типа. Пучки расположены по кругу и разделены между собой паренхимой сердцевинных лучей (рис. 34А).

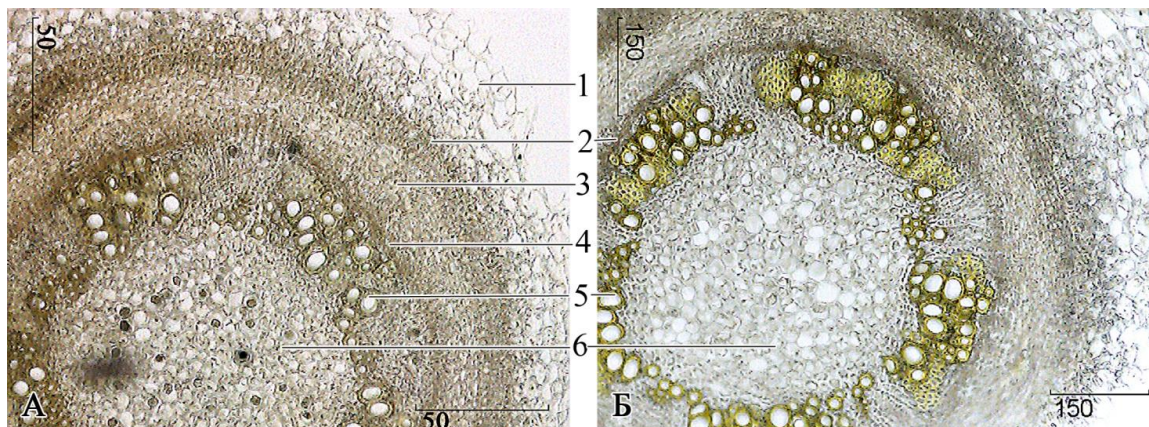


Рисунок 34 – Поперечное сечение корня лабазника шестилепестного диаметром 2 мм. Поперечный срез (x100): А – фрагмент до окрашивания; Б – окраска 10% раствором сернокислого анилина

Обозначения: 1 – паренхима первичной коры, 2 – эндодерма, 3 – флоэма, 4 – камбий, 5 – ксилема, 6 – сердцевина

Мелкопросветные проводящие элементы первичной ксилемы расположены радиально. Лучи первичной ксилемы, как правило, пять, они армированы клетками ксилемной склеренхимы, стенки которой сильно утолщены. Большая часть ксилемных элементов лигнифицирована (рис. 35А).

Флоэма мелкоклеточная, по периферии имеет клетки с утолщенными целлюлозными оболочками (рис. 35А, рис. 35Б).

Внутренний слой первичной коры – эндодерма, визуально диагностируется обработкой реактивом Судана III и окрашивается в розовый цвет (рис. 35Б).

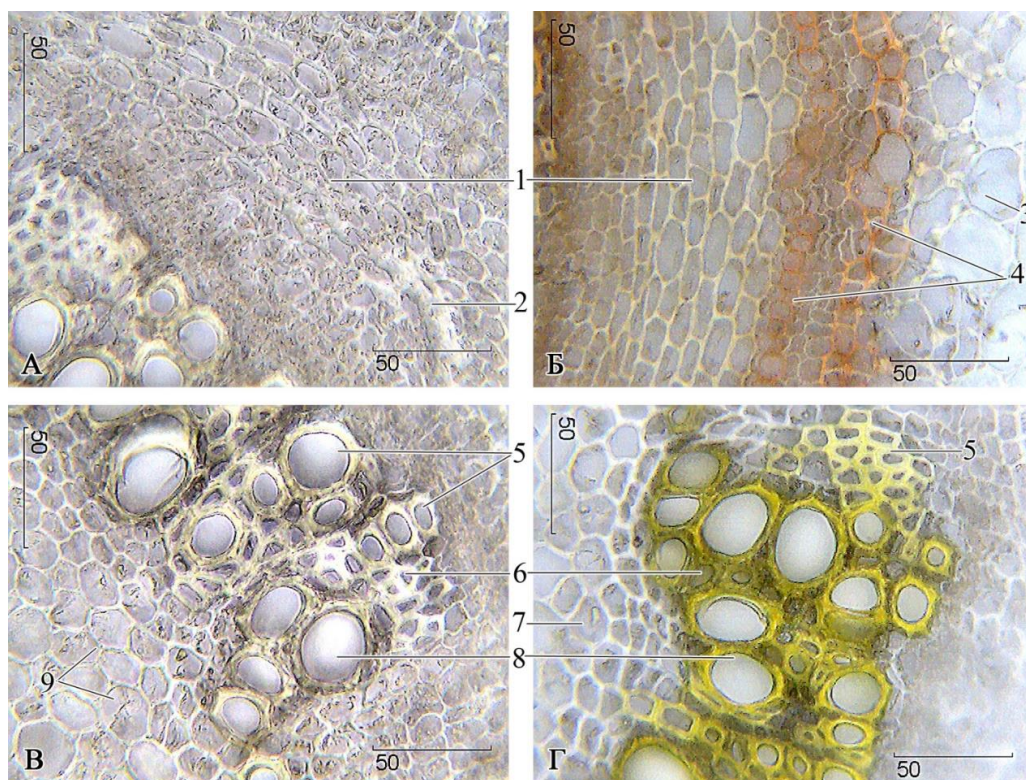


Рисунок 35 – Поперечные сечения корня лабазника шестилепестного диаметром 2 мм. Поперечный срез (х400): А – фрагмент флоэмы до окраски; Б – окраска флоэмы раствором Судана III; В – фрагмент ксилемы до окраски; Г – окраска ксилемы 10% раствором сернокислого анилина
 Обозначения: 1 – клетки флоэмы, 2 – утолщенные стенки, 3 – коровая паренхима, 4 – эндодерма, 5, 6 – паратрахеальная паренхима ксилемы, 7, 9 – паренхима сердцевины, 8 – сосуды ксилемы

Полученные данные морфолого-анатомического анализа надземной и подземной лабазника шестилепестного позволили провести сравнение изученных нами признаков гистологического строения сырья лабазника вязолистного. Результаты сравнения приведены в таблице 1, 2 и 3 Приложения 2.

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

- Морфологические особенности. У плодов лабазника вязолистного односемянная листовка по форме продолговато-выпуклая с оттянутым носиком на верхушке с голым

околоплодиком, у лабазника шестилепестного односемянная листовка по форме каплевидная, горизонтально оттянутым на верхушке носиком и околоплодиком с прижатым по поверхности опушением.

- Характер эпидермиса экзокарпия. У плодов лабазника вязолистного на поперечном срезе форма клеток продолговатая, неправильная. Клеточные стенки извилистые, тонкостенные, плотно прилегающие друг к другу. У плодов лабазника шестилепестного на поперечном срезе форма клеток угловатая, неправильная. Клеточные стенки заметно утолщены.
- Характер опушения экзокарпия. Плоды лабазника вязолистного на поверхности имеют волоски простые одноклеточные, немногочисленные. Плоды лабазника шестилепестного имеют ретортовидные многочисленные волоски имеющие округло-расширенные основания и острые оттянутые верхушки.

Таким образом, нами изучены морфолого-анатомические признаки плодов и подземных органов лабазника вязолистного, произрастающего в районах Приволжского федерального округа в сравнении с примесным видом, лабазников шестилепестным. 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 «Лабазника вязолистного плоды».

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

Результаты проведенных морфолого-анатомических исследований надземных и подземных частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного позволяют сделать следующие выводы:

1. В ходе морфолого-анатомического исследования выявлена высокая степень сходства анатомических и гистологических признаков у цветков лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. Предложены селективные признаки дающие межвидовую таксацию для данных видов. Так у цветков лабазника шестилепестного лепестки удлинено-обратно-яйцевидные, с короткими ноготками, а у цветков лабазника вязолистного лепестки с длинными ноготками. В цветках лабазника шестилепестного обнаружены нектарники, которые размещаются по одному на пластинке у основания с внутренней и верхней стороны чашелистика, что не наблюдается у цветков лабазника вязолистного.

2. Впервые изучены анатомо-гистологические и люминесцентные особенности плодов двух видов лабазника.

3. Выявлены различия плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного заключающихся в особенностях морфологического строения, анатомо-гистологических особенностях (характер эпидермиса экзокарпия, характер опушения экзокарпия).

4. Для подтверждения подлинности плодов лабазника вязолистного определен следующий набор диагностически значимых признаков:

- переходный тип строения стели плодоножек;
- наличие в плодоножках, неравномерно расположенных лизигенные вместилищ;
- опушение эпидермиса простыми одноклеточными трихомами;
- трехслойная структура перикарпия;
- значительное количество монокристаллов в паренхиме листовки;

- конусовидную форму проводящего пучка в области шва листовки;
- обильный эндосперм семени, окружающий зародыш.

5. Для подтверждения подлинности плодов лабазника шестилепестного определены следующий набор диагностически значимых признаков:

- ретортовидные волоски, составляющие густое опушение околоцветника и многолисточка;
- многослойный эндокарпий из склеренхимных волокон;
- структура зародыша.

6. Признаки, имеющие диагностическое значение, могут быть рекомендованы нами для внесения в раздел «Микроскопия» проекта фармакопейной статьи на новые виды лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды».

7. Выявлены различия подземных органов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного заключающихся в особенностях морфологического строения, анатомо-гистологических особенностях проводящей системы.

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНОЙ И ПОДЗЕМНОЙ ЧАСТЕЙ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО И ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО

В рамках фитохимического исследования провели выделение из препаратов плодов лабазника вязолистного индивидуальных веществ методом колоночной хроматографии и их идентификацию, качественное и количественное определение доминантного БАВ, скрининговый ТСХ-анализ водно-спиртовых извлечений из сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного, определение спектральных характеристик извлечений, изучение динамики накопления веществ.

4.1. Выделение индивидуальных веществ из плодов лабазника вязолистного

Выделение индивидуальных соединений провели методом колоночной хроматографии. Исследованию подвергли настойку плодов лабазника вязолистного, полученную методом перколяции на 70%-ном спирте этиловом. Из 200 г сырья получили 1000 мл водно-спиртового извлечения. Для проведения колоночной хроматографии 950 мл настойки лабазника вязолистного упарили в роторном вакуумном испарителе примерно до 100 мл. Полученное в результате упаривания концентрированное извлечение наносили на сорбент - силикагель L 40/100, затем высушивали полученную пробу. Навеска сорбента для пробы - 60,0 г (примерно 30% от массы сырья).

Приблизительно такое же количество сорбента отмеривали для колоночной хроматографии.

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

веществ получили 72 фракции. Схема элюирования представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема элюирования компонентов водно-спиртового извлечения из плодов лабазника вязолистного

№ фракции	Состав элюента, об %			Объем фракций, мл
	Хлороформ	Спирт этиловый 96%	Вода	
1-4	100	0	0	500
5-7	97	3	0	500
8-12	95	5	0	500
13-17	93	7	0	500
18-25	90	10	0	1000
26-33	85	15	0	1000
34-41	80	20	0	1000
42-45	70	30	0	500
46-49	60	40	0	500
50-59	60	50	0	1500
60-62	40	60	0	500
63-67	0	100	0	1000
68-72	0	0	100	1500

Полученные в результате элюирования фракции из плодов лабазника вязолистного собирали в маркированные ёмкости и упаривали в вакуумном испарителе до объёма примерно 5-10 мл. Полученные концентрированные фракции переносили в пенициллиновые флаконы и затем подвергали дальнейшему исследованию.

Контроль за ходом элюирования проводили визуально (по интенсивности окраски раствора), а также с использованием метода ТСХ. На хроматографическую пластинку «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ», предварительно активированную в сушильном шкафу при 105°C, капилляром наносили образцы концентрированных фракций. Разделение проводили в системе растворителей хлороформ–спирт этиловый–вода (в соотношении 26:16:3). После прохождения фронтом примерно 7-8 см пластинку вынимали, высушивали и просматривали в УФ-свете при длине

волны 366 нм и 254 нм, затем обрабатывали щелочным раствором ДСК и вновь просматривали.

В качестве объекта – свидетеля использовали настойку (1:5) плодов лабазника вязолистного на 70%-ном спирте этиловом и стандартные образцы: ГСО рутина, ГСО кверцетина, ГСО кемпферола.

4.1.1. Физико-химические и спектральные характеристики выделенных индивидуальных веществ из плодов лабазника вязолистного

В результате колоночной хроматографии получены 72 фракции и выделены 6 индивидуальных веществ. После перекристаллизации веществ для их идентификации определили температуры плавления и исследовали с помощью ТСХ, УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-, масс-спектрометрии.

Четыре из шести выделенных веществ идентифицировали как флавоноиды: два флавона – лютеолин (синоним лютеолол) и кверцетин, два глюкозида кверцетина - изокверцитрин и спиреозид. Пятое соединение – растительный стероидный спирт эргостерин (синоним эргостерол), шестое – сапонин лупеол – основной в группе пентациклических тритерпенов. Химические формулы, названия веществ и сырьевой источник представлены в таблице 1 главы 1 «Обзор литературы». Характеристики биологически активных веществ, впервые выделенных из плодов лабазника вязолистного, произрастающего в Самарской области, представлены ниже.

Лютеолин (5,7,3¹,4¹-тетрагидроксифлавоон). Светло-желтое кристаллическое вещество состава $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ с т.пл. 329-330 °С.

УФ-спектр: λ_{max} EtOH 257 нм, 268 нм (пл), 355 нм; + NaOAc 273 нм, 375 нм; + NaOAc + H_3BO_3 273 нм, 380 нм; + AlCl_3 273 нм, 405 нм; + AlCl_3 + HCl 270 нм, 401 нм.

^1H -ЯМР-спектр: (300 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,63 (1H, с, 5-OH), 10,78 (1H, с, 7-OH), 9,32 (2H, уш. с, 3¹- и 4¹-OH), 7,68 (1H, д, 2.5 Гц, H-2¹), 7,52 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 6,91 (1H, с, H-3), 6,82 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,28 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6,15 (1H, д, 2.5 Гц, H-6).

Кверцетин (3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлавонон). Желтое кристаллическое вещество состава C₁₅H₁₀O₇ с т.пл. 314-315 °С (метанол-хлороформ).

УФ-спектр: $\lambda_{\max}$ EtOH 257 нм, 268 нм (пл), 375 нм; + NaOAc 273 нм, 386 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 273 нм, 390 нм; + AlCl₃ 273, 405 нм; + AlCl₃ + HCl 270 нм, 401 нм.

¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d₆, δ , м.д., J/Гц): 12,63 (1H, с, 5-OH), 10,78 (1H, с, 7-OH), 9,60 (1H, с, 3-OH), 9,32 (2H, уш. с, 3¹- и 4¹-OH), 7,67 (1H, д, 2,5 Гц, H-2¹), 7,53 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 6,84 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,38 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,17 (1H, д, 2,5 Гц, H-6).

¹³C-ЯМР спектр (126,76 МГц, DMSO-d₆, δ_c , м.д.): C-4 (175,86), C-7 (163,91), C-5 (160,77), C-9 (156,15), C-2 (156,15), C-3¹ (147,72), C-4¹ (146,08), C-3 (135,72), C-1¹ (121,98), C-6¹ (120,01), C-2¹ (115,76), C-5¹ (115,63), C-10 (103,03), C-8 (98,21), C-6 (93,39).

Масс-спектр (70 eV, 200 °С, m/z, %): 302 (100%), 153 (27%), 137 (15 %).

Изокверцитрин (3-O- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлавонона или β -D-глюкозил-3-кверцетин). Светло-желтое кристаллическое вещество состава C₂₁H₂₂O₁₂ с т.пл. 238-240 °С (водный спирт).

УФ-спектр: $\lambda_{\max}$ EtOH 257 нм, 268 нм (пл), 361 нм; + NaOAc 273 нм, 381 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 273 нм, 381 нм; + AlCl₃ 273 нм, 412 нм; + AlCl₃ + HCl 270 нм, 401 нм.

¹H-ЯМР-спектр (300 МГц, DMSO-d₆, δ , м.д., J/Гц): 12,63 (1H, с, 5-OH), 9,52 (1H, с, 7-OH), 9,05 (1H, с, 4¹-OH), 7,63 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 7,53 (1H, д, 2,5 Гц, H-2¹), 6,83 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,38 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,19 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,34 (1H, д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкозы), 3,2-4,6 (м, 6H глюкозы).

Масс-спектр: (ESI-MS, 180 °С, m/z): M⁺ 465 (464 + H), M⁺ 487 (464 + Na), M⁺ 503 (464 + K).

Спиреозид (4¹-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3¹,4¹-пентагидрокси флавоны). Светло-желтое кристаллическое вещество состава C₂₁H₂₂O₁₂ с т. пл. 228-230 °C (водный спирт).

УФ-спектр: λ_{max} EtOH 260 нм, 274 нм (пл), 372 нм; + NaOAc 276 нм, 384 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 276 нм, 384 нм; + AlCl₃ 265 нм, 274, 424 нм; + AlCl₃ + HCl 265 нм, 274, 424 нм.

¹H-ЯМР-спектр: (300 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12,39 (1H, с, 5-OH), 9,50 (1H, с, 7-OH), 9,03 (1H, с, 3-OH), 7,68 (1H, д, 2.5 Гц, H-2¹), 7,63 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 7,24 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,43 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6,20 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 4,86 (1H, д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкозы), 3.2-4,7 (м, 6H глюкозы).

¹³C-ЯМР спектр (126,76 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.): C-4 (176,05), C-7 (164,09), C-5 (160,73), C-9 (156,26), C-2 (156,26), C-4¹ (146,79), C-3¹ (148,38), C-3 (136,41), C-1¹ (125,16), C-6¹ (121,97), C-2¹ (115,68), C-5¹ (115,28), C-10 (103,92), C-1¹¹ глюкозы (101,40), C-8 (98,28), C-6 (93,53), C-3¹¹ (77,28), C-4¹¹ (75,97), C-5¹¹ (75,84), C-2¹¹ (73,28), C-6¹¹ (60,76).

Масс-спектр: (ESI-MS, 180 °C, m/z): M⁺ 465 (564 + H), M⁺ 487 (464 + Na), M⁺ 503 (464 + K).

Лулеол. Белое кристаллическое вещество состава C₃₀H₅₀O с т.пл. 214-216 °C (спирт этиловый).

¹H-ЯМР спектр: (300 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 0,64 (3H, с, CH₃-27), 0,87 (6H, с, CH₃-23 и CH₃-26), 0,90 (6H, с, CH₃-24 и CH₃-25), 1,17 (3H, с, CH₃-28), 1,40 (3H, с, CH₃-30), 1,0-2,4 (25H), 2,48 (1H, м, H-2), 3,23 (1H, уш.с, H-3), 5,11 (1H, с, H-29a), 5,15 (1H, с, H-29b).

¹³C-ЯМР спектр: (126,76 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.) (фрагмент): 15,11 (C-27), 16,29 (C-23), 16,59 (C-24), 16,83 (C-26), 16,90 (C-25), 18,04 (C-28), 18,17 (C-6), 19,70 (C-30), 21,08 (C-11), 25,61 (C-2), «7,22 (C-12), 27,84 (C-15), 30,23 (C-21), 33,37 (C-7), 36,34 (C-16), 37,29 (C-10), 38,12 (C-1), 38,29 (C-4), 39,13 (C-13), 39,36 (C-22), 41,65 (C-8), 42,61 (C-14), 45,71 (C-17), 47,07 (C-18), 52,40 (C-9), 54,86 (C-5), 78,86 (C-3), 121,50 (C-22), 143,81 (C-20).

Масс-спектр: (70 eV, 200 °C, m/z, %): M^+ 426 (5), 248 (100), 203 (70), 189 (23), 133 (53).

Эргостерин. Белое мелкокристаллическое вещество состава $C_{28}H_{44}O$ с т. пл. 162-164 °C (спирт этиловый).

УФ-спектр: $\lambda_{\max}$ EtOH 271 нм.

1H -ЯМР-спектр (300 МГц, (ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 5,29 (2H, H-6, H-7), 4,18 (2H, д, 7,7 Гц, H-22, H-23), 3,62 (1H, м, H-3), 1,0-3,8 (21H), 0,60-1,20 (18H шести CH_3).

Масс-спектр (70 eV, 200 °C, m/z, %): 396 (M^+ , 28), 255 (8), 177 (27).

Информация о нахождении в растениях рода Лабазник эргостерина – полициклического спирта из группы стероидов, в литературе не найдена. Как известно, эргостерин является биологическим прекурсором (провитамином) витамина D_2 (эргокальциферола), промышленное значение эргостерина определяется возможностью получения из него витамина D_2 . Но фитостерины – растительные стероидные спирты, широко используются в косметике, медицине, в качестве пищевых добавок. Известна и возможность противоракового действия эргостерина.

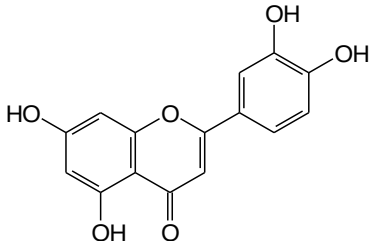
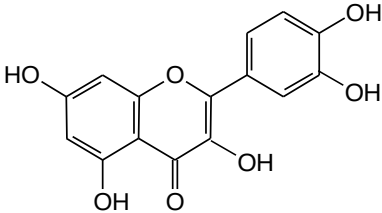
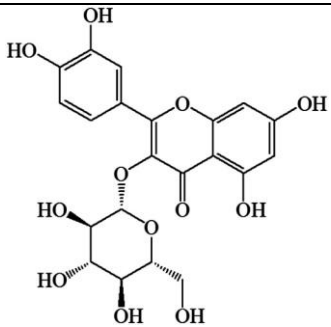
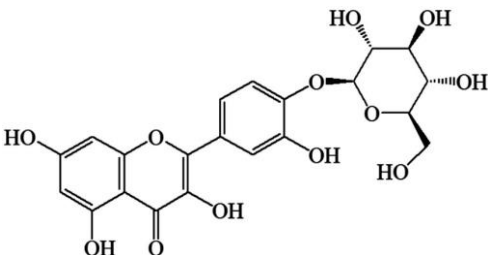
Идентификация в плодах лабазника вязолистного сапонины лупеола – основного в группе пентациклических тритерпенов, не удивительна, так как известен факт широкого распространения сапонинов в растительном мире, особенно среди растений семейств розоцветных и гвоздичных. Наличие лупеола позволяет прогнозировать уже известные для сапонинов различных растений противовоспалительное, диуретическое, седативное, тонизирующее и другие действия.

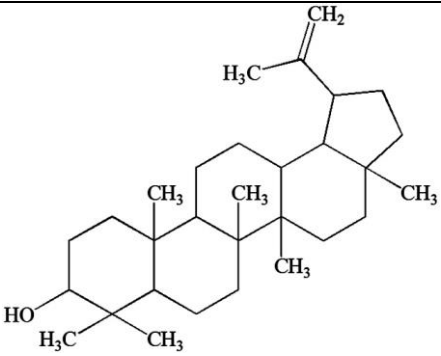
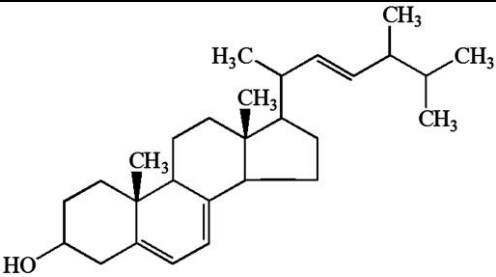
Основную группу действующих веществ, которые определяют лечебную ценность плодов лабазника вязолистного, как и плодов лабазника шестилепестного, представляют флавоноиды. Это естественно, поскольку известно, что флавоноидами богаты высшие растения, относящиеся к семействам розоцветных, а к розоцветным относятся и лабазники. Многообразие химической структуры флавоноидов сказывается на

проявлении ими большого количества различных фармакологических эффектов, среди которых главным считается антиоксидантный.

Структурные формулы, названия и физико-химические характеристики выделенных и идентифицированных соединений представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Физико-химические характеристики соединений, выделенных из плодов лабазника вязолистного, произрастающего в Самарской области

№ п/п	Структура	Название, физико-химические характеристики
1		Лютеолин. 3', 4', 5,7-Тетрагидроксифлавоон. $C_{15}H_{10}O_6$, 286,24 г/моль. Кристаллическое вещество светло-жёлтого цвета. Т.пл. 329-330 °С.
2		Кверцетин. 3, 5,7,3',4', - Пентагидроксифлавоон. $C_{15}H_{10}O_7$, 302,24 г/моль. Кристаллическое вещество жёлтого цвета. Т.пл. 314-315 °С (метанол-хлороформ).
3		Изокверцитрин. Глюкозил-3-кверцетин. $C_{21}H_{20}O_{12}$, 464,38 г/моль Кристаллическое вещество светло-жёлтого цвета. Т.пл. 238-240 °С (водный спирт).
4		Спиреозид. 4'-О-β-D-Глюкозид кверцетина. $C_{21}H_{22}O_{12}$, 464,38 г/моль. Кристаллическое вещество светло-жёлтого цвета. Т.пл. 228-230 °С (водный спирт).

5		Лулеол (фагастерол). $C_{30}H_{50}O$, 426,72 г/моль. Кристаллическое вещество белого цвета. Т.пл. 214-216 °С (спирт этиловый).
6		Эргостерин (эргостерол). Эргоста-5,7,22-триен-3β-ол. $C_{28}H_{44}O$, 396,65 г/моль. Мелкокристаллическое вещество белого цвета. Т. пл. 162-164 °С (спирт этиловый).

1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР- и масс-спектры выделенных веществ представлены в Приложении 3.

4.2. Сравнительное хроматографическое и спектральное исследование надземной и подземной частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного

Для разработки ЛРП на основе плодов лабазника, необходимо подтвердить и уточнить особенности выделения целевых групп биологически активных соединений (БАС) из сырья.

Исследовали водно-спиртовые извлечения из цветков, травы, плодов, корней с корневищами лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. В качестве экстрагентов использовали спирт этиловый в концентрациях 40%, 70%, 95%, а также хлороформ.

ТСХ-анализ проводили на пластинках «Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ» в системах: спирт *n*-бутиловый-ледяная кислота уксусная-вода (4:1:2) для гидрофильных веществ; хлороформ-спирт этиловый-вода (26:16:3) и хлороформ–спирт этиловый (19:1) для гидрофобных веществ. Результат оценивали, просматривая хроматограммы в УФ-свете при $\lambda=366$ и 264 нм, а

также после обработки реактивами ДСК, 20%-ным раствором кислоты серной, ФВК при нагревании до 100 °С.

В качестве оптимальной системы растворителей определена система хлороформ-спирт этиловый-вода (26:16:3), в качестве экстрагента - 70%-ный спирт этиловый. На хроматограммах водно-спиртовых извлечений на основе 70%-ного спирта этилового в видимой области обнаружили пятно, имеющее внешнее сходство с пятном рутина, с величиной R_f около 0,45 в виде доминирующего пятна желто-оранжевого цвета для надземных органов лабазника вязолистного и с несколько менее интенсивным окрашиванием для подземной части (рис. 36).

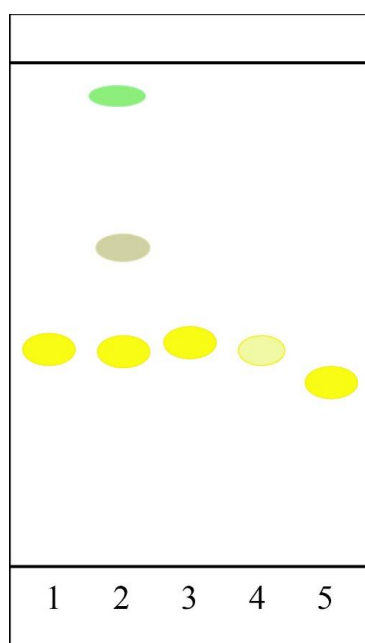


Рисунок 36 – Схема хроматограммы водно-спиртовых извлечений из надземных и подземных органов лабазника вязолистного 70%-ным спиртом этиловым

Обозначения: 1 – извлечение из плодов; 2 - извлечение из травы; 3 - извлечение из цветков; 4 – извлечение из корней и корневищ; 5 – ГСО рутина

Аналогично выглядит хроматограмма с извлечениями из плодов лабазника шестилепестного, но с менее интенсивной окраской пятен.

При хроматографировании водно-спиртовых и хлороформных извлечений из плодов двух видов лабазника в системе хлороформ – этиловый

спирт (19:1) выявили наличие в плодах стеринных и сапониновых соединений.

При детектировании хроматограмм хлороформных извлечений исследуемых образцов облучением УФ-светом при $\lambda = 366$ нм наблюдали ярко выраженную розовую флуоресценцию пятен хлорофилла с подвижностью $R_f \approx 0,70$.

В водно-спиртовых извлечениях 70%-ным спиртом этиловым и в извлечениях 96%-ным спиртом этиловым так же, но менее интенсивно, наблюдали проявление хлорофилла в извлечениях.

При обработке 20%-ным раствором кислоты серной с последующим нагревом до 100°C детектировали на хроматограммах водно-спиртовых и хлороформных извлечений пятна розового цвета с коэффициентом подвижности $R_f \approx 0,50$, характерные для тритерпеновых сапонинов и РСО олеаноловой кислоты ($R_f \approx 0,52$). Кроме того, детектировали окрашенные пятна веществ с коэффициентом подвижности $R_f \approx 0,59$, характерные для фитостеринов, имеющих сходство с РСО β -ситостерином ($R_f \approx 0,60$).

При проявлении хроматографической пластинки фосфорномолибденовой кислотой с последующим нагревом до 100°C наблюдали в случае водно-спиртовых (70%-ным и 96%-ным спиртом этиловым) и хлороформных извлечений из плодов двух видов лабазника темные окрашивания с коэффициентом подвижности пятен $R_f \approx 0,59$, что характерно для фитостеринов, а в случае лабазника вязолистного - насыщенно темные окрашивания с коэффициентом подвижности пятен $R_f \approx 0,50$, что характерно для тритерпеновых сапонинов.

Итак, хроматографическое исследование химического состава органов надземной и подземной частей растений позволило выявить сходство двух родственных видов лабазника.

Обнаружение в извлечениях вещества фенольной природы, близкого по строению флавоноиду рутину, определило интерес к сравнительной оценке содержания суммы флавоноидов в надземных и подземных частях лабазника

вязолистного и лабазника шестилепестного методом дифференциальной спектрофотометрии.

Для указанного исследования нами разработана методика.

Готовили извлечение из сырья лабазника. Для приготовления извлечения брали около 1,0 г измельченного сырья с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм и помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 70%-ного спирта этилового. Колбу закрывали пробкой и взвешивали на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г, после чего колбу присоединили к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем колбу охлаждали в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывая той же пробкой, снова взвешивали и добавляли экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр (красная полоса).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовили следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 3%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и доводили объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (испытуемый раствор А).

Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 минут после приготовления.

В качестве раствора сравнения использовали раствор, полученный следующим образом: 2 мл извлечения (1:50) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (раствор сравнения А).

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

$$x = \frac{D_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot m_x \cdot (100 - W)} \cdot 100\%,$$

где D_x – оптическая плотность исследуемого раствора, m_0 – масса ГСО рутин г, D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутин, m_x – масса исследуемого сырья г, W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Результаты спектрофотометрического исследования содержания суммы флавоноидов в сырье лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Содержание суммы флавоноидов в сырье лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного

№ n/n	Вид сырья лабазника	Экстрагент	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
1	Цветки лабазника вязолистного	70% спирт этиловый	3,03±0,02
2	Трава лабазника вязолистного	70% спирт этиловый	2,40±0,01
3	Плоды лабазника вязолистного	70% спирт этиловый	2,55±0,02
4	Корни с корневищами лабазника вязолистного	70% спирт этиловый	1,94±0,02
5	Цветки лабазника шестилепестного	70% спирт этиловый	2,76±0,03
6	Трава лабазника шестилепестного	70% спирт этиловый	2,09±0,02
7	Плоды лабазника шестилепестного	70% спирт этиловый	2,40±0,01
8	Корни с корневищами лабазника шестилепестного	70% спирт этиловый	1,5±0,03

Как видно из таблицы 3, содержание суммы флавоноидов в сырье лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного имеет схожий характер. Однако, в сырье лабазника вязолистного веществ фенольной природы (флавоноидов) все же больше. Количественное содержание флавоноидов в плодах лабазника вязолистного не уступает по содержанию

этих веществ в цветках или в траве изучаемого вида, что даёт основание утверждать перспективность использования плодов в фармацевтической практике в качестве источника БАС.

4.3. Сравнительное исследование фракционного состава белков и малатдегидрогеназы в сырье лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного

Из органических веществ, входящих в состав растений и других живых организмов, наиболее важными в биологическом отношении являются белковые вещества. В растениях белки выполняют разнообразные функции, важнейшими из которых являются:

1. Каталитическая (белки-ферменты катализируют биохимические реакции).
2. Запасная (запасные белки накапливаются в клетках зерна и семян, а затем при прорастании зерна и семян гидролизуются до аминокислот или молекулярных пептидов, используемых затем клеткой для формирования нового растения)
3. Защитная (защитные белки предохраняют живой организм от разрушения или способствуют его выживанию при повреждении, например, насекомыми-вредителями).
4. Структурная (структурные белки входят в состав покровных тканей растений, в том числе семян и плодов, составляют структурную основу биомембран клеток).

Проблема сохранения действующих веществ в лекарственном растительном сырье в процессе его сушки и хранения имеет самостоятельное теоретическое, а также практическое значение и требует дальнейших исследований. Очевидно, что в процессе высушивания ЛРС молекулы белков теряют гидратную оболочку, при этом нарушаются четвертичная, третичная структура молекулы и биологическая активность. Формирование оптимальных значений температуры, pH и влажности способствует

ренатурации белка с восстановлением первоначальной конформации и каталитической функции [65, 137]. В связи с этим актуально исследование биохимических характеристик ЛРС. Основная масса белковых веществ концентрируется в семенах и плодах. Это объясняет интерес к определению содержания белка в плодах изучаемых видов лабазника.

С другой стороны, ферменты, со всей совокупностью изоферментных систем и их белковых кофакторов представляют собой в молекулярной биологии важнейшую область биологического и генетического маркирования организма с большим числом его теоретических и практических аспектов для многостороннего использования. Именно открытие изоферментов (множественные формы одного фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся по физическим и химическим свойствам: сродству к субстрату, максимальной скорости катализируемой реакции, электрофоретической подвижности, разной чувствительности к ингибиторам и активаторам, оптимуму pH и термостабильности) дало в руки исследователей простые и надёжные маркерные признаки для изучения самого широкого класса биологических явлений. Появились принципиально новые возможности маркирования генов и генетических систем. Изоферментные спектры могут служить основой для идентификации и регистрации сортов, документации генофонда культурных растений и диких сородичей с целью учёта, сохранения и использования в селекции. Специфичность спектров характеризуется как определённым числом изоферментов и их относительной активностью в исследованных органах, так и полным отсутствием изоферментов на фореграммах. Среди изоферментных систем значительное место занимают дегидрогеназы, к числу которых относится и НАД-зависимая малатдегидрогеназа (МДГ, L-малат, НАД-оксиредуктаза; К.Ф.1.1.1.37) – широко распространённый фермент животных, растений и микроорганизмов. Имеются данные о том, что малат играет существенную роль в поддержании внутренних физиологических условий растительных клеток. Растительная малатдегидрогеназная система

представляет собой ассоциат белков, способный четко реагировать на физиологическое состояние и потребности растительного организма, а также изменение окружающей среды. Малатдегидрогеназный комплекс представлен четырьмя дегидрогеназами, две из которых обладают оксидоредуктазной активностью, а две другие - декарбоксилирующие МДГ [156]. Каждый изофермент малатдегидрогеназы кодируется отдельным геном, и аминокислотный состав у разных изоферментов неодинаков. Как показали работы многих исследователей высокий уровень активности МДГ в разных органах и тканях, чёткое фенотипическое проявление изоферментных спектров делают этот фермент надёжным и удобным генетическим маркером в популяционно-генетических исследованиях. В научной литературе представлено немало работ по изучению МДГ растений, например, детально изучена органная специфичность НАД-МДГ у сахарной свёклы [155] но отсутствуют работы, посвящённые плодам лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. Это объясняет интерес к изучению НАД-МДГ у обсуждаемых видов лабазника.

Анализ суммы белков проводили методом прямой спектрофотометрии с использованием биуреточного реактива [39]. Исследования проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 500 нм.

Результаты количественного содержания суммы белка в исследуемых плодах лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Содержание суммы белка в плодах лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного

№ п/п	Вид сырья	Содержание суммы белка, %
1	Плоды лабазника вязолистного	7,80±0,81
2	Плоды лабазника шестилепестного	7,61±0,64

Для сравнительного исследования фракционного состава белков и малатдегидрогеназы использовали электрофорез в полиакриламидном геле.

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования биомолекул, таких как, например, аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты. В современной научной литературе редко можно встретить статью, в которой бы на той или иной стадии фракционирования или характеристики этих биополимеров не был использован электрофорез. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, электрический заряд и др.

Передвижение частиц при электрофорезе зависит от ряда факторов, основными из которых являются: напряженность электрического поля, величина электрического заряда, скорость и размер частицы, вязкость, pH и температура среды, а также продолжительность электрофореза. Количественной характеристикой передвижения частиц является электрофоретическая подвижность.

О результатах электрофоретического исследования судили по числу электрофоретических зон на гелевых пластинках после проявления и величинам относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). Идентификацию проводили путём сопоставления ОЭП зон, полученных на электрофореграмме пробы, с ОЭП рабочих стандартных растворов.

При проведении электрофоретического анализа во всех извлечениях из свежего растительного сырья лабазника вязолистного и шестилепестного обнаружили белки (табл. 5). На электрофореграммах свежей травы лабазника регистрировали две фракции неспецифических белков: в траве лабазника вязолистного белки с ОЭП 0,68 и 0,75; в траве лабазника шестилепестного - с близкими к этим значениям ОЭП 0,65 и 0,77.

В образце из высушенной травы лабазника вязолистного отмечали две фракции неспецифических белков со значениями ОЭП 0,37 и 0,52 через 24 часа, но только одну фракцию с ОЭП 0,66 после 72 часов увлажнения в

процессе пробоподготовки. В образце из высушенной травы лабазника шестилепестного отмечали две фракции неспецифических белков со значениями ОЭП 0,42 и 0,62 через 24 часа, и две фракции с ОЭП 0,65 и 0,78 после 72 часов увлажнения в процессе пробоподготовки.

Через 120 часов экспозиции во влажной среде на электрофореграммах этих образцов белковые фракции не наблюдали, что, по-видимому, связано с активной деструкцией макромолекул и образованием маленьких частиц, легко диффундирующих через поры геля. Таким образом, продолжительность экспозиции во влажной среде оказала существенное влияние на траву исследуемых лабазников.

В образцах извлечений из свежих и высушенных цветков лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного тоже обнаружили наличие двух фракций неферментативных белков. Однако, в отличие от травы, на электрофореграммах образцов сухого ЛРС двух видов лабазника наблюдали активные зоны даже через 120 часов экспозиции во влажной среде.

Таблица 5 – Относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП) компонентов надземных органов двух видов лабазника

Лекарственное растительное сырье	Свежее ЛРС	Время экспозиции сухого ЛРС во влажной среде при T=20°C		
		24 час	72 час	120 час
	ОЭП*, (M±m)	ОЭП*, (M±m)	ОЭП*, (M±m)	ОЭП*, (M±m)
Трава лабазника вязолистного	0,68±0,02	0,37±0,02	0,66±0,02	-
	0,75±0,03	0,52±0,02	-	-
Трава лабазника шестилепестного	0,65±0,02	0,42±0,02	0,65±0,02	-
	0,77±0,03	0,62±0,02	0,78±0,03	-
Цветки лабазника вязолистного	0,40±0,02	0,40±0,03	0,70±0,02	-
	0,80±0,03	0,55±0,03	-	0,88±0,03
Цветки лабазника шестилепестного	0,39±0,02	0,23±0,03	0,65±0,02	-
	0,88±0,03	0,65±0,03	-	0,74±0,03
Плоды лабазника вязолистного	0,24±0,02	0,57±0,03	-	-
	0,80±0,03	0,85±0,03	0,85±0,03	0,85±0,03
Плоды лабазника шестилепестного	0,25±0,02	0,19±0,03	-	0,20±0,02
	0,90±0,03	0,75±0,03	0,75±0,03	0,75±0,03

В извлечениях из свежих плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного тоже обнаружили наличие двух фракций неферментативных белков с близкими значениями ОЭП: 0,24 и 0,25; 0,80 и 0,90 соответственно. В ходе эксперимента с высушенным растительным сырьем, экспозиционированным во влажной среде при комнатной температуре, установили, что обнаруженные в образцах через 24 часа экспозиции белки с ОЭП 0,85 для лабазника вязолистного и 0,75 для лабазника шестилепестного, обнаруживались на электрофореграммах образцов не только после 72-х часовой экспозиции, но и на электрофореграммах образцов высушенных плодов после 120-ти часовой экспозиции во влажной среде.

Исследование изоферментного спектра малатдегидрогеназы, привело к выводу о наличии МДГ-3 во всех образцах свежего ЛРС двух видов лабазника: на электрофореграммах всех образцов наблюдали активную зону, соответствующую по относительной электрофоретической подвижности МДГ-3 с ОЭП $\approx 0,28$ (табл. 6).

Таблица 6 – Относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП) МФ МДГ сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного

Лекарственное растительное сырье	МФ МДГ	Свежее ЛРС	Сухое ЛРС после экспозиции во влажной среде при 20 ⁰ С в течение 24 час
		ОЭП*, (М±m)	ОЭП*, (М±m)
Трава лабазника вязолистного	МДГ 3	0,30±0,02	-
Трава лабазника шестилепестного	МДГ 3	0,27±0,02	-
Цветки лабазника вязолистного	МДГ 3	0,30±0,02	0,29±0,03
Цветки лабазника шестилепестного	МДГ 3	0,25±0,02	0,29±0,03
Плоды лабазника вязолистного	МДГ 3	0,28±0,02	0,25±0,03
		-	-
Плоды лабазника шестилепестного	МДГ 3	0,25±0,02	-
	МДГ 1	-	0,70±0,02

В образцах из сухой травы двух видов лабазника изоферменты МДГ не обнаружили.

Электрофоретический анализ молекулярных форм малатдегидрогеназы в цветках двух видов лабазника позволил обнаружить в высушенном, но после экспозиции во влажной среде, сырье тот же изофермент МДГ-3.

Изоферментные спектры извлечений из плодов двух видов лабазника после экспозиции во влажной среде, оказались различны: на электрофореграмме извлечения из плодов лабазника вязолистного обнаружили МДГ-3, а на электрофореграмме извлечения из плодов лабазника шестилепестного - только МДГ-1

Таким образом, проведенный электрофоретический анализ извлечений из сырья двух видов лабазника позволил обнаружить две фракции белков с различной электрофоретической подвижностью.

Динамика активности молекулярных форм малатдегидрогеназы и изменение числа фракций неферментативных белков в органах вышеуказанных растениях носит индивидуальный характер и может быть основой для идентификации ЛРС.

Получено экспериментальное подтверждение необходимости хранения и сушки лекарственного растительного сырья при определённых, оптимальных для этого сырья, условиях, позволяющих сохранить действующие вещества.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Проведенные сравнительные фитохимические исследования надземной и подземной частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного с помощью методов тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии позволили выявить сходство химического состава близкородственных растений.

2. В результате исследования водно-спиртовых и хлороформных извлечений из цветков, травы, плодов, корней с корневищами лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного методом ТСХ определены оптимальный экстрагент (70%-ный спирт этиловый) и система растворителей (хлороформ-спирт этиловый-вода в соотношении 26:16:3).

3. Методом ТСХ в извлечениях из плодов двух видов лабазника обнаружены фитостерины, а в извлечениях из плодов лабазника вязолистного тритерпеновые сапонины.

4. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в надземных и подземных частях лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье

5. В результате изучения химического состава плодов лабазника вязолистного, произрастающего в Самарской области, с помощью колоночной хроматографии впервые выделены и идентифицированы 6 соединений: флавоны кверцетин и лютеолин, глюкозиды кверцетина изокверцитрин и спиреозид, сапонин лупеол, фитостерин эргостерин (эргостерол).

6. Количественное содержание суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного не уступает по содержанию этих биологически активных веществ в других органах изучаемого растения, что позволяет рекомендовать использование плодов в качестве источника БАС.

7. Методом прямой спектрофотометрии с использованием биуреточного реактива определено содержание суммы белков в плодах лабазника вязолистного ($7,80 \pm 0,81\%$) и лабазника шестилепестного ($7,61 \pm 0,64\%$).

8. Проведенный электрофоретический анализ извлечений из сырья двух видов лабазника позволил обнаружить две фракции неферментативных белков с различной электрофоретической подвижностью. Динамика активности молекулярных форм малатдегидрогеназы и изменение числа фракций неферментативных белков в органах вышеуказанных растениях носит индивидуальный характер и может быть основой для идентификации Лабазника.

ГЛАВА 5. ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЛОДОВ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО

Проведенное фитохимическое исследование представителей рода Лабазник позволило выявить группу БАС, на которую целесообразно опираться при анализе сырья. Для возможности использования нового вида сырья, плодов лабазника вязолистного, в медицинской и фармацевтической практике необходима разработка методик его качественного и количественного анализа для включения в проект нормативной документации.

5.1. Разработка методик стандартизации плодов лабазника вязолистного

В настоящее время фармакопейным сырьем на территории РФ являются цветки лабазника вязолистного (ВФС 42-1777-87). ВФС на цветки лабазника вязолистного рекомендует оценивать цветки по количественному содержанию флавоноидов (не менее 2%) в пересчете на гликозиды кверцетина (спиреозид) методом дифференциальной спектрофотометрии [31, 91].

В ГФ Республики Беларусь включены лабазника вязолистного трава и лабазника вязолистного цветки. Для определения подлинности сырья описаны внешние признаки, микроскопия, числовые показатели и методика определения наличия салицилового альдегида и метилсалицилата в эфирном масле травы с использованием ТСХ. Количественный анализ ориентирован на определение содержания эфирного масла в траве, а в цветках – на определение суммы флавоноидов по оптической плотности экстракта на 96%-ном спирте, в пересчёте на гликозиды кверцетина (спиреозид) [42].

Д.В. Моисеевым представлена методика идентификации и количественного определения флавоноидов в соцветиях лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* L.) методом жидкостной хроматографии. Для экстракции использовали 40%-ный спирт этиловый.

Томскими учеными (И.В. Шилова, И.А. Самылина, Н.И. Суслов) для стандартизации травы лабазника вязолистного предложен спектроскопический метод количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин. [146].

Ранее нами были проведены сравнительные фитохимические исследования сырья двух видов лабазника. В результате выявлено, что содержание действующих веществ в плодах лабазника не уступает другому химически изученному сырью данного рода.

Положительным аргументом является и то, что хранение плодов, в отличие от цветков лабазника не требует особых усилий и затрат.

Не соответствующие требованиям ФС условия хранения цветков лабазника, способствуют ускорению процесса порчи сырья. Лабазник является медоносным растением в связи с этим, на цветках данного вида могут находиться жуки – опылители, оказывающие неблагоприятные действия, повышающие микробное обсеменение и приводящие к порче лекарственного сырья. Внешними проявлениями порчи растительного сырья являются изменение цвета и загнивание, плесневение всего растения или его частей. При этом резко снижается содержание или полностью исчезают фармакологически активные вещества и использование такого недоброкачественного сырья становится бесполезным. Легко портятся цветки и листья, более устойчивыми являются плоды, что еще раз подтверждает целесообразность внедрения данного сырья в фармацевтическую практику.

Кроме того, внедрение нового вида ЛРС «Лабазника вязолистного плоды» будет способствовать решению проблемы комплексной переработки данного растения в рамках ресурсосберегающих технологий и создаст предпосылки для решения проблемы безотходного использования природных ресурсов.

5.1.1. Исследование влияния различных параметров экстракции на выход действующих веществ из плодов лабазника вязолистного

На начальном этапе разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного изучали влияние условий экстрагирования данной группы веществ из сырья.

Для определения оптимальных условий экстракции были выбраны следующие параметры: экстрагент, соотношение «сырье – экстрагент», а продолжительность экстракции.

Проводили экстракцию 40, 50, 60, 70, 80 и 96%-ным спиртом этиловым в соотношении «сырье - экстрагент» – 1:20, 1:30, 1:50 и 1:100 в течение 30, 45, 60, 90 и 120 минут (табл. 7).

Таблица 7 – Влияние условий экстракции на полноту извлечения флавоноидов из плодов лабазника вязолистного

Концентрация этилового спирта	Соотношение сырье – экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
40%	1:50	60	2,56±0,02
50%			2,60±0,03
60%			2,63±0,02
70%			2,66±0,02
80%			2,64±0,01
96%			2,40±0,02
70%	1:20	30	2,48±0,03
		45	2,51±0,02
		60	2,52±0,01
		90	2,50±0,02
	1:30	30	2,39±0,02
		45	2,40±0,02
		60	2,42±0,02
		90	2,38±0,02
	1:100	30	2,00±0,02
		45	2,08±0,03
		60	2,10±0,02
		90	1,95±0,03

В ходе исследования влияния условий экстракции на полноту извлечения флавоноидов установлены оптимальные условия экстракции флавоноидов из плодов лабазника вязолистного: экстрагент – 70%-ный спирт этиловый, соотношение «сырье–экстрагент» – 1:50, продолжительность экстракции – 60 минут.

5.1.2. Разработка методик качественного анализа плодов лабазника

ВЯЗОЛИСТНОГО

Для разработки подходов к стандартизации плодов лабазника вязолистного использованы результаты исследований компонентного состава сырья данного растения.

С целью проведения качественного анализа плодов лабазника вязолистного нами предлагается метод ТСХ с использованием в качестве стандартного образца флавоноида рутин, а также метод электронной спектроскопии водно-спиртового извлечения из плодов растения. Для определения наличия флавоноидов проводили качественные реакции с 1%-ным спиртовым раствором железа окисного хлорида, с порошком цинка в концентрированной хлористоводородной кислоте и с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида. Результаты этих предварительных испытаний подтвердили возможность присутствия флавоноидов в исследуемых образцах.

5.1.2.1. Тонкослойная хроматография

Исследованию подвергали плоды лабазника вязолистного, собранные в период плодоношения (июнь 2017 года) в поселке Алексеевка Самарской области.

В термостойкую коническую колбу на 100 мл помещали 1,0 г (точная навеска) измельчённого сырья и добавляли 50 мл 70%-ного спирта этилового. Колбу взвешивали вместе с содержимым, после чего подсоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60

минут после закипания содержимого. Через 60 минут колбу остужали, взвешивали, доводили массу содержимого до первоначального значения.

Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр во флакон темного стекла и использовали для нанесения на хроматографические пластинки. С помощью метода ТСХ-анализа в извлечении из плодов лабазника вязолистного 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» обнаружили зоны веществ, предположительно, фенольной 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 плодов лабазника вязолистного. В качестве веществ-свидетелей на ту же пластинку наносили спиртовый раствор ГСО рутина.

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 37.

На полученной хроматограмме видно, что в извлечениях из плодов лабазника вязолистного обнаруживается зона вещества с $R_f = 0,50$. По характеру свечения в УФ-свете, а также по окрашиванию реактивом ДСК можно сделать вывод, что данное вещество представляет собой вещество фенольной природы. В качестве стандартного образца в данном случае служил ГСО рутина. Как видно на хроматограмме, пятна всех извлечённых компонентов имеют внешнее сходство со стандартом, но располагаются чуть выше, что характерно для гликозидных форм флавонолов.

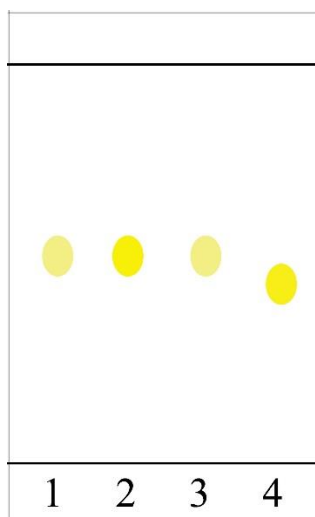


Рисунок 37 – Схема хроматограммы извлечения из плодов лабазника вязолистного. Система *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2)
Обозначения: 1 – извлечение из плодов лабазника вязолистного (1:50) 40%-ным спиртом этиловым; 2 – извлечение из плодов лабазника вязолистного (1:50) 70%-ным спиртом этиловым; 3 – извлечение из плодов лабазника вязолистного (1:50) 96%-ным спиртом этиловым; 4 – ГСО рутина

Окраска пятна извлечения 70%-ным спиртом этиловым более интенсивна по сравнению с окраской пятен других извлечений, что еще раз подтверждает правильность выбора экстрагента для данного сырья.

Таким образом, является рациональным использование в качестве вещества-стандарта ГСО рутина в методике качественного определения флавоноидов в плодах лабазника вязолистного.

5.1.2.2. УФ-спектроскопия

Для изучения электронного спектра извлечения из плодов лабазника вязолистного готовили извлечение. Для приготовления исследуемого раствора брали около 1 г сырья (точная навеска) измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм и помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 70%-ного спирта этилового. Колбу закрывали пробкой и взвешивали на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г, после чего колбу присоединили к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем

колбу охлаждали в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывая той же пробкой, снова взвешивали и добавляли экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр (красная полоса).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовили следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 3%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и доводили объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (испытуемый раствор А).

В качестве раствора сравнения использовали раствор, полученный следующим образом: 2 мл извлечения (1:50) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (раствор сравнения А).

Электронный спектр снимали на сканирующем спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena, Германия) в кювете с толщиной слоя 10 мм и на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, РФ).

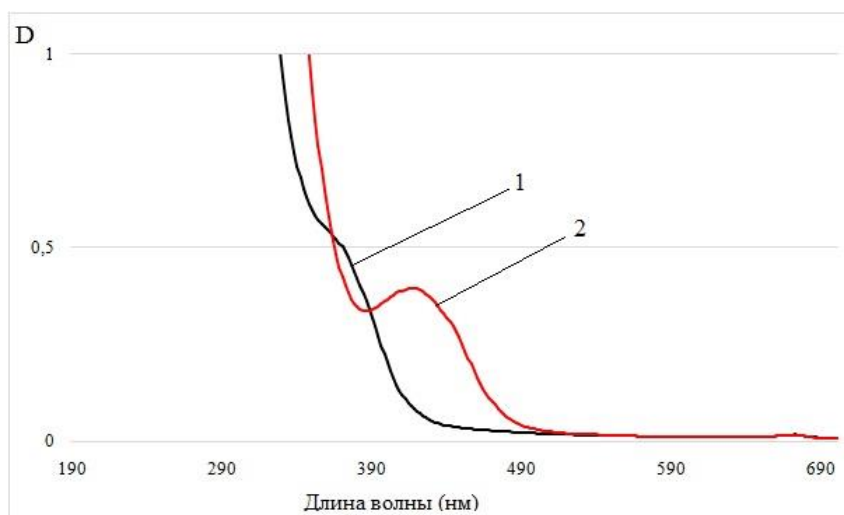


Рисунок 38 – Спектральная кривая водно-спиртового извлечения из плодов лабазника вязолистного

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

Для исключения вклада в значение оптической плотности других групп соединений, кроме флавоноидов, использовали реакцию комплексообразования с 3%-ным раствором алюминия хлорида. В результате батохромного сдвига наблюдали максимум поглощения окрашенного комплекса при длине волны 412 ± 2 нм (рис. 38).

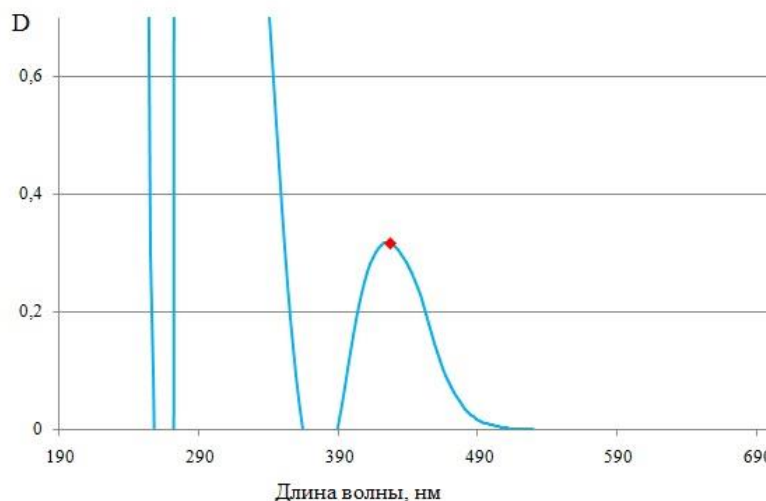


Рисунок 39 – Дифференциальная кривая спектра поглощения водно-спиртового извлечения из плодов лабазника вязолистного

Указанный максимум на дифференциальной кривой спектра поглощения характерен для гликозидных форм флавонолов, в частности, для рутина. В связи с этим в качестве аналитической длины волны нами выбрано значение около 412 нм (рис. 39), в качестве стандартного образца в методике количественного анализа – ГСО рутин.

5.2. Разработка методик количественного определения содержания фенольных веществ в плодах лабазника вязолистного

Плоды лабазника вязолистного для данного эксперимента были заготовлены на территории Самарской области в поселке Алексеевка в июне 2017 года. Собранное сырье было высушено на воздухе без доступа прямых солнечных лучей.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного. Аналитическую пробу сырья измельчают

до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1,0 г сырья (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70%-ного спирта этилового. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г, после чего колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывая той же пробкой, снова взвешивают и добавляют экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (испытуемый раствор А).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 минут после приготовления.

В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 2 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (раствор сравнения А).

Примечание: *Приготовление раствора ГСО рутина:* Около 0,025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в 30 мл 70%-ного спирта этилового при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят объем 70%-ным спиртом этиловым до метки (раствор А рутина). 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и доводят 95%-ным спиртом этиловым до метки (испытуемый раствор Б рутина). В качестве

раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А рутина, помещенного в мерную колбу на 25 мл и доведенный 95%-ным спиртом этиловым до метки (раствор Б рутина).

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

$$x = \frac{D_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot m_x \cdot (100 - W)} \cdot 100\%,$$

где: D_x – оптическая плотность исследуемого раствора, m_0 – масса ГСО рутина г, D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина, m_x – масса исследуемого сырья г, W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

В случае отсутствия стандартного образца рутина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 250, расчет вести по формуле:

$$x = \frac{D_x \cdot 25 \cdot 50}{250 \cdot 2 \cdot m_x \cdot (100 - W)} \cdot 100\%,$$

где: D_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

m_x – масса сырья, г;

250 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) ГСО рутина при 412 нм;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного

f	$\bar{X}$	$s^2 \times 10^2$	$s \times 10^2$	P, %	t(P, f)	Δx	$\overline{\Delta x}$	$\varepsilon, \%$
10	2,48	1,708	13,03	95	2,26	0,124	0,093	3,80

Статистическая обработка проведенных опытов, свидетельствует о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье с достоверной вероятностью 95% составляет 3,80% (табл. 8).

Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определяли по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов плодов лабазника вязолистного и рутина с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рутина (с концентрациями в диапазоне от 0,0088 до 0,0352 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,9895.

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора рутина с известной концентрацией (25%, 50% и 75%) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 97%.

5.2.1. Анализ содержания суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного в зависимости от года сбора сырья

В ходе диссертационной работы проанализировали количественное содержание суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного в зависимости от года сбора сырья.

Объектами исследования служили образцы плодов лабазника вязолистного, собранные в июне в период с 2016 по 2018 год в п. Алексеевка Самарской области. Сушка сырья проводилась естественным путем, под навесами. Количественный анализ образцов сырья проводили по разработанной нами методике методом спектроскопии.

С использованием разработанной методики проанализировали ряд образцов плодов лабазника вязолистного (табл. 9).

Таблица 9 – Содержание суммы флавоноидов в образцах плодов лабазника вязолистного

№ п/п	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на рутин
1.	Самарская область, п. Алексеевка (июль 2016 г.)	2,66±0,05
2.	Самарская область, п. Алексеевка (июнь 2017 г.)	2,54±0,08
3.	Самарская область, п. Алексеевка (июль 2018 г.)	2,03±0,04

Таким образом, содержание суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного незначительно варьирует в зависимости от года заготовки сырья, оставаясь в пределах от (2,03±0,04)% до (2,66±0,05)%. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать для плодов лабазника вязолистного нижний предел содержания суммы флавоноидов не менее 2,0%.

5.3. Числовые показатели для нового вида ЛРС «Лабазника вязолистного плоды»

Для присвоения ЛРС статуса фармакопейного помимо методик качественного и количественного анализа необходимо обоснование числовых показателей для сырья [37, 40 71]. Для плодов лабазника вязолистного нами разработаны числовые показатели, которые включены в проект ФС на новый вид ЛРС. Исследования проводили согласно методикам указанных в ГФ XIV [40].

Для цельного сырья рекомендуются следующие числовые показатели: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 2%; влажность не более 7%; золы общей не более 5%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5%; кусочков листьев и стеблей не более 1%; органической примеси не более 0,5%; минеральной примеси не более 1%.

Для измельченного сырья рекомендуются следующие числовые показатели: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 2%; влажность не более 7%; золы общей не более 5%; золы, нерастворимой в 10%-ном растворе хлористоводородной кислоты не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 5%; кусочков листьев и стеблей не более 1%; органической примеси не более 0,5%; минеральной примеси не более 1%.

Для порошка рекомендуются следующие числовые показатели: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 2%; влажность не более 7%; золы общей не более 5%; золы, нерастворимой в 10 %-ном растворе хлористоводородной кислоты, не более 3%; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 5%; минеральной примеси не более 1%.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Результаты предварительных испытаний с проведением качественных реакций с 1%-ным спиртовым раствором железа окисного хлорида, с порошком цинка в концентрированной хлористоводородной кислоте и с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида. подтвердили возможность присутствия флавоноидов в водно-спиртовых извлечениях из плодов лабазника вязолистного.

2. В ходе исследования влияния условий экстракции на полноту извлечения флавоноидов из плодов лабазника вязолистного установлены оптимальные условия экстракции: экстрагент – 70%-ный спирт этиловый, соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50, продолжительность экстракции – 60 минут.

3. Результаты исследования водно-спиртовых извлечений из плодов лабазника вязолистного методами тонкослойной хроматографии и УФ-спектроскопии с добавками, позволяют рекомендовать в качестве стандартного образца в методике качественного и количественного анализа - ГСО рутина

4. Разработаны методики качественного анализа плодов лабазника вязолистного методом тонкослойной хроматографии водно-спиртовых извлечений в системе растворителей н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) с использованием стандартного образца рутина. Метод предусматривает определение доминирующего компонента, который по характеру свечения в УФ-свете, по окрашиванию реактивом ДСК и значению $R_f = 0,50$ представляет собой флавоноид, близкий к рутину.

5. В УФ-спектрах водно-спиртовых извлечений из плодов лабазника вязолистного в присутствии раствора алюминия хлорида наблюдали батохромный сдвиг полосы поглощения и максимум при длине волны около 412 нм, как и в УФ-спектре РСО рутина в присутствии раствора алюминия хлорида. Это позволило выбрать в качестве аналитической длины волны

значение около 412 нм, в качестве стандартного образца - ГСО рутина в методике количественного анализа.

6. Определены метрологические характеристики разработанной методики количественного определения флавоноидов в извлечениях из плодов лабазника вязолистного методом спектрофотометрии при длине волны 412 нм с использованием ГСО рутина. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного с достоверной вероятностью 95% составляет $\pm 3,80\%$.

7. По разработанной методике с использованием дифференциальной спектрофотометрии определено суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин в зависимости от периода сбора сырья. Суммарное содержание фенольных веществ варьировало от $2,03 \pm 0,04 \%$ до $2,66 \pm 0,05\%$. Полученные данные позволили рекомендовать минимальное содержание суммы флавоноидов в доброкачественном сырье в пересчете на рутин: не менее 2%.

8. Разработанные методики стандартизации вошли в проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Лабазника вязолистного плоды» (Приложение 4).

ГЛАВА 6. НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО И ЛАБАЗНИКА ШЕСТИЛЕПЕСТНОГО

Ведущей группой БАС в плодах лабазника вязолистного являются флавоноиды. В лекарственном растительном сырье данная группа БАС отвечает за разнообразные фармакологические эффекты [87]. Так, флавоноиды отвечают за такие эффекты, как гепатопротекторный, желчегонный, мочегонный, спазмолитический, противовоспалительный и другие [87].

В настоящее время на территории Российской Федерации не представлены препараты на основе плодов лабазника вязолистного. На наш взгляд, благодаря широкому спектру БАС плоды лабазника вязолистного могут применяться в качестве индивидуального лекарственного средства. Для удобства применения плодов лабазника вязолистного целесообразным является создание галеновых препаратов на его основе [87].

6.1. Разработка способа получения густого экстракта из плодов лабазника вязолистного и его стандартизация

В лабораторных условиях получены образцы жидких экстрактов (1:1) из плодов лабазника вязолистного. Все жидкие экстракты получены одновременно с использованием в качестве оптимального экстрагента 70%-ного спирта этилового в соотношении «сырье-экстрагент» 1:1 с помощью методов перколяции, реперколяции и реперколяции с нагреванием.

Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в полученных жидких экстрактах (1:1) определяли методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 412 нм на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 500 нм. Раствором сравнения служил

96% спирт этиловый. Обработку результатов, полученных в ходе эксперимента, осуществляли при помощи программного обеспечения «WinAspect Excel». Результаты проведенного анализа приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Содержание суммы флавоноидов в жидких экстрактах из плодов лабазника вязолистного

№ п/п	Название метода	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
1	Перколяция	2,30±0,20%
2	Реперколяция	1,45±0,30%
3	Реперколяция с нагреванием	3,90±0,10%

Как видно из данных, представленных в таблице 10, содержание суммы флавоноидов в жидких экстрактах, полученных разными способами, существенно отличается, варьируя в пределах 1,45% – 3,90%. Максимальное значение достигается при использовании метода реперколяции с нагреванием. Высокое содержание суммы флавоноидов (3,90% в пересчете на рутин) позволяет рекомендовать полученный жидкий экстракт из плодов лабазника вязолистного в качестве самостоятельного лекарственного препарата или основы для изготовления лекарственных препаратов. Нами сгущением (упариванием) жидкого экстракта в роторно-вакуумном испарителе при температуре не выше 50⁰С получены препараты «Лабазника вязолистного экстракт густой» с более высоким содержанием флавоноидов. Содержание суммы флавоноидов в густом экстракте варьирует в пределах от (4,23±0,21)% до (5,12±0,16)%.

Расчет содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в полученных экстрактах проводили по следующим методикам:

Методика анализа жидкого экстракта из плодов лабазника вязолистного. В мерную колбу на 25 мл помещают 1 мл жидкого экстракта плодов лабазника вязолистного и доводят объём спиртом этиловым 70%-ным

до метки (раствор А). В качестве раствора сравнения готовят раствор ГСО рутина (раствор Б) по методике, изложенной в главе 5, но без добавления алюминия хлорида. Через 30 мин после приготовления растворов, измеряют их оптическую плотность на спектрофотометре «Specord 40» Analytik Jena при аналитической длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в 1 мл экстракта в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{D_x \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot 50 \cdot m_x} \cdot 100\%,$$

где: D_x – оптическая плотность исследуемого раствора, m_0 – масса ГСО рутина г, D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина, m_x – масса исследуемого сырья г.

При отсутствии стандартного образца рутина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 250, расчет вести по формуле:

$$x = \frac{D_x \cdot 25}{250 \cdot m_x} \cdot 100\%,$$

где: D_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

m_x – масса сырья, г;

250 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) ГСО рутина при 412 нм.

Методика анализа густого экстракта из плодов лабазника вязолистного.

В мерную колбу на 25 мл помещают 1,0 мл густого экстракта плодов лабазника вязолистного и доводят объем спиртом этиловым 70%-ным до метки (раствор А). В качестве раствора сравнения готовят раствор ГСО рутина (раствор Б) по методике, изложенной в главе 5, но без добавления алюминия хлорида. Через 30 мин после приготовления растворов, измеряют их оптическую плотность на спектрофотометре «Specord 40» Analytik Jena при аналитической длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в 1 мл экстракта в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{D_x \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot 50 \cdot m_x} \cdot 100\%,$$

где: D_x – оптическая плотность исследуемого раствора, m_0 – масса ГСО рутина г, D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина, m_x – масса исследуемого сырья г.

При отсутствии стандартного образца рутина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 250, расчет вести по формуле:

$$x = \frac{D_x \cdot 25}{250 \cdot m_x} \cdot 100\%,$$

где: D_x – оптическая плотность испытуемого раствора; m_x – масса сырья, г; 250 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) ГСО рутина при 412 нм.

6.2. Определение острой токсичности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного

При создании новых лекарственных растительных препаратов одним из обязательных критериев при проведении доклинических исследований является оценка их безопасности, в связи с чем и проводится анализ острой токсичности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного.

Опыты по изучению острой токсичности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного проведены по методике, описанной в Главе 2 диссертации. За время наблюдения отклонений в поведении белых беспородных крыс контрольных и опытных групп не отмечалось, летальных исходов зарегистрировано не было. Вес опытных животных в результате

исследования на острую токсичность не имел достоверных отличий от веса контрольных крыс на протяжении всего эксперимента.

Однократное внутрижелудочное введение густого экстракта из плодов лабазника вязолистного в дозе 15 г/кг не привело к гибели испытуемых животных, следовательно, изучаемый препарат относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76 [36].

6.3. Изучение диуретической активности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного

Исследования по изучению диуретической активности проводили по методике, описанной в Главе 2 диссертации. В ходе проведенных хронических экспериментов на белых беспородных крысах установлено, что внутрижелудочное введение густого экстракта из плодов лабазника вязолистного в дозе 50 мг/кг за 4 ч опытного периода на фоне 3%-ной водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля, вело к достоверному увеличению показателей диуреза (на 36%), калийуреза (на 48%). При этом натрийурез и креатининурез изменялись недостоверно (табл. 11).

Таблица 11 – Влияние внутрижелудочного введения густого экстракта плодов лабазника вязолистного на выделительную функцию почек крыс за 4 ч эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкмоль	Калийурез, мкмоль	Креатининурез, мг
Контроль (вода)	1,17±0,12	285,74±32,28	73,14±7,26	1,74±0,22
Густой экстракт из плодов лабазника вязолистного	1,59±0,12*	402,45±69,73	107,99±7,17*	2,19±0,18

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

Препарат сравнения фуросемид при однократном внутрижелудочном введении в пороговой дозе 1 мг/кг способствовал достоверному возрастанию диуреза (на 23%) и натрийуреза (на 31%) за 4 ч эксперимента в опытной группе животных относительно показателей водного контроля преимущественно за счет снижения канальцевой реабсорбции (табл. 12).

Таблица 12 – Влияние внутрижелудочного введения фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг на выделительную функцию почек крыс за 4 ч эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкм	Калийурез, мкм	Креатининурез, мг
Контроль (вода)	1,98±0,11	403,68±32,08	104,10±10,72	2,73±0,29
Фуросемид	2,44±0,13*	529,24±43,46*	123,76±6,83	3,14±0,25

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

В суточном хроническом эксперименте при однократном внутрижелудочном введении густого экстракта лабазника вязолистного в дозе 50 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля отмечалось достоверное значительное увеличение показателей диуреза (на 58%), натрийуреза (на 61%), калийуреза (на 74%) и креатининуреза (на 70%) (табл. 13).

Таблица 13 – Влияние внутрижелудочного введения густого экстракта плодов лабазника вязолистного на выделительную функцию почек крыс за 24 ч эксперимента

Препарат	Диурез, мл	Натрийурез, мкмоль	Калийурез, мкмоль	Креатининурез, мг
Контроль (вода)	2,00±0,15	570,76±60,50	124,43±12,60	2,76±0,28
Густой экстракт из плодов лабазника вязолистного	3,16±0,24 *	921,52±57,92*	216,54±23,29*	4,70±0,42*

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

В свою очередь, препарат сравнения гидрохлоротиазид, введенный однократно внутривентрикулярно в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг, способствовал значительному достоверному возрастанию диуреза (на 40%), натрийуреза (на 54%) и калийуреза (на 55%) относительно водного контроля за 24 ч эксперимента (табл. 14).

Таблица 14 – Влияние внутривентрикулярного введения гидрохлоротиазида на выделительную функцию почек крыс за 24 ч эксперимента

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

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

Таким образом, при однократном внутривентрикулярном введении густого экстракта лабазника вязолистного в дозе 50 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки по сравнению с контролем у лабораторных животных за 4 ч эксперимента достоверно увеличиваются показатели диуреза преимущественно за счет снижения канальцевой реабсорбции. В то время как за 24 ч опыта происходит достоверное увеличение диуреза, как за счет увеличения клубочковой фильтрации, так и за счет снижения канальцевой реабсорбции.

6.4. Изучение антидепрессантной активности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного

Исследование по определению антидепрессантной активности густого экстракта плодов лабазника вязолистного проводили по методике, описанной

в Главе 2 диссертации. Результаты исследования влияния густого экстракта из плодов лабазника вязолистного на двигательную активность крыс в методике теста «Отчаяние» представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Исследования антидепрессантной активности густого экстракта лабазника вязолистного при однократном внутрижелудочном введении в дозе 50 мг/кг на фоне 3%-ной водной нагрузки

Название препарата	Время активного движения, с	Время активного движения, %	О/К
Контроль (вода)	58,71±6,53	100	
Густой экстракт лабазника вязолистного	76,57±2,89	130	p=0,028

При однократном внутрижелудочном введении густого экстракта лабазника вязолистного в дозе 50 мг/кг на фоне 3%-ной водной нагрузки у животных опытной группы относительно показателей водного контроля отмечалось достоверное увеличение продолжительности активных движений животных в плавательном тесте отчаяния.

Таким образом, однократное внутрижелудочное введение густого экстракта лабазника вязолистного в дозе 50 мг/кг животным опытной группы привело к достоверному увеличению продолжительности активных движений животных в плавательном тесте отчаяния относительно показателей водного контроля. Следовательно, данный препарат обладает антидепрессантной активностью.

6.5. Изучение противовоспалительного действия водных и водно-спиртовых извлечений из плодов лабазников двух видов

Оценку противовоспалительной активности проводили по методике, описанной в Главе 2 диссертации. Изучали противовоспалительную активность отвара (1:10) и водно-спиртовых извлечений 40%-ным спиртом

этиловым (1:5) из плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. Исследуемые препараты вводили животным перорально через зонд в дозе 100 мг/кг. Настойки предварительно разводили водой очищенной в 2 раза. Провели 2 серии экспериментов.

Острую воспалительную реакцию (отек) воспроизводили субплантарным введением 0,1 мл 1% раствора каррагинина. Выраженность воспалительной реакции оценивали, измеряя размер отека лапы через 3 часа после индукции воспаления. Исследуемые препараты вводили зондом в желудок за 1 час до введения каррагинина. Противовоспалительное действие оценивали классически: по уменьшению отека.

В ходе исследования выявлено, что все полученные извлечения из плодов лабазников двух видов обладают выраженными противовоспалительными свойствами, настойка (1:5) лабазника вязолистного на 40% спирте этиловом более эффективна по сравнению с другими фитопрепаратами лабазника. Результаты позволяют рекомендовать плоды указанных видов лабазника к использованию в качестве сырья для изготовления лекарственных препаратов противовоспалительного действия.

6.6. Сравнительное изучение антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного

В рамках настоящей работы провели скрининговый анализ антимикробной активности водных (1:10) и водно-спиртовых (1:5) извлечений из травы, цветков и плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного 40%-ным и 70%-ным спиртом этиловым по методике, описанной в Главе 2 диссертации. Результаты представлены в таблице 16.

В ходе эксперимента установлено, что извлечения из плодов лабазников двух видов оказывают более выраженное бактериостатическое действие в отношении грамположительных бактерий, чем в отношении грамотрицательных бактерий. Максимальную активность в отношении

Staphylococcus aureus проявила настойка плодов лабазника вязолистного на 40%-ном спирте этиловом (активна при восьмом разведении). Этот же препарат оказался в числе наименее активных в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (активна лишь при первом разведении). При дальнейшем разведении наблюдали рост тестируемых микроорганизмов. Более активными, чем спиртовые извлечения из плодов лабазника вязолистного в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* оказались спиртовые извлечения из плодов лабазника шестилепестного.

Таблица 16 – Антибактериальная и противогрибковая активность извлечений из органов лабазника вязолистного (в.) и лабазника шестилепестного (ш.)

Препарат	Водное извлечение (1:10)						Настойка на 40%-ном спирте этиловом						Настойка на 70%-ном спирте этиловом			
Орган растения	плоды		цветки		травы		плоды		цветки		травы		плоды		цветки	
Вид лабазника	в.	ш.	в.	ш.	в.	ш.	в.	ш.	в.	ш.	в.	ш.	в.	ш.	в.	ш.
	Порядковый номер разведения															
<i>Bacillus cereus</i>	3	3	5	4	5	3	8	4	6	7	3	3	7	5	7	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	4	6	5	3	7	6	6	8	10	1	2	6	4	10	7
<i>Escherichia coli</i>	1	1	7	1	4	1	1	4	4	2	3	2	1	4	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	3	3	3	3	6	5	6	8	2	2	6	5	6	6
<i>Candida albicans</i>	2	3	8	7	2	6	4	6	9	9	1	1	4	6	8	9

Все извлечения из плодов лабазника шестилепестного оказались более активными, чем извлечения из плодов лабазника вязолистного в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Независимо от экстрагента, извлечения из плодов лабазника шестилепестного проявили

противогрибковую активность при больших разведениях, то есть при меньших концентрациях действующих веществ.

Гораздо более выраженное антимикробное действие проявили спиртовые извлечения, но направленность их действия различна. Так, спиртовые извлечения из плодов лабазника вязолистного проявили большую активность в отношении *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, а спиртовые извлечения из плодов лабазника шестилепестного оказались более активными в отношении *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Максимальную активность проявили препараты цветков растений.

Параллельно наблюдали антибактериальную и противогрибковую активность нескольких лекарственных средств. Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Антибактериальная и противогрибковая активность образцов сравнения в условиях эксперимента

Объект исследования	40% спирт этиловый	70% спирт этиловый	0,1% раствор левомецетина спиртовой	0,1% раствор бензилпенициллина	5% спиртовой раствор салициловой кислоты
Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения				
<i>Bacillus cereus</i>	2	4	4	4	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	4	2	7
<i>Escherichia coli</i>	3	4	6	4	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	3	4	-	6
<i>Candida albicans</i>	3	3	1	-	6

Раствор левомецетина спиртовой концентрации 0,1% и 0,1%-ный раствор бензилпенициллина проявили свою естественную противомикробную активность в отношении исследуемых штаммов. Высокую активность проявил 5%-ный спиртовой раствор салициловой

кислоты. Согласно проведенному анализу, все исследуемые водные и водно-спиртовые извлечения из плодов, цветков двух видов лабазника не уступают по антимикробной активности антибиотикам и антисептическим средствам, служившим в данном исследовании образцами сравнения.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Определены оптимальные условия получения жидкого экстракта плодов лабазника вязолистного: экстрагент – 70%-ный спирт этиловый, соотношение «сырье-экстрагент» 1:1, метод реперколяции с нагреванием.

2. Предложен способ изготовления препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой» сгущением (упариванием) жидкого экстракта в роторно-вакуумном испарителе жидкого экстракта, полученного методом реперколяции с нагреванием.

3. Разработаны методики количественного определения содержания флавоноидов в жидком и густом экстрактах плодов лабазника вязолистного методом спектрофотометрии при длине волны 412 нм пересчёте на рутин, как при наличии ГСО рутин, так и в отсутствии этого стандарта.

4. В ходе фармакологических исследований определена выраженная противовоспалительная активность отвара (1:10) и водно-спиртовых извлечений 40%-ным спиртом этиловым (1:5) из плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. Показано, что препарат «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой» относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76, в дозе 50 мг/кг оказывает антидепрессантное и диуретическое действие.

3. В результате микробиологического исследования выявлена антимикробная активность водных (1:10) и водно-спиртовых (1:5) извлечений из травы, цветков и плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного 40%-ным и 70%-ным спиртом этиловым в отношении грамположительных (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) и грамотрицательных (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) бактерий, дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

Результаты исследования биологической активности подтверждают целесообразность внедрения препаратов на основе сырья лабазника в качестве противомикробных, противовоспалительных и антидепрессантных лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное химико-фармакогностическое исследование надземной и подземной частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного позволило сделать следующие **общие выводы**:

1. Анализ научной литературы выявил перспективность исследования растений рода Лабазник в силу следующих их достоинств: значительный ресурсный потенциал на территории России и большая вегетативная масса, лёгкость культивирования, разнообразие биологически активных веществ, обуславливающее широкий спектр фармакологической активности, многолетний опыт успешного применения в народной медицине. В литературе не представлены результаты изучения химического состава и биологической активности плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного.

2. Проведенное морфолого-анатомическое исследование позволило выявить особенности строения плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного и впервые определить диагностические признаки, характерные для плодов изучаемых растений. Результаты данных исследования включены в раздел «Микроскопические признаки» проекта ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды».

3. Проведенные сравнительные фитохимические исследования надземной и подземной частей лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного с помощью методов тонкослойной и бумажной хроматографии, спектрофотометрии, электрофореза и химических методов анализа позволили выявить сходство химического состава близкородственных растений, наличие флавоноидов как основных действующих веществ, с преобладанием спиреозида, наличие фитостеринов, углеводов, белков, изофермента малатдегидрогеназы МДГ-3. В извлечениях из плодов лабазника вязолистного обнаружены тритерпеновые сапонины.

4. В результате изучения химического состава плодов лабазника вязолистного, произрастающего в Самарской области, с помощью колоночной хроматографии впервые выделены и идентифицированы 6 соединений: флавоны кверцетин и лютеолин, глюкозиды кверцетина изокверцитрин и спиреозид, сапонин лупеол, фитостерин эргостерин (эргостерол). Выделенные соединения охарактеризованы значениями температур плавления, данными УФ- ^1H -, ^{13}C -спектроскопии, масс-спектрометрии.

5. Разработаны методики качественного анализа плодов лабазника вязолистного методом тонкослойной хроматографии водно-спиртовых извлечений в системе растворителей спирт н-бутиловый-кислота уксусная ледяная-вода (4:1:2) с использованием стандартного образца рутина. Метод предусматривает определение доминирующего компонента, который по характеру свечения в УФ-свете, по окрашиванию реактивом ДСК и значению $R_f = 0,50$ представляет собой флавоноид, близкий к рутину.

6. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в извлечениях из плодов лабазника вязолистного в пересчете на рутин с использованием дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 412 нм. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного с достоверной вероятностью 95% составляет $\pm 3,80\%$. Сумма флавоноидов в пересчете на рутин в сырье растения варьирует от $2,03 \pm 0,04\%$ до $2,66 \pm 0,05\%$. Условие достижения максимальной полноты извлечения: экстрагент – 70%-ный спирт этиловый, соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50, продолжительность экстракции – 60 минут.

7. Разработаны метод изготовления препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой» сгущением (упариванием) жидкого экстракта в роторно-вакуумном испарителе жидкого экстракта, полученного методом реперколяции с нагреванием, методики качественного и количественного определения БАВ в препарате. Предложены формулы расчёта содержания

суммы флавоноидов по результатам спектрофотометрии как при наличии ГСО рутина, так и в отсутствии этого стандарта.

8. В ходе фармакологических исследований на белых беспородных крысах определена выраженная противовоспалительная активность отвара (1:10) и водно-спиртовых извлечений 40%-ным спиртом этиловым (1:5) из плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. Показано, что препарат «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой» относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007 – 76, в дозе 50 мг/кг оказывает антидепрессантное и диуретическое действие.

В результате микробиологического исследования выявлена антимикробная активность водных (1:10) и водно-спиртовых (1:5) извлечений из травы, цветков и плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного на 40%-ном и 70%-ном этаноле в отношении грамположительных (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) и грамотрицательных (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) бактерий, дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

9. Выявленное в ходе экспериментов высокое содержание действующих веществ, результаты исследования биологической активности, доступность сырья в природе подтверждают целесообразность внедрения нового вида лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды» и препаратов на его основе, в частности препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой», в качестве противомикробных и антидепрессантных лекарственных средств.

10. Разработан проект ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды», в который включены результаты анатомо-морфологических и фитохимических исследований, разработанные показатели качества.

Практические рекомендации.

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья,

содержащего флавоноиды, 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.

Продолжение исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии, поскольку направлено на решение важной социальной задачи: изучение химического состава лекарственных растений для расширения спектра представлений о реализованных и потенциальных возможностях использования их в медицине.

Результаты фитохимического анализа с использованием комплекса современных методов исследования послужат научной основой для разработки объективных и унифицированных методик анализа в ряду ЛРС - лекарственная субстанция – лекарственная форма, для осуществления контроля качества лекарственных средств растительного происхождения на всех этапах их производства.

Внедрение плодов двух видов лабазника в фармацевтическое производство позволит использовать весь комплекс надземных частей этих растений, достаточно распространённых в средней полосе России, для создания лекарственных средств на их основе.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

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

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Авдеева, Е.Ю. Анатомическая характеристика травы лабазника вязолистного / Е.Ю. Авдеева, И.В. Шилова, Н.Э. Коломиец и др. // Фармация. – 2008. – №2. – С. 21-23.
2. Авдеева, Е.Ю. Компонентный состав фракций *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. с высокой антиоксидантной активностью / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, И.В. Шилова // Химия растительного сырья. – 2008. – №3. – С. 115-118.
3. Авдеева, Е.Ю. Антиоксидантные свойства биологически активных веществ лабазника вязолистного / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, И.В. Шилова // V Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ»: Тезисы докладов. Уфа, 2008. – 65 с.
4. Авдеева, Е.Ю. Исследование лабазника вязолистного как источника эффективного ноотропного средства: Автореф. дис. канд. фарм. наук / Е.Ю. Авдеева. - Пермь, 2008. – 27 с.
5. Акопов, И.Э. Важнейшие отечественные лекарственные растения и их применение / И.Э. Акопов. – Ташкент: Медицина, 1990. – 444 с.
6. Аксиненко, С.Г. Исследование антигипоксической активности лабазника вязолистного / С.Г. Аксиненко, Т.Н. Поветьева, Ю.В. Нестерова // Теоретические и прикладные вопросы образования и науки: Сборник научных трудов. Часть 4. – Тамбов. – 2014. – С. 8-9.
7. Александрова, Н.В. Лабазник вязолистный – перспективное сырье для создания лекарственных средств при заболеваниях полости рта / Н.В. Александрова, М.А. Буракова, Н.А. Криштанова // Материалы в сборнике: Инновации в здоровье нации сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2015. – С. 156-158.

8. Александровский, Ю.А. Лекарственные средства для лечения и коррекции психических нарушений / Ю.А. Александровский // Новая аптека. – 2011. - №9. – С. 18-23.
9. Амосов, В.В. Антиоксидантная емкость спиртовых экстрактов растений рода лабазник / В.В. Амосов, А.А. Лапин и др. // IV Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ»: Тезисы докладов. Сыктывкар, 2006. – 225 с.
10. Амосов, В.В. Антиоксидантная емкость водных и водно-спиртовых экстрактов лабазника камчатского (*Filipendula kamtschatica Maxim.*) / В.В. Амосов, А.А. Лапин и др. // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. – 2009. - №1. – С. 25-26.
11. Башилов, А.В. Хроматографический анализ и идентификация основных компонентов водоспиртовых экстрактов растений рода *Filipendula Mill.* / А.В. Башилов, Е.В. Спиридович, В.П. Курченко и др. // Фармация. – 2000. – №5. – С. 9-11.
12. Башилов, А.В. Фитохимический состав и фармакологические свойства лабазника шестилепестного (*Felipendula hexapetala*) / А.В. Башилов // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2009. – №4. – С. 111-114.
13. Башилов, А.В. Использование GLC-анализа при изучении химического состава *Felipendula hexapetala Gilib.* / А.В. Башилов // Биология наука XXI века: 13-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Пущино, 2009. – С. 294.
14. Башилов, А.В. Ингибирование накопления гидропероксидов в льняном масле экстрактами лабазника шестилепестного (*Felipendula hexapetala*) / А.В. Башилов // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2011. – №2. – С. 10-13.
15. Башилов, А.В. Скрининг бактерицидной активности экстрактов таволги вязолистной, пятилитника кустарникового, мяты перечной и камелии китайской // Биологически активные вещества растений - изучение и использование: материалы международной научной конференции, г. Минск.

– Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2013. – С. 74-75.

16. Баширова, Р.Г. Биологически активные вещества клубеньков *Felipendula vulgaris* Moench. из флоры Башкортостана / Р.Г. Баширова, Е.Г. Галкин, А.Х. Фаттахов и др. // Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология - от науки к практике». Том 2. Уфа, 2014. – С. 9-15.

17. Березовская, Т.П. Методы микроскопического анализа ботанических объектов / Т.П. Березовская, Н.В. Дощинская, Е.А. Серых. – Томск. – 1978. – 113 с.

18. Берхин, Е.Б. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Е.Б. Берхин // Омская правда. – 1972. – 200 с.

19. Беспалов, В.Г. Антисканцерогенные, противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства отвара цветков лабазника вязолистного / В.Г. Беспалов, А.Ю. Лимаренко, Б.О. Войтенков и др. // Хим.-фарм. журн. – 1992. – Т.26. – №1. – С. 59-61.

20. Ботанико - фармакогностический словарь: Справочное пособие / Под. ред. К.Ф. Блиновой, Г.П. Яковлева. - М.: Высшая школа, 1990. – С. 229-230.

21. Бубенчикова, В.Н. Разработка методов анализа растительного сырья, содержащего флавоноиды / В.Н. Бубенчикова, Т.В. Точкова // Состояние и перспективы развития фармации в Сибири и на Дальнем Востоке: Тез. докл. научно-практической конференции, посвященной 50-летию фармацевтического факультета 1991 г. – Томск, 1991. – С. 117-118.

22. Бубенчикова, В.Н. Лабазник шестилепестный: аминокислотный и минеральный состав / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Сухомлинов // Фармация. – 2005. – №3. – С. 9-11.

23. Бубенчикова, В.Н. Минеральный состав растений рода лабазник / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Сухомлинов // Вестник ВГУ. – 2006. – №1. – С. 189-190.

24. Бубенчикова, В.Н. Сравнительная оценка макро- и микроэлементного состава некоторых видов растений семейства Asteraceae и Rosaceae / В.Н. Бубенчикова, С.В. Логутев, Ю.А. Сухомлинов и др. // Вестник ВГУ. – 2011. – №2. – С. 181-184.

25. Быков, В.А. Эффективность разработки лекарственных средств из растительного сырья / В.А. Быков // Химия, технология, медицина: тр. Всерос. науч.-исслед. ин-та лекарственных и ароматических растений. – М., 2000. – С. 177-185.

26. Быков, В.А. Фармацевтическая технология. Руководство к лабораторным занятиям: учеб. пособие / В.А. Быков, Н.Б. Демина, С.А. Скатков, М.Н. Анурова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 304 с.

27. Вайс, Р.Ф. Фитотерапия. // Р.Ф. Вайс, Ф. Финтельманн / Руководство: Пер. с нем. – М.: Медицина, 2004. – 552 с.

28. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Книга 2: Физико-химические методы анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец.- 5-е изд., стереотип. / В.П. Васильев. – М.: Дрофа, 2005. – 383 с.

29. Величко, Н.А. Биологически активные вещества лабазника вязолистного // Н.А. Величко, З.Н. Берикашвили // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы IV Всероссийской конференции. Книга 2. – Барнаул: Издательство Алтайского государственного университета. – 2009. – С. 275-276.

30. Вернигорова, М.Н. Изучение микроскопических признаков цветков лабазника вязолистного / М.Н. Вернигорова, Н.Г. Бузук, Н.А. Троцкая // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 70-ой научной сессии сотрудников университета. – Витебск, 2015. – С. 164-166.

31. ВФС 42-1777-87. Flores Filipendule ulmarie - Цветки лабазника вязолистного.

32. Высочина, Г.И. Фитохимическая характеристика лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.), произрастающего на среднем

Урале // Г.И. Высочина, Т.А. Кукушкина, Е.С. Васфилова // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы. Материалы I международной научной конференции. - Новосибирск. – 2013. – С. 142-145.

33. Гаммерман, А.Ф. Дикорастущие лекарственные растения СССР /А.Ф. Гаммерман, И.И. Гром. - М.: изд-во "Медицина". – 1976. – 286 с.

34. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения: справочное пособие. - 3-е издание, переработанное и дополненное / А.Ф. Гаммерман, Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. – М.: Высшая школа, 1983. – 400 с.

35. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1990. – 333 с.

36. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. М.: Стандартиформ, 2007. – 7 с.

37. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание / МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.

38. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

39. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.1 / М. – 2018. – 1814 с.

40. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.2 / М. – 2018. – 3262 с.

41. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>. – 20.05.2018.

42. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.2. Контроль качества вспомогательных веществ и лекарственного растительного сырья. Центр экспертиз и испытания в здравоохранении (под ред. А.А. Шерякова) Молодечко: «Победа». – 2008. – 472 с.

43. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М., Высш. Шк., 1983. – С. 176.
44. Гринкевич, Н.И. Фармакогнозия. Атлас / Н.И. Гринкевич, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1989. – 512 с.
45. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 2: Покрывосемянные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов, К.В. Киселёва, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров // Москва: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований. 2004. – С. 368-369.
46. Гудкова, Н.Ю. О перспективах интродукции представителей рода лабазник (*Filipendula* Mill.) в качестве источников лекарственного сырья / Н.Ю. Гудкова // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – №2. – С. 73-79.
47. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1977. – 275 с.
48. Дубашинская, Н.В. Лабазник вязолистный: химический состав и фармакологическая активность / Н.В. Дубашинская, А.А. Юркевич // Вестник фармации. – 2017. – № 4 (78). – С. 55-58.
49. Дудченко, Л.Г. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения. Справ. / Л.Г. Дудченко, А.С. Козьяков, В.В. Кривенко. – Киев: Наукова думка, 1989. – 304 с.
50. Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака (пер. с англ.). – М.: Мир. – 1978. – 428 с.
51. Жилина, И.В. Разработка состава и технология геля с экстрактом из цветков лабазника вязолистного для использования в качестве дерматопротектора / И.В. Жилина, Э.Ф. Степанова, Г.А. Голова // Фундаментальные исследования. – 2011. – №9. – С.349-351.
52. Жилина, И.В. Разработка состава и фармакотехнологические исследования мягких лекарственных форм с экстрактом цветков лабазника вязолистного / И.В. Жилина // автореферат дис. ... Кандидата фармацевтических наук / Волгогр. Гос. Мед. Ун-т. Пятигорск, 2016.

53. Задорожный, А.М. Справочник по лекарственным растениям / А.М. Задорожный, А.Г. Кошкин, С.Я. Соколов. – М., 1988. – 228 с.
54. Зайцев, В.М., Прикладная медицинская статистика / Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. – С.-Пб. Фолиант. – 2003. – 432 с.
55. Зайцева, Е.Н. Способ получения диуреза у лабораторных животных: патент на изобретение 2494703 Рос. Федерация / Е.Н. Зайцева // №2012104057/13; заявл. 06.02.12; опубл. 10.10.13, Бюл. № 28. 11 с.
56. Заяц, Д.В. Определение содержания дубильных веществ в лабазнике вязолистном, заготовленном на территории Архангельской области / Д.В. Заяц // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2016. – № 1 (36). – С. 293-294.
57. Заяц, Д.В. Определение флавоноидов в лабазнике вязолистном (*Filipendula ulmaria* L.), произрастающем на территории Архангельской области / Д.В. Заяц // Современные научные исследования и инновации. – 2016. – № 4 (60). – С. 614-620.
58. Зубарев, П.Д. Анатомо-морфологическое изучение подземных органов лабазника вязолистного/ П.Д. Зубарев, Т.Ю. Ковалёва, Т.С. Шилина// Ботаника и природное многообразие растительного мира. Всероссийская научная Интернет - конференция с международным участием. Материалы конференции. – Казань. – 2014. – С. 62-67.
59. Зыкова, И.Д. Компонентный состав эфирного масла корней и корневищ *Filipendula ulmaria* (Rosaceae) / И.Д.Зыкова, А.А. Ефремов // Химия и технология растительных веществ – VII Всероссийская научная конференция. – Сыктывкар. – 2011. – С. 57.
60. Зыкова, И.Д. Компонентный состав эфирного масла из соцветий *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. в фазах цветения и плодоношения / И.Д. Зыкова, А.А. Ефремов // Химия растительного сырья. – 2011. – №1. – С. 133-136.

61. Зыкова, И.Д. Компонентный состав эфирного масла стеблей, листьев и соцветий *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / И.Д. Зыкова, А.А. Ефремов // Химия растительного сырья. – 2011. – №4. – С. 99-102.
62. Зыкова, И.Д. Макро- и микроэлементы стеблей, листьев и соцветий *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / И.Д. Зыкова, А.А. Ефремов, В.С. Герасимов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы V Всероссийской конференции. – Барнаул: Издательство Алтайского государственного университета. – 2012. – С. 332-333.
63. Зыкова, И.Д. К вопросу перспективности эфирного масла *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. как источника метилсалицилата / И.Д. Зыкова, А.А. Ефремов // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – №2. – С. 101-102.
64. Зыкова, И.Д. Особенности накопления макро- и микроэлементов в надземной части *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. в разные фенологические фазы // И.Д. Зыкова, А.А. Ефремов, В.С. Герасимов и др. // Химия растительного сырья. – 2013. – №2. – С. 189-193.
65. Иванищев, В.В. Ферменты метаболизма малата: характеристика, регуляция активности и биологическая роль / В.В. Иванищев, Б.И. Курганов // Биохимия. – 1992. – Т.57, Вып. 5. – С. 653 - 661.
66. Кайгородцев, А.В. Влияние экстрактов лабазника обыкновенного на поведение при моделях тревожных состояний / А.В. Кайгородцев // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. - №6. – С. 93-99.
67. Калашникова, Л.М. Экология лабазника *Filipendula vulgaris* и перспективы его использования / Л.М. Калашникова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. – С. 281.
68. Каррер, П. Курс органической химии / П. Каррер / Пер. с немецкого Государственное научно-техническое издательство химической литературы, Ленинград, 1962. – 1216 с.

69. Киржаков, И.Н. Получение экстракта из травы лабазника и его применение в технологии изготовления чая / И.Н. Киржаков, Н.И. Алмакаева, А.А. Печенкин, Е.Д. Григорьева, Г.А. Панкратова, Е.В. Семенова, Е.В. Тихонова // Материалы в сборнике: Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийский технологический институт (филиал). – 2015. – С. 291-295.

70. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х томах. / Пер. с англ. Под ред. д.х.н., проф. В.Г. Березкина. – М.: Мир. –1981. – 1139 с.

71. 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. – 295 с.

72. Козаева, Л.Т. Определение содержания антиоксидантов водных экстрактов лабазника вязолистного методом кулонометрического титрования электрогенерированным бромом / Л.Т. Козаева, С.А. Бекузарова и др. // IV Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ»: Тезисы докладов. Сыктывкар, 2006. – 251 с.

73. Королук, Е.А. Красильные растения Алтая и сопредельных территорий / Е.А. Королук // Химия растительного сырья. – 2003. – №1. – С. 101-135.

74. Кортиков, В.Н. Справочник народной медицины / В.Н. Кортиков, А.В. Кортиков. - Минск: Белмаркет, 1993. – 240 с.

75. Котельников, Г.П. Доказательная медицина. Научно обоснованная медицинская практика: Монография / Г.П. Котельников, А.С. Шпигель. – Самара; СамГМУ, 2000. – 116 с.

76. Краснов, Е.А. Выделение и антиоксидантная активность филимарина - нового флавонольного гликозида из *Filipendula ulmaria* / Е.А.

Краснов, В.А. Ралдугин, Е.Ю. Авдеева // Хим.-фарм. журн. – 2009. – Т.43. – №11. – С. 24-25.

77. Краснов, Е.А. Химический состав растений рода *Filipendula* (обзор) / Е.А. Краснов, Е.Ю. Авдеева // Химия растительного сырья. – 2012. – №4. – С. 5-12.

78. Круглов, Д.С. Сравнительное микроморфологическое исследование листьев лабазника вязолистного и обыкновенного / Д.С. Круглов, М.Ю. Круглова, М.А. Ханина, Е.О. Кокорева // Разработка, исследование и маркетинговой фармацевтической продукции: сб. научн. тр. – Пятигорск, 2013. – Вып.68. – С. 60-62.

79. Круглова, Ю.В. Полисахаридный и аминокислотный состав наиболее распространенных видов лабазника / Ю.В. Круглова, Д.С. Круглов и др. // Медицина и образование Сибири. – 2011. – №5. – 7 с.

80. Круглова, Ю.В. Исследование эфирного масла из надземной части *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. / Ю.В. Круглова, М.А. Ханина и др. // Медицина и образование Сибири. – 2011. – №5. – 7 с.

81. Круглова, М.Ю. Анализ фенольного комплекса двух видов лабазника / М.Ю. Круглова, Д.С. Круглов, Н.С. Фурса // Фармация. – 2012. – №7. – С. 21-23.

82. Круглова, М.Ю. Элементный состав надземной части лабазника вязолистного и суммарного водного извлечения из него / М.Ю. Круглова, Д.С. Круглов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы V Всероссийской конференции. – Барнаул: Издательство Алтайского государственного университета. – 2012. – С. 335-337.

83. Крылов, Г.В. Травы жизни и их искатели / Г.В. Крылов. – Второе, дополненное издание. Западно-Сибирское книжное издат-во Новосибирск, 1972. – С. 337.

84. Крылов, Н.Н. Разработка технологии получения сухого экстракта травы лабазника вязолистного / Н.Н. Крылов, А.М. Шевченко // Научные

ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2016. – №5 (226). – С. 141-144.

85. Кудряшова (Круглова), М.Ю. Сравнительный фармакогностический анализ *Filipendula ulmaria* и *Filipendula palmata* / М.Ю. Кудряшова // Экология России и сопредельных территорий. Экологический катализ: мат-лы XII междунаrodn. экологич. конф. – Новосибирск, 2007. – С. 170.

86. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие / В.А.Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.

87. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с.

88. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография/ А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.

89. Кучина, Н.С. Лекарственные растения средней полосы европейской Н.С. Кучина. – М.: Планета, 1992. – 187 с.

90. Ладыгина, Е.Я. Фармакогнозия. Атлас / Е.Я. Ладыгина. – М.: Медицина, 1989.

91. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие / Под ред. Г.П. Яковлева. СПб.: СпецЛит, 2006. – 845.: ил.

92. Лечение растениями: основы фитотерапии: Учеб. пособие / В.М. Баева – М.: ООО «Издательство Астрель», 2004. – 202 с.

93. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 292 с.

94. Макаренко, Н.В. Исследование острой токсичности и диуретической активности металлопроизводных гуминовых, фульвовых и гумусовых кислот / Н.В. Макаренко, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев, Д.А.

Андрянов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т.17. – №5-3. – С. 925-929.

95. Маркова, А.В. Тайны народной медицины. Полная энциклопедия / сост. А.В. Маркова. – М., 2003. – 637 с.

96. Маркова, А.В. Травник: золотые рецепты народной медицины / Сост. А. Маркова. – М.: Эксмо; Форум, 2007. – 928 с.

97. 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.

98. Мовсумов, И.С. Химические компонентные цветков *Filipendula ulmaria* и *F. vulgaris* из флоры Азербайджана / И.С. Мовсумов, Э.А. Гараев, Д.Ю. Юсифова // Химия растительного сырья. – 2011. – №3. – С. 159-162.

99. Моисеев, Д.В. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в соцветиях лабазника вязолистного методом жидкостной хроматографии / Д.В. Моисеев // Вестник фармации. – 2011. – №4 (54). – С. 36-42.

100. 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.

101. Николаев, С.М. Влияние комплексного растительного средства на морфофункциональное состояние печени белых крыс при этаноловом гепатите / С.М. Николаев, Я.Г. Разуваева, А.А. Торопова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2016. – № 6. – С. 167-170.

102. Николайчук, Л.В. Целебные растения: лекарственные свойства, кулинарные рецепты, применение в косметике. – 2-е изд., стереотип. / Л.В. Николайчук, М.П. Жигар. – Харьков: Прапор, 1992. - 239 с.

103. Огурцов, Ю.А. Особенности влияния водных экстрактов растений на тонус гладких мышц тонкой кишки крыс / Ю.А. Огурцов, Е.Ф. Кульбеков // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической

продукции. Сборник научных трудов. Выпуск 65. Пятигорск, 2010. – С. 482-484.

104. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т.6. – № 4. – С. 306-359.

105. Павлов, Н.В. Флора Казахстана. Том 4 / Н.В. Павлов // Алма-Ата: Изд-во Академии Наук Казахской ССР – 1961. – С. 459-462.

106. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: Использование в народной медицине и быту / Л.В. Пастушенков, А.Л. Пастушенков, В.Л. Пастушенков. – Л.: Лениздат, 1990. – 384 с.

107. 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.

108. Попов, И.В. Современное состояние проблемы использования лекарственного растительного сырья в Северо-Кавказском Федеральном округе / И.В. Попов, О.И. Попова // Научно-практическая конференция, посвященная 65-летию факультета промышленной технологии лекарств: сб. науч. тр. – Ч.1. – СПб: Изд-во СПХФА, 2010. – 212 с.

109. Протасеня, Н.И. Лекарственные сборы. Справ. / Н.И. Протасеня, Ю.В. Василенко. – Симферополь: Витекс, 1992. – 353 с.

110. Рабинович, М. И. Лекарственные растения в ветеринарной практике. Справ. / М.И. Рабинович. – М.: Агропромиздат, 1987. – 288 с.

111. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Hydrangeaceae* – *Haloragaceae*. – Л.: Наука, 1987. – С. 45-46.

112. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

113. Рыжова, Г.Л. Сравнительное изучение компонентного состава наземной и подземной частей лабазника вязолистного / Г.Л. Рыжова, С.С. Кравцова, В.В. Хасанов, К.А. Дычко // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы IV Всероссийской конференции. Книга 2. – Барнаул: Издательство Алтайского государственного университета. – 2009. – С. 46.

114. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т.2. – С. 364.

115. 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.

116. Складневская, Н.В. сравнительный фитохимический анализ лабазника вязолистного и лабазника камчатского / Н.В. Складневская, Ю.А. Гладкая, Л.А. Пахомова // Материалы в сборнике: Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия. – 2016. – С. 580-583.

117. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия): Справ. / Сост.: С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М.: Медицина, 1988. – 463 с.

118. Степанова Э.Ф. Использование валидации при выборе методики количественного определения суммы флавоноидов в геле с экстрактом цветков лабазника вязолистного / Э.Ф. Степанова, Л.Б. Губанова, Г.А. Голова // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – №1. – С. 126-129.

119. Суслов, Н.И. Влияние экстракта лабазника вязолистного и его фракций на память и работоспособность в эксперименте / Н.И. Суслов, И.В.

Шилова, Н.В. Провалова и др. // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. – 2008. – №6. – С. 47-50.

120. Сухомлинов, Ю.А. Анатомическое строение лабазника вязолистного / Ю.А. Сухомлинов, Л.И. Прокошева // Вестник ВГУ. – 2006. – №1. – С. 222-224.

121. Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилова, Е.Н. Музафарова. – Пушино: Synchronobook, 2013. – 310 с.

122. Тахтаджян, А.Л. Жизнь растений. Цветковые растения. Том 5, часть 2 / А.Л. Тахтаджян. – М.: Изд-во "Просвещение". – 1981. – 576 с.

123. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Стручкова И.В., Кальясова Е.А.: Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 60 с.

124. Удут, В.В. Противотревожное действие биологически активных веществ лабазника обыкновенного / В.В. Удут, А.И. Венгеровский, Н.И. Суслов и др. // Хим.-фарм. журн. – 2012. – Т.46. – №8. – С. 27-29.

125. Улезко, А.В. Психотропные средства в психиатрической практике / А.В. Улезко, Ю.В. Платонова. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2009. – 176 с.

126. Фадеев, Н.Б. Перспективы применения растений рода лабазник / Н.Б. Фадеев // Генетические ресурсы лекарственных и ароматических растений: Материалы Международной конференции. – М., 2004. – С. 328-331.

127. Фармакогнозия. Атлас. Учеб. пособие для студентов фармацевт. ин-тов и фармацевт. фак-тов мед. ин-тов / Е.Я. Ладыгина, Н.И. Гринкевич, И.А. Самылина и др.; Под ред. Н.И. Гринкевич., Е.Я. Ладыгиной. – М.: Медицина, 1989. – 511 с.

128. Филиппова Г.Г. Биохимия растений: метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоят. работы студентов / Г.Г. Филиппова, И.И. Смолич. – Мн.: БГУ, 2004. – 60 с.
129. Фитотерапия с основами клинической фармакологии / Под ред. В.Г. Кукеса. - М.: Медицина, 1999. – 192 с.
130. Флора Сибири *Rosaceae* / С.Н. Выдрин и др. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. - 1988. – С. 99-100.
131. Хазиев, Р.Ш. Стандартизация цветков лабазника вязолистного по содержанию суммы водорастворимых окисляемых веществ / Р.Ш. Хазиев, А.А. Тынчерова // Материалы V Всероссийской конференции с международным участием, Барнаул. – 2012. – С. 313-314.
132. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия (аналитика). В 2 кн. Кн. 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа: Учебник для вузов. – М.: Высш. шк., 2001. – 559 с.: ил.
133. Хроленко, Ю.А. Особенности анатомического строения эпидермиса листьев некоторых растений острова Сахалин / Ю.А. Хроленко // Вестник КрасГАУ. – 2010. – №7. – С. 44-47.
134. Цугкиев, Б.Г. Содержание металлов и БАВ в лабазнике вязолистном (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) / Б.Г. Цугкиев, Л.Ч. Гагиева, Ц.У. Созанов, К.Г. Караев // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2017. – Т.54. – №2. – С. 202-207.
135. Черненькая, Е.В. Динамика накопления химических элементов в лабазнике вязолистном (*Filipendula ulmaria*) Томской области / Е.В. Черненькая, А.С. Миронова // Международная молодежная школа -семинар: Геоэкология, охрана и защита окружающей среды. Материалы конференции. – Томск, 2013. – С. 623-625.
136. Шалдаева, Т.М. Фенольные соединения и антиоксидантная активность некоторых видов рода *Filipendula* Mill. (*Rosaceae*) / Т.М. Шалдаева, Г.И. Высочина, В.А. Костикова // Вестник Воронежского

государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – №1. – С. 204-212.

137. Шаталаев, И.Ф. Молекулярные формы малатдегидрогеназы лекарственных растений семейства сложноцветные / И.Ф. Шаталаев, Н.В. Расцветова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т.16, Вып. №5(2). – С. 1033 - 1035.

138. Шашкова М.А. Изучение морфологических и анатомических диагностических признаков травы лабазника вязолистного / М.А. Шашкова, А.С. Рабичева, А.И. Ахметзянова // Материалы в сборнике: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов волггму с международным участием, посвященной 80-летию ВОЛГГМУ. – 2015. – С. 521-522.

139. Шилова, И.В. Антиоксидантная активность экстрактов надземной части лабазника вязолистного / И.В. Шилова, Е.А. Краснов и др. // Хим.-фарм. журн. – 2006. – Т.40. – №12. – С. 22-24.

140. Шилова, И.В. Химический состав и антиоксидантные свойства растений рода лабазник и альфредия / И.В. Шилова, Е.А. Краснов, Е.Ю. Авдеева и др. // IV Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ»: Тезисы докладов. Сыктывкар, 2006. – 217 с.

141. Шилова, И.В. Рациональные подходы к поиску и созданию ноотропных средств растительного происхождения / И.В. Шилова // Вестник Российского Университета Дружбы Народов. – 2007. – №6. – С. 250-256.

142. Шилова, И.В. Антиоксидантные свойства и биологически активные вещества экстракта лабазника обыкновенного / И.В. Шилова, Е.И. Короткова, А.Н. Вторушина // V Всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ»: Тезисы докладов. Уфа, 2008. – 329 с.

143. Шилова, И.В. Ноотропная активность экстрактов наземной части лабазника вязолистного / И.В. Шилова, Н.И. Суслов, Н.В. Провалова и др. // *Вопр. биол. мед. и фарм. химии.* – 2008. – №4. – С. 24-26.
144. Шилова, И.В. Химический состав и биологическая активность фракций экстракта лабазника вязолистного / И.В. Шилова, А.А. Семенов, Н.И. Суслов и др. // *Хим.-фарм. журн.* – 2009. – Т.43. – №4. – С.7-11.
145. Шилова, И.В. Гепатопротекторные свойства экстракта лабазника вязолистного / И.В. Шилова, Е.А. Геренг, Т.В. Жаворонок и др. // *Вопр. биол. мед. и фарм. химии.* – 2010. – №2. – С. 28-32.
146. Шилова, И.В. Стандартизация травы лабазника вязолистного / И.В. Шилова, И.А. Самылина, Н.И. Суслов // *Фармация.* – 2012. – №2. – С. 19-22.
147. Шилова, И.В. Разработка состава, технология и стандартизация таблеток с экстрактом лабазника вязолистного сухим / И.В. Шилова, Т.Г. Хоружая, И.А. Самылина // *Хим.-фарм. журн.* – 2013. – Т.47. – №10. – С. 41-44.
148. Шилова, И.В. Химический состав растений Сибири и разработка ноотропных средств на их основе / И.В. Шилова, Н.И. Суслов, В.В. Жданов // *Первая Российская конференция по медицинской химии: Тезисы докладов.* – Москва. – 2013. – С. 182.
149. Шилова, И.В. Фармакологические аспекты изучения химических элементов в растениях / И.В. Шилова // *Геохимия живого вещества: материалы Международной молодежной школы–семинара; Томский политехнический университет.* – Томск: Издательство Томский политехнический университет. – 2013. – С. 111-116.
150. Шилова, И.В. Ноотропные свойства экстракта наземной части лабазника обыкновенного / И.В. Шилова, Н.И. Суслов // *Вестник фармации.* – 2014. – Т.64. – №2. – С. 84-89.
151. Шилова, И.В. Лабазник обыкновенный – источник биологически активных веществ / И.В. Шилова // *Материалы в сборнике: Научный поиск в*

современном мире сборник материалов 7-й международной науч.-практ. Конф., 2014. – С. 117-118.

152. Шилова, И.В. Фитохимическое исследование надземной части *Filipendula vulgaris* Moench флоры Сибири / Шилова И.В. // Традиционная медицина. – 2015. – №2 (41). – С. 50-51.

153. Шилова, И.В. Технология и стандартизация экстрактов лабазника вязолистного / И.В. Шилова, Т.Г. Хоружая, И.А.Самылина // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т.49. – №5. – С. 42-46.

154. Шилова, И.В. Биологически активные вещества лабазника обыкновенного и оценка их антиоксидантных свойств / И.В. Шилова, Е.И. Короткова // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т.51. – №7. – С. 46-49.

155. Юдина, Р.С. Генетика и фенотипика малатдегидрогеназы растений / Р.С. Юдина // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т.14. – №2. – С. 243-254.

156. Eprintsev, A.T. Function of malatdehydrogenase complex of Maize mesophyll and bundle sheath cell under salt stress condition / A.T. Eprintsev, O.S. Fedorina // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2006. – Vol.2. – №2. – P. 4-9.

157. European Pharmacopoeia. – 5-th Ed. – Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008. – P. 2524.

158. João Lima, M. Flower extracts of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim inhibit the proliferation of the NCI-H460 tumour cell line / João Lima M., Diana Sous, Raquel T. Lima et al // Industrial Crops and Products. – 2014. – Vol.59. – P. 149-153.

159. Katanić, J. The ameliorating effect of *Filipendula hexapetala* extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin / J. Katanić, V. Mihailović, N. Stanković, T. Boroja, M. Mladenović, S. Matic, S. Stanić, V. Stanković, S. Kreft, M. Mihailović // Journal of Functional Foods. – 2015. – Vol.18. – С. 198-212.

160. Katanić, J. Dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.): potential role as antioxidant and antimicrobial agent / J. Katanić, V. Mihailović, N. Stanković, T.

Boroja, M. Mladenović, S. Solujić, M.S. Stanković, M.M. Vrvic // EXCLI Journal. – 2015. – Vol.14. – C. 1-20.

161. Katanić J. In vitro and in vivo assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent / J. Katanić, T. Boroja, V. Mihailović, S. Nikles, Pan S.-P., R. Bauer, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, S. Mitrović // Journal of Ethnopharmacology. – 2016. – Vol.193. – C. 627-636.

162. Kato, E. Substrate-like water soluble lipase inhibitors from *Filipendula kamtschatica* / E. Kato, M. Yama, R. Nakagomi et al // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2012. – Vol.22. – P. 6410-6412.

163. Lillian Barro Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants / Lillian Barros, Luis Cabrita, Miguel Vilas Boas et al // Food Chemistry. – 2011. – Vol.127. – P. 1600-1608.

164. Lima, M.J. Flower extracts of *Filipendula ulmaria* (l.) Maxim inhibit the proliferation of the NCI-H460 tumour cell line // M.J. Lima, M.H. Vasconcelos, D. Sousa, R.T. Lima, A.M. Carvalho, I.C.F.R. Ferreira // Industrial Crops and Products. – 2014. – Vol.59. – C. 149-153.

165. Movsumov, I.S. Flavonoids of *Acacia dealbata* and *Filipendula vulgaris* growing in Azerbaijan / I.S. Movsumov, E.E. Garaev, T.A. Suleimanov, E.A. Garaev, B. Baghdikian, E. Ollivier, R. Elias, G. Herbette // Chemistry of Natural Compounds. – 2017. – Vol.53. – No.4. – C. 754-755.

166. Neagu, E. Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts / E. Neagu, G. Paun, C. Albu, G.-L. Radu // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. – 2015. – Vol.52. – C. 1-6.

167. Niamh Harbourne Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*) / Niamh Harbourne, Eunice Marete, Jean Christophe Jacquier et al // LWT - Food Science and Technology. – 2009. – Vol.42. – P. 1468-1473.

168. Pukalskiene, M. Phytochemical composition and antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients / M. Pukalskiene, P.R. Venskutonis, A. Pukalskas // Journal of Functional Foods. – 2015. – Vol.15. – C. 233-242.
169. Radulović, N. Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil / N. Radulović, M. Mišić, J. Aleksić et al // Fitoterapia. – 2007. – Vol.78. – P. 565-570.
170. Samardžić, S. Antihyperalgesic activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench in a rat model of inflammation / S. Samardžić, Z. Maksimović, M. Tomić, U. Pecikoza, R. Stepanović-Petrović // Journal of Ethnopharmacology. – 2016. – Vol.193. – C. 652-656.
171. Samardžić, S. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. / S. Samardžić, J. Arsenijević, Z. Maksimović, D. Božić, M. Milenković, V. Tešević // Journal of Ethnopharmacology. – 2018. – Vol.213. – C. 132-137.
172. Shilova, I.V. Development of the composition, technology, and standardization of tablets containing dry extract of meadowsweet *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim / I.V. Shilova, T.G. Khoruzhaya, I.A. Samylina // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2014. – Vol.47. – No.10. – C. 552-555.
173. Shilova, I.V. Nootropic effect of meadowsweet (*Filipendula vulgaris*) extracts / I.V. Shilova, N.I. Suslov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol.158. – No.5. – C. 659-663.
174. Shilova, I.V. Nootropic effects of *Filipendula vulgaris* Moench. water extract fractions / I.V. Shilova, N.I. Suslov, V.P. Amelchenko // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol.159. – No.3. – C. 376-379.
175. Shilova, I.V. Technology and standardization of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) extract / I.V. Shilova, T.G. Khoruzhaya, I.A. Samylina // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2015. – Vol.49. – No.5. – C. 329-333.
176. Shilova, I.V. Biologically active substances from dropwort (*Filipendula vulgaris*) and assessment of their antioxidant properties / I.V. Shilova,

E.I. Korotkova // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2017. – Vol.51. – No.7. – C. 602-605.

177. Yoko Nitta Inhibitory activity of *Filipendula ulmaria* constituentson recombinant human histidine decarboxylase / Yoko Nitta, Hiroe Kikuzaki, Toshiaki Azuma et al // Food Chemistry. – 2013. – Vol.138. – P. 1551-1556.

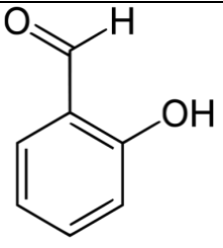
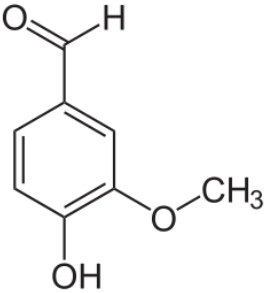
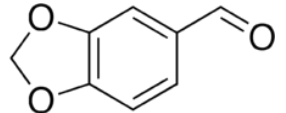
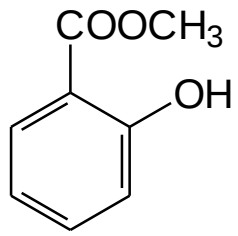
178. Zoran Maksimović Antioxidant activity of *Filipendula hexapetala* flowers / Zoran Maksimović, Silvana Petrović, Milica Pavlović et al // Fitoterapia. – 2007. – Vol.78. – P. 265-267.

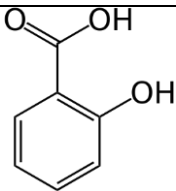
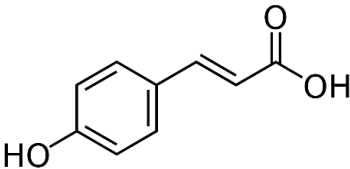
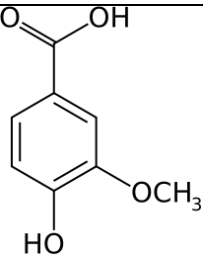
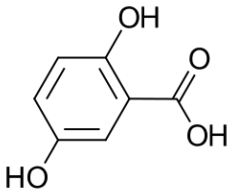
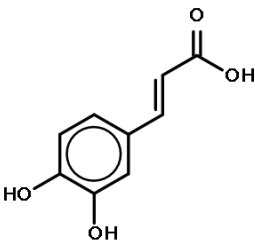
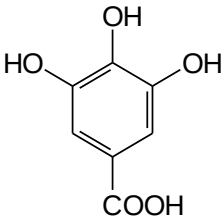
ПРИЛОЖЕНИЯ

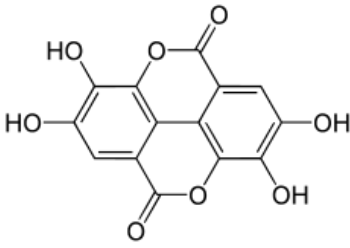
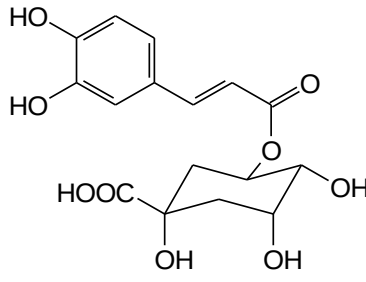
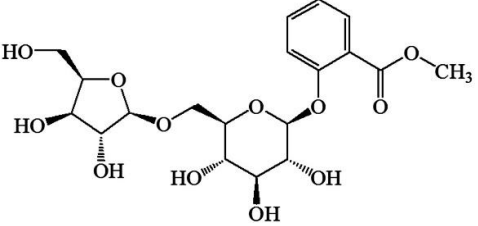
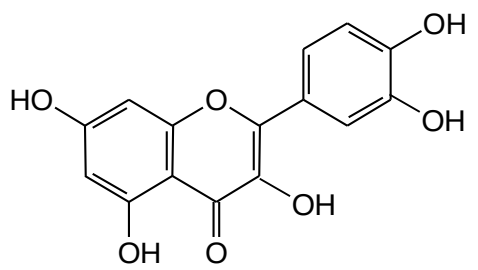
ПРИЛОЖЕНИЕ 1

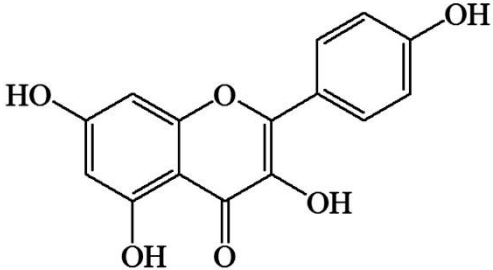
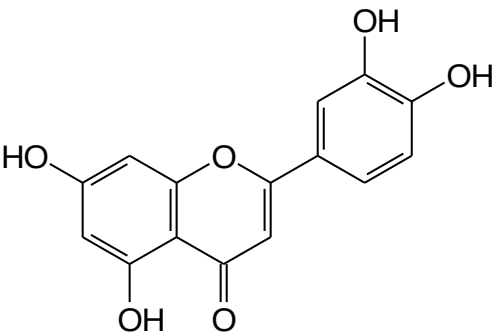
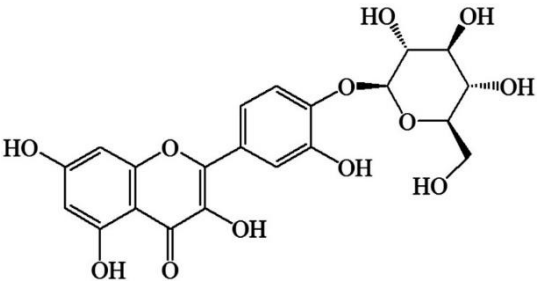
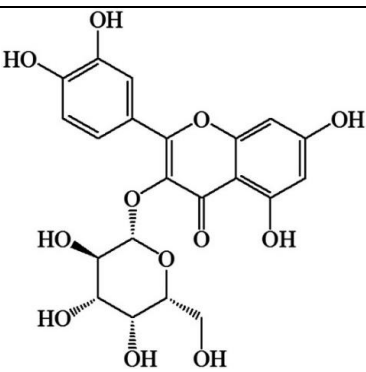
Таблица 1

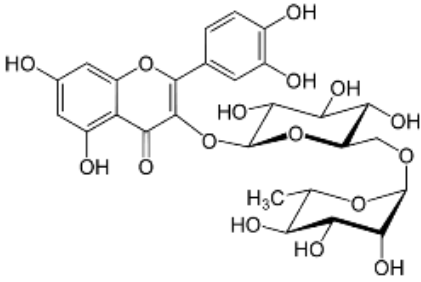
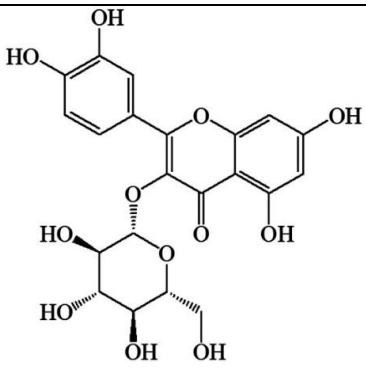
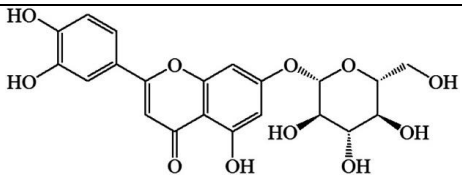
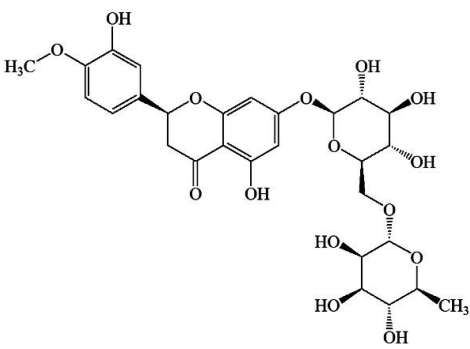
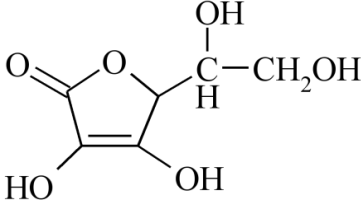
**Химические соединения различных сырьевых органов лабазника
вязолистного (*Filipendula ulmaria*) и лабазника шестилепестного
(*Filipendula hexapetala*)**

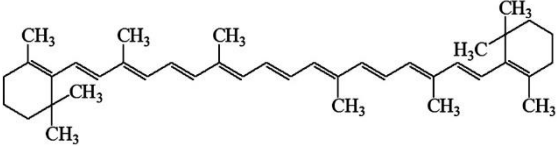
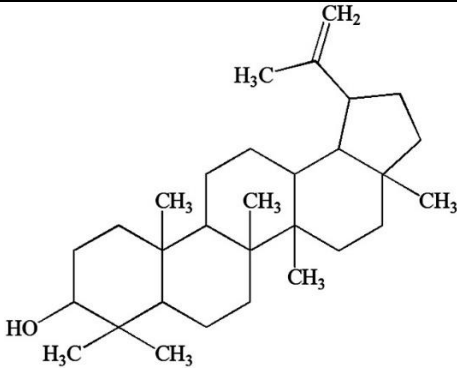
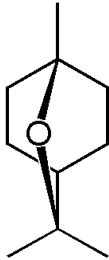
№	Соединение	Структура	Сырьевой источник
Фенольные соединения			
1	Салициловый альдегид $C_{15}H_{10}O_7$ 122,123 г/моль	 2-Гидроксibenзальдегид	Листья, цветы, корни и корневища <i>F. ulmaria</i> .
2	Ванилин $C_8H_8O_3$ 152,15 г/моль	 3-Метокси-4-гидроксibenзальдегид	Цветки, корни, корневища <i>F. ulmaria</i> .
3	Гелиотропин (пиперональ) $C_8H_6O_3$ 150,13 г/моль	 3,4-Метилendioксибензальдегид	Цветки <i>F. ulmaria</i> .
4	Метилсалицилат $C_8H_8O_3$ 152,15 г/моль	 Метилoвый эфир 2-гидроксibenзойной кислоты	Листья, цветы корни и корневища <i>F. ulmaria</i> . Цветки <i>F. hexapetala</i> .

5	Салициловая кислота $C_7H_6O_3$ 138,12 г/моль	 2-гидроксibenзойная кислота	Трава, корни и корневища <i>F. hexapetala</i> .
6	Пара-кумаровая кислота $C_9H_8O_3$ 164,16 г/моль	 3-(4-гидроксифенил) пропеновая кислота	Цветки <i>F. ulmaria</i> и <i>F. hexapetala</i> .
7	Ванилиновая кислота $C_8H_{14}O_4$ 168,15 г/моль	 4-гидроксi-3-метоксibenзойная кислота	Листья <i>F. ulmaria</i> . Цветки <i>F. hexapetala</i> .
8	Гентизиновая кислота $C_7H_6O_4$ 154,22 г/моль	 2,5-дигидроксibenзойная кислота	Надземная часть <i>F. ulmaria</i> .
9	Кофейная кислота $C_9H_{10}O_4$ 180,16 г/моль	 3,4-диоксикоричная кислота	Листья, цветки <i>F. hexapetala</i> .
10	Галловая кислота $C_6H_{12}O_5$ 170,12 г/моль	 3,4,5-Тригидроксibenзойная кислота	Листья <i>F. ulmaria</i> . Цветки <i>F. hexapetala</i> .

11	Эллаговая кислота $C_{14}H_6O_8$ 302,19 г/моль	 2,3,7,8-Тетрагидрокси [1] бензопирано [5,4,3-cde] [1] бензопиран-5,10-дион	Листья, цветки <i>F. ulmaria</i>.
12	Хлорогеновая кислота $C_{16}H_{18}O_9$ 354,31 г/моль	 (1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-Дигидроксифенил) проп-2-енолокси-1,4,5-тригидроксициклогексан-1-карбоновая кислота	Листья, цветки, пыльца <i>F. ulmaria</i> цветки <i>F. hexapetala</i>.
13	Монотропитин (гаультерин) $C_{19}H_{26}O_{12}$ 446,41 г/моль	 Метил-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-6-[[[(2R,3R,4R,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил) оксолан-2-ил] оксиметил]-3,4,5-тригидрокси оксан-2-ил] оксibenзоат	Цветки <i>F. ulmaria</i> Надземная часть, корни, корневища <i>F. hexapetala</i>.
Флавоноиды			
14	Кверцетин $C_{15}H_{10}O_7$ 302,24 г/моль	 3, 5, 7 ,3',4', - Пентагидроксифлавонон	Листья, цветки <i>F. ulmaria</i>. Листья, цветки, трава, и корни с корневищами <i>F. hexapetala</i>.

15	Кемпферол $C_{15}H_{10}O_6$ 286,24 г/моль	 3,5,7-Тригидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4-хромен-4-он	Листья и цветы <i>F. ulmaria</i>. Трава, цветки <i>F. hexapetala</i>.
16	Лютеолин $C_{15}H_{10}O_6$ 286,24 г/моль	 3', 4', 5,7-Тетрагидроксифлавоон	Листья <i>F. ulmaria</i>. Наземная часть, корни и корневища <i>F. hexapetala</i>.
17	Спиреозид $C_{21}H_{20}O_{12}$ 464,38 г/моль	 4'-O-β-D-Глюкозид кверцетина	Листья, цветки <i>F. ulmaria</i>. Трава, цветки и корни с корневищами <i>F. hexapetala</i>.
18	Гиперозид $C_{21}H_{20}O_{12}$ 464,38 г/моль	 Кверцетин 3-O- β -D-галактопиранозид	Листья, цветы <i>F. ulmaria</i>. Наземная часть и корни с корневищами <i>F. hexapetala</i>.

19	Рутин (софорин) $C_{27}H_{30}O_{16}$ 610,52 г/моль	 Кверцетин-3-О-рутинозид	Листья, цветки <i>F. ulmaria</i>. Трава, цветки и корни с корневищами <i>F. hexapetala</i>.
20	Изокверцитрин $C_{21}H_{20}O_{12}$ 464,38 г/моль	 Глюкозил-3-кверцетин	Листья, цветки <i>F. ulmaria</i>. Корни и корневища <i>F. hexapetala</i>.
21	Цинарозид $C_{21}H_{20}O_{11}$ 448,38 г/моль	 Лютеолин-7-О-β-D-гликозид	Трава, корни и корневища <i>F. hexapetala</i>.
22	Гесперидин $C_{28}H_{34}O_{15}$ 610,56 г/моль	 3',5,7-Тригидрокси-4'-метокси флавонон -7-рамноглюкозид	Трава, корни и корневища <i>F. hexapetala</i>.
Витамины			
23	Аскорбиновая кислота $C_6H_8O_6$ 176,12 г/моль	 Гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты	Цветки, пыльца, корни и корневища <i>F. ulmaria</i>. Трава, листья, цветки и корни с корневищами <i>F. hexapetala</i>.

24	β-каротин $C_{40}H_{56}$ 536,89 г/моль		Пыльца <i>F. ulmaria</i>. Листья, цветки <i>F. hexapetala</i>.
<i>Другие соединения</i>			
25	Лулеол (фагастерол) $C_{30}H_{50}O$ 426,72 г/моль		Трава <i>F. ulmaria</i>.
26	Оксиметил- фурфурол $C_6H_6O_3$ 126,11 г/моль	 5-(Гидроксиметил)-2-фуральдегид	Цветки <i>F. ulmaria</i>.
27	1,8-цинеол (эвкалиптол) $C_{10}H_{18}O$ 154,25 г/моль	 1,8-Эпокси-пара-ментан	Цветки <i>F. ulmaria</i>.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица 1

**Сравнительная характеристика морфологических и анатомо-
гистологических диагностических признаков цветков лабазника
вязолистного и лабазника шестилепестного**

Морфологические признаки цветков		
Признаки	Лабазник вязолистный	Лабазник шестилепестный
Тип соцветия	Метельчатое, крупное, до 20 см длиной, рыхлое. Гипантий плоский.	Щитковидно-метельчатое, крупное, 12-15 мм диаметром.
Строение чашечки и венчика	Чашечка пятилопастная, с отогнутыми вниз треугольно-яйцевидными долями, снаружи слабовойлочная. Венчик раздельнолепестный, в 2-2,5 раза длиннее чашечки.	Чашечка 6-ти членная, актиноморфная, сростнолистная. Венчик 6-лепестный.
Число и форма чашелистиков и лепестков	Чашелистиков и лепестков по 5 (редко лепестков 6). Лепестки обратно-яйцевидные с длинным ноготком, по краю слегка волнистые, с вогнутой морщинистой поверхностью, с обеих сторон голые.	Чашелистиков и лепестков по 5 или 6 (редко лепестков 7). Верхушки чашелистиков заостренные, густо опушенные у основания и середины пластинки чашелистика. Лепестки удлинненно-обратно-яйцевидные, с короткими ноготками до 6 мм длиной.
Число и строение тычинок	Тычинки многочисленные, свободные, в 1,5-2 раза длиннее лепестков, отогнутые и одинаковые по длине.	Тычинки многочисленные, по длине равны лепесткам или несколько длиннее их.
Характер поверхности цветоножки	Густо опушена.	Не опушена.
Цвет	Лепестки и бутоны желтовато-белые. Чашечки, цветоножки и веточки темно-зеленые.	Лепестки и бутоны белые или бледно-розовые.

Анатомо-гистологические признаки цветков		
<i>Признаки</i>	<i>Лабазник вязолистный</i>	<i>Лабазник шестилепестный</i>
Характер эпидермиса чашелистика	Клетки, удлинённые с извилистыми стенками и бугорчатой поверхностью. На наружной стороне встречаются одноклеточные, остроконечные, извилистые волоски.	Имеется тонкая кутикула, мезофилл листочков состоит из однородной, хлорофилоносной паренхимы, не дифференцируется и состоит из округлых клеток с межклетниками. Сосудисто-волоконная система редуцирована, без вторичных утолщений, лубяные волокна, также, как и колленхима отсутствуют. Имеют нектарники, которые размещаются по одному на пластинке у основания с внутренней и верхней стороны.
Характер эпидермиса лепестка	Клетки округлые со слегка извилистыми стенками, с внутренней (верхней) стороны бугорчатый, с наружи – гладкий.	Клетки паренхимные, округлые, покрыты тонкой кутикулой. Имеются обширные межклетники, а также малое количество пигмента в клетках. Клетки мезофилла тонкостенные, целлюлозные. Проводящая система представляет собой жилки, состоящие из спирально-кольчатых трахеид. Лепесток имеет утолщения в местах, где проходит средняя жилка, а также у его основания.
Особенности строения пыльца	Зерна почти шаровидные, мелкие (до 20 мкм), желтые, с пятнистой поверхностью, в очертании с полюса трехлопастные.	Зерна, находящаяся внутри пыльника по форме округло-угловатые, гладкие.

**Сравнительная характеристика морфологических и анатомо-
гистологических диагностических признаков плодов лабазника
вязолистного и лабазника шестилепестного**

Морфологические признаки плодов		
<i>Признаки</i>	<i>Лабазник вязолистный</i>	<i>Лабазник шестилепестный</i>
Тип плода	Сухая многолистовка.	Сухая многолистовка.
Форма плода	Сплюснутые, спирально завернутые вдоль оси листовка.	Волосистая, свободная, сидячая, прямая листовка.
Число листовок	12 односемянных листовок.	10 односемянных листовок.
Форма отдельной листовки и особенности строения околоплодика	Форма продолговато-выпуклая с оттянутым носиком на верхушке. Околоплодик голый.	Форма каплевидная, горизонтально оттянутым на верхушке носиком. Околоплодик с прижатым по поверхности опушением.
Цвет околоплодика	Желто-зеленый, светлый.	Желто-зеленый, темный.
Анатомо-гистологические признаки плодов		
Экзокарпий эпидермиса (форма клеток, клеточных стенок, тип устьичных аппаратов, характер опушения)	Форма клеток продолговатая, неправильная. Клеточные стенки извилистые, тонкостенные, плотно прилегающие друг к другу. Устьичные аппараты аномоцитного типа, мелкие, немногочисленные. Волоски простые одноклеточные, немногочисленные.	Форма клеток угловатая, неправильная. Клеточные стенки заметно утолщены. Устьичные аппараты аномоцитного типа, мелкие, немногочисленные. Ретортовидные многочисленные волоски имеющие округло-расширенные основания и острые оттянутые верхушки.
Характер паренхимы (мезокарпий)	Клетки овально-круглые, крупные, хлорофиллоносные. Целлюлозные стенки слабо утолщены с аморфным протопластом по цвету желто-зеленым. Изредка в клетках монокристаллы и друзы оксалата кальция.	Клетки округлые, мелкие. Целлюлозные стенки слабо утолщены с аморфным протопластом по цвету светло-зеленый. Монокристаллы и друзы оксалата кальция отсутствуют.

<i>Признаки</i>	<i>Лабазник вязолистный</i>	<i>Лабазник шестилепестный</i>
Секреторные каналы, млечники, вместилища	Диагностируются в плодоножке.	Не диагностируются.
Характер проводящей системы	Один крупный коллатеральный пучок со стороны шва листовки. Слабо развита ксилема. Сосуды ксилемы мелкие. Флоэмная часть крупнее ксилемной, проводящие элементы мелкоклеточные, тонкостенные.	Один крупный коллатеральный пучок со стороны шва листовки. Ксилема развита слабо, представлена сосудами, расположенными в два ряда. Сосуды мелкие. Флоэмная часть пучка хорошо развита, проводящие элементы мелкоклеточные, тонкостенные.
Наличие механической ткани (перикарпий)	Волокна склеренхимы на поперечном срезе перикарпия узкопросветные с видимыми остатками протопласта. Клеточные стенки заметно утолщены и лигнифицированы.	Волокна склеренхимы на поперечном срезе перикарпия широкопросветные с видимыми остатками протопласта. Клеточные стенки заметно утолщены и лигнифицированы.

Сравнительная характеристика морфологических и анатомо-гистологических диагностических признаков подземной части лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного

Морфологические признаки подземных органов		
<i>Признаки</i>	<i>Лабазник вязолистный</i>	<i>Лабазник шестилепестный</i>
Форма и особенности корней и корневищ	Корень без клубневидных утолщений с ползучим корневищем.	Короткий корень и корневище имеющее округлые или веретеновидные утолщения («орешки»).
Анатомо-гистологические признаки подземных органов		
Особенности корня	Переходного от первичного к вторичному типу строения. Клетки <u>экзодермы</u> округло-шестигранные по форме имеют равномерно утолщенные плотно сомкнутые оболочки. Первичная <u>ксилема пучка</u> сильно паренхимизирована. <u>В центре корня</u> расположена древесная перенхима первичного происхождения. Проводящие элементы прокамбиальной <u>флоэмы</u> не диагностируются.	Переходного от первичного к вторичному типу строения. Клетки <u>экзодермы</u> уплощенные, прозенхимные, с бурым аморфным протопластом. Мелкопросветные проводящие элементы первичной <u>ксилемы</u> расположены радиально. <u>В центре корня</u> расположена древесная перенхима. <u>Флоэма</u> мелкоклеточная, по периферии имеет клетки с утолщенными целлюлозными оболочками.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

**^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР-, масс-спектры выделенных веществ из плодов
лабазника вязолистного**

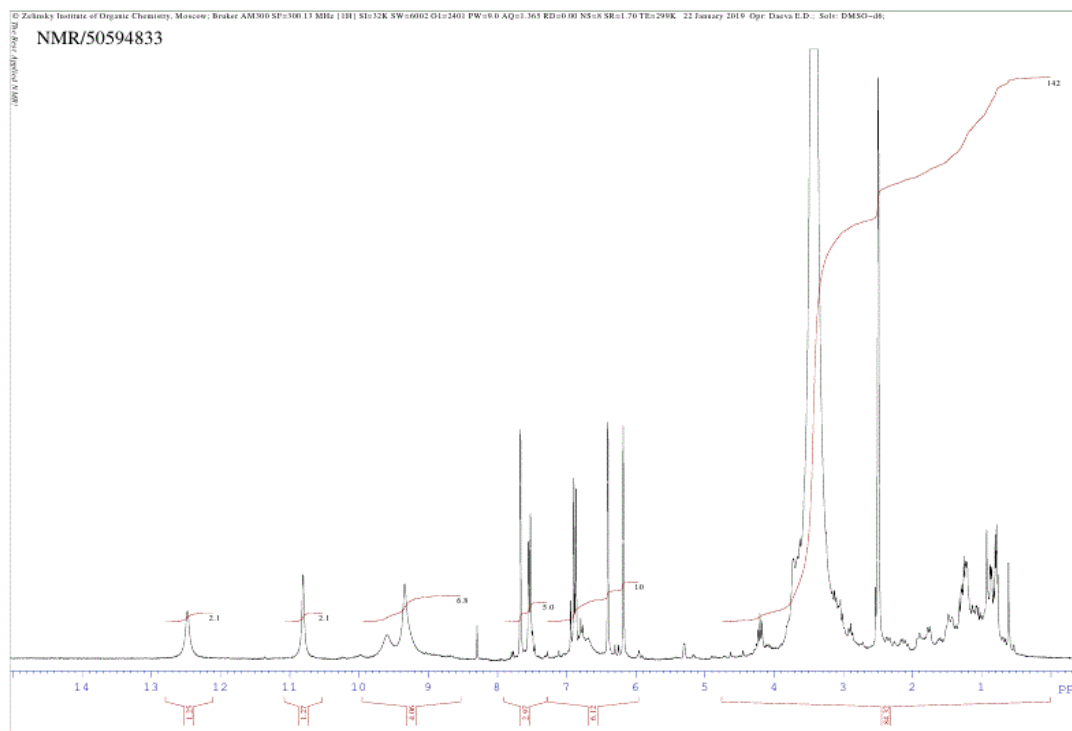


Рисунок 1 – ^1H -ЯМР-спектр 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона (кверцетин)

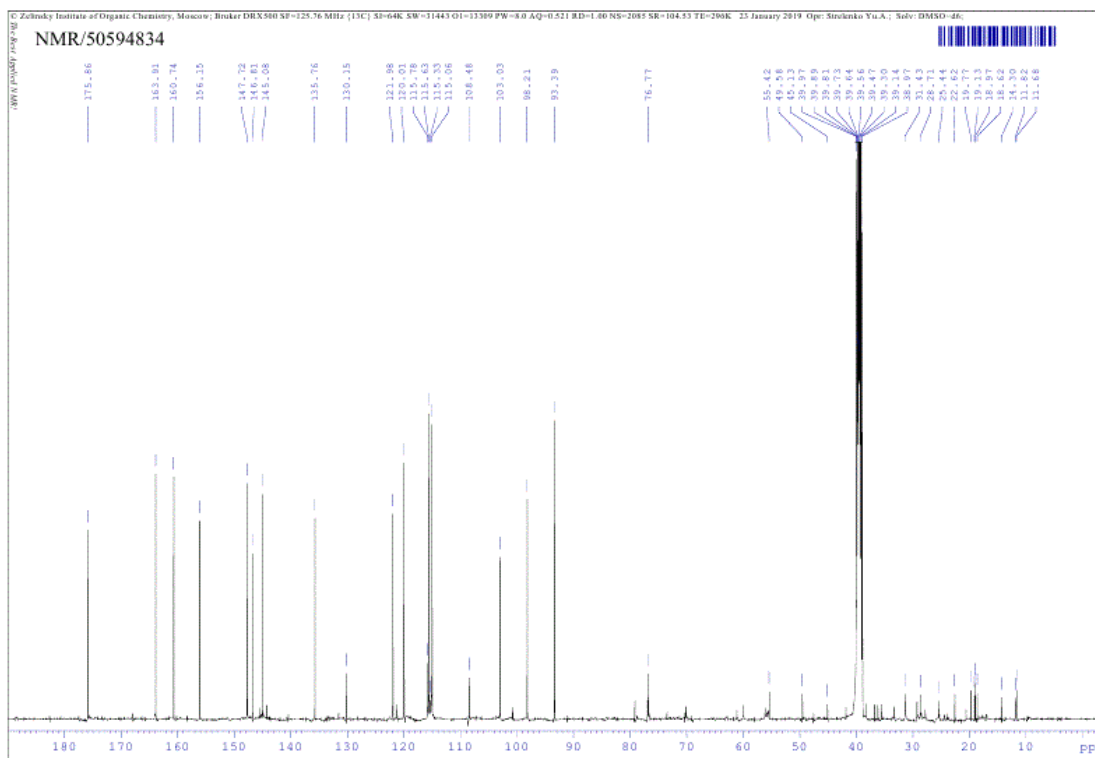


Рисунок 2 – ^{13}C -ЯМР-спектр 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона (кверцетин)

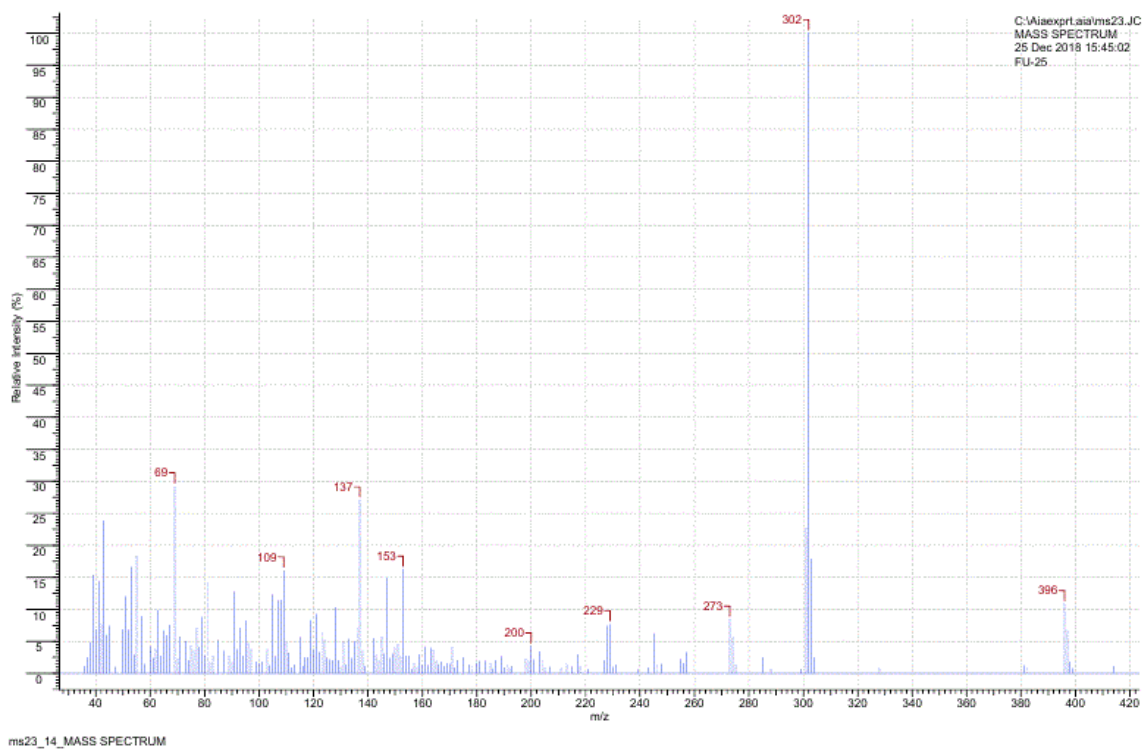


Рисунок 3 – Масс-спектр 3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлавона (кверцетин)

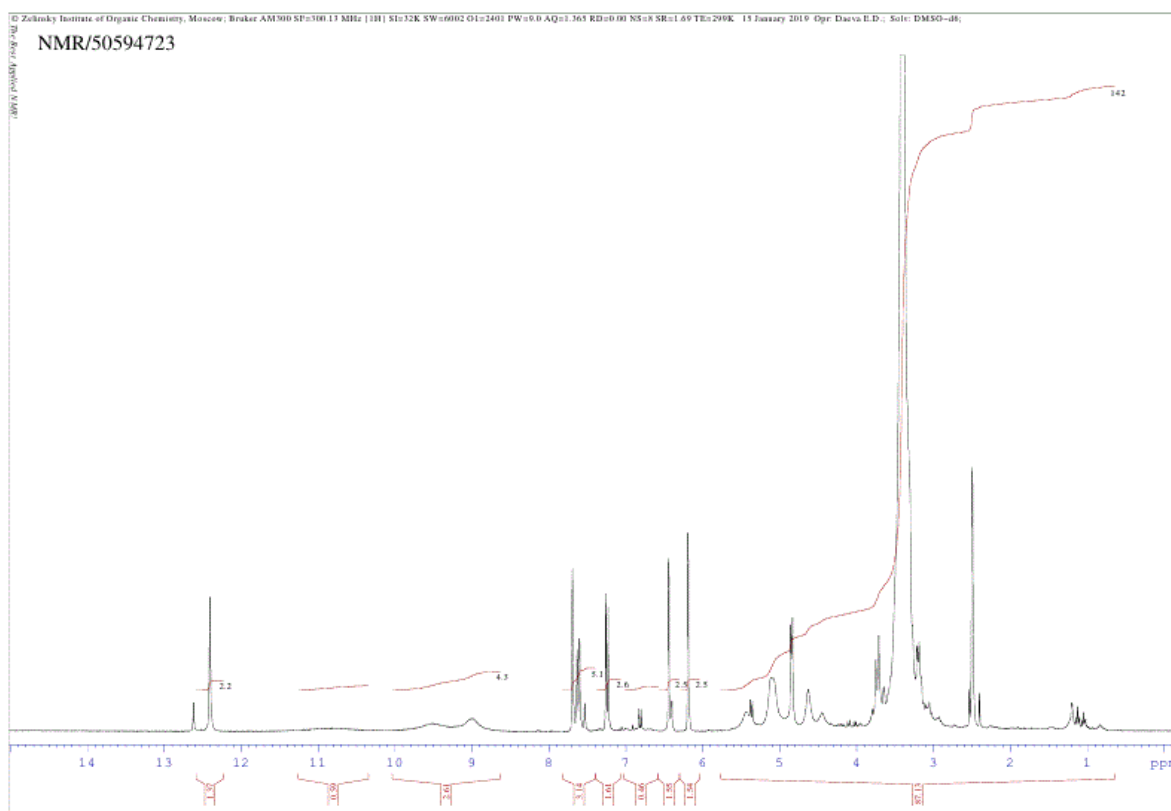


Рисунок 4 – ¹H-ЯМР-спектр 4¹-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3¹,4¹-пентагидрокси флавона (спиреозид)

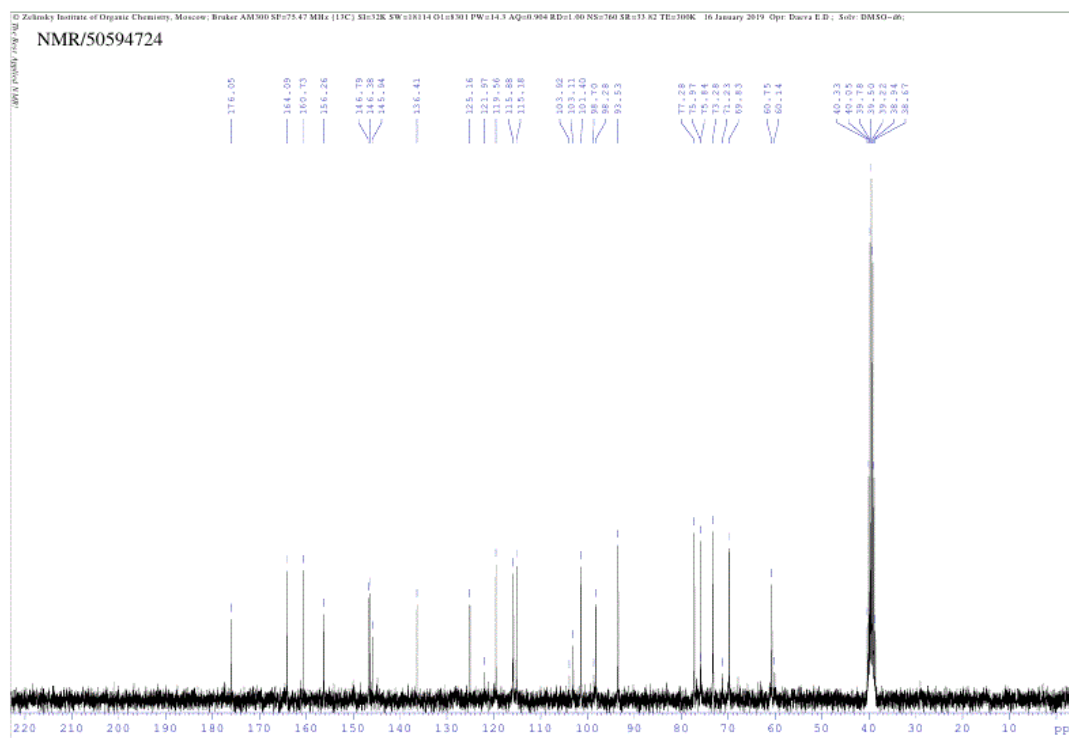


Рисунок 5 – ^{13}C -ЯМР-спектр 4'-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси флавона (спиреозид)

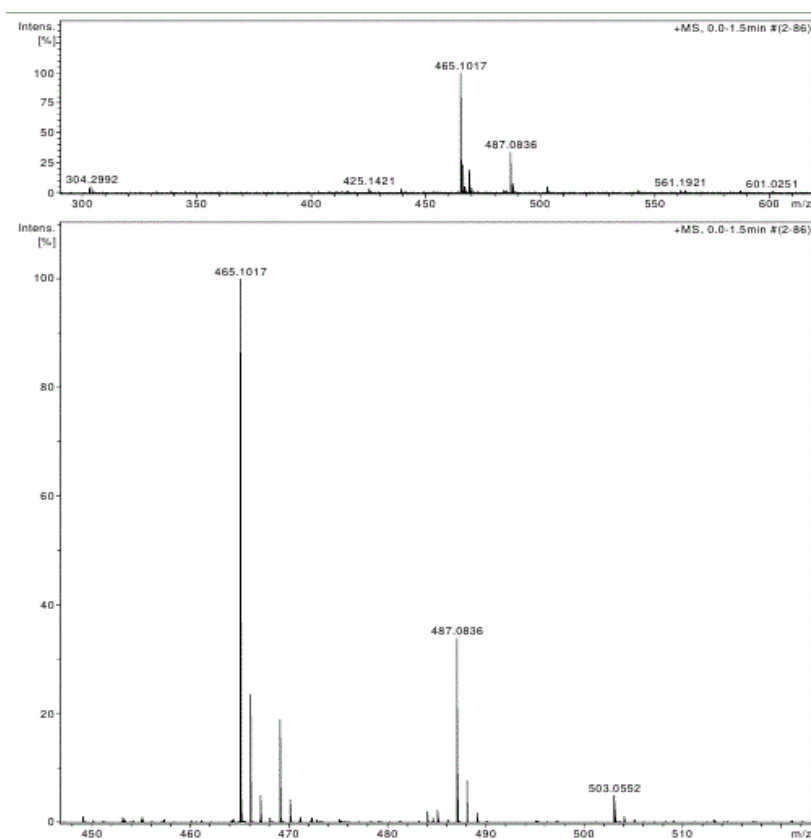
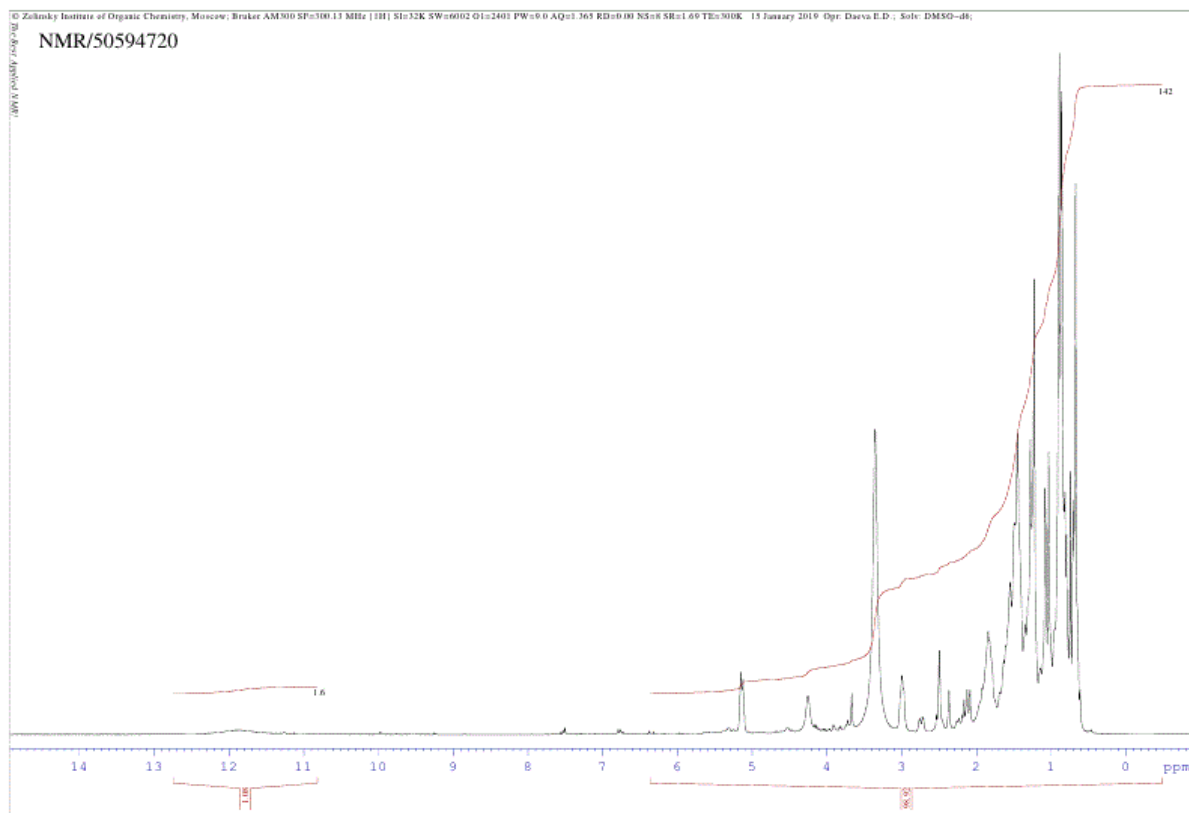
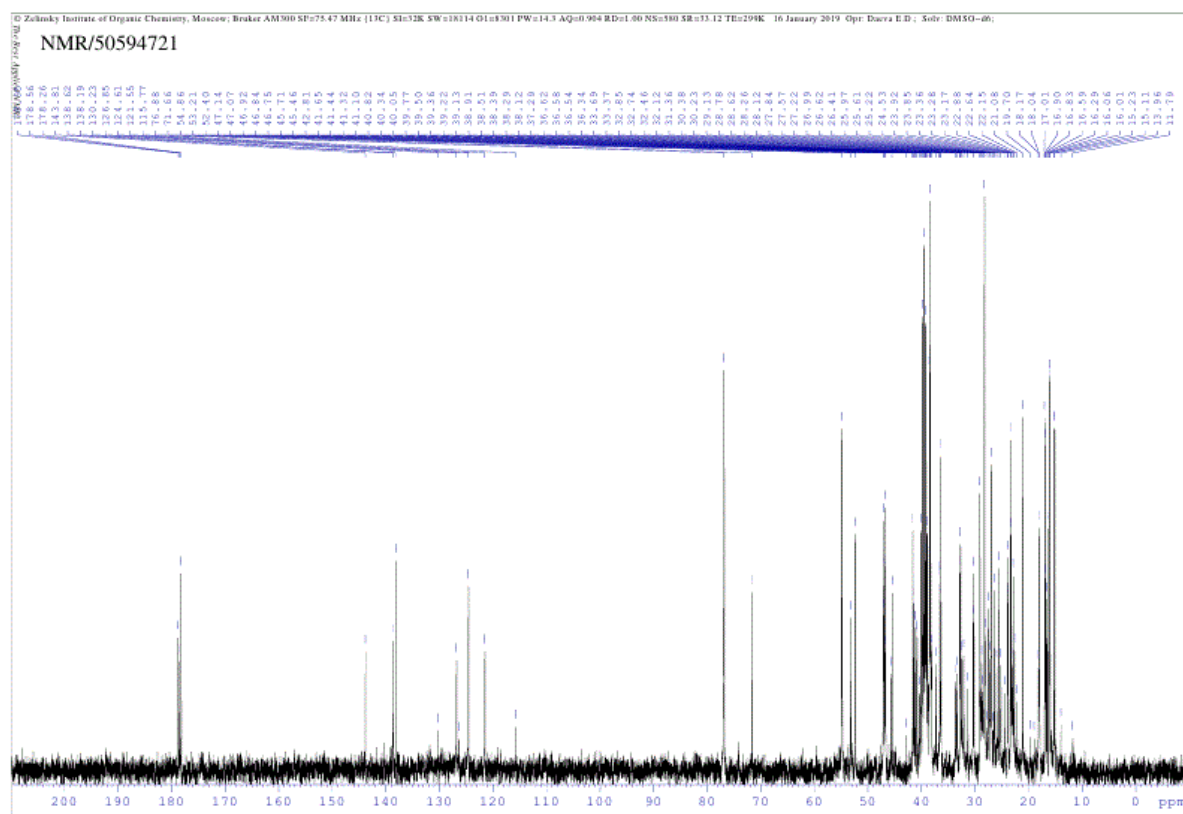


Рисунок 6 – Масс-спектр 4'-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси флавона (спиреозид)

Рисунок 7 – ^1H -ЯМР-спектр лупеолаРисунок 8 – ^{13}C -ЯМР-спектр лупеола

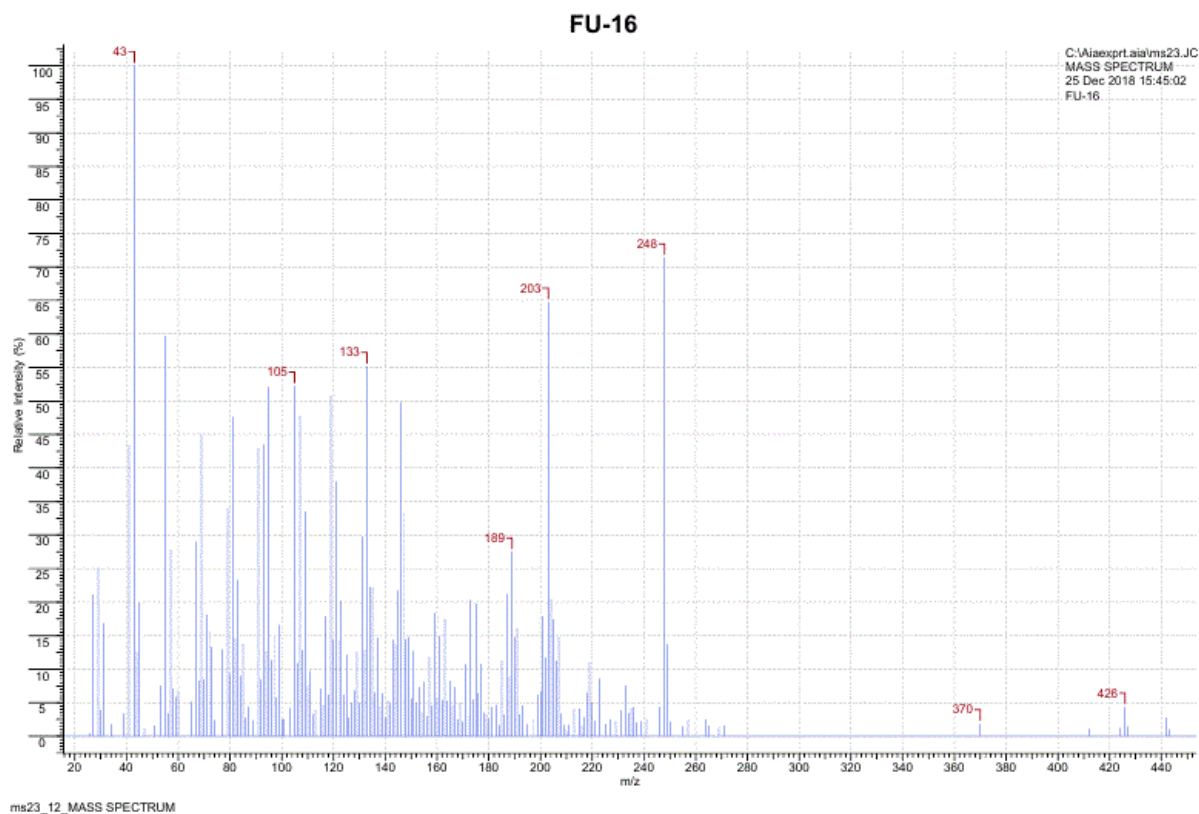


Рисунок 9 – Масс-спектр лупеола

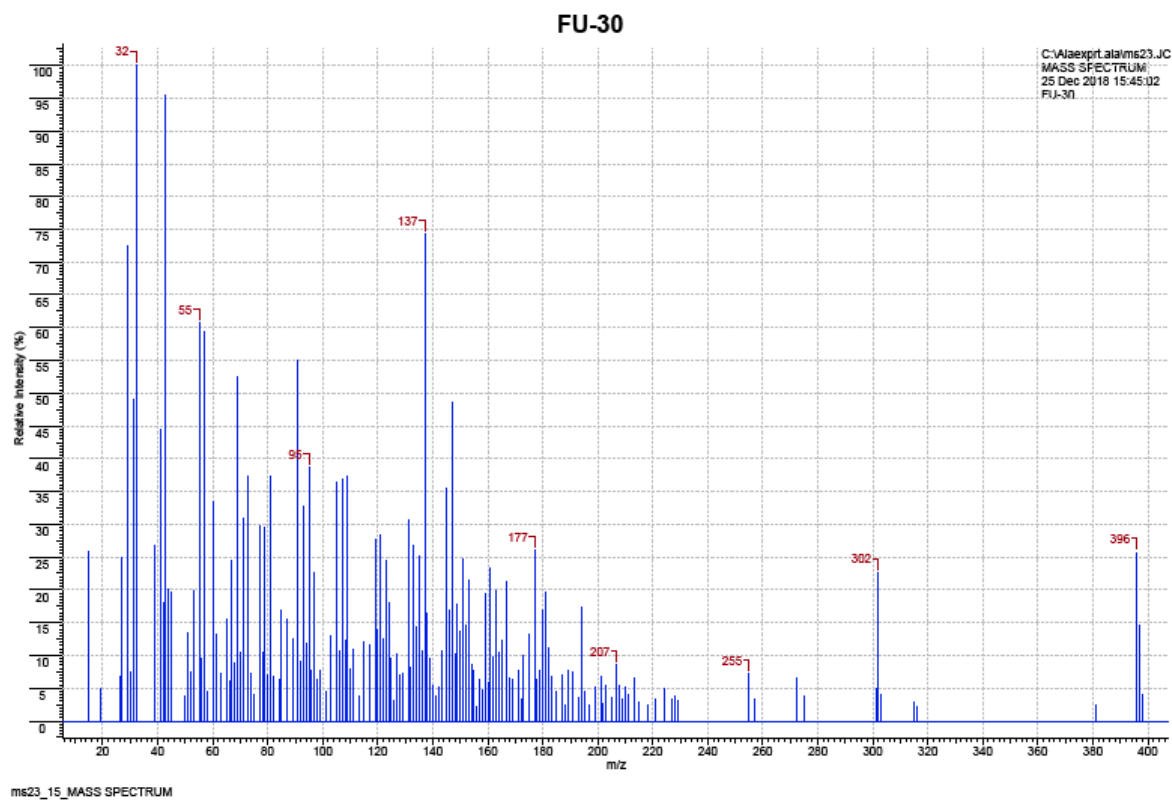


Рисунок 10 – Масс-спектр эргостерина

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

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

_____ **Е.И. САКАНЯН**
«__» _____ 20__ г

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

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

Лабазника вязолистного	ФС 42 –
<i>плоды</i>	<i>Вводится впервые</i>
<i>Filipendula ulmaria fructus</i>	

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

Настоящая фармакопейная статья распространяется на зрелые и высушенные плоды травянистого растения лабазника вязолистного – *Filipendula ulmaria* L. (семейство Розоцветные – *Rosaceae*).

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

Спецификация
лекарственного растительного сырья
«Лабазника вязолистного плоды»

Показатели	Испытуемый метод	Нормируемое значение
1	2	3
Внешние признаки	<i>Просмотр невооруженным глазом и под лупой с увеличением (10х) или стереомикроскопа (8х, 16х, 20х, 40х).</i>	Соответствие морфологическим признакам.
Микроскопия	Просмотр под микроскопом с увеличением (<i>не менее 40х</i>).	Соответствие анатомическим признакам.
Качественные реакции	1. Качественные реакции 2. УФ-спектр	1. Положительная цианидиновая реакция: розовое окрашивание. 2. Соответствует приведенному рисунку.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки.

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

Цельное сырье. Сухие сплюснутые, спирально завернутые вдоль оси многолисточки, расположенные на плодоножках щитковидно-метельчатого соцветия. На одной плодоножке насчитывается до 12-ти листочков.

Цвет листочков зелено-желтый, светлый; при хранении плоды темнеют до светло-бурого цвета. Запах сухих плодов характерный травянистый, слегка пряный. Вкус настоя слабый специфический.

Микроскопические признаки.

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

Цельное сырье.

Анатомически плодоножка переходного типа строения. Очертания поперечного сечения плодоножек округлые, слегка волнистые. Поверхность плодоножек представлено эпидермой (рис. 2). Эпидермальные клетки на поперечном сечении округло-овальной формы, с заметно утолщенными стенками. С поверхности эпидермис слабо кутинизирован, что проявляется по окрашиванию кутикулы в розовый цвет после обработки 0,5% раствором Судана III (рис. 2Б). Под слоем эпидермы расположена 3-4 рядная уголкового колленхима. Её клеточные стенки целлюлозные, характерно утолщенные, без выраженных поровых каналов (рис. 2В). Клетки основной ткани первичной коры значительно крупнее колленхимных, округлой формы, с тонкими клеточными стенками. В толще паренхимы первичной коры локализованы неравномерно расположенные крупные лизигенные вместилища. Оболочки клеток по периферии вместилищ окрашиваются в розовый цвет после обработки 0,5%-м раствором Судана III (рис. 2Б), что говорит о липофильной природе их секрета. Эндодерму первичной коры от основной паренхимы отличают меньшие размеры клеток с более толстыми клеточными стенками (рис. 2). Центральный цилиндр плодоножки представлен совокупностью разноразмерных открытых коллатеральных пучков, расположенных по кольцу (рис. 2А). Со стороны флоэмной части пучки армированы мощным блоком склеренхимных волокон. Значительно утолщенные клеточные стенки волокон лигнифицированы, что подтверждается характерной реакцией с 10-% раствором сернокислого анилина (рис. 2В). Проводящие элементы флоэмы на поперечном сечении мелкоклеточные, их протопласт слабо-пигментирован (рис. 2В).

Ксилема плодоножки выражена слабо, представлена мелкими кольчатыми и спиральными сосудами, расположенными радиальными рядами (рис. 2В). В пучках, в области первичной ксилемы, локализованы полости рексигенного происхождения (рис. 2Г). Сердцевина плодоножки крупноклеточная, её клетки с лигнифицированными оболочками разноразмерные (рис. 2Г).

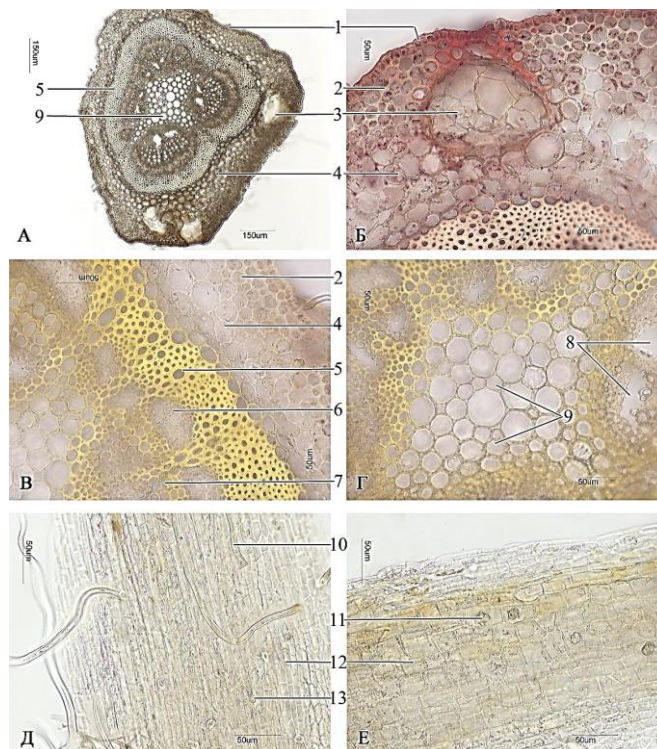


Рисунок 2 – Гистология эпидермиса и поперечных сечений плодоножки плода: А – общий вид до окрашивания (x100); Б – фрагмент поперечного сечения после окраски 0,5 % раствором Судана III (x400); В – фрагмент поперечного сечения после окраски 10%-ным раствором сернокислого анилина (x400); Г – фрагмент паренхимы сердцевины плодоножки (x400), Д – фрагмент эпидермы с волосками (x400), Е – фрагмент эпидермы с включениями (x400).

Обозначения: 1 – эпидерма; 2 – колленхима; 3 – вместилище; 4 – паренхима; 5 – склеренхима; 6 – флоэма; 7 – ксилема, 8 – рексигенная полость; 9 – клетки паренхимы; 10 – одноклеточный волосок; 11 – друзы оксалата кальция; 12 – клетки эпидермы; 13 – место прикрепления волоска.

При рассмотрении эпидермиса плодоножки с поверхности видны вытянутые клетки, угловатые по форме. В клетках изредка встречаются монокристаллы оксалата кальция (рис. 2Е). Эпидермис плодоножки слабо опушен простыми одноклеточными волосками (рис. 2Д).

Эпидермис листовки представлен продолговатыми, неправильной формы клетками. Клеточные стенки извилистые, тонкостенные, плотно прилегающие друг к другу. Устьичные аппараты аномоцитного типа (рис. 4Б). Сквозь эпидермис хорошо просвечиваются большое количество монокристаллов, расположенных в тканях. Изредка на поверхности эпидермиса встречаются простые одноклеточные волоски подобные описанным ранее на плодоножке (рис. 4А).

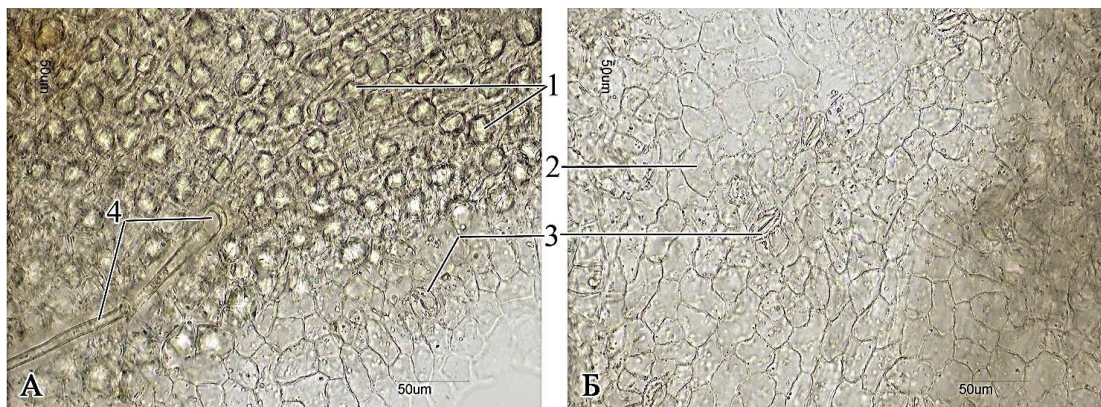


Рисунок 4 – Особенности эпидермиса плодолистика (листовки) (x400): А – фрагмент эпидермы с простыми волосками; Б – фрагмент эпидермы с устьицами.

Обозначения: 1 – друзы оксалата кальция; 2 – клетки эпидермиса; 3 – устьица; 4 – простые одноклеточные волоски.

На поперечном сечении оболочка листовки (перикарпий) состоит из трех блоков тканей. Первый, внешний блок - эпидермальный. На поперечном срезе клетки эпидермы плодолистиков широкопросветные, округлой формы, с целлюлозной оболочкой, незначительно кутинизированной с поверхности (рис. 5Б, Г).

Под эпидермисом расположен блок мезокарпия (рис. 5Б). Паренхима состоит из крупных хлорофиллоносных клеток овально-округлой формы. Клетки имеют слабо утолщенные целлюлозные стенки и аморфный желто-зеленый по цвету протопласт. В клетках мезокарпия изредка встречаются монокристаллы и друзы оксалата кальция (рис. 5А; рис. 5В).

Со стороны шва листовки локализован один крупный коллатеральный пучок конусовидной формы (рис. 5А; рис. 5Б). Ксилема пучка развита слабо. Сосуды ксилемы мелкие, их оболочки лигнифицированы (рис. 5Б). Флоэмная часть пучка крупнее ксилемной, проводящие элементы флоэмы мелкоклеточные, тонкостенные. С периферии флоэмной части пучок значительно армирован группой склеренхимных волокон (рис. 5). Волокна склеренхимы широкопросветные с видимыми остатками протопласта. Клеточные стенки волокон заметно утолщены и лигнифицированы (рис. 5).

Третий внутренний слой – эндокарпий состоит из нескольких слоев склеренхимных волокон «паркетного типа», каждый слой расположен перпендикулярно предыдущему, они окрашиваются в ярко желтый цвет после обработки 10-% раствором сернокислого анилин (рис. 5В). По периферии эндокарпия локализованы многочисленные призматических монокристаллы оксалата кальция (рис. 5В).

На поперечных сечениях плодов лабазника вязолистного заметны элементы зародыша (рис. 7), тело которого округлой или округло-яйцевидной формы достигает в длину до 790 мкм, в ширину до 400 мкм (рис. 7А).

Оболочка семени составлена клетками с бурым протопластом. Основная часть семени – эндосперм представлена крупноклеточной паренхимой; клетки её округлой формы с тонкостенными стенками. В центре семени визуализируется полость на месте выпавшего зародыша (рис. 7Б).

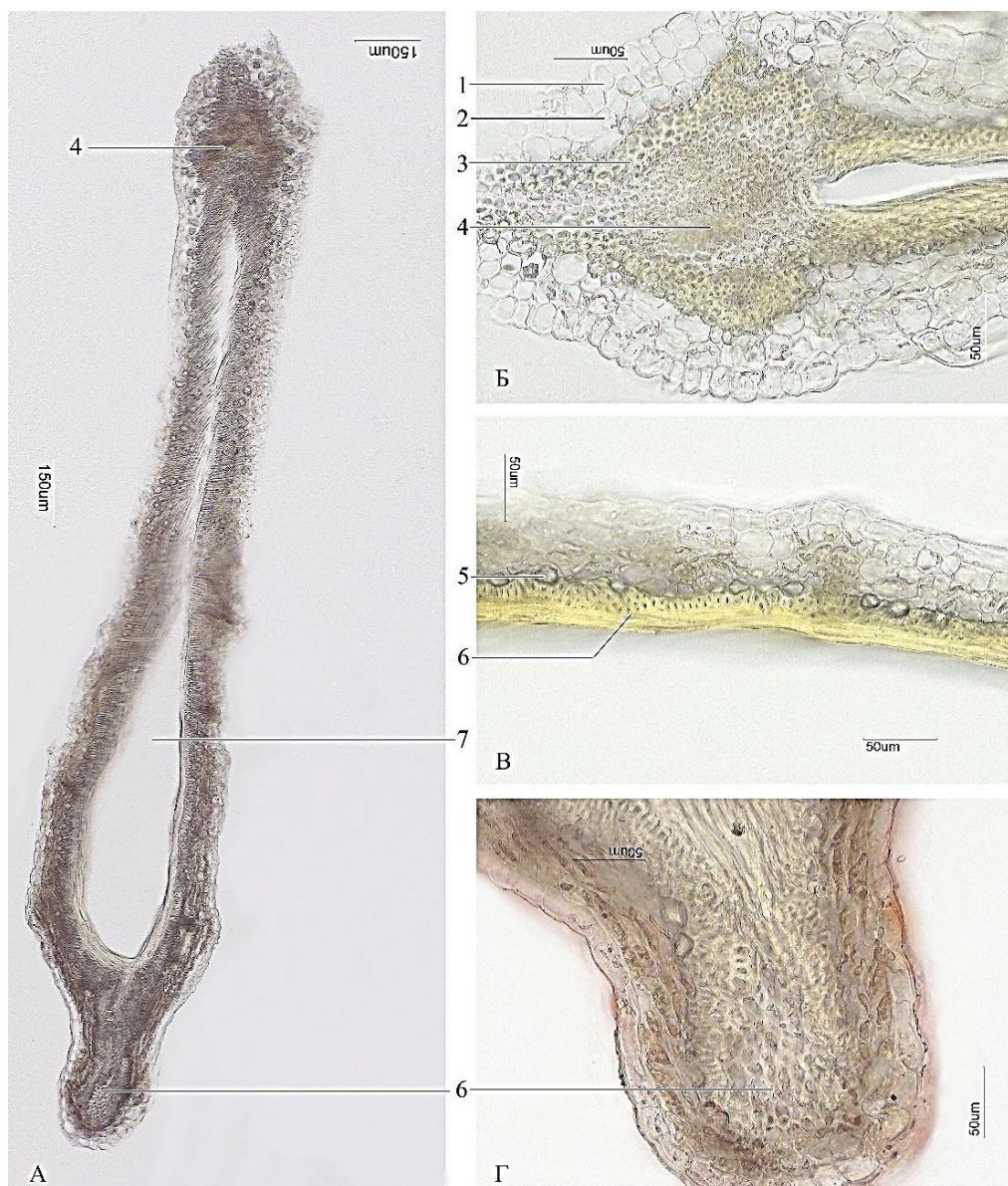


Рисунок 5 – Плодолистик (листовка): А – общий вид на поперечном сечении (x100); Б – жилка листочки на поперечном сечении окрашенная 10%-ным раствором сернокислого анилина (x400); В – фрагмент перикарпия на поперечном сечении окрашенная 10%-ным раствором сернокислого анилина (x400); Г – фрагмент, окрашенный раствором Судана III (x400).

Обозначения: 1 – клетки эпидермиса; 2 – паренхима мезокарпия; 3 – склеренхима; 4 – ксилема; 5 – монокристаллы; 6 – слои склеренхимы эндокарпия; 7 – полость листочки.

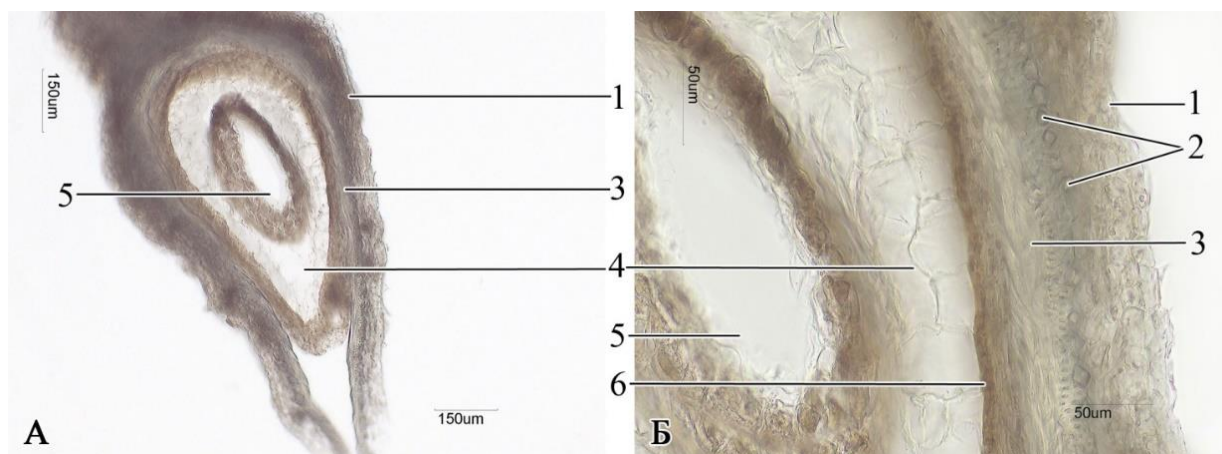


Рисунок 7 – Односемянная листовка с зародышем на поперечном сечении: А – общий вид плода (x100); Б – фрагмент зародыша (x400).

Обозначения: 1 – эпидермис листовки; 2 – монокристаллы; 3 – склеренхима; 4 – клетки эндосперма; 5 – полость, 6 – оболочка семени.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Пробирочные 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. УФ-спектроскопия.

Ультрафиолетовый спектр раствора А (см. раздел «Количественное определение») при использовании реакции комплексообразования с 3% раствором алюминия хлорида в результате батохромного сдвига наблюдается максимум поглощения окрашенного комплекса водно-спиртового извлечения при длине волны 412 ± 2 нм.

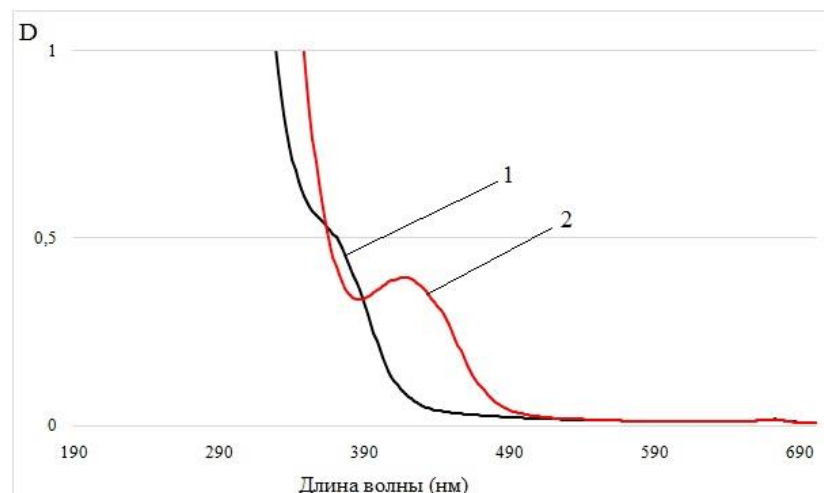


Рисунок 1 – УФ-спектр водно-спиртового извлечения из плодов лабазника вязолистного.

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

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 7%.*

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 5%.*

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

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5%. *Измельченное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 5%. *Порошок:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, не более 5%.

Посторонние примеси

Кусочков листьев и стеблей, остатки цветоносов. *Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1%.*

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

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ XIV, том 2).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ XIV, том 2).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ XIV, том 2).

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ XIV, том 1).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2%.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1,0 г сырья (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70%-ного спирта этилового. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$ г, после чего колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут при комнатной температуре, закрывая той же пробкой, снова взвешивают и добавляют экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу

вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (испытуемый раствор А).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 минут после приготовления.

В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 2 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора 70%-ным спиртом этиловым до метки (раствор сравнения А).

Примечание: *Приготовление раствора ГСО рутина:* Около 0,025 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу на 50 мл, растворяют в 30 мл 70%-ного спирта этилового при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят объем 70%-ным спиртом этиловым до метки (раствор А рутина). 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3%-ного спиртового раствора алюминия хлорида и доводят 95%-ным спиртом этиловым до метки (испытуемый раствор Б рутина). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А рутина, помещенного в мерную колбу на 25 мл и доведенный 95%-ным спиртом этиловым до метки (раствор Б рутина).

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

$$x = \frac{D_x \cdot 50 \cdot 25 \cdot m_0 \cdot 100}{D_0 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot m_x \cdot (100 - W)} \cdot 100\%,$$

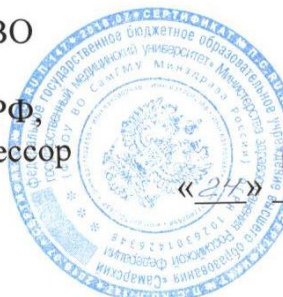
где: D_x – оптическая плотность исследуемого раствора, m_0 – масса ГСО рутина г, D_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутина, m_x – масса исследуемого сырья г, W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

ФС 42-_____ С.12

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ XIV, том 1).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ XIV, том 1).

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



 И.Л. Давыдкин
«24» ЯНВАРЯ 2019 г.

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



В.А. Куркин
«24» ЯНВАРЯ 2019 г.

Доцент кафедры химии
фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
России, кандидат химических наук



С.Х. Шарипова
«24» ЯНВАРЯ 2019 г.

Аспирант кафедры химии
фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
России



К.Н. Сазанова
«24» ЯНВАРЯ 2019 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор  И.Л. Давыдкин« 14 »  2019 г.

АКТ

О внедрении результатов диссертационной работы Сазановой Ксении Николаевны «Химико-фармакогностическое исследование лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

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

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе лабазника вязолистного.

Члены комиссии:

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



А.В. ВОРОНИН

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



Н.В. РАСЦВЕТОВА

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



С.Х. ШАРИПОВА

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

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор  И.Л. Давыдкин« 21 »  2019 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Сазановой Ксении Николаевны «Химико-фармакогностическое исследование лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

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

Внедренные результаты способствуют разработке объективных методик диагностики и определения качества сырья растений рода лабазник и препаратов на основе данных растений.

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.



Е.В. АВДЕЕВА

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



О.Е. ПРАВДИВЦЕВА

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор И.Л. Давыдкин

« 29 »

2019 г.



АКТ

О внедрении результатов диссертационной работы Сазановой Ксении Николаевны «Химико-фармакогностическое исследование лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

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

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

Члены комиссии:

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

С.В. ПЕРВУШКИН

Доцент кафедры
фармацевтической технологии,
к.фарм.н.

Л.Д. КЛИМОВА

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

О.В. БЕР

«Утверждаю»

Проректор по научной и инновационной работе

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,

д.м.н., профессор И.Л. Давыдкин

«30»

2019 г.

АКТ

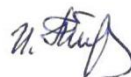
О внедрении результатов диссертационной работы Сазановой Ксении Николаевны «Химико-фармакогностическое исследование лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, д.фарм.н., профессора И.К. Петрухиной, д.фарм.н., профессора Е.П. Гладуновой, к.фарм.н., доцента А.Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Сазановой К.Н., посвященного изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов лабазника вязолистного в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области фармакоэкономических исследований антидепрессантных и диуретических препаратов.

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе плодов лабазника вязолистного и создания конкурентоспособных антидепрессантных лекарственных препаратов, а также препаратов с диуретической активностью.

Члены комиссии:

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



И.К. ПЕТРУХИНА

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



Е.П. ГЛАДУНОВА

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



Е.Л. АБДУЛМАНОВА

«Утверждаю»

Руководитель ГБУЗ

«Центр контроля качества лекарственных
средств Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

2019 г.

**АКТ**

о внедрении результатов диссертационной работы Сазановой Ксении Николаевны «Химико-фармакогностическое исследование лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.)» 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» и.о. руководителя испытательной лаборатории Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Федоровой А.В. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Сазановой К.Н., посвященного фармакогностическому изучению растений рода лабазник 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 рутина. Методики определения подлинности сырья и препаратов плодов лабазника вязолистного, а также методики определения суммы фенольных веществ воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Сазановой Ксении Николаевны будет способствовать повышению объективности стандартизации плодов лабазника вязолистного, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

И.о. руководителя испытательной
лаборатории ГБУЗ «Центр контроля качества
лекарственных средств Самарской области», к. фарм. н.

Л.Е. ЖНЯКИНА

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

Г.И. ВЛАСОВА

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

А.В. ФЕДОРОВА

«Утверждаю»

Генеральный директор
 ЗАО «Самаралектравы»
 Н.Д. ЛУЖНОВ
 1 декабря 2018 г.



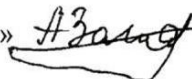
АКТ

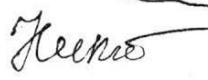
о внедрении результатов диссертационной работы Сазановой Ксении Николаевны «Химико-фармакогностическое исследование лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загорянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Сазановой К.Н., посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик анализа плодов лабазника вязолистного, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья – «Лабазника вязолистного плоды» в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа плодов лабазника вязолистного апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе растений рода лабазник.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»  А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»  А.В. НИКИТЕНКОВ

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